

José Adorno

Avaliação Histológica e Imunohistoquímica de cicatrização com curativo de Pele de Rã (*Rana catesbeiana*) em pacientes vítimas de queimaduras.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Albino Verçosa Magalhães

**Brasília
2005**

Dedico à minha esposa Gilda, meus filhos Marina e José Victor por estimularem a realização desse trabalho incluindo-o entre os vários planos das nossas vidas, e participando ativamente com o mesmo entusiasmo de todos os passos dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Antenor Soares Adorno, que no decorrer desse trabalho nos deixou, imortalizando-se em meus pensamentos como o grande responsável pela visão missionária que tenho enquanto estamos no planeta Terra. Devemos acreditar sempre, em tudo que fazemos.

À minha mãe, Maria Pereira Adorno e meus cinco irmãos frente a impossibilidade de homenageá-los individualmente, por todo apoio familiar que me propiciaram permitindo meu crescimento profissional. Retribuo-os com presteza e carinho no exercício do ofício da medicina e com infinita gratidão.

Aos professores do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, que sempre acreditaram nesse projeto, e em especial a Profa. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz pelo incentivo.

Ao meu orientador Prof. Albino Verçosa Magalhães, pela condução didática pontual e objetiva, inclusive na análise histológica e imunohistoquímica do material coletado.

À equipe da Unidade de Queimados, integralmente, pela ajuda e compreensão durante a coleta de dados. Em especial à equipe de médicos clínicos, coordenados pelo Dr. Mário Frattini. A toda equipe de enfermagem e em especial à Técnica de Enfermagem, Maria José Rezende e Silva, que tanto colaborou na coordenação e organização das biópsias.. Sei que todos anseiam pelo sucesso da pesquisa pois conhecem de perto, há longa data, o sofrimento das vítimas de queimaduras. A todos muito obrigado pelo carinho.

Ao grande amigo e parceiro, Dr. Simão Pedro Safe de Matos, que me auxilia no exercício de minhas atividades profissionais diárias, com as quais dividi meu tempo enquanto desenvolvia o projeto. Em especial à Dra. Francieleide Paes e Silva por emprestar-me sua experiência na análise estatística dos dados e mais ainda por honrar-me com sua dedicada amizade.

Ao Ranário Ouro Verde LTDA (Rander), representado pelo Sr Joaquim Barbosa, que mostrou-se parceiro incansável no atendimento de todas as exigências implicadas no fornecimento da pele de rã necessária a este experimento.

Por fim, agradeço aos pacientes que aceitaram participar dessa pesquisa submetendo-se aos procedimentos necessários, reafirmando sua disposição solidária com outros pacientes que por infortúnio sentirão as mesmas dores que ora sentem, na esperança de contribuir para abrandá-las no futuro.

Sou um homem de sorte,
mas percebo que quanto
mais trabalho mais sorte
eu tenho.

(frase atribuída a Henry. Ford)

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
INTRODUÇÃO	10
1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 QUEIMADURAS NO BRASIL E NO MUNDO: DIMENSÃO DO PROBLEMA	12
1.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TRATAMENTO DE QUEIMADURAS	14
1.3 AS ÁREAS DOADORAS DE AUTOENXERTO	21
1.4 OS SUBSTITUTOS DE PELE	22
1.5 O USO DA PELE DE RÃ	25
1.6 REPARAÇÃO DOS TECIDOS	29
1.7 RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR	31
1.8 RECEPTORES COM ATIVIDADE INTRÍNSECA DE CINASE	33
1.9 TRANSDUÇÃO DE SINAL	33
1.10.FATORES DE CRESCIMENTO ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS	35
2.MATERIAL E MÉTODOS	38
3.ANÁLISES DOS RESULTADOS	45
4.DISSCUSSÃO	54
5.CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA	71
ANEXO 2 – CODIGO DE CONDUTA PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E RESPONSÁVEL DE CULTIVO DE RÃS	72
ANEXO 3 – PROCESSO DE TRATAMENTO COM RAIOS GAMA	73

