



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho

Papel dos receptores β -adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas em camundongos: modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão

Rio de Janeiro

2014

Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho

Papel dos receptores β -adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas em camundongos: modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C331 Carvalho, Thatiana Luiza de Brito.

Papel dos receptores β -adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas em camundongos: modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão / Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho. – 2014.
58 f.

Orientadora: Bruna Romana de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Pele - Reparos e reconstrução - Teses. 2. Beta adrenoreceptores - Teses. 3. Fibroblastos - Teses. 4. Mastócitos - Teses. 5. Úlcera por pressão - Teses. 6. Traumatismo por Reperfusão - Induzido quimicamente. I. Souza, Bruna Romana de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-003.93:616-002.46

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho

Papel dos receptores β -adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas em camundongos: modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2014.

Orientadora: Prof.^a Dra. Bruna Romana de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Andréa Monte Alto Costa
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marcia Ramos e Silva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me guiou nesta árdua tarefa.

Aos meus pais Eliana Assis de Brito e Marcos Gomes de Carvalho pelo apoio, carinho e compreensão.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo constante.

A minha orientadora Bruna Romana de Souza pela oportunidade, confiança e orientação.

A professora Andréa Monte Alto Costa por ter me apoiado durante este período, pelos conselhos e pela compreensão.

As amigas Adriana, Jeanine, Marcela e Taís pela amizade, conselhos e enriquecimento profissional.

As minhas amigas Bianca, Fernanda e Taiza pela amizade, ajuda nos experimentos e pelo apoio.

Aos amigos do HLA pelo acolhimento e amizade.

A TODOS os membros do Laboratório de Reparo Tecidual pelo companheirismo e enriquecimento profissional.

A Luana e a TODOS os meus amigos da UFRRJ pela amizade, incentivo e apoio.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Edital 024/2010 - Pró-Ensino na Saúde), pela confiança e investimento neste projeto.

Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas.

Luís Fernando Veríssimo

RESUMO

CARVALHO, Thatiana Luiza Assis de Brito. *Papel dos receptores β -adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas em camundongos: modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão*. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Os receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos estão presentes em inúmeras células que participam do processo de reparo como fibroblastos, queratinócitos, células inflamatórias e células endoteliais. Diversos trabalhos demonstram que estes receptores modulam o processo de reparo tecidual. Entretanto, nenhum trabalho demonstrou se o bloqueio destes receptores compromete o reparo de úlceras de pressão. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos no reparo de úlceras de pressão em camundongos, para isto utilizamos um modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão. No presente estudo, utilizamos animais que foram tratados por gavagem com propranolol (um antagonista não seletivo dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos). A administração do antagonista teve início um dia antes do início dos ciclos de isquemia e reperfusão e se manteve diariamente até a eutanásia. Para desenvolver a úlcera de pressão, um par de magnetos foi aplicado no dorso dos animais previamente depilado. O período de permanência do magneto é caracterizado como período de isquemia, enquanto sua retirada é caracterizada como período de reperfusão. Os ciclos de isquemia e reperfusão foram repetidos duas vezes, e ao final do último ciclo, duas úlceras circulares foram criadas no dorso dos animais. Os animais foram mortos 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão. Após o último ciclo de isquemia, o fluxo sanguíneo da área comprimida foi nulo, 7 horas após a compressão o fluxo sanguíneo estava elevado, com níveis superiores ao da pele normal. Após 24 e 48 horas, o fluxo sanguíneo estava reduzido e abaixo dos níveis da pele normal. O bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumentou os níveis de peróxidos lipídicos 3 dias após a lesão, comprometeu a migração dos queratinócitos, levando a um aumento da proliferação epitelial, resultando em uma re-epitelização atrasada. O retardo na formação da neo-epiderme induzido pelo bloqueio destes receptores prejudicou a remoção do tecido necrótico. O bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumentou o número de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), os níveis proteicos de elastase neutrofílica 3 dias após a lesão e reduziu os níveis proteicos de MCP-1 3 dias após a lesão e os níveis proteicos de MMP-12 7 dias após a lesão. O bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumentou a proliferação celular e apoptose no tecido conjuntivo 7 dias após a lesão e aumentou a densidade de vasos sanguíneos 14 e 21 dias após a lesão. O bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos retardou a diferenciação miofibroblástica e reduziu os níveis proteicos de TGF- β 1/2/3 3 dias após a lesão e a contração da lesão. Vinte e um dias após a lesão, o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumentou a espessura da neo-epiderme e a expressão de tenascina-C em fibroblastos e reduziu a deposição de colágeno. Em conclusão, o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos atrasa o reparo tecidual em úlceras de pressão.

Palavras-chave: Lesão cutânea. Reparo tecidual. Receptores β -adrenérgicos. Úlcera de pressão. Isquemia. Reperfusão.

ABSTRACT

CARVALHO, Thatiana Luiza Assis de Brito. *Role of β -adrenergic in mice chronic wound repair: non invasive model induced by ischemia and reperfusion*. 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

β_1 - and β_2 -adrenergic receptors are present in several cells that participate in tissue repair such as fibroblasts, keratinocytes, inflammatory cells and endothelial cells. Several studies demonstrate that these receptors modulate cutaneous wound healing. However, neither study demonstrated if the blockade of these receptors compromises the cutaneous wound healing of pressure ulcers. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of blockade of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors in wound healing of pressure ulcer in mice using a noninvasive model of lesion induced by ischemia and reperfusion. In this study, animals were also treated with propranolol (a nonselective antagonist of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors). Antagonism administration began one day before ischemia-reperfusion cycles and daily maintained until euthanasia. In order to develop a pressure ulcer, a shaved skin was placed between a pair of magnet disks. The period of magnet placement is characterized as ischemia period, whereas release period as reperfusion period. Two cycles of ischemia and reperfusion were performed, and after last cycle, two circular ulcers per animal were created in the animal dorsum. Animals were killed 3, 7, 14 and 21 days after wounding. After last ischemia cycle, blood flow of compressed area was nulled, 7 hours after compressed area underwent reperfusion during subsequent hours reaching blood flow 98% superior of normal skin. After 24 and 48 hours, blood flow of compressed area was again reduced when compared with normal skin. Blockade of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors increased the levels of lipid peroxydes 3 days after wounding, compromised keratinocyte migration leading to an increase epithelial proliferation and impairment in the re-epithelialization. The impairment in the neo-epidermis formation induced by β_1 - and β_2 -adrenergic receptor blockade delayed the necrotic tissue loss. Blockade of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors increased the inflammatory cell number (macrophages and neutrophils), protein levels of neutrophil elastase 3 days after wounding and reduced protein levels of MCP-1 3 days after wounding and protein levels of MMP-12 7 days after wounding. Blockade of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors increased cell proliferation and apoptosis in connective tissue 7 days after wounding and blood vessel density 14 and 21 days after wounding. Blockade of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors impaired myofibroblastic differentiation and reduced protein levels of TGF- β 1/2/3 3 days after wounding and lesion contraction. Twenty-one days after wounding, β_1 - and β_2 -adrenergic receptor blockade increased neo-epidermis thickness and tenascin-C-positive fibroblast number and reduced collagen deposition. In conclusion, blockade of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors delays cutaneous wound healing of pressure ulcers.

Keywords: Cutaneous lesion. Tissue repair. β -Adrenergic receptors. Pressure ulcer. Wound model induced by ischemia and reperfusion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Os três estágios clássicos do processo de reparo cutâneo	14
Figura 2 - Protocolo experimental	22
Figura 3 - Avaliação do modelo de úlcera de pressão	30
Figura 4 - Avaliação da formação da neo-epiderme	31
Figura 5 - Avaliação da resposta neutrofílica	33
Figura 6 - Avaliação da resposta de macrófagos	34
Figura 7 - Análise da formação do tecido de granulação	36
Figura 8 - Avaliação macroscópica	37
Figura 9 - Avaliação da qualidade da cicatriz	38

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	α -actina de músculo liso
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EPM	Erro padrão da média
ERK	Fosforilação da quinase regulada por sinais extracelulares
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FOX	<i>Ferrous Oxidation-Xylenol Orange</i>
IL-1	Interleucina-1
LM-3A32	Cadeia α 3 longa da laminina-332
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MMPs	Metaloproteinases da matriz
NO	Oxido nítrico
NPUAP	<i>National Pressure Ulcer Advisory Panel</i>
PCNA	<i>Anti-proliferating cellular nuclear antigen</i>
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF-4	Fator plaquetário-4
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	20
1.1	Gerais	20
2	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1	Animais	21
2.2	Propranolol e modelo de lesão	21
2.3	Sistema de classificação da úlcera	22
2.4	Fluxometria Laser Doppler	23
2.5	Análises macroscópicas	23
2.6	Coleta do material e análise microscópica	23
2.7	Imunohistoquímica e quantificação	24
2.8	Determinação dos níveis de hidroxiprolina	25
2.9	Tampão de lise e dosagem de proteína	26
2.10	Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos	26
2.11	Western-blotting	27
2.12	Análise estatística	28
2.13	Material didático sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde ..	28
3	RESULTADOS	29
3.1	Avaliação do modelo de úlcera de pressão	29
3.2	Avaliação da formação da neo-epiderme	29
3.3	Avaliação do infiltrado inflamatório	32
3.4	Análise da formação do tecido de granulação	35
3.5	Avaliação da qualidade da cicatriz	37
3.6	Material didático sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde ..	39
4	DISCUSSÃO	42
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE - Produtos 1 e 3 do material didático sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde	56
	ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais	57
	ANEXO B – Aceite do artigo	58

INTRODUÇÃO

Reparo tecidual cutâneo

A pele é o maior e um dos principais órgãos do corpo. Sabe-se que este complexo órgão reveste externamente o corpo, conferindo uma barreira de proteção e exercendo diversas funções protetoras essenciais para o organismo (1). Quando porções da pele são perdidas, então o processo de reparo tecidual se inicia para recompor a área lesada. Este processo é didaticamente dividido em três fases distintas que se sobrepõem: fase inflamatória, proliferativa e de remodelamento (2).

Logo após a lesão se inicia a fase inflamatória, esta é didaticamente dividida em duas fases: a primeira consiste na resposta vascular e na restauração da homeostase e a segunda, é referente à resposta celular e à inflamação propriamente dita (2). Durante a primeira fase, as plaquetas se aderem e agregam no sítio da lesão, e começam a liberar mediadores químicos que iniciam a formação de uma rede de fibrina a partir da clivagem do fibrinogênio (3). Então uma rede altamente solúvel é formada, convertendo o *plug* plaquetário em um coágulo de fibrina, fibronectina, vitronectina e trombospondinas (4, 5).

Imediatamente após a formação do coágulo, se inicia a segunda fase, as plaquetas que formam o coágulo liberam quimioatrativos e fatores de crescimento. A liberação local de interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), fator plaquetário-4 (PF-4) e de produtos do metabolismo bacteriano, atuam como potentes quimioatrativos para os neutrófilos (6). Já no leito da lesão, os neutrófilos fagocitam os restos celulares e teciduais, secretam proteases e eliminam bactérias locais (7). Os neutrófilos são seguidos por monócitos, que se diferenciam em macrófagos quando invadem o tecido (8). Neutrófilos e macrófagos ativados fagocitam partículas estranhas e restos celulares. No local da lesão, os macrófagos liberam fatores quimiotáticos tais como a fibronectina, que atrai os fibroblastos para a lesão (2). Além disto, produzem o TGF- β , que estimula a proliferação, migração e diferenciação de fibroblastos e citocinas pró-inflamatórias para a área lesada, e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que estimula a migração de células inflamatórias para a área lesada (9). Os macrófagos também mediam a angiogênese, fibroplasia, síntese de óxido nítrico (6) e promovem a resolução da inflamação (4). Além dos neutrófilos e dos macrófagos, vários

outros tipos celulares participam da fase celular da inflamação, dentre eles, estão os mastócitos, uma das principais substâncias liberadas pelos mastócitos é a histamina, que promove a dilatação das artérias e aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos (2). Os mastócitos também secretam heparina que aumenta a permeabilidade inicial das vênulas. Além disso, a heparina também atua como anticoagulante, impedindo a coagulação durante a fase inicial da resposta inflamatória (2). Essas sinalizações essenciais para a coordenação do reparo e para estimular a chegada da próxima fase (7).

Subsequente à fase inflamatória tem-se início a fase proliferativa, nesta fase o tecido de granulação substitui o coágulo de fibrina formado na fase inflamatória (7). Os principais eventos durante esta fase são a criação de uma barreira com permeabilidade seletiva (re-epitelização), estabelecimento do suprimento sanguíneo adequado (angiogênese) e síntese de uma matriz rica em fibras do sistema colágeno (fibroplasia) para lesão fornecer a estrutura necessária para a posterior produção de uma nova barreira funcional (2).