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

TABELA 1 – VARIEDADE DE SUBSTITUTOS DE PELE	23
TABELA 2 – QUANTIFICAÇÃO DE HISTOLOGIA E IMUNOHISTOQUIMICA DO CURATIVO COM PELE DE RÃ E GAZE RAYON	45
GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DE CRESCIMENTO DE EPITÉLIO E IMUNORREAÇÃO COM EGF α ENTRE PR E GR	43
FOTOGRAFIA 1 – SECÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDA TRATADA COM PELE DE RÃ	47
FOTOGRAFIA 2 – SECÇÃO HISTOLÓGICA DE FERIDA TRATADA COM GAZE RAYON	47
GRÁFICO 2 – COMPARAÇÃO PERCENTUAL DE CRESCIMENTO EPITELIAL ENTRE PR E GR	48
GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA IMUNORREAÇÃO DE EGF α POSITIVA ENTRE OS GRUPOS PR E GAZE	49
GRÁFICO 4- INTENSIDADE DE MARCAÇÃO DO EGF α NO GRUPO PR	50
FOTOGRAFIA 3 – IMUNORREAÇÃO DISCRETA (EGF1)	51
FOTOGRAFIA 4 – IMUNORREAÇÃO AUSENTE (EGF0)	51
FOTOGRAFIA 5 – IMUNORREAÇÃO MODERADA (EGF2)	51
TABELA 3 – QUANTIFICAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	52
FOTOGRAFIA 6 – REAÇÃO INFLAMATÓRIA EXSUDATIVA CRÔNICA	52
FOTOGRAFIA 7 – EPITÉLIO NEOFORMADO	52
FOTOGRAFIA 8 – FORMAÇÃO DE ABSCESSO	53
FOTOGRAFIA 9 – EPITÉLIO HUMANO E PELE DE RÃ	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C.	- Antes de Cristo
AP-1	-Proteína Ativadora 1
ACQ	-Área Corporal Queimada
APOSEQ	-Associação dos Portadores de Seqüelas de Queimaduras
bFGF	-Basic Fibroblast Growth Factor
c-AMP	-5'-monofosfato cíclico
c-FOS	-c-fos protein(proto-oncogene do osteosarcoma murino)
c-JUN	-c-Jun protein(proto-oncogene)
c-MYC	-c-MYC protein(proto-oncogene do mielocitoma aviário)
EUA	-Estados Unidos da América
EGF	-Epidermal Growth Factor
EGFr	-Epidermal Growth Factor receptor
FC	-Fator de Crescimento
FGF	-Fibroblast Growth Factor
GDP	-Guanosina Difosfato (Proteínas G)
GTPase	-Guanosina Trifosfatase
HB-EGF	-Heparin Binding Epidermal Growth Factor
HE	-Hematoxilina Eosina
HER	-Human Epidermal Receptor
HRAN	-Hospital Regional da Asa Norte
IGF	-Insulin Growth Factor
JAK/STAT	-Janus Kinase/Signal Transducer and Activation of Transcription
LPC	-Lipoproteic Complex
MAP	-Mitogen Active Protein
MEK	-MAP cinase cinase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
SCQ	-Superfície Corporal Queimada
SES/DF	-Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal
SIPAC	-Sistema Integrado de Procedimentos de Alta Complexidade
SUS	-Sistema Único de Saúde
TGF α	-Transforming Growth Factor α
TGF β	-Transforming Growth Factor β
UQ/HRAN	-Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte
VEGF	-Vasculoendothelial Growth Factor

RESUMO

Os curativos biológicos tem sido motivo de um grande número de pesquisas nos últimos anos. A sobrevivência dos pacientes com grandes áreas corporais acometidas pelo trauma térmico, depende muito da substituição da pele e por mais que se avance no suporte clínico, metabólico, imunológico, nutricional, cardiológico, e respiratório ou qualquer outro setor, o paciente crítico vitimado pelas queimaduras não suportará muito tempo se não houver cobertura cutânea, definitiva ou temporária.

O objetivo desse trabalho é estudar uma alternativa viável para um país como o nosso: sem recursos suficientes para empregar soluções de alto custo oferecidas pela indústria de bioengenharia de tecidos. Temos recursos naturais autóctones ainda inexplorados na nossa biodiversidade muitas soluções advem dessa riqueza.