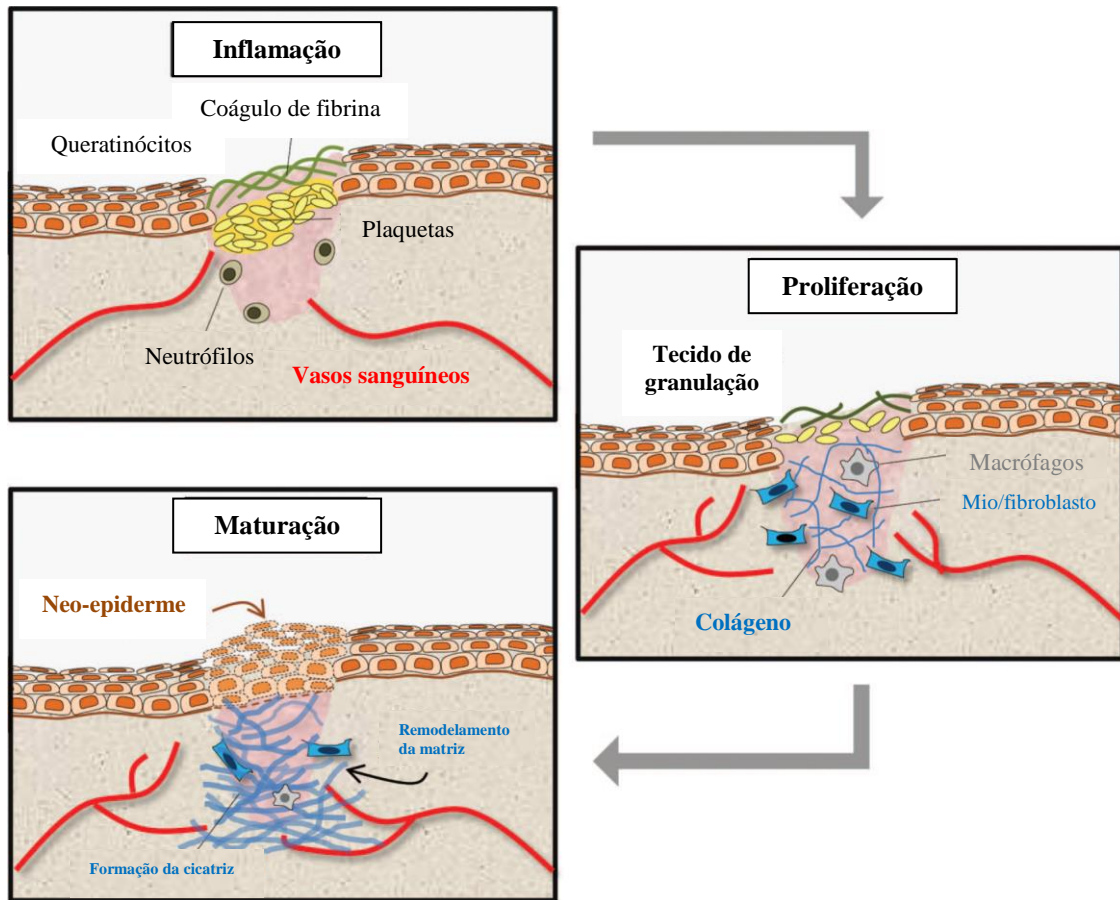
A re-epitelização é o processo de restauração da epiderme após a lesão. Geralmente envolve vários processos, incluindo a migração e proliferação de queratinócitos, diferenciação da neoepiderme em uma epiderme estratificada e restauração da área que conecta a epiderme e a derme subjacente (2). É induzida pelo fator de crescimento epidérmico (EGF) e pelo TNF- α , produzidos pelas plaquetas ativadas e pelos macrófagos (4) Os macrófagos estimulados pelo PDGF e pelo TGF- β_1 , secretam EGF juntamente com as plaquetas o que induz a migração e proliferação de fibroblastos no tecido adjacente à lesão (7).

Com esses estímulos, os próprios fibroblastos passam a sintetizar PDGF e começam a produzir a matriz provisória, que é composta por colágeno do tipo III, glicosaminoglicanos, fibronectina, entre outras proteínas da matriz (6). Este arcabouço forma, um ambiente favorável para a proliferação de células endoteliais, que sob estímulo do TNF- α e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (6), formam novos vasos sanguíneos a partir dos vasos pré-existentes (angiogênese). A formação dos novos vasos sanguíneos sustenta metabolicamente a formação do novo tecido (7). A formação dessa matriz extracelular com fibras colagenosas relativamente desorganizadas, alta densidade de fibroblastos, macrófagos e granulócitos, além do estabelecimento de uma nova rede vascular, formam a base do que chamamos de tecido de granulação (4). O tecido de granulação é a resposta inicial da lesão, consiste em tecido conjuntivo altamente vascularizado que contém novos capilares, fibroblastos e células inflamatórias (10, 11). Os vasos sanguíneos se associam com fibroblastos e macrófagos, substituindo o coágulo de fibrina pelo tecido de granulação, formando um novo substrato para migração de queratinócitos. No início da fase proliferativa,

os fibroblastos, sob ação do TGF- β_1 secretado pelos macrófagos, começam a se diferenciar em miofibroblastos, que são células contráteis que expressam α -actina de músculo liso (α -SMA), que tem a capacidade de aproximar os bordos da lesão (contração) e também auxiliam na deposição de matriz extracelular (12, 13).

Após a re-epitelização completa, se inicia a fase de remodelamento. Nesta fase, os processos ativados após a lesão são reduzidos gradativamente e cessam. A maioria das células endoteliais, macrófagos e fibroblastos/miofibroblastos sofrem apoptose, reduzindo a celularidade do tecido de granulação (1). O tecido de granulação que é rico em colágeno do tipo III é gradualmente substituído por uma cicatriz colagenosa que é composta principalmente por colágeno do tipo I (4, 5), esta substituição é realizada pelas metaloproteinases da matriz (MMPs) que são secretadas pelos fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, devolvendo a força de tensão da pele lesada em até 70% (2). O equilíbrio entre a atividade das MMPs e dos inibidores de MMPs (TIMPs) é muito importante para que ocorra o reparo tecidual normal (2). Entretanto, em algumas ocasiões o processo de reparo não ocorre de forma adequada devido a diversos fatores, que podem levar a formação de lesões que não cicatrizam como as lesões crônicas causando diversos problemas clínicos.

Figura 1 - Os três estágios clássicos do processo de reparo cutâneo



Legenda: inflamação (*acima, esquerda*), proliferação (*direita*) e remodelamento (*abaixo, esquerda*). Durante a inflamação, após a lesão, as plaquetas se agregam a área lesada para formar um coágulo de fibrina para alcançar a homeostase. Bactérias, neutrófilos e plaquetas são abundantes na lesão. A proliferação é caracterizada pela angiogênese, formação do tecido de granulação e re-epitelização. Durante a maturação, o colágeno é remodelado e reorganizado ao longo das linhas de tensão.

Fonte: adaptada de Ko et al. (14).

Lesões crônicas

As lesões crônicas tendem a ocorrer como resultado de fatores locais associados (insuficiência arterial, hipertensão venosa e trauma) e/ou presença de doença sistêmica, tais como diabetes mellitus ou artrite reumatoide (15). As lesões crônicas possuem alguns aspectos característicos, tais como: fase inflamatória prolongada (16), constantes infecções (15), formação de biofilmes microbianos resistentes a medicamentos (17) e incapacidade de células dérmicas e/ou epidérmicas de responder a estímulos reparadores. Estes fenômenos fisiopatológicos fazem com que o processo de reparo seja prejudicado neste tipo de lesão, levando ao atraso da síntese de colágeno, da angiogênese e da re-epitelização (15, 18-21). Entretanto, o mecanismo exato através do qual as lesões crônicas se desenvolvem ainda não foi completamente esclarecido.

Dentre os diferentes tipos de lesão crônica temos a úlcera de pressão. A úlcera de pressão, também chamada de úlcera de decúbito, escara, escara de decúbito, é desenvolvida quando tecidos moles são comprimidos entre uma proeminência óssea e uma superfície externa rígida por um período prolongado causando isquemia e necrose tecidual (22). Geralmente este tipo de úlcera surge em indivíduos forçados à imobilidade e, se concentram nas regiões sacral, glútea, tronco-antérica e no calcanhar. Ela também pode acometer pacientes submetidos a pressões externas exercidas por equipamentos ou dispositivos. O principal mecanismo de ação das úlceras de pressão são os períodos de isquemia e reperfusão que causam um aumento dos radicais livres, de infiltrado inflamatório e de proteases que comprometem a reconstrução dérmica e a síntese de fatores de crescimento levando a necrose tecidual.

A quantidade de casos envolvendo úlceras por pressão tem aumentado nos últimos anos, devido ao aumento da expectativa de vida da população, associada aos avanços da medicina (23-25). A incidência de úlceras por pressão é estimada entre 0,4% a 38% em pacientes internados para atendimento emergencial, e cerca de 25% a 85% dos pacientes com paraplegia crural (26, 27). Pesquisas relatam que mais de 50% dos pacientes com úlceras tem 70 anos de idade ou mais e também relatam uma incidência de 35% de úlceras de pressão com indicação para tratamento cirúrgico (28, 29). No Brasil, poucos estudos vêm sendo realizados a respeito de úlceras de pressão e seu tratamento. Em 2005, Costa e colaboradores observaram que a incidência de úlceras de pressão é de 40% em unidades cirúrgicas, e este número aumenta para acima de 41% em unidades de terapia intensiva (30). Dentre os pacientes, ele

observou que 33% (n=25) apresentaram úlcera sacral, 33% (n=25) úlcera tronco-antérica, 16% (n=12) úlcera isquiática, 5% (n=4) úlcera no joelho, 4% (n=3) úlcera no calcâneo, 3% (n=2) úlceras nos membros inferiores, ombro e região lombar e 1% (n=1) na região torácica e occipital.

Modelos de isquemia e reperfusão

Diversos estudos vêm tentando desvendar o mecanismo através do qual estas úlceras não cicatrizam, para assim desenvolver um tratamento eficaz que promova o reparo destas lesões. A utilização de modelos humanos para estudar as úlceras de pressão é de alto custo e prejudicial ao paciente. Por isso, modelos em animais que mimetizam as úlceras de pressão foram desenvolvidos (31, 32).

Desde a década de 60, pesquisadores vêm desenvolvendo modelos experimentais que visam entender o processo isquêmico em órgãos e tecidos (33). Os primeiros modelos experimentais animais de úlceras por pressão inicialmente visavam observar apenas o papel de isquemia na formação de lesões, utilizando a aplicação de uma pressão constante para criar a lesão, não levando em conta à contribuição do período de reperfusão para a formação da lesão.

Em 1961, Lindan e colaboradores utilizaram duas variáveis para desenvolver a úlcera de pressão: isquemia e tempo de reperfusão aplicando dispositivos mecânicos que desenvolviam diferentes níveis pré-determinados de pressão por diferentes períodos de tempo (33). Como resultado eles observaram níveis e períodos específicos de pressão que auxiliaram na pesquisa sobre de úlceras de pressão (34). Entre as décadas de 70 e 80, diversos modelos experimentais avaliaram o efeito do período da isquemia e do atrito (35, 36), o papel da musculatura esquelética adjacente à pele (37) e os precursores bioquímicos que participavam da formação das úlceras de pressão (38).

As pesquisas sobre lesões crônicas em modelos com animais possibilitaram a comunidade científica a obtenção de dados sobre o fluxo sanguíneo, amostras de histopatologia entre outros (34). Na década de 90, alguns fatores foram integrados aos modelos de estudo de úlcera de pressão como hiperemia reativa, isquemia e reperfusão e algumas variáveis (idade, temperatura, paralisia) (39, 40). A partir destes dados, vários estudos avaliaram os níveis necessários de pressão para desenvolver os diferentes estágios de

úlceras de pressão (41-43). Em 1994 foi desenvolvido um modelo de úlcera de pressão que utiliza uma coluna de deslocamento controlada pelo computador, que produz uma pressão constante. Esta coluna possui um transdutor de força localizado entre dois cilindros de metal. A pressão cutânea é mantida por um motor de passo, controlado por um computador, que com o auxílio de software desloca a coluna para a área desejada. O sinal do transdutor de força é convertido para forma digital, amplificado e registrado. Este sistema de fornecimento de pressão monitorado pelo computador foi desenvolvido com o objetivo de desenvolver de úlceras de pressão no grau II (perda parcial da pele, envolvendo a epiderme, derme ou ambas) (39, 40, 44). Os resultados de Salcido enfatizaram o papel dos radicais livres e da apoptose durante o desenvolvimento de uma úlcera de pressão (39, 40, 44).

Atualmente sabe-se que um dos fatores cruciais para formação das úlceras de pressão é o período de isquemia e reperfusão. Durante o período de isquemia a pressão exercida sobre o tecido não permite que oxigênio e nutrientes cheguem ao tecido. Quando ocorre o período de reperfusão, um grande fluxo de sanguíneo é liberado, aumentando a tensão de oxigênio. Esta alta tensão de oxigênio libera radicais livres no tecido previamente isquêmico, aumentando o dano tecidual produzido pela hipóxia e isquemia (34). Então foi desenvolvido um modelo que utiliza ciclos de isquemia e reperfusão para desenvolver a úlcera de pressão (31). O modelo desenvolvido por Peirce e colaboradores consiste em induzir ciclos de isquemia e reperfusão (31), utilizando parâmetros clinicamente relevantes de pressão e duração, onde o animal não é anestesiado durante os períodos de isquemia e reperfusão. Os ciclos de isquemia e reperfusão são induzidos através da aplicação e remoção de um magneto na região dorsal do animal, onde uma chapa de aço magnético foi implantada. A grande desvantagem encontrada neste modelo é o efeito cirúrgico causado pela implantação da chapa de aço no dorso dos animais.

Em 2004, Standler (32) desenvolveu um simples, reproduzível e não cirúrgico modelo murino de úlcera de pressão através da utilização de magnetos para realizar os períodos de isquemia e reperfusão. Este modelo se mostra eficaz para estudar o papel do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos no reparo tecidual cutâneo de lesões crônicas.

Receptores β -adrenérgicos

Ahlquist (45) foi o primeiro pesquisador a diferenciar farmacologicamente os receptores adrenérgicos em receptores α e β . Alguns anos mais tarde, os receptores adrenérgicos foram subdivididos em α_1 -, α_2 - e β_1 -, β_2 - e β_3 -adrenérgicos através da utilização de agonistas e antagonistas (46-48). Recentemente foi apontada a possível existência de um receptor β_4 -adrenérgico no átrio de humanos e ratos (49).

Os receptores β -adrenérgicos são expressos por vários tipos celulares que participam do processo de reparo cutâneo como fibroblastos, queratinócitos, células inflamatórias e células endoteliais (50-52). Diversos trabalhos demonstram que estes receptores atuam na modulação do processo de reparo cutâneo (53-60). Entretanto, os estudos sobre o papel da administração dos receptores β -adrenérgicos no reparo tecidual cutâneo são controversos. Em fibroblastos cardíacos de ratos e embrionários de murinos, a administração de agonistas β -adrenérgicos estimula a proliferação celular através da ativação da fosfolipase C, da proteína cinase C, e da inibição da adenilato ciclase (51, 61). Vários estudos têm demonstrado que a administração de norepinefrina, um agonista α - e β -adrenérgico, estimula o recrutamento dos macrófagos para a área lesada em pele de camundongos (62-65). Trabalhos utilizando macrófagos isolados de roedores, através de um modelo padrão de esponja subcutânea também demonstraram o recrutamento dos macrófagos (53).