A pele de rã tem sido citada esparsamente, em pesquisas, acerca do seu potencial cicatrizante e benefício no tratamento das feridas. O conhecimento da biologia animal nos fornece subsídios importantes quanto a presença de vários polipeptídios antimicrobianos neste material.

Propusemos esse estudo de cicatrização em humanos, utilizando a pele de rã *Rana catesbeiana*. Sua utilização terapêutica é incomum e carece de pesquisas bem controladas em humanos para corroborarmos o benefício de sua aplicação.

Com este objetivo utilizamos a pele de rãs previamente selecionadas, desidratadas e esterilizadas por Raios Gama em áreas doadoras de autoenxerto em pacientes vítimas de queimaduras admitidos na Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte (Brasília /DF).

Através de biópsias seriadas, submetidas a análise histológica e imunohistoquímica com anti-receptor de EGF buscamos demonstrar as diferenças entre o grupo controle utilizando curativo com gaze vaselinada e o grupo tratado com o curativo biológico.

O material é de fácil aplicação, de manuseio e armazenagem simples. Pode ser estocado por tempo prolongado e não requer transporte especial. As feridas tratadas com curativo de pele de rã evoluíram sem complicações como infecção, alergias ou aprofundamento das lesões, na verdade observamos cicatrização com epiderme sadia.

A histologia demonstrou epitélio regenerado sem diferenças significantes ($p < 0,05$) quando comparados curativos com pele de rã e gaze vaselinada, mas um tecido organizado e regenerado é evidente em microscopia com HE. Marcação com anti-receptor de EGF, apesar de discreta, foi mostrada em ambos os grupos, mas também com resultados não significantes. Outros estudos deverão advir no futuro para caracterizar melhor o curativo biológico com pele de rã.

Concluimos que há estímulo à cicatrização em áreas doadoras de auto enxerto através de fatores locais de crescimento quando tratadas com curativo biológico com pele de rã, apesar de não ter sido demonstrado estatisticamente significativa sua superioridade quando comparado com curativo com gazes vaselinadas; e demonstrou não haver impedimento à cicatrização nem evidências de aumento de complicações. No futuro outros marcadores envolvidos na cicatrização deverão ser estudados bem como observações com amostras maiores serão analisadas.

ABSTRACT

The biological dressing have been reason of a great number of researches in the last years for. The burn patients survival depends too much of tissues substitution despite of we have advanced in the support clinical, metabolic, immune, nutritional, cardiac, and breathing or any other section, the critical burn patient will not support a long time without cutaneous covering, definitive or temporary.

The objective of this study is to investigate a viable alternative to a country as ours, instead of importing expensive materials offered by the bioengineering tissues industry, we should use our autochthonous natural resources wich in some way still unexplored in our biodiversity.

The frog skin has been mentioned sparsely, in researches, concerning healing and potential benefit in the treatment of the wounds, including the presence of several antimicrobial polypeptides.

We have proposed this study in humans, using skin of frog *Rana catesbeiana* as a temporary biological dressing. Its therapeutic use is uncommon and needs more controlled studies in humans to corroborate the benefit or not of its application.

That biological dressing is made of frog skin selected previously, dehydrated and sterilized by Gamma X rays. The application occurs in auto graft donors areas in patient victims of burn admitted on the Burn Unit at Hospital Regional da Asa Norte –Brasilia /DF.

Through serial biopsies, submitted to an histological analysis (hematoxilin-eosin) and immunohistochemistry with anti-receptor of EGF-r to demonstrate the differences among the group control using oiled gauze dressing (Vaseline) and the group with biological dressing (*Rana catesbeiana*).

The material is easy for application and storage . It can be stocked by long time and it doesn't request special transport. The wounds treated with biological dressing of frog skin evolved without complications as infection, allergies or turn it deeper instead of it we observe lesions healing with healthy epidermis.