A expressão dos receptores β -adrenérgicos pelos queratinócitos foi demonstrada nas décadas de 70 e 80 (66, 67). Inicialmente, a utilização de um agonista β -adrenérgico inibe a migração de queratinócitos estimulada através de EGF ou cálcio (68). Além disso, a diferenciação e proliferação de queratinócitos humanos dependem de um gradiente de cálcio que é regulado por receptores β -adrenérgicos (69). Outros trabalhos também demonstram que a utilização de antagonistas β -adrenérgicos acelera a re-epitelização e aumenta a taxa de migração dos queratinócitos, mas não altera a proliferação dos queratinócitos (70).

O efeito dos antagonistas β -adrenérgicos no reparo de córneas é controverso. Alguns estudos *in vivo* sugerem que antagonistas β -adrenérgicos retardam o reparo de lesões no epitélio de córneas de macacos e coelhos (71-73). Enquanto outros estudos demonstram que estes antagonistas aceleram o fechamento de lesões nos córneas de bovinos e coelhos (54, 74). O bloqueio de receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos prejudica a contração e a re-epitelização de lesões excisionais cutâneas, aumenta a espessura da neo-epiderme e compromete a deposição de fibras do sistema colágeno em ratos (56, 75). No entanto, sabe-se que níveis

elevados de catecolaminas podem prejudicar a cicatrização cutânea em pacientes hiperglicêmicos, com queimaduras de 3º grau e estressados (55, 57, 76). Em modelo com roedores foi demonstrado que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos promove o reparo de lesões excisionais cutâneas em animais hiperglicêmicos, severamente queimados ou cronicamente estressados (55, 57, 59, 77). Também foi demonstrado que o bloqueio do receptor β_2 -adrenérgico promove a angiogênese, migração dos fibroblastos dérmicos *in vivo* e *in vitro*, a migração dos queratinócitos, a re-epitelização e não tem efeito na inflamação da lesão (78). Entretanto, nenhum estudo demonstrou se o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos altera o processo de reparo de em lesões crônicas.

Tendo em vista que o papel do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos no processo de reparo tecidual em lesões crônicas ainda não foi elucidado, e levando em consideração que pesquisas realizadas no Laboratório de Reparo Tecidual demonstram como o bloqueio dos receptores β - adrenérgicos atua em animais com lesões excisionais cutâneas (agudas). Nós nos propusemos a investigar o efeito dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas enfocando no modelo animal de lesão por isquemia e reperfusão que mimetiza as úlceras de pressão.

1 OBJETIVOS

1.1 Gerais

Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos no reparo de úlceras de pressão utilizando um modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusão em camundongos.

Além de desenvolver material didático sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde, levando aos alunos de graduação de forma simples e interativa, o que acontece na pele quando esta sofre uma lesão, e como o organismo age para cicatrizar a mesma (Edital nº 024/2010 - Pró-ensino na Saúde).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

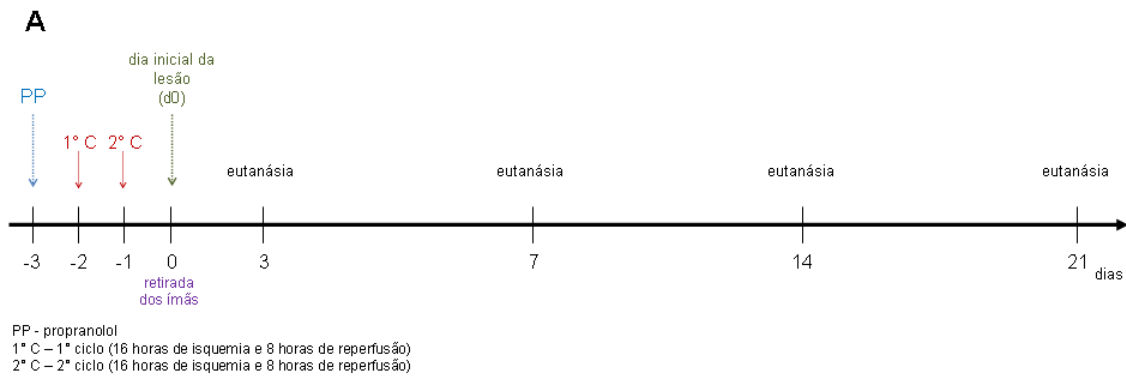
Camundongos machos Swiss (8-12 semanas de idade) foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle e tratado (n=10; por grupo). Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram condicionados em uma sala com temperatura controlada (22°C) em um ciclo de luz com 12 horas claro/escuro. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética para o uso de animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/049/2012) (Anexo).

2.2 Propranolol e modelo de lesão

Os animais foram tratados diariamente com 25 mg/kg de cloridrato de propranolol, um antagonista dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos não seletivo (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, Estados Unidos), dissolvido em água filtrada por gavagem (77). O grupo controle recebeu apenas água filtrada no mesmo volume da droga no grupo tratado. A administração de propranolol ou água filtrada se manteve diariamente até a eutanásia.

Um dia após o início da administração do antagonista, os camundongos foram intraperitonealmente anestesiados com quetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg). A pele do dorso dos animais foi depilada, pinçada e presa entre um par de magnetos com 8 mm de diâmetro e 4 mm de espessura, com um peso médio de 1,47 g e força magnética de 300G (Eudes Angelo de Almeida Produtos ME, São Paulo, Brasil). Os magnetos foram posicionados a dois centímetros de distância do osso occipital na linha mediana. Assim, a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo foram submetidos à força de compressão de 50 mmHg. Os animais permaneceram com os magnetos durante 16 horas (período de isquemia). Em seguida, os magnetos foram removidos e os animais permaneceram sem os magnetos por oito horas (período de reperfusão) (Figura 2). O ciclo de isquemia e reperfusão foi repetido duas vezes e após o último ciclo duas úlceras circulares foram observadas no dorso dos animais e este período foi considerado o dia 0.

Figura 2 – Protocolo experimental



Legenda: (A) Modelo experimental utilizado no projeto. (B) Aplicação dos magnetos no modelo de lesão por isquemia e reperfusão.

2.3 Sistema de classificação da úlcera

O estágio da úlcera formada foi avaliado seguindo o sistema *National Pressure Ulcer Advisory Panel* (NPUAP) (79). Neste sistema, as úlceras de pressão são classificadas como: Grau I – lesão superficial, a pele permanece intacta. Grau II – ocorre a perda parcial da pele, envolvendo a epiderme, derme ou ambas. Grau III – ocorre a perda total da pele, envolvendo dano no tecido subcutâneo. Grau IV – ocorre a perda total da pele com extensa destruição do tecido subjacente (80).

2.4 Fluxometria Laser Doppler

O fluxo sanguíneo cutâneo da área comprimida e da área não comprimida abaixo da lesão foram medidos logo após o segundo ciclo de isquemia e reperfusão e após 7, 24 e 48 horas através de fluxometria Laser Doppler (PeriFlux System 5000; Perimed Inc., Estocolmo, Suécia).

2.5 Análises macroscópicas

A área da lesão foi medida após o último ciclo (d0), três, sete, quatorze e vinte e um dias de lesão. Para medir a área da lesão, uma folha de papel celofane transparente foi aplicada sobre as lesões e suas margens foram desenhadas com o auxílio de uma caneta permanente (81). As áreas lesadas re-epitelizadas foram medidas 7, 14 e 21 dias após a lesão. Após a digitalização, as áreas lesadas foram medidas através do programa ImageJ (National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, Estados Unidos). Os dados da contração são expressos como porcentagem da área inicial lesada ou porcentagem de área lesada re-epitelizada.

2.6 Coleta do material e análise microscópica

Os animais (n=10; por grupo) foram mortos 3, 7, 14 ou 21 dias após a lesão por exposição ao gás carbônico. As lesões com pele sã adjacente foram devidamente removidas. Uma das lesões foi fixada em formol e embebida em parafina, enquanto a outra (sem pele sã adjacente) foi congelada a -80°C para análises bioquímicas. Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação do aspecto geral da lesão e para medir a espessura e o comprimento da neo-epiderme. Para a realização das medidas, imagens da língua migratória e da neo-epiderme (três imagens aleatórias) foram capturadas utilizando o microscópio de luz (microscópio Axiolab; Zeiss-Vision, Oberkochen, Alemanha). O comprimento da língua migratória foi medido da borda da lesão até a sua ponta, para isto todo o comprimento da

língua migratória foi delimitado e medido com o auxílio do programa ImageJ (82). A espessura da neo-epiderme foi definida como sendo a distância (em μm) da camada granulosa até a camada basal (56), e as medidas foram realizadas através do programa ImageJ a neo-epiderme foi medida em três pontos distintos em cada imagem.

Os cortes também foram corados com vermelho de picrossírius e observados com microscopia de luz polarizada para avaliar a organização das fibras do sistema colágeno.

2.7 Imunohistoquímica e quantificação

Para quantificação do número de macrófagos, neutrófilos, de células em apoptose e positivas para tenascina-C, os cortes foram respectivamente incubados com anticorpos rato anti-F4/80 (Serotec Inc., Raleigh, NC, Estados Unidos, 1:500), rato anti-mieloperoxidase (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Hercules, CA, Estados Unidos, 1:500), anti-caspase-3 clivada (Cell Signaling Technology Inc.; Boston, MA, Estados Unidos, 1:200) e anti-tenascina-C (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Hercules, CA, Estados Unidos 1:50). Para recuperação antigênica os cortes foram imersos em tampão citrato a 70°C (pH 6,0) e para inibir a peroxidase endógena os cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 3% diluído metanol. Após a lavagem, o anticorpo primário foi detectado utilizando anticorpos secundários biotinizados anti-rato (1:800), anti-coelho (1:500) ou anti-cabra (1:1.000) (DAKO, Carpinteria, CA, Estados Unidos) seguida pela incubação com estreptavidina (DAKO). A diaminobenzidina (DAKO) foi utilizada como cromógeno e os cortes foram contrastados com hematoxilina.

Para quantificar o número de macrófagos, neutrófilos, células em apoptose e positivas para tenascina-C, 5 campos aleatórios por animal ($14.544 \mu\text{m}^2$) foram avaliados no tecido de granulação utilizando a objetiva de 40x e um sistema de videomicroscopia (microscópio Axiolab, Zeiss-Vision, Oberkochen, Alemanha; câmera TecVoz; Sony Corporation, Tóquio, Japão; monitor CCE 14" LCD, Manaus, Brasil). Os dados foram apresentados como quantidade de células por mm^2 .

Para quantificação de miofibroblastos e antígeno celular de células em proliferação, algumas alterações na técnica padrão de imunohistoquímica foram realizadas para permitir o uso de anticorpos monoclonais de camundongos. Os cortes foram incubados com o Sistema EnVision (DAKO, 1:60) por 50 minutos. Em seguida para inibir a peroxidase endógena os

cortes foram incubados com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol por 30 minutos. Após a lavagem, os cortes foram incubados em uma solução com anticorpo monoclonal anti- α -SMA (1:600) (Sigma-Aldrich) ou anti-*proliferating cellular nuclear antigen* (PCNA) (1:800) (DAKO) e Sistema Envision anti-mouse (1:20) (DAKO) em PBS/BSA 1% de um dia para o outro. Diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno, os cortes foram contrastados com hematoxilina. Controles negativos foram realizados substituindo o anticorpo primário por PBS/BSA a 1% e nenhuma marcação foi observada.

A densidade de volume de miofibroblastos positivos para α -SMA e de vasos sanguíneos (cortes corados com hematoxilina-eosina) foi estimada através da contagem de pontos. Para isto, dez campos aleatórios por animal foram analisados utilizando um sistema de videomicroscopia (microscópio Axiolab, Zeiss-Vision; câmera TecVoz; Sony Corporation; monitor CCE 14" LCD) e um sistema-teste com 16 pontos (83). A densidade de volume (V_v) mede a ocupação relativa da área-teste pela área das imagens da estrutura que está sendo avaliada (84). Os resultados foram expressos como densidade de volume dos miofibroblastos ($V_{v[\text{miofibroblastos}]} \%$) e dos vasos sanguíneos ($V_{v[\text{vasos sanguíneos}]} \%$).

A proliferação celular foi quantificada na neo-epiderme e no tecido de granulação. Na neo-epiderme, a percentagem de queratinócitos basais positivos para PCNA foi calculada através da contagem de 120 células (60 em cada lado da neo-epiderme), onde estas células foram diferenciadas como positivas ou negativas a partir da margem da língua migratória até a sua extremidade. No tecido de granulação, 5 campos aleatórios por animal ($14.544 \mu\text{m}^2$) foram avaliados no tecido de granulação utilizando a objetiva de 40x e um sistema de videomicroscopia (microscópio Axiolab, Zeiss-Vision; câmera TecVoz; Sony Corporation; monitor CCE 14" LCD). Os dados foram apresentados como quantidade de células por mm^2 .

Todas as análises foram realizadas sem a identificação do material e repetidas duas vezes sem que fosse observada qualquer diferença significativa entre as medidas.

2.8 Determinação dos níveis de hidroxiprolina

A deposição de colágeno na área lesada foi quantificada pelo ensaio de hidroxiprolina no tecido congelado (85). As amostras (4-30 mg) foram desidratadas com acetona 100 % por 48 horas, os lipídeos foram removidos com uma mistura de álcool etílico 100% e clorofórmio (2:1) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Em seguida, as amostras foram secas a 60°C durante 1

hora. As amostras secas e livres de lipídios foram hidrolisadas com 6 mol/l de ácido clorídrico a 6N por 18 horas a 118°C em tubos de ensaio selados. Os hidrolisados foram diluídos em água destilada, neutralizados com 6 mol/l de hidróxido de sódio a 6N. Os níveis de hidroxiprolina foram medidos nesses hidrolisados (85). Para dosar os níveis de hidroxiprolina nos hidrolisados, alíquotas (80 µl) foram misturadas com 40 µl de cloramina-T a 0,05 M (Merck, Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos) e incubadas por 20 minutos a 25°C. Em seguida, 40 µl de ácido perclórico a 3,17 M (Vetec), e 40 µl de 4-dimetilaminobenzaldeído a 4% (Merck) foram adicionados e as placas foram novamente incubadas durante 20 minutos a 60°C. A placa foi lida em espectrofotômetro a 550 nm. As concentrações de L-hidroxiprolina foram determinadas a partir de uma curva padrão com diferentes concentrações de L-4-hidroxiprolina (Sigma-Aldrich). Todas as análises foram realizadas em triplicata e repetidas, e nenhuma diferença significativa foi observada entre as amostras. Os dados foram expressos como ng de hidroxiprolina por mg de tecido seco.

2.9 Tampão de lise e dosagem de proteína

Para realizar as análises bioquímicas, as amostras foram maceradas em 900 µl tampão de lise (Tris-HCl a 20 mM, glicerol 10%, Triton X a 1%, leupeptina a 10 µg/ml, ácido etilenodiamino tetra-acético a 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila a 1mM, cloreto de sódio a 1,5 mM e água destilada) (Sigma-Aldrich). A concentração total de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinônico utilizando as instruções do fabricante (Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, Estados Unidos).

2.10 Determinação dos níveis de hidroperóxidos lipídicos

Os níveis de peróxidos lipídicos foram medidos através do método de *Ferrous Oxidation-Xylenol Orange* (FOX) (86, 87). Este método quantifica a formação de peróxidos durante a peroxidação lipídica, baseia-se no princípio que os peróxidos oxidam em pH baixo o Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) a Fe^{3+} , e por sua vez este íon se liga ao corante xilenol laranja

formando um complexo de cor laranja (86). Uma alíquota (90 μ l) de cada lisado foi misturada a 10 μ l de butiidroxitolueno e centrifugada a 5.000 g por 5 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada por 2 horas com uma mistura de contendo 100 μ L de alaranjado de xilenol (1 mM) (Sigma-Aldrich), 250 μ l de sulfato ferroso (1 mM) (Sigma-Aldrich), 25 mM de ácido sulfúrico e metanol (Vetec) a 90% à temperatura ambiente (protegido da luz). As misturas foram lidas em 560 nm através de um espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol de peróxidos lipídicos por μ g de proteína total.

2.11 *Western-blotting*

A expressão proteica da MMP-12, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), elastase neutrofílica e TGF- β 1/2/3 latente foram detectadas através de *western-blotting*. As proteínas contidas em 20 μ g de cada lisado foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio 10% ou 12% e em seguida transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno. O padrão de peso molecular (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos) foi incluído. As membranas foram bloqueadas com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich) ou com leite desnatado em pó (Nestlé Ind. Com. Ltda., São Paulo, Brasil) a 5% e posteriormente incubadas de um dia para o outro com os anticorpos primários anti-MMP-12, anti-MCP-1, anti-elastase neutrofílica e anti-TGF- β 1/2/3 latente (Santa Cruz Biotechnology, 1:200) a 4°C. As membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários apropriados conjugados à peroxidase (DAKO) por uma hora. Os anticorpos ligados foram detectados através de um conjunto de elementos de quimioluminescência (Thermo Scientific, Rockford, IL, Estados Unidos). Os anticorpos ligados as membranas foram removidos através da incubação com um tampão de *stripping* contendo β -mercaptoetanol e as membranas foram novamente incubadas com anticorpo anti- β -actina (Sigma-Aldrich, 1:1.000) para o controle de aplicação das amostras. A densitometria foi realizada pelo programa Adobe Photoshop versão CS3 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, Estados Unidos).

2.12 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os resultados de proliferação epitelial, número de células positivas para PCNA no tecido conjuntivo, *western-blotting*, retração da lesão, re-epitelização, espessura da epiderme, neutrófilos positivos para mieloperoxidase, macrófagos positivos para F4/80, densidade de miofibroblastos e de vasos sanguíneos, fibroblastos positivos para tenascina-C, células em apoptose foram analisados utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os resultados de comprimento da língua migratória, dias para perda do tecido necrótico e níveis de hidroxiprolina foram analisados utilizando o teste paramétrico *t* de Student com correção de Welch. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prisma versão 4.00 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, Estados Unidos).

2.13 Material didático sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde

Para a divulgação do processo de reparo cutâneo para Ensino na Saúde foram desenvolvidos os seguintes produtos utilizando os programas PowerPoint e Adobe Captivate 6:

Produto 1: Animação demonstrando o processo de reparo cutâneo com tempo de duração de 1 a 2 minutos.

Produto 2: Relação de perguntas com respostas sobre cicatrização cutânea para o público em geral.

Produto 3: Aula interativa sobre reparo cutâneo para cursos de graduação à distância, presencial e/ou semipresencial.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação do modelo de úlcera de pressão

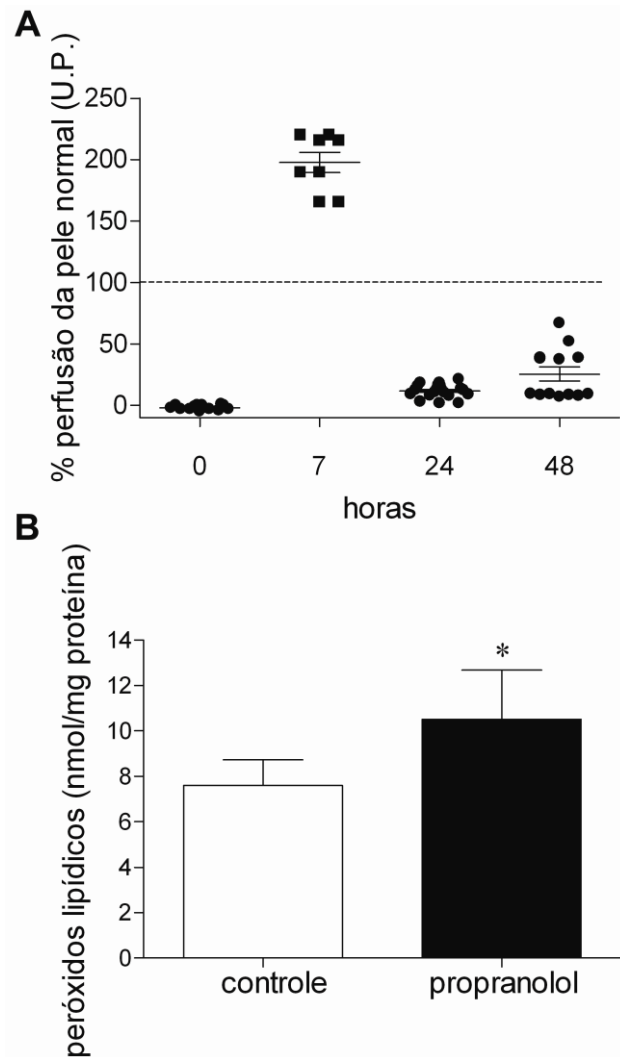
Para determinar a eficiência do modelo de lesão por isquemia e reperfusão, o fluxo sanguíneo da pele comprimida foi medido. O fluxo sanguíneo cutâneo na área comprimida foi nulo logo após a retirada dos ímãs, confirmando assim o período de isquemia. Após sete horas, o fluxo sanguíneo estava elevado, com níveis superiores ao da pele normal indicando o período de reperfusão. No entanto, 24 horas e 48 horas após a remoção dos ímãs, o fluxo sanguíneo estava reduzido novamente, ficando abaixo do nível da pele normal indicando que a perda da reperfusão do tecido induzida pela lesão (Figura 3A).

Para avaliar o efeito do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos no dano oxidativo, os níveis de peróxidos lipídicos foram medidos na área lesada. Os níveis de peróxidos lipídicos estavam maiores no grupo tratado com propranolol quando comparado ao grupo controle três dias após a lesão (Figura 3B).

3.2 Avaliação da formação da neo-epiderme

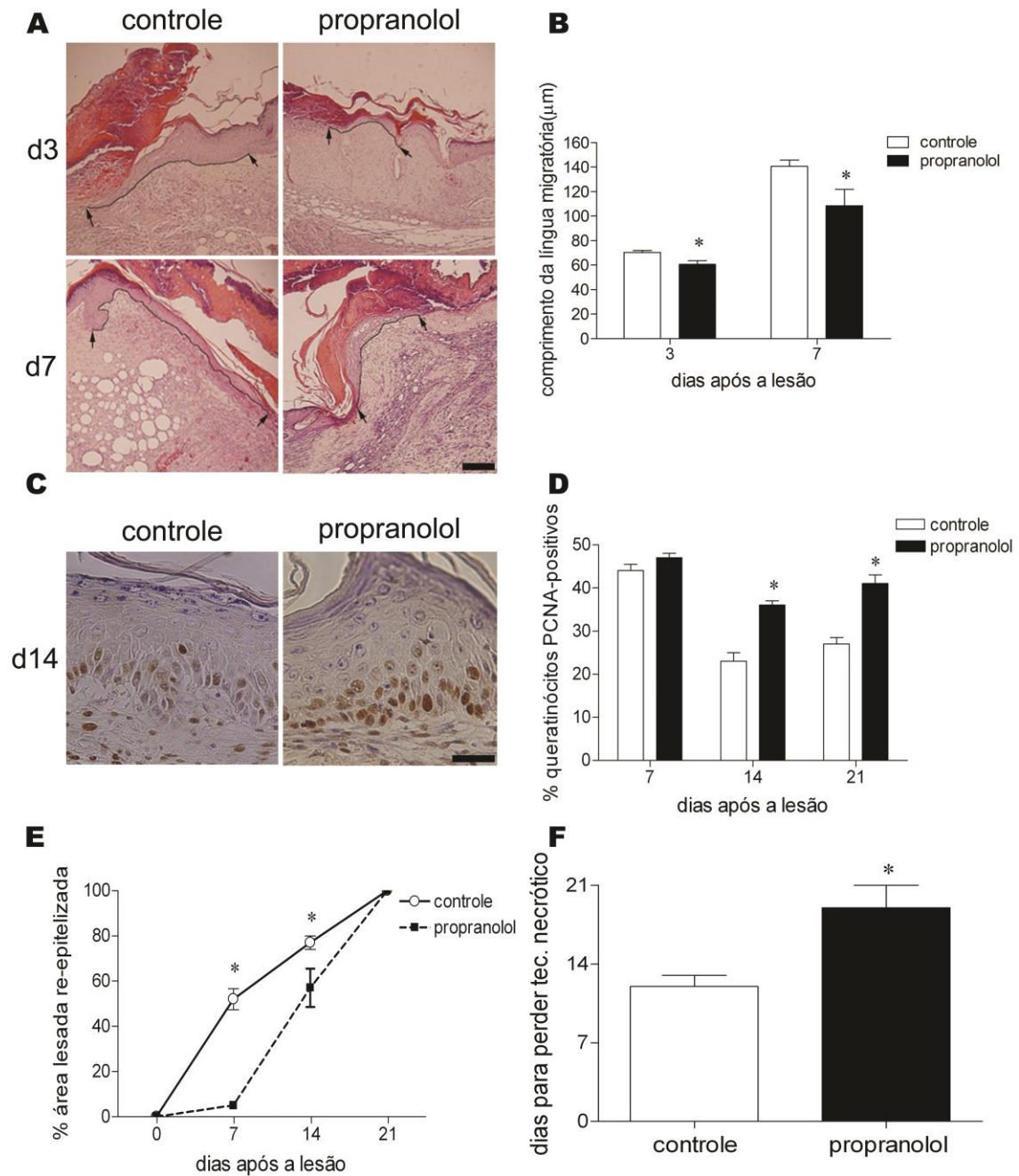
O comprimento da língua migratória foi menor no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 3 e 7 dias após a lesão (Figura 4A e B). A percentagem de queratinócitos positivos para PCNA foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 14 e 21 dias após a lesão (Figura 4C e D). O grupo tratado propranolol apresentou uma menor percentagem de área lesada coberta pela neo-epiderme 7, 14 e 21 dias após a lesão (Figura 4E). O período total de dias para a perda do tecido necrótico foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle (Figura 4F).

Figura 3 – Avaliação do modelo de úlcera de pressão



Legenda: (A) Medidas do fluxo sanguíneo cutâneo na área comprimida logo após ao último ciclo de isquemia e reperfusão e 7, 24 e 48 horas após. Valores apresentados em unidade de perfusão (U.P.) e normalizadas com a pele normal. (B) Níveis de peróxidos lipídicos na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 3 dias após a lesão. Média±EPM. * $p < 0,05$ comparando com o grupo controle.

Figura 4 - Avaliação da formação da neo-epiderme



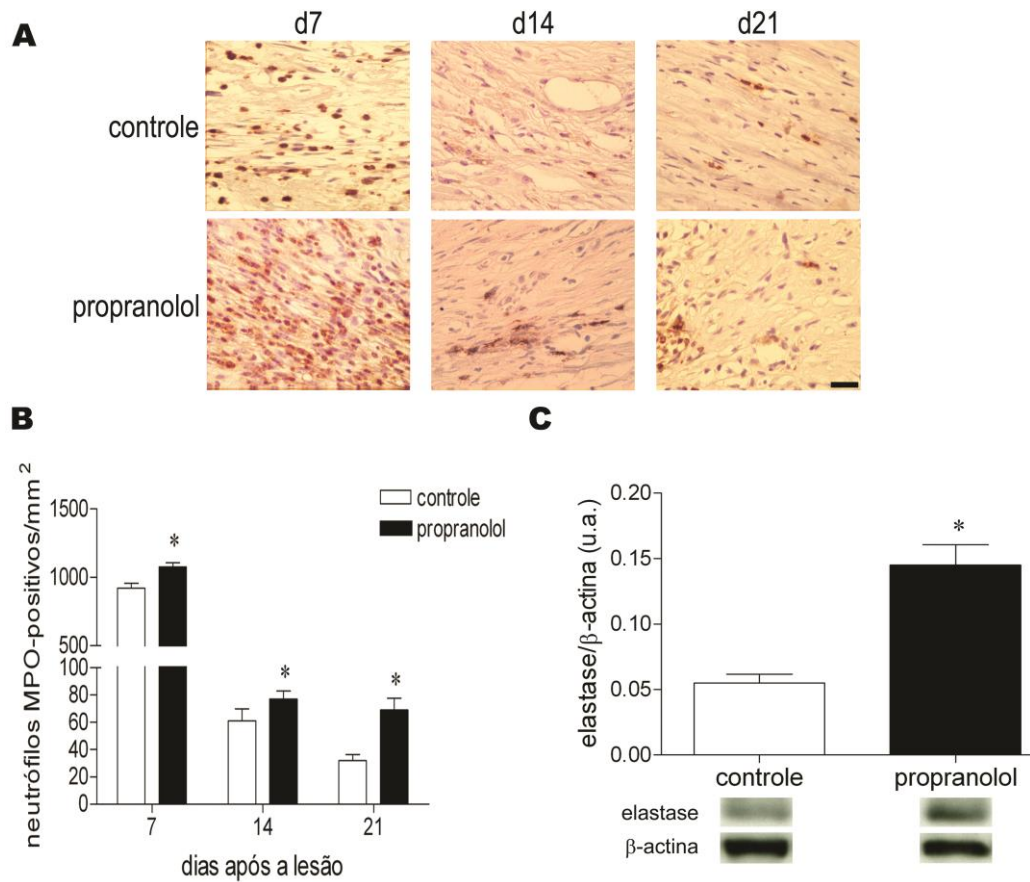
Legenda: (A) Imagens representativas da língua migratória dos grupos controle e tratado com propranolol 3 (d3) e 7 (d7) dias após a lesão. A linha preta e as setas demarcam o tamanho da língua migratória. Hematoxilina-eosina. (B) Medição do comprimento da língua migratória nos grupos controle e tratado com propranolol 3 e 7 dias após a lesão. (C) Imagens representativas dos queratinócitos positivos para PCNA 14 dias (d14) após a lesão. (D) Porcentagem de queratinócitos positivos para PCNA nos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (E) Porcentagem de área lesada re-epitelizada nos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (F) Período em dias para a perda do tecido necrótico nos grupos controle e tratado com propranolol. Média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparando com o grupo controle. Barra=30 μm .