The histology demonstrate regenerated epithelial despite of has not been significant differences ($p < 0,005$) in the frog skin dressing group when compared with the curative with oiled gauze The tissue is organized and epithelial regeneration is quite evident in HE microscopy. Demarcation with anti-receiver of EGF, in spite of discreet, was shown on both groups, but as the histological exams there is no significant differences between then. Other studies should come in the future to characterize evident advantages of the frog skin as a biological dressing.

We conclude that this product stimulate healing in auto graft donors sites trough growth factors action in wounds treated with skin bullfrog dressing supported by evidences on histological and immunohistochemical tests, as the controlled group made by oiled gauze dressing, and does not have any evidence that enhance the complications or impaired the wound healing process In the future other immunohistochemical markers involved in the wound healing can be tested contributing to understanding the effects of those dressings in tissue repair in different phases, enlarging the observations and measures in the study groups.

Key words: wound healing; donor sites areas; biological dressing; EGF receptor; human; bullfrog; *Rana catesbeiana*; skin substitutes; burn treatment; tissue repair; immunohistochemistry and skin histology.

INTRODUÇÃO

O tratamento das queimaduras tem recebido nos últimos anos atenção especial no Brasil. Sensibilizados pelos profissionais envolvidos neste tratamento, autoridades e gestores de serviços de saúde, tem destacado programas especiais para organização e estruturação de centros qualificados para seu atendimento. Um grande avanço neste setor tem sido observado..

A Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte (SES/DF), é classificada pelo Ministério da Saúde como centro de Alta Complexidade para tratamento de queimados. Por ser a única unidade pública para esse tipo de atendimento localizada na Região Centro-Oeste do país, recebe pacientes dos mais variados pontos geográficos. Este serviço atende cerca de 250 grandes queimados por ano, entre eles, 60% menores que 15 anos. Apresenta média de internação de 17 dias/paciente e conta com uma equipe multiprofissional interdisciplinar na rotina de atendimento incluindo médico clínico, pediatras, anestesistas e cirurgiões, enfermeiros, fisioterapeutas e terapeuta ocupacional. Participam ainda psicólogo, nutricionistas, assistente social e professores para o acompanhamento escolar das crianças enquanto internadas. Possui também o serviço de ambulatório para acompanhamento de agudos e seqüelados e uma associação de apoio (APOSEQ). Todos envolvidos na reabilitação e ressocialização do paciente vítima de queimaduras.

Tratar queimaduras é lidar com lesão grave no maior órgão do corpo humano: a pele. Mais exatamente é lidar com as desafiantes conseqüências de sua destruição, e com a inquietante necessidade às vezes dramática de reconstrução das áreas atingidas. A substituição da pele por membranas permanentes ou temporárias para desacelerar a cascata de problemas que advém da sua destruição, tem sido alvo de um grande número de pesquisas.

Esse trabalho tem por objetivo estudar a ação cicatrizante da pele de rã (*Rana catesbeiana*) como curativo biológico ou substituto temporário da pele humana, considerando os altos custos implicados em importação de materiais biossintéticos disponíveis no mercado, para esse fim.

Com esse objetivo trataremos neste texto de revisão da bibliografia acerca do tratamento das queimaduras, reparação tecidual, substitutos de pele, e

reparação tecidual envolvendo os fatores de crescimento celular na fase aguda da cicatrização., bem como da origem da utilização da pele de rã na medicina. A seguir detalharemos a metodologia e resultados alcançados, nossa discussão e conclusão.

REVISÃO DE LITERATURA

1- QUEIMADURAS NO BRASIL E NO MUNDO: DIMENSÃO DO PROBLEMA

As queimaduras representam um dos piores traumas ao qual o ser humano pode sobreviver. O tratamento, bem como sua prevenção na sociedade moderna é de grande importância considerando os altos custos hospitalares e longos períodos de internação, a morbidade e mortalidade envolvidas no manuseio dos pacientes vitimados pelo trauma térmico.

Cerca de 1.400.000 queimaduras acontecem nos EUA, resultando 54.000 hospitalizações. No Reino Unido cerca de 250.000 pessoas se queimam anualmente, dos quais 13.000 são internados. Cerca de 1.000 pacientes são vítimas de queimaduras graves necessitando de reposição de líquidos; metade destes são crianças abaixo de 12 anos e o país tem cerca de 300 vítimas fatais por ano. Globalmente, em 1998, a OMS relatou que acidentes relacionados com fogo ocupam o 9º lugar entre as causas de doenças entre crianças de 5 a 14 anos de idade (Violence and Injury Prevention Department -World Health Organization, 2002; Hettiaratchy ; Dziewulski, 2004).

Estima-se hoje nos EUA um gasto de \$ 3.000 a \$ 5.000 por paciente/dia. Além do impacto econômico causado pela forte demanda nos serviços de saúde do país, o paciente queimado enfrenta a perda da renda pessoal e muitas outras dificuldades doravante devido às seqüelas funcionais, estéticas e emocionais resultantes do trauma térmico (Violence and Injury Prevention Department -World Health Organization, 2002)

O problema se agrava mais nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos. Na Índia cerca de 2.000.000 de pessoas se queimam por ano, e quase 1.000.000 destes sofrem queimaduras de moderada a severa intensidade e, neste país, 70% destas vítimas é do sexo feminino, caracterizando violência contra a mulher. Além da incidência maior nestes países a taxa de mortalidade por este trauma é também maior. No Nepal ocorrem 1.700 mortes por ano numa população de 20 milhões, resultando numa taxa de mortalidade 17 vezes maior que no Reino Unido (Hettiaratchy et al., 2004).

As crianças são as mais acometidas por queimaduras atingindo quase a metade dos números em algumas estatísticas, tendo como perfil predominante o sexo masculino, baixo nível sócio econômico, não ser o primogênito e a exposição ao estresse psicossocial, segundo estudo no Brasil (Werneck, 1997 *apud* in Maciel ; Serra, 2004).

Caracteristicamente são acidentes que ocorrem no ambiente doméstico, dentro da cozinha, com líquidos quentes na região urbana das cidades, já os acidentes ocorridos na área rural são revestidos de pior evolução, pois o tempo entre o acidente e o tratamento recebido é mais prolongado, agravando o prognóstico geral. Etilismo, tabagismo, baixa condição sócio-econômica, violência contra a mulher, abuso ou negligência infantil e epilepsia são alguns dos fatores de risco relacionados aos grupos populacionais vítimas de queimaduras.

Embora o atendimento a tais pacientes tenha melhorado muito nos últimos anos, aumentando inclusive a sobrevivência e evoluindo na melhora da reabilitação, a prevenção continua sendo a melhor medida para lidar com o problema.

No Brasil as estatísticas ainda são imprecisas, mas estima-se que 1.000.000 de pessoas se queimam por ano e destes, 100.000 necessitarão de atendimento hospitalar, dos quais 2.500 irão falecer direta ou indiretamente de suas lesões (Gomes; Serra ; Macieira, 2001).

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Queimaduras existem 52 serviços especializados no tratamento de pacientes queimados em 16 dos 26 Estados da Federação (Maciel et al., 2004). A maioria destes serviços é unidade pública do Sistema Único de Saúde (SUS) com notória dificuldade financeira e administrativa, mas que sofrem uma numerosa procura de pacientes em busca de tratamento de emergência e também das seqüelas cicatríciais.

Apesar do atraso em relação aos países mais desenvolvidos, no Brasil, o atendimento ao paciente vítima de queimaduras tem recebido atenção especial do Ministério da Saúde, a partir da criação do Sistema Integrado de Procedimentos de Alta Complexidade em Queimados (SIPAC/Queimados) em conjunto com a Sociedade Brasileira de Queimaduras fundada na década de 90 com objetivo de propor estrutura adequada, padronizar rotinas, incentivar estudos e pesquisa nessa área. A formação de novas unidades nas diferentes regiões do país e organização daquelas já existentes em centros de atendimento em diversos níveis de

complexidade é o início de um trabalho moderno no atendimento desse trauma que envolve certas peculiaridades no seu manuseio(Maciel ; Serra, 2004).