3.3 Avaliação do infiltrado inflamatório

Para avaliar como o do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos atuam na resposta inflamatória das úlceras de pressão, a mobilização e ativação de neutrófilos e macrófagos foram analisadas. O número de neutrófilos positivos para mieloperoxidase foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 7, 14 e 21 dias após a lesão (Figura 5A e B). Os níveis proteicos de elastase neutrofílica foram maiores no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 3 dias após a lesão (Figura 5C).

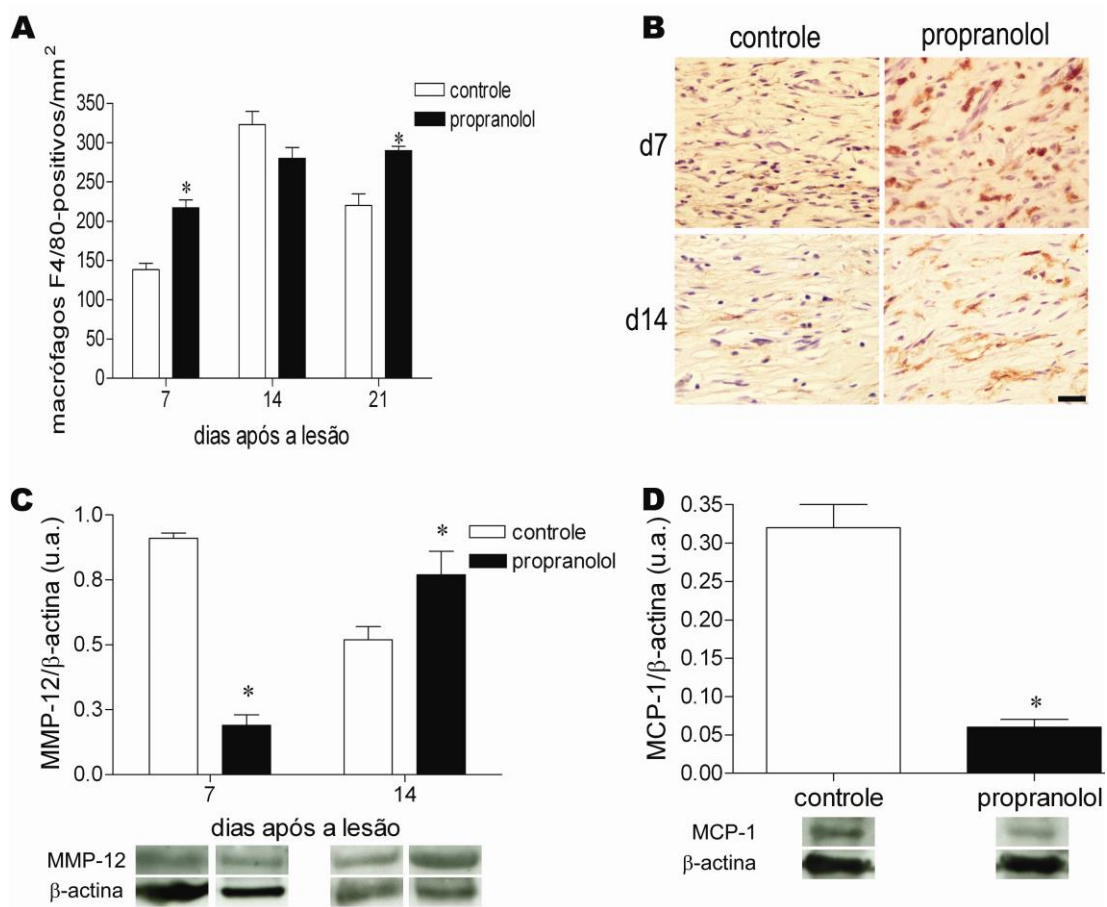
O número de macrófagos positivos para F4/80 foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 7 e 21 dias após a lesão (Figura 6A e B). Além disso, o número de macrófagos no grupo controle aumentou de 7 para 14 dias após a lesão e sofreu uma redução de 14 para 21 dias após a lesão, enquanto no grupo tratado com propranolol foi observado um aumento constante 7, 14 e 21 dias após a lesão (Figura 6A). Foi observado que os níveis de MMP-12 estavam menores no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 7 dias após a lesão, porém eles estavam maiores 14 dias após a lesão (Figura 6C). Os níveis de MCP-1 foram menores no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 3 dias após a lesão (Figura 6D).

Figura 5 – Avaliação da resposta neutrofílica



Legenda: (A) Imagens da marcação para neutrófilos positivos para mieloperoxidase (MPO) nos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (B) Quantificação do número de neutrófilos positivos para mieloperoxidase na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (C) Níveis proteicos de elastase neutrofílica na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 3 dias após a lesão. Densitometria é expressa em unidades arbitrárias (u.a.). Média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparando com o grupo controle. Barra=30 μ m

Figura 6 – Avaliação da resposta de macrófagos

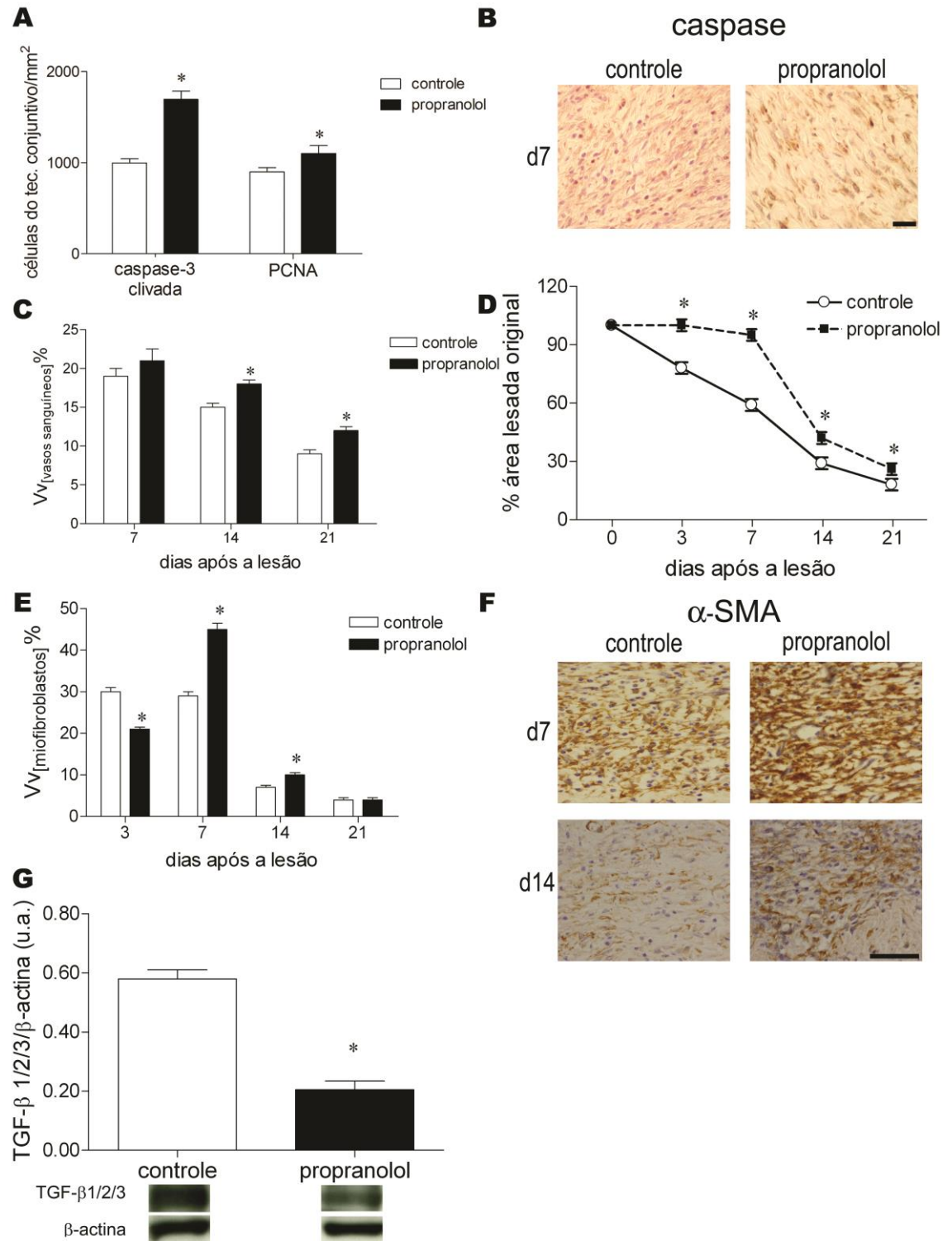


Legenda: (A) Quantificação do número de macrófagos positivos para F4/80 na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (B) Imagens da marcação para macrófagos positivos para F4/80 nos grupos controle e tratado com propranolol 7 e 14 dias após a lesão nos grupos estudados. (C) Níveis proteicos de metaloproteinases da matriz-12 (MMP-12) na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7 e 14 dias após a lesão. (D) Níveis proteicos da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 3 dias após a lesão. Densitometria é expressa em unidades arbitrárias (u.a.). Média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparando com o grupo controle. Barra=30 μ m.

3.4 Análise da formação do tecido de granulação

O número de células do tecido conjuntivo em proliferação e apoptose foi maior no grupo tratado com propranolol do que no controle 7 dias após a lesão (Figura 7A). O grupo controle apresentou um número similar de células em proliferação e apoptose 7 dias após a lesão (Figura 7A). No entanto, o grupo tratado com propranolol apresentou um maior número de células em apoptose do que células em proliferação (Figura 7A). Imagens representativas mostram que o número células caspase-3 clivada positivas no tecido conjuntivo é maior no grupo tratado com propranolol quando comparado ao grupo controle sete dias após a lesão (Figura 7B). A densidade de vasos sanguíneos foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 14 e 21 dias após a lesão (Figura 7C). A porcentagem da área lesada original foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 3, 7, 14 e 21 dias após a lesão quando comparado ao grupo controle (Figura 7D). A densidade de miofibroblastos estava menor no grupo tratado com propranolol 3 dias após a lesão, mas maior 7 e 14 dias após a lesão quando comparado ao grupo controle (Figura 7E e F). Os níveis proteicos de TGF- β 1/2/3 latente estavam menores no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 3 dias após a lesão (Figura 7G). O fechamento da lesão pode ser acompanhado através de fotografias das áreas lesadas obtidas após o último ciclo de isquemia e reperfusão (dia 0) e 7, 14 e 21 após (Figura 8A). Vinte e um dia após a lesão, as úlceras estavam completamente fechadas nos grupos estudados (Figura 8A).

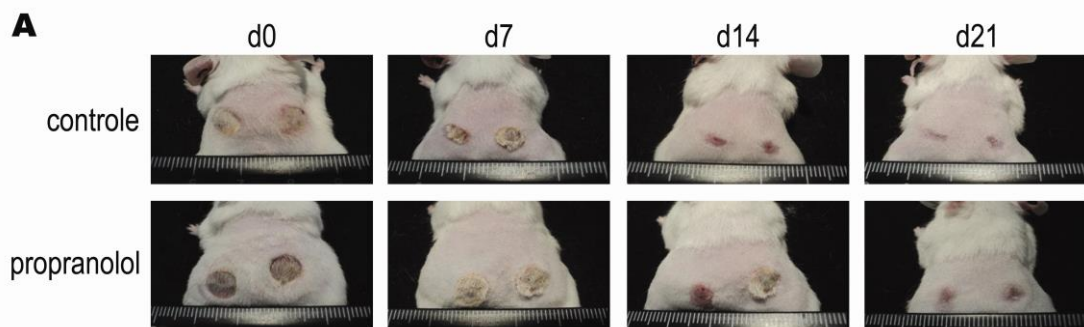
Figura 7 – Análise da formação do tecido de granulação



Legenda: (A) Quantificação do número de células no tecido conjuntivo positivas para caspase-3 clivada e para *proliferating cellular nuclear antigen* (PCNA) na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7 dias após a lesão. (B) Imagens representativas da marcação para caspase-3 clivada na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7 dias (d7) após a lesão. (C) Densidade de volume (Vv) de vasos sanguíneos na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (D) Porcentagem de área lesada original nos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (E) Densidade de volume (Vv) de miofibroblastos na área lesada dos grupos controle e

tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. (F) Imagens representativas da marcação para miofibroblastos positivos para α -actina de músculo liso na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7 e 14 dias após a lesão. (G) Níveis proteicos do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) 1/2/3 latente na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 7, 14 e 21 dias após a lesão. Densitometria é expressa em unidades arbitrárias (u.a.). Média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparando com o grupo controle.