Como em muitas áreas da medicina o tratamento de pacientes queimados evoluiu do ponto de vista organizacional e técnico. Mas o aspecto multidisciplinar e de infra-estrutura física requerida no manejo desses pacientes tem sido essencial nas mudanças mais recentes. A implementação de rotinas nestes centros requer adequação a margens estreitas de orçamento dentro de uma realidade que impossibilita a adoção de métodos que impliquem alto custo. Os centros de queimados necessitam para o tratamento na fase aguda de estrutura física adequada, aquisição de equipamentos especiais para cirurgias, profissionais treinados de diferentes especialidades (equipe multiprofissional), leitos especiais para pós-operatório de enxertos e unidades de atendimento intensivo para pacientes graves, além de suporte laboratorial com ampla capacidade e outros materiais de consumo não menos dispendiosos em grandes quantidades que incluem os hemoderivados, antibióticos e curativos. A prestação de serviços aos seus pacientes ou à sua população por um centro de queimados é ampla incluindo desde atendimento agudo, até serviços de reabilitação física e social , serviço de cirurgia reparadora, sendo o grande responsável por políticas e estratégias de prevenção aos acidentes por trauma térmico(HOLUBEC ; KARFIK, 1951; Sheridan ; Tompkins, 2004).

2 – CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O TRATAMENTO DAS QUEIMADURAS

Diferentes agentes causam queimaduras, o que requer condutas também especiais de todos os profissionais envolvidos em seu tratamento. Isso prevê por parte da equipe interdisciplinar um entendimento correto da fisiopatologia deste tipo de trauma para que seja oferecido um tratamento eficaz.

Na década de 40 Jackson definiu as áreas de queimaduras conforme os graus de transição. Localmente as áreas de queimaduras são classificadas em 3 zonas: coagulação, estase e hiperemia. A primeira representa a área de maior destruição (tecido não viável); a segunda é uma região de possível reversão da crise na microcirculação local se o tratamento correto (ressuscitação hídrica) for instituído em tempo hábil a partir do momento do acidente; e a terceira, mais

externa como de boa perfusão tecidual exceto que evolua com sepse ou prolongada hipoperfusão. Quando a superfície corporal queimada (SCQ) atinge áreas maiores (acima de 20 a 30%) há liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios do local da queimadura provocando uma resposta sistêmica que incluem efeitos cardiovasculares, respiratórios, metabólicos e imunológicos (Hettiaratchy; Dziewulski, 2004).

A classificação conforme a profundidade de 1º, 2º e 3º graus usada no passado, atualmente é recomendado substituí-la pela denominação de ferimentos de espessura parcial ou total, sendo chamadas de queimadura de espessura parcial superficial aquelas de 1º grau e as que envolvem a epiderme e se estendem a porção superficial das papilas dérmicas; e as queimaduras de espessura parcial profunda onde há destruição de toda a epiderme, incluindo as papilas dérmicas deixando intacta as glândula sudoríparas e os folículos pilosos a partir dos quais ocorrem disseminação marginal dos elementos epiteliais que gradualmente cobrem a ferida. Espessura total fica reservada para a perda de toda espessura da pele, denominada anteriormente de 3º grau (Artz; Moncrief; Pruitt, Jr., 1980).

A resposta corporal à temperatura busca uma adaptação através de vasoconstrição ou vasodilatação no sentido de armazenar ou dissipar calor, respectivamente. Isto é controlado por alterações da circulação do corpo através de mecanismos periféricos e centrais. As mudanças graduais resultam numa alteração no volume de sangue daquela superfície, mas em temperaturas extremas, os mecanismos corporais de compensação são ultrapassados e ocorre a destruição local com morte celular. O meio interno do ser humano deve ser mantido dentro de estreitas variações térmicas, a partir do momento em que a absorção do calor exceder a taxa de dissipação, a temperatura celular será elevada além da sua capacidade de sobrevivência determinando sua desintegração (Artz et al., 1980).

Evidências de alterações no potencial de membrana das células identificaram que após a queimadura atinge até -60 milivolts (potencial normal é -90 milivolts), quando não recebe ressuscitação efetiva. Essa alteração é devida a um grande aumento no sódio e água intracelular. Ocorrendo ressuscitação hídrica adequada, todas essas mudanças podem ser revertidas (Artz et al., 1980).