Figura 8 - Avaliação macroscópica

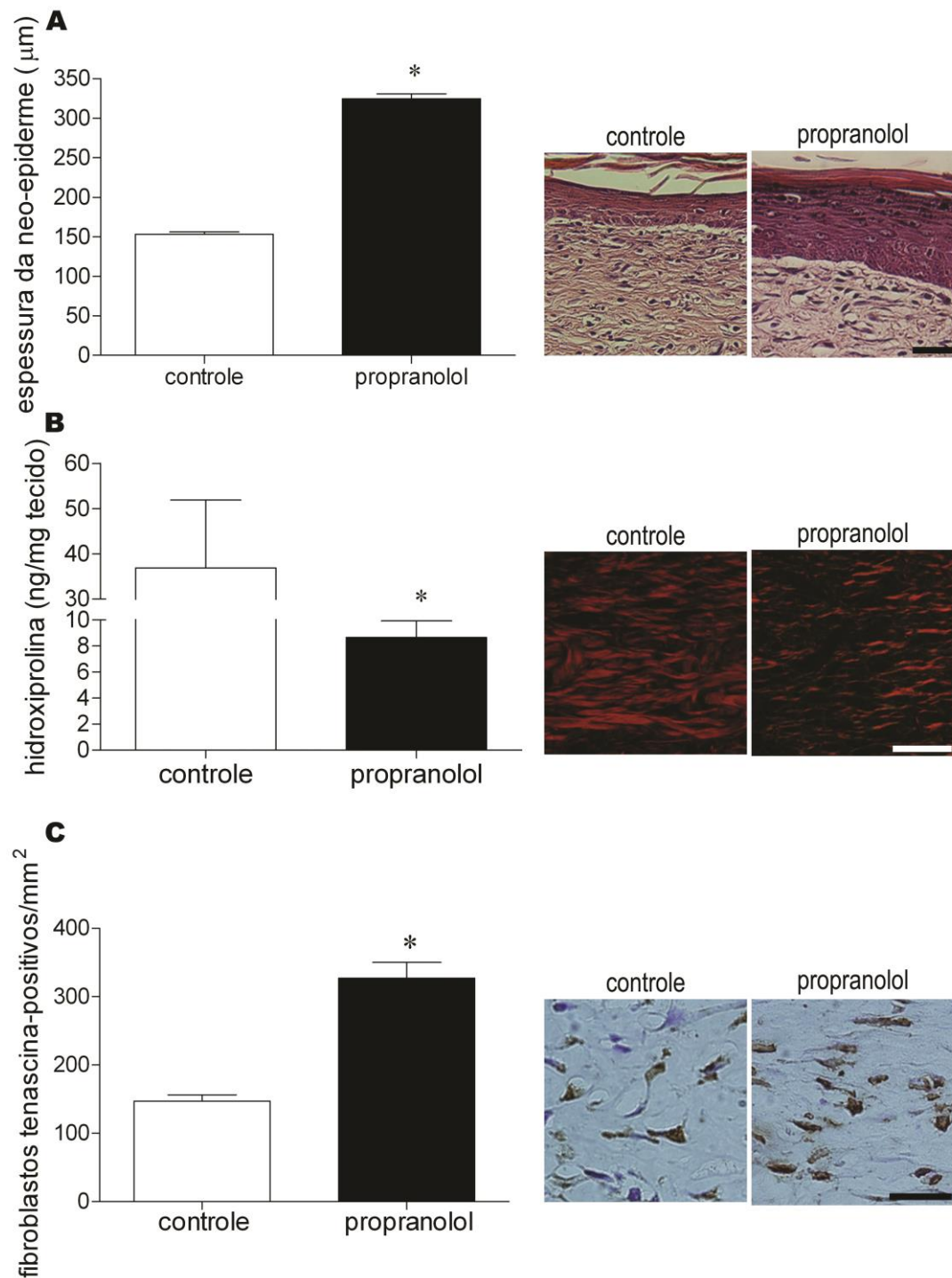


Legenda: (A) Imagens representativas das áreas lesadas após o último ciclo de isquemia e reperfusão 0 (d0), 7 (d7), 14 (d14) e 21 (d21) dias após a lesão.

3.5 Avaliação da qualidade da cicatriz

A espessura da neo-epiderme foi maior no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 21 dias após a lesão (Figura 9A). As fibras colágenas estavam amarelo-avermelhadas, curtas, finas, organizadas paralelamente à superfície, no grupo tratado com propranolol 21 dias após a lesão (Figura 9B). No grupo controle, as fibras colágenas estavam vermelho-brilhantes, longas, espessas e organizadas perpendicular e paralelamente à superfície (Figura 9B). Estas observações histológicas indicam que a deposição de colágeno estava reduzida no grupo tratado com propranolol quando comparado ao grupo controle. Para confirmar esta observação os níveis de hidroxiprolina foram dosados na área lesada. Os níveis de hidroxiprolina estavam menores no grupo tratado com propranolol do que no grupo controle 21 dias após a lesão (Figura 9B). O grupo tratado com propranolol apresentou uma elevada expressão de fibroblastos positivos para tenascina-C quando comparado ao grupo controle (Figura 9C).

Figura 9 - Avaliação da qualidade da cicatriz



Legenda: (A) Medição da espessura da neo-epiderme na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 21 dias após a lesão. Hematoxilina-eosina. (C) Níveis de hidroxiprolina na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 21 dias após a lesão. Imagens representativas coradas com vermelho de picosírius mostram que as fibras colágenas estavam amarelo-avermelhadas, curtas, finas, organizadas paralelamente a superfície, indicando uma reduzida deposição de colágeno no grupo tratado com propranolol, enquanto o grupo controle apresentou vermelho-brilhantes, alongadas, espessas e organizadas perpendicular e paralelamente à superfície. (D) Número de fibroblastos positivos para tenascina-C na área lesada dos grupos controle e tratado com propranolol 21 dias após a lesão. Média \pm EPM. * $p < 0,05$ comparando com o grupo controle. Barra = 20 μm (A) e 50 μm (B e C).

3.6 Material didático sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde

Produto 1: Animação visando demonstrar de forma simples e interativa como ocorre o processo de reparo cutâneo para os alunos do Ensino Médio (disponível no APÊNDICE, f. 56 e no endereço eletrônico: <http://www.lrt.uerj.br/>).

Produto 2: Perguntas e respostas relacionadas a curiosidades e mitos sobre o processo de reparo cutâneo (disponível no endereço eletrônico: <http://www.lrt.uerj.br/>).

O que saber sobre a cicatrização da pele

1- Limpar o machucado com água oxigenada evita infecções e ajuda na cicatrização?

R: Sim. A água oxigenada é um bom desinfetante, pois mata eficazmente os microorganismos. Entretanto, a água oxigenada pode atrapalhar a cicatrização, pois pode matar também as células que participam do processo de cicatrização inicial.

2- É correto aplicar manteiga na queimadura?

R: Não. A aplicação da manteiga pode agravar a lesão. O tratamento inicial deve ser feito com água corrente em grandes quantidades, salvo nos casos de queimadura química. Após lavar o local, a pessoa deve procurar um hospital para que um médico possa avaliar a ferida e tratá-la adequadamente.

3- Cobrir as feridas com curativo ou deixá-las expostas ao ar faz diferença na cicatrização?

R: Sim. Quando cobrimos a ferida com um curativo esta fica úmida e isto altera o fechamento da lesão. Entretanto, ao cobrirmos a lesão com um curativo reduzimos o seu contato com microorganismos.

4- É bom chupar a ferida após a lesão?

R: Não, pois a boca está cheia de bactérias aumentando assim o risco de infecção.

5- O que é a larva-terapia?

R: A larvo-terapia é indicada no tratamento de feridas com formação tecido necrótico (p. ex., lesões crônicas). As larvas aplicadas diretamente sobre o leito da ferida digerem o tecido necrótico e secretam substâncias que promovem a cicatrização. A larva de mosca medicinal deve ser estéril e originária de criadouros especializados, não disponíveis no Brasil (Opletalová K, Blaizot X, Mourgeon B, Chêne Y, Creveuil C, Combemale P, Laplaud AL, Sohyer-Lebreuilly I, Dompmartin A. Maggot therapy for wound debridement: a randomized multicenter trial. Arch Dermatol. 2012 Apr;148(4):432-8.)

6- É correto tirar a crosta (“casquinha”) da ferida a fim de evitar a formação da cicatriz?

R: Não, porque ao retirar a “casquinha” abre-se novamente a ferida retardando a cicatrização e promovendo a formação de cicatriz.

7- Passar pasta de dente na queimadura é bom?

R: Não. A pasta de dente possui componentes que atrapalham a cicatrização.

8- Por que as feridas coçam durante a cicatrização?

R: Após a resposta inflamatória inicial há a migração para a lesão de células chamadas de mastócitos e estes liberam substâncias que auxiliam a cicatrização, mas que causam coceira.

9- Uma alimentação deficiente em proteína faz com que a cicatrização ocorra de forma mais lenta?

R: Sim. Pacientes com deficiência protéica podem apresentar uma cicatrização retardada, pois a síntese de proteínas que ocorre durante a cicatrização é prejudica.

10- A babosa (Aloe vera) tem poder cicatrizante?

R: Diversas páginas na Web sugerem a aplicação de extratos de babosa (Aloe vera) para promover a cicatrização de queimaduras ou cortes. Trabalhos científicos em cobaias sugerem que a Aloe vera aplicada sobre as lesões como creme ou gel pode melhorar a cicatrização, mas não há estudos em humanos (Dat AD, Poon F, Pham KB, Doust J. Aloe vera for treating acute and chronic wounds. Cochrane Database Syst Rev. 2012 Feb 15;2:CD008762.)

11- A aplicação de própolis melhora a cicatrização da pele?

R: Trabalhos científicos em cobaias sugerem que o própolis aplicado sobre as lesões (como queimaduras e lesões na mucosa oral) pode melhorar a cicatrização, mas não há estudos em humanos (Pessolato AG, Martins Ddos S, Ambrósio CE, Mançanares CA, de Carvalho AF. Propolis and amnion reepithelialise second-degree burns in rats. Burns. 2011 Nov;37(7):1192-201.)

12- Passar uma queimadura no cabelo alivia a dor?

R: Não. Não se deve passar a área queimada sobre o cabelo, pois aumenta o risco de infecção.

Produto 3: Aula *on-line* sobre reparo cutâneo para cursos de graduação à distância (disponível no APÊNDICE, f. 56 e no endereço eletrônico: <http://www.lrt.uerj.br/>).

4 DISCUSSÃO

Estudos realizados em camundongos com lesões excisionais e/ou estressados (56, 76), apresentaram resultados semelhantes aos encontrados em camundongos com úlceras de pressão, onde foi observado que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos em camundongos levou a formação de uma maior área de lesão, assim como uma menor área re-epitelizada e um atraso na fase inflamatória. Também foi observada uma maior densidade de vasos sanguíneos em ambos os trabalhos (56).

No presente estudo foi utilizado um modelo de lesão reproduzível e controlado baseado no mecanismo de lesão por isquemia e reperfusão em animais não anestesiados (31, 32). Após sete horas, o fluxo sanguíneo estava elevado, com níveis superiores ao da pele normal. No entanto, 24 horas e 48 horas após a isquemia, o fluxo sanguíneo estava reduzido novamente, ficando abaixo do nível da pele normal indicando o início da necrose tecidual. Peirce e colaboradores (31), observaram que a aplicação do ímã por 2 horas reduziu 20% do fluxo sanguíneo quando comparado ao fluxo da pele normal. Quando um tecido tem seu fornecimento de sangue interrompido durante um período significativo, o tecido tende a reduzir seu metabolismo para preservar sua função (88). Estudos apontam que os períodos de isquemia-reperfusão levam a um aumento excessivo da tensão de oxigênio no tecido (89) que consequentemente resulta em uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) levando ao dano oxidativo (90). Os níveis de peroxidação lipídica podem ser utilizados como um indicativo do envolvimento de radicais de oxigênio nos mecanismos moleculares deste tipo de lesão (31, 91). Através do aumento dos níveis de peróxidos lipídicos observamos que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumenta a peroxidação lipídica que pode ter contribuído para o aumento da necrose tecidual.

A proliferação celular é um evento essencial durante a re-epitelização, os queratinócitos proliferam de modo a assegurar um fornecimento adequado de células para migrar e cobrir a área que sofreu a lesão (2). Os queratinócitos possuem um maquinário enzimático para a produção de catecolaminas (70, 92). A migração dos queratinócitos foi estimada através do comprimento da língua migratória. Nosso estudo demonstrou que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumenta a proliferação epitelial e atrasa a re-epitelização. Estudos em pacientes com lesão diabética também demonstraram um aumento na proliferação e uma redução na migração de queratinócitos (93). A redução na migração de queratinócitos pode ter sido ocasionada pelo fato dos queratinócitos não conseguirem

sustentar a produção da cadeia $\alpha 3$ longa da laminina-332 (LM-3A32), ou porque a LM-3A32 é clivada por proteases (93). No entanto, estudos *in vitro* demonstram que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumenta a migração celular em cultura de queratinócitos humanos (59, 70), e em células epiteliais da córnea através de um aumento na fosforilação da quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (54, 94-98). Estudos anteriores demonstraram que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos promoveu a re-epitelização em ratos com queimaduras de 3º grau (57) e em lesões excisionais cutâneas em ratos hiperglicêmicos (55). Ambos os trabalhos propõem que a ativação do receptor β_3 -adrenérgico estimula a síntese do óxido nítrico melhorando a re-epitelização (55, 57). Outros trabalhos demonstram que a ativação dos receptores β_2 -adrenérgicos compromete a re-epitelização (99). Em ratos, o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumenta a proliferação de queratinócitos, assim como reduz a re-epitelização de lesões excisionais totais (56). Além disso, a aplicação tópica de timolol (um bloqueador dos receptores β -adrenérgicos não seletivo) compromete o reparo de lesões em córneas de coelhos (73, 100). Nossos resultados mostram que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos retarda a re-epitelização, e provavelmente este atraso compromete a remoção do tecido necrótico, comprometendo o desenvolvimento das outras fases do processo de reparo.