Estudos em animais revelaram um padrão bifásico de aumento da permeabilidade capilar após o início da queimadura. Na fase inicial tem duração aproximada de 20 minutos, seguida de uma fase maior que de 2 a 3 semanas. Mas a maior mudança na permeabilidade capilar termina em 24 a 36 horas após o trauma, e uma parte desta dentro das primeiras 12 horas. (Hayashi, H., et al *apud in* Artz et al., 1980). Esse aumento da permeabilidade capilar local (em casos de pequenas áreas de queimaduras) ou sistêmico nos pacientes grandes queimados (SCQ > 20 a 30%) é pedra lapidar no entendimento da fuga de líquidos do espaço intra para o extravascular e da importância da ressuscitação hídrica o mais precocemente possível a partir do momento da ocorrência do acidente.

Grandes alterações na integridade capilar resultam em intensos deslocamentos de líquidos através do corpo, entre o compartimento vascular e interstício. Um derramamento maciço de proteínas no espaço extravascular, com fuga de grandes moléculas de proteínas excedendo 150.000A, resulta em grande aumento da pressão oncótica tecidual, culminando com rápido acúmulo de líquido edematoso no tecido queimado ou no tecido subjacente à queimadura. Quando a extensão da queimadura ultrapassa 20 a 30% da SCQ, este fenômeno está presente em todo o corpo, caracterizando o que se chama de grande queimado (Artz et al., 1980).

Os mecanismos que levam a esse aumento da permeabilidade capilar característico nas queimaduras permanecem ainda desconhecidos. Vários mediadores (citocinas, cininas, leucotrienos, tromboxane, prostaglandinas, radicais livres e histaminas) são liberados a partir do tecido queimado o que resulta na maior causa da morbidade decorrente do tratamento das queimaduras aceito atualmente; que é o edema, associado ao impedimento e instabilidade respiratória, isquemia de membros e síndromes compartimentais. Durante os 5 primeiros dias após a queimadura, a interleucina-1, interleucina-8 e interleucina-6 alcançam altos níveis no plasma. Alguns autores atribuem o aumento da permeabilidade das membranas celulares a ação da Interleucina-6. No entanto relação de causa e efeito entre as citocinas e as trocas de fluidos ou instabilidade hemodinâmica merecem ainda comprovação.

Pacientes com queimaduras profundas, lesão inalatória e retardo no atendimento inicial sofrem com fatores que implicam num aumento da requisição

do volume hídrico, e com inevitável aumento da morbidade. Existem evidências de que a utilização de antioxidantes (altas doses de Vitamina C) é capaz de modificar essa demanda de fluidos, mas ainda carecemos de mais estudos comprobatórios para sua utilização na prática clínica.

Ainda devido ao fraco entendimento da fisiopatologia das queimaduras é que são utilizadas as fórmulas de reposição de líquidos nestes pacientes, tais como fórmulas de Parkland, Brooke-Evans e Moore's Burn Budget , sendo úteis principalmente para o planejamento inicial da reposição hídrica. Os cristalóides são mais preconizados nas primeiras horas, não sendo recomendado a utilização de colóides nas 24 horas iniciais em função da grande permeabilidade capilar permitindo seu acúmulo no interstício, realimentando o edema. A utilização da albumina tem recebido críticas e merece estudos prospectivos para melhor definição do seu papel em pacientes graves.

Por todos esses eventos ainda mal definidos do ponto de vista fisiopatológico é que parâmetros clínicos de débito urinário, oximetria de pulso, perfusão tecidual continuam guiando o tratamento inicial de grandes queimados, apesar das controvérsias na literatura sobre qual deles é o mais fidedigno para orientar uma boa ressuscitação hídrica. Uma hidratação precoce permanece sendo o único tratamento que pode reduzir a incidência de choque e insuficiência renal.

Mas sejam quais forem os mecanismos envolvidos, o trauma térmico segue o padrão da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (Sheridan et al., 2004; Gueugniaud; Carsin; Bertin-Maghit ; Petit, 2000). Hoje, ao invés da ameaça do choque hipovolêmico ou insuficiência renal do passado, os estudos se voltam para o edema generalizado que vulnerabiliza o sistema cardiorespiratório, expondo o indivíduo às infecções por isquemia e hipoperfusão tecidual.