Uma característica do microambiente das úlceras de pressão é o elevado número de neutrófilos, macrófagos e de suas proteases. Este aumento causa uma destruição maciça dos componentes da matriz extracelular e de fatores de crescimento comprometendo o fechamento destas lesões (101). Estudos demonstram que neutrófilos (102) e macrófagos (103) expressam receptores β_2 -adrenérgicos (104), e também que o MCP-1 pode ser um fator crítico no recrutamento macrófagos e na inflamação durante os ciclos de isquemia e reperfusão (105). Em nosso estudo observamos que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos promoveu a formação de um ambiente proteolítico através dos neutrófilos. Estudos realizados mostram que o exsudato de lesões crônicas contém elastase neutrofílica, que é capaz de hidrolisar PDGF e TGF- β (106). Estes parâmetros podem, em parte, explicar o conceito que as úlceras de pressão reduzem os níveis de fatores de crescimento (107). Além disto, o infiltrado de neutrófilos altamente ativos encontrados nas úlceras de pressão está relacionado com a dissociação da matriz extracelular, que pode resultar na destruição da matriz e na redução da deposição de colágeno (108). Também observamos o comprometimento da mobilização dos macrófagos para a área lesada e uma reduzida expressão proteica de MCP-1 durante os períodos iniciais do processo de reparo tecidual o que pode ter contribuído para o prolongamento da fase inflamatória. Corroborando com estes dados pesquisas demonstraram

que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos prolonga a resposta inflamatória nos animais resultando em um consequente atraso nas fases do reparo tecidual (56, 75). Estudos relatam o aumento da infiltração de neutrófilos e macrófagos, uma acentuada expressão de citocinas pró-inflamatórias e síntese do óxido nítrico induzido durante os ciclos de isquemia e reperfusão, além de um aumento nos níveis de MCP-1 no primeiro dia da indução dos ciclos de isquemia e reperfusão (105). Outros estudos mostram que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos em lesões agudas de animais com queimaduras de 3° grau e hiperglicêmicos, pode reduzir a resposta inflamatória local e consequentemente acelerar o desenvolvimento das fases subsequentes do reparo tecidual (55, 57). O efeito positivo do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos em animais hiperglicêmicos pode ser explicado através da estimulação da síntese de NO (55). Em animais estressados com lesão aguda o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos reverte os efeitos prejudiciais do estresse sobre a resposta inflamatória e síntese do TNF- α , melhorando o processo de reparo tecidual (77). Entretanto, pesquisas mostram que a administração sistêmica de agonistas β -adrenérgicos possui efeito positivo sobre a resposta inflamatória, reduzindo a tendência de o indivíduo desenvolver uma úlcera venosa (109).

A reconstrução da derme é caracterizada pela formação do tecido de granulação, e tem como principais etapas, a angiogênese, proliferação celular e fechamento da lesão (2). Neste estudo foi observado que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos elevou os níveis de proliferação celular no tecido de granulação, possivelmente este aumento pode ser uma resposta ao aumento da apoptose no tecido de granulação. O bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos comprometeu a contração e aumentou a angiogênese, provavelmente esta redução da contração ocorreu porque houve uma redução dos níveis proteicos de TGF- β 1/2/3 latente indicando que a diferenciação miofibroblástica foi comprometida. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (56), onde foi observado que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos reduz a contração da lesão e retarda a diferenciação miofibroblástica (75). Além disto, estudos apontam que altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias estimulam a permanência de altos níveis de proteases que destroem fatores de crescimento (como o TGF- β_1) e a MEC, levando a uma contração da lesão reduzida (110-112). Em contrapartida o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos acelera o processo de contração da lesão em ratos com queimaduras de 3° grau e em ratos hiperglicêmicos (55, 57). E este efeito benéfico do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos pode estar relacionado com o aumento da síntese de óxido nítrico (NO). Corroborando com os achados do presente estudo, Souza (56) e colaboradores observaram que em ratos o bloqueio dos receptores β_1 - e

β_2 -adrenérgicos aumentou a quantidade de vasos sanguíneos. E essa alteração pode ser explicada através da interação entre mastócitos e angiogênese, esta interação pode ser estimulada através da síntese do NO que pode levar a um comprometimento na formação do tecido de granulação. Observamos em nosso trabalho que em lesões crônicas o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumenta a densidade de vasos sanguíneos, demonstrando assim uma modulação positiva da angiogênese. Em contrapartida alguns estudos demonstram que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos aumentou a angiogênese em ratos com queimaduras de 3° grau e em ratos hiperglicêmicos (55, 57).

Após o fechamento da lesão, o tecido de granulação, que é rico em colágeno do tipo III e vasos sanguíneos, é progressivamente substituído por uma cicatriz rica em colágeno do tipo I com poucos vasos sanguíneos (2). Neste experimento observamos que apesar do bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos retardar a contração e re-epitelização, 21 dias após a lesão a área apresentava-se completamente re-epitelizada. Porém o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos induziu a formação de uma neo-epiderme mais espessa, o que poderia ser um indicativo que os queratinócitos ainda estavam em proliferação. Foi observada também uma reduzida deposição de colágeno. Dentre os componentes da matriz extracelular presente na derme, glicoproteínas como a tenascina desenvolve um importante papel no reparo tecidual (113). Trabalhos mostram que nas primeiras fases do reparo tecidual e durante a formação do tecido de granulação ocorre um aumento na expressão de tenascina, enquanto que no final da re-epitelização esta expressão diminui (113, 114). No processo de reparo tecidual, após a re-epitelização ocorre a redução da celularidade (115). Em nosso trabalho foi observada uma alta expressão de fibroblastos expressando tenascina-C, indicando que ocorreu um comprometimento na redução da celularidade. Estes achados indicam que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos comprometeu a formação da cicatriz. Corroborando com nossos dados Romana-Souza (75) e colaboradores observaram que animais tratados com propranolol ou atenolol apresentam fibras colágenas desorganizadas e imaturas, aumento da densidade de vasos sanguíneos e reduzidos níveis de MMP-2, e sugerem que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos compromete o desenvolvimento do tecido de granulação, retardando a ativação da MMP-9 e MMP-2 e o remodelamento do colágeno. Por outro lado ratos com queimadura de 3° grau apresentaram a matriz colágena organizada e madura, juntamente com uma redução no número de vasos sanguíneos (57).

No presente estudo, foi mostrado que a cicatrização de lesões cutâneas foi comprometida pelo bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos. Embora não seja possível transpor estes resultados obtidos a partir de modelos animais para humanos, os efeitos

adversos provocados pelo bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos em lesões crônicas devem ser considerados pelos médicos. Porém, pesquisas vêm demonstrando que em determinados tipos de lesão é aconselhada a utilização de bloqueadores β_1 - e β_2 -adrenérgicos. Como em pacientes com hemangioma infantil (60, 116-118), que é definido como um tumor vascular comum durante a infância, geralmente este tumor regride espontaneamente em 2-10 anos (119), mas em certos casos este tumor evolui, levando a formação de lesões. E também em pacientes com úlceras refratárias, estas são consequência de complicações que ocorrem após o transplante, que geram lesões que não cicatrizam (118).

CONCLUSÃO

Através dos dados apresentados neste estudo observamos que o bloqueio dos receptores β_1 - e β_2 -adrenérgicos atrasa o reparo de úlceras de pressão em camundongos prolongando a fase inflamatória e atrasando fases subsequentes do processo de reparo, incluindo a formação do tecido de granulação, angiogênese, re-epitelização, proliferação celular, a diferenciação miofibroblástica e a formação da cicatriz.

O desenvolvimento do material didático sobre reparo tecidual permitiu divulgar aos alunos de Graduação e do Ensino Médio e profissionais da Área de Saúde, de forma simples e interativa, como o ocorre o processo de reparo cutâneo.

PERSPECTIVAS

Este trabalho tem como próximas etapas:

- Avaliar o efeito de drogas anti-inflamatórias e/ou antioxidantes no processo de reparo de lesões crônicas utilizando o modelo de lesão por isquemia e reperfusão. Para isto serão utilizados o celecoxibe (anti-inflamatório não esteróide que inibe seletivamente a COX-2) e o CAPE (componente ativo da própolis do mel de abelha e possui propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes).

REFERÊNCIAS

1. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15; 453(7193): 314-21.
2. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007 Jan-Feb; 25(1): 9-18.
3. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011 Aug; 19(3): 441-53.
4. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49(1): 35-43.
5. Sonnemann KJ, Bement WM. Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011; 27: 237-63.
6. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Jun; 117(7 Suppl): 1e-S-32e-S.
7. Profyris C, Tziotziou C, Do Vale I. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics Part I. The molecular basis of scar formation. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Jan; 66(1): 1-10; quiz 1-2.
8. Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*. 2007 May; 127(5): 1009-17.
9. Falanga V. Growth factors and wound healing. *Dermatol Clin*. 1993 Oct; 11(4): 667-75.
10. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999 Sep 2; 341(10): 738-46.
11. Robbins, Cotran. *Pathologic Basis of Disease*. Pathologic Basis of Disease. 8 ed. New York: Elsevier. p. 77-103.
12. Desmouliere A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen*. 2005 Jan-Feb; 13(1): 7-12.
13. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol*. 2003 Jul; 200(4): 500-3.
14. Ko SH, Nauta A, Wong V, Glotzbach J, Gurtner GC, Longaker MT. The role of stem cells in cutaneous wound healing: what do we really know? *Plast Reconstr Surg*. 2011 Jan; 127 Suppl 1: 10S-20S.
15. Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis*. 2004 Apr; 17(2): 91-6.
16. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol*. 2007 Mar; 127(3): 514-25.
17. Wolcott RD, Rhoads DD, Dowd SE. Biofilms and chronic wound inflammation. *J Wound Care*. 2008 Aug; 17(8): 333-41.

18. Robson MC, Stenberg BD, Heggers JP. Wound healing alterations caused by infection. *Clin Plast Surg*. 1990 Jul; 17(3): 485-92.
19. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 1996 Oct; 4(4): 411-20.
20. Cooper RA. The contribution of microbial virulence to wound infection. *British Journal of Community Nursing*. 2002 Dec: 10-4.
21. Ovington L. Bacterial toxins and wound healing. *Ostomy Wound Manage*. 2003 Jul; 49(7A Suppl): 8-12.
22. Cullum N, Nelson EA, Nixon J. Pressure ulcers. *Clin Evid*. 2006 Jun; (15): 2592-606.
23. Catania K, Huang C, James P, Madison M, Moran M, Ohr M. Wound wise: PUPPI: the Pressure Ulcer Prevention Protocol Interventions. *Am J Nurs*. 2007 Apr; 107(4): 44-52; quiz 3.
24. Jaul E. Assessment and management of pressure ulcers in the elderly: current strategies. *Drugs Aging*. 2010 Apr 1; 27(4): 311-25.
25. Wada A. Pressure Sores. *Rev Med (São Paulo)*. 2010 Jul-Dez; 89(3-4): 170-7.
26. Noreau L, Proulx P, Gagnon L, Drolet M, Laramee MT. Secondary impairments after spinal cord injury: a population-based study. *Am J Phys Med Rehabil*. 2000 Nov-Dec; 79(6): 526-35.
27. Pagliacci MC, Celani MG, Spizzichino L, Zampolini M, Franceschini M, Gruppo Italiano Studio Epidemiologico Mielolesioni g. Hospital care of postacute spinal cord lesion patients in Italy: analysis of readmissions into the GISEM study. *Am J Phys Med Rehabil*. 2008 Aug; 87(8): 619-26.
28. Allman RM. Pressure ulcers among the elderly. *N Engl J Med*. 1989 Mar 30; 320(13): 850-3.
29. Gusenoff JA, Redett RJ, Nahabedian MY. Outcomes for surgical coverage of pressure sores in nonambulatory, nonparaplegic, elderly patients. *Ann Plast Surg*. 2002 Jun; 48(6): 633-40.
30. Costa MP. Epidemiological Profile and Treatment of Pressure Sores: experience with 77 cases. *Acta Ortop Bras*. 2005; 13(3): 124-33.
31. Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen*. 2000 Jan-Feb; 8(1): 68-76.
32. Stadler I, Zhang RY, Oskoui P, Whittaker MS, Lanzafame RJ. Development of a simple, noninvasive, clinically relevant model of pressure ulcers in the mouse. *J Invest Surg*. 2004 Jul-Aug; 17(4): 221-7.
33. Lindan O. Etiology of decubitus ulcers: an experimental study. *Arch Phys Med Rehabil*. 1961 Nov; 42: 774-83.
34. Salcido R, Popescu A, Ahn C. Animal models in pressure ulcer research. *J Spinal Cord Med*. 2007; 30(2): 107-16.
35. Dinsdale SM. Decubitus ulcers in swine: light and electron microscopy study of pathogenesis. *Arch Phys Med Rehabil*. 1973 Feb; 54(2): 51-6 passim.

36. Daniel RK, Priest DL, Wheatley DC. Etiologic factors in pressure sores: an experimental model. *Arch Phys Med Rehabil.* 1981 Oct; 62(10): 492-8.
37. Nola GT, Vistnes LM. Differential response of skin and muscle in the experimental production of pressure sores. *Plast Reconstr Surg.* 1980 Nov; 66(5): 728-33.
38. Hagisawa S, Ferguson-Pell MW, Palmieri VR, Cochran GV. Pressure sores: a biochemical test for early detection of tissue damage. *Arch Phys Med Rehabil.* 1988 Sep; 69(9): 668-71.
39. Salcido R, Donofrio JC, Fisher SB, LeGrand EK, Dickey K, Carney JM, et al. Histopathology of pressure ulcers as a result of sequential computer-controlled pressure sessions in a fuzzy rat model. *Adv Wound Care.* 1994 Sep; 7(5): 23-4, 6, 8 passim.
40. Salcido R, Fisher SB, Donofrio JC, Bieschke M, Knapp C, Liang R, et al. An animal model and computer-controlled surface pressure delivery system for the production of pressure ulcers. *J Rehabil Res Dev.* 1995 May; 32(2): 149-61.
41. Swaim SF, Bradley DM, Vaughn DM, Powers RD, Hoffman CE. The greyhound dog as a model for studying pressure ulcers. *Decubitus.* 1993 Mar; 6(2): 32-5, 8-40.
42. Hyodo A, Reger SI, Negami S, Kambic H, Reyes E, Browne EZ. Evaluation of a pressure sore model using monoplegic pigs. *Plast Reconstr Surg.* 1995 Aug; 96(2): 421-8.
43. Goldstein B, Sanders J. Skin response to repetitive mechanical stress: a new experimental model in pig. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998 Mar; 79(3): 265-72.
44. Salcido R, Donofrio JC, Fisher SB, LeGrand EK, Carney JM, Schosser R, et al. Evaluation of ibuprofen for pressure ulcer prevention: application of a rat pressure ulcer model. *Adv Wound Care.* 1995 Jul-Aug; 8(4): 30-2, 4, 8-40 passim.
45. Ahlquist RP. A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* 1948 Jun; 153(3): 586-600.
46. Lands AM, Luduena FP, Buzzo HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci.* 1967 Nov 1; 6(21): 2241-9.
47. Ablad B, Carlsson B, Carlsson E, Dahlof C, Ek L, Hultberg E. Cardiac effects of beta-adrenergic receptor antagonists. *Adv Cardiol.* 1974; 12(0): 290-302.
48. Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, et al. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994 Jun; 46(2): 121-36.
49. Kaumann AJ. Four beta-adrenoceptor subtypes in the mammalian heart. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 Mar; 18(3): 70-6.
50. Duell EA. Identification of a beta 2-adrenergic receptor in mammalian epidermis. *Biochem Pharmacol.* 1980 Jan 1; 29(1): 97-101.
51. Leicht M, Greipel N, Zimmer H. Comitogenic effect of catecholamines on rat cardiac fibroblasts in culture. *Cardiovasc Res.* 2000 Nov; 48(2): 274-84.
52. Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Bolaji RS, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor modulation of wound repair. *Pharmacol Res.* 2008 Aug; 58(2): 158-64.

53. Gosain A, Muthu K, Gamelli RL, DiPietro LA. Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. *Surgery*. 2007 Aug; 142(2): 170-9.
54. Pullar CE, Zhao M, Song B, Pu J, Reid B, Ghoghawala S, et al. Beta-adrenergic receptor agonists delay while antagonists accelerate epithelial wound healing: evidence of an endogenous adrenergic network within the corneal epithelium. *J Cell Physiol*. 2007 Apr; 211(1): 261-72.
55. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Propranolol improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jun 2; 611(1-3): 77-84.
56. Souza BR, Santos JS, Costa AM. Blockade of beta1- and beta2-adrenoceptors delays wound contraction and re-epithelialization in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 May-Jun; 33(5-6): 421-30.
57. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Low-dose propranolol improves cutaneous wound healing of burn-injured rats. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Dec; 122(6): 1690-9.
58. Romana-Souza B, Otranto M, Vieira AM, Filgueiras CC, Fierro IM, Monte-Alto-Costa A. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav Immun*. Mar; 24(3): 427-37.
59. Sivamani RK, Pullar CE, Manabat-Hidalgo CG, Rocke DM, Carlsen RC, Greenhalgh DG, et al. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: potential new indication for beta blockers. *PLoS Med*. 2009 Jan 13; 6(1): e12.
60. Lev-Tov H, Dahle S, Moss J, Isseroff RR. Successful treatment of a chronic venous leg ulcer using a topical beta-blocker. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Oct; 69(4): e204-5.
61. Anesini C, Borda E. Modulatory effect of the adrenergic system upon fibroblast proliferation: participation of beta 3-adrenoceptors. *Auton Autacoid Pharmacol*. 2002 Jun; 22(3): 177-86.
62. Brown SW, Meyers RT, Brennan KM, Rumble JM, Narasimhachari N, Perozzi EF, et al. Catecholamines in a macrophage cell line. *J Neuroimmunol*. 2003 Feb; 135(1-2): 47-55.
63. Abrass CK, O'Connor SW, Scarpace PJ, Abrass IB. Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol*. 1985 Aug; 135(2): 1338-41.
64. Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA, Blenk N, Kunkel SL. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. *J Immunol*. 1994 Mar 15; 152(6): 3024-31.
65. Szelenyi J, Kiss JP, Vizi ES. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2- and beta-adrenoceptors in mice. *J Neuroimmunol*. 2000 Feb 1; 103(1): 34-40.
66. Harper RA, Flaxman BA. Effect of pharmacological agents on human keratinocyte mitosis in vitro. II. Inhibition by catecholamines. *J Cell Physiol*. 1975 Oct; 86(2 Pt 1): 293-9.

67. Orenberg EK, Pfenndt EA, Wilkinson DI. Characterization of alpha- and beta-adrenergic agonist stimulation of adenylate cyclase activity in human epidermal keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol.* 1983 Jun; 80(6): 503-7.
68. Chen J, Hoffman BB, Isseroff RR. Beta-adrenergic receptor activation inhibits keratinocyte migration via a cyclic adenosine monophosphate-independent mechanism. *J Invest Dermatol.* 2002 Dec; 119(6): 1261-8.
69. Grando SA. Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1997 Aug; 2(1): 41-8.
70. Pullar CE, Rizzo A, Isseroff RR. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem.* 2006 Jul 28; 281(30): 21225-35.
71. Liu GS, Trope GE, Basu PK. Beta adrenoceptors and regenerating corneal epithelium. *J Ocul Pharmacol.* 1990 Summer; 6(2): 101-12.
72. Haruta Y, Ohashi Y, Matsuda S. Corneal epithelial deficiency induced by the use of beta-blocker eye drops. *Eur J Ophthalmol.* 1997 Oct-Dec; 7(4): 334-9.
73. Nork TM, Holly FJ, Hayes J, Wentlandt T, Lamberts DW. Timolol inhibits corneal epithelial wound healing in rabbits and monkeys. *Arch Ophthalmol.* 1984 Aug; 102(8): 1224-8.
74. Reidy JJ, Zarzour J, Thompson HW, Beuerman RW. Effect of topical beta blockers on corneal epithelial wound healing in the rabbit. *Br J Ophthalmol.* 1994 May; 78(5): 377-80.
75. Romana-Souza B, Santos JS, Monte-Alto-Costa A. beta-1 and beta-2, but not alpha-1 and alpha-2, adrenoceptor blockade delays rat cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009 Mar-Apr; 17(2): 230-9.
76. Romana-Souza B, Otranto M, Vieira AM, Filgueiras CC, Fierro IM, Monte-Alto-Costa A. Rotational stress-induced increase in epinephrine levels delays cutaneous wound healing in mice. *Brain, behavior, and immunity.* 2010 Mar; 24(3): 427-37.
77. Romana-Souza B, Porto LC, Monte-Alto-Costa A. Cutaneous wound healing of chronically stressed mice is improved through catecholamines blockade. *Exp Dermatol.* 2010 Sep; 19(9): 821-9.
78. Pullar CE, Le Provost GS, O'Leary AP, Evans SE, Baier BS, Isseroff RR. beta2AR antagonists and beta2AR gene deletion both promote skin wound repair processes. *J Invest Dermatol.* 2012 Aug; 132(8): 2076-84.
79. Lardenoye JW, Thiefaine JA, Breslau PJ. Assessment of incidence, cause, and consequences of pressure ulcers to evaluate quality of provided care. *Dermatol Surg.* 2009 Nov; 35(11): 1797-803.
80. Tong M, Tuk B, Hekking IM, Pleumeekers MM, Boldewijn MB, Hovius SE, et al. Heparan sulfate glycosaminoglycan mimetic improves pressure ulcer healing in a rat model of cutaneous ischemia-reperfusion injury. *Wound Repair Regen.* 2011 Jul-Aug; 19(4): 505-14.
81. Nascimento AP, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr.* 2006 Dec; 96(6): 1069-77.

82. Tschardtke M, Pofahl R, Chrostek-Grashoff A, Smyth N, Niessen C, Niemann C, et al. Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *J Cell Sci.* 2007 Apr 15; 120(Pt 8): 1480-90.
83. Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988 Oct; 96(10): 857-81.
84. Mandarim-de-Lacerda C. Métodos quantitativos em morfologia. "In": EDUERJ, editor. Métodos quantitativos em morfologia. Universidade do Estado do Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 1995. p. 131.
85. Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys.* 1961 May; 93: 440-7.
86. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem.* 1992 May 1; 202(2): 384-9.
87. Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem.* 1994 Aug 1; 220(2): 403-9.
88. Kubes P, Jutila M, Payne D. Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest.* 1995 Jun; 95(6): 2510-9.
89. Mogford JE, Roy NK, Cross KJ, Mustoe TA. Use of hypoxia-inducible factor signal transduction pathway to measure O₂ levels and modulate growth factor pathways. *Wound Repair Regen.* 2003 Nov-Dec; 11(6): 496-503.
90. Tsuji S, Ichioka S, Sekiya N, Nakatsuka T. Analysis of ischemia-reperfusion injury in a microcirculatory model of pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2005 Mar-Apr; 13(2): 209-15.
91. Hermes-Lima M, Ponka P, Schulman HM. The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Oct 18; 1523(2-3): 154-60.
92. Pullar CE, Isseroff RR. Cyclic AMP mediates keratinocyte directional migration in an electric field. *J Cell Sci.* 2005 May 1; 118(Pt 9): 2023-34.
93. Usui ML, Mansbridge JN, Carter WG, Fujita M, Olerud JE. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J Histochem Cytochem.* 2008 Jul; 56(7): 687-96.
94. Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T, Varani J. Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol.* 1999 Aug; 180(2): 271-84.
95. Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol.* 1997 Apr 21; 137(2): 481-92.
96. Matsubayashi Y, Ebisuya M, Honjoh S, Nishida E. ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Curr Biol.* 2004 Apr 20; 14(8): 731-5.

97. Turchi L, Chassot AA, Rezzonico R, Yeow K, Loubat A, Ferrua B, et al. Dynamic characterization of the molecular events during in vitro epidermal wound healing. *J Invest Dermatol.* 2002 Jul; 119(1): 56-63.
98. Providence KM, White LA, Tang J, Gonclaves J, Staiano-Coico L, Higgins PJ. Epithelial monolayer wounding stimulates binding of USF-1 to an E-box motif in the plasminogen activator inhibitor type 1 gene. *J Cell Sci.* 2002 Oct 1; 115(Pt 19): 3767-77.
99. Pullar CE, Grahn JC, Liu W, Isseroff RR. Beta2-adrenergic receptor activation delays wound healing. *FASEB J.* 2006 Jan; 20(1): 76-86.
100. Trope GE, Liu GS, Basu PK. Toxic effects of topically administered Betagan, Betoptic, and Timoptic on regenerating corneal epithelium. *J Ocul Pharmacol.* 1988 Winter; 4(4): 359-66.
101. Nwomeh BC, Yager DR, Cohen IK. Physiology of the chronic wound. *Clin Plast Surg.* 1998 Jul; 25(3): 341-56.
102. de Coupade C, Gear RW, Dazin PF, Sroussi HY, Green PG, Levine JD. Beta 2-adrenergic receptor regulation of human neutrophil function is sexually dimorphic. *Br J Pharmacol.* 2004 Dec; 143(8): 1033-41.
103. Verhoeckx KC, Doornbos RP, Witkamp RF, van der Greef J, Rodenburg RJ. Beta-adrenergic receptor agonists induce the release of granulocyte chemotactic protein-2, oncostatin M, and vascular endothelial growth factor from macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2006 Jan; 6(1): 1-7.
104. Flierl MA, Rittirsch D, Sarma JV, Huber-Lang M, Ward PA. Adrenergic regulation of complement-induced acute lung injury. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 632: 93-103.
105. Saito Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita T, Horikawa M, Takenaka M, et al. The loss of MCP-1 attenuates cutaneous ischemia-reperfusion injury in a mouse model of pressure ulcer. *J Invest Dermatol.* 2008 Jul; 128(7): 1838-51.
106. Yager JY, Thornhill JA. The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev.* 1997 Mar; 21(2): 167-74.
107. Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, Kenney WC, et al. Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest.* 1995 Sep; 96(3): 1336-50.
108. Diegelmann RF. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 2003 Nov-Dec; 11(6): 490-5.
109. Margolis DJ, Hoffstad O, Isseroff RR. Association between the use of beta-adrenergic receptor agents and the development of venous leg ulcers. *Arch Dermatol.* 2007 Oct; 143(10): 1275-80.
110. Bitar MS, Labbad ZN. Transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I in relation to diabetes-induced impairment of wound healing. *J Surg Res.* 1996 Feb 15; 61(1): 113-9.
111. Darby IA, Bisucci T, Hewitson TD, MacLellan DG. Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jan; 29(1): 191-200.

112. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia*. 2002 Jul; 45(7): 1011-6.
113. Mackie EJ, Halfter W, Liverani D. Induction of tenascin in healing wounds. *J Cell Biol*. 1988 Dec; 107(6 Pt 2): 2757-67.
114. Chuong CM, Chen HM. Enhanced expression of neural cell adhesion molecules and tenascin (cytotactin) during wound healing. *Am J Pathol*. 1991 Feb; 138(2): 427-40.
115. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol*. 1995 Jan; 146(1): 56-66.
116. Pope E, Chakkittakandiyil A. Topical timolol gel for infantile hemangiomas: a pilot study. *Arch Dermatol*. 2010 May; 146(5): 564-5.
117. Chakkittakandiyil A, Phillips R, Frieden IJ, Siegfried E, Lara-Corrales I, Lam J, et al. Timolol maleate 0.5% or 0.1% gel-forming solution for infantile hemangiomas: a retrospective, multicenter, cohort study. *Pediatr Dermatol*. 2012 Jan-Feb; 29(1): 28-31.
118. Tang JC, Dosal J, Kirsner RS. Topical timolol for a refractory wound. *Dermatol Surg*. 2012 Jan; 38(1): 135-8.
119. Drolet BA, Esterly NB, Frieden IJ. Hemangiomas in children. *N Engl J Med*. 1999 Jul 15; 341(3): 173-81.

APÊNDICE - Produtos 1 e 3 do material didático em multimídia sobre reparo tecidual cutâneo para o Ensino na Saúde

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/049/2012** sobre **“Papel dos receptores beta-adrenérgicos no reparo cutâneo de lesões crônicas em camundongos: modelo não invasivo de lesão por isquemia e reperfusao”**, sob a responsabilidade de **Bruna Romana de Souza**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **03/08/2012**. Este certificado expira em **03/08/2016**.

Rio de Janeiro, 03 de Agosto de 2012.

Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof.^a Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

/ass

Prof. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

ANEXO B – Aceite do artigo

Christine Kisthardt <lifesci@email.arizona.edu> escreveu:
Ref.: Ms. No. LFS-D-13-00723R1
Propranolol impairs the closure of pressure ulcers in mice
Life Sciences

Dear Dr. Romana-Souza,

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Life Sciences.

Your accepted manuscript will be sent to Elsevier for publication. Upon receipt of your article, the publisher will send you an acknowledgement letter with a copyright agreement and off print order form.

We request that you return proofs within 48 hours of receipt. Author proofs will be sent in .pdf format to the email address you have provided. As noted in the Guide for Authors, Elsevier may proceed with publication of your article if no response is received within 48 hours.

Thank you for your contribution to Life Sciences. We look forward to publishing future work from your laboratory.

Sincerely yours,

Loren E. Wold, Ph.D., F.A.H.A., F.A.P.S.
Editor-in-Chief
Life Sciences