Além do cuidado com a instabilidade hemodinâmica o tratamento da ferida deve ser objeto de definições iniciais na conduta. Nas queimaduras, diferentemente de outras doenças, a ferida é a causa da desorganização da homeostase, e não consequência da patologia (ex. úlcera vascular, úlcera diabética, etc.)(Herndon, 1997).

Após os procedimentos iniciais na sala de emergência, quais sejam: diagnóstico amplo do acidente e das condições em que ocorreu; indícios de

inalação, traumas associados; condições clínicas pré existentes; acesso venoso de bom calibre (periférico ou central); escarotomias e fasciotomias.

O tratamento da dor e a profilaxia antitetânica, diagnóstico de extensão e profundidade das lesões para o planejamento adequado da reposição de líquidos, precedem o manuseio específico da ferida queimada.

A abordagem inicial da ferida no momento da balneoterapia ainda faz parte dessa primeira avaliação da área queimada, analisando mais detalhadamente a profundidade e extensão das lesões, considerando que as medidas iniciais de atendimento já foram cumpridas. Esse tratamento com banhos diários ou alternados é um procedimento ainda eficiente em muitos serviços. É realizado com água corrente, clorada, com controle de temperatura e limpeza com substâncias degermantes (clorexidine 2% a ou polivinil-pirrolidona a 10%). Realiza-se remoção mecânica dos tecidos necrosados, flictenas e tecidos estranhos, sendo a primeira limpeza da ferida. Esses banhos podem ser realizados sob analgesia ou anestesia numa maca especial tipo mesa de Morgani com escoamento adequado(Maciél et al., 2004a) após o que é realizado a aplicação de creme de Sulfadiazina de Prata1% ou Nitrato de Cério que podem ser inclusive utilizados em associação com benefícios terapêuticos(Koller ; Orsag, 1998). Ambas as substâncias tem bom espectro de ação contra alguns gram-positivos e gram-negativos, reservando ao cério uma função imunorreguladora, e também como um potente agente antimicrobiano(Settle, 1996; Scheidegger; Sparkes; Luscher; Schoenenberger ; Allgower, 1992).

O debridamento cirúrgico com dermatômos manuais,realizado tangencialmente, deve ser planejado tão logo o paciente se estabilize hemodinamicamente. O tecido queimado é reservatório de um grande número de substâncias imunossupressoras(Settle, 1996).

A pele tem sido caracterizada há pelo menos uma década como o maior órgão imunológico do corpo humano(Allgower; Schoenenberger ; Sparkes, 1995). A após o trauma térmico torna-se uma grande fonte de toxinas e substâncias imunossupressoras favorecendo infecções e sepse (Spies; Herndon; Sparkes ; Allgower, 2003). A retirada do tecido queimado do corpo é uma importante medida terapêutica para controle da ação das endotoxinas.

Vários autores demonstraram a presença, no tecido queimado de um complexo lipoproteico (LPC) de ação imunossupressora (Sparkes, 1993; Monge; Sparkes; Allgower ; Schoenenberger, 1991), bem como a redução do número de neutrófilos na ferida após a excisão deste tecido (Tchervenkov; Epstein; Silberstein ; Alexander, 1988)

Há cerca de 25 anos a conduta era de tratamento tópico com antimicrobianos (mafenide,nitrato de prata 0,5%) e debridamentos seriados até obter um tecido sadio de granulação que pudesse então receber os enxertos definitivos.Essa conduta estava associada com maior tempo de tratamento e internação, maior índice de complicações infecciosas, grandes perdas protéicas e hídricas, determinando seqüelas cicatriciais pouco funcionais e esteticamente inaceitáveis. A taxa de sobrevivência era notadamente menor nos pacientes acima de 1/3 de área corporal queimada. Também eram deficientes o controle de infecção e monitorização das feridas, sendo comum evoluir para sepse sistêmica. Em agravo o suporte ventilatório não se estendia além de oxigenoterapia e traqueostomia(Herndon, 1997).

Desde a 2ª.Guerra Mundial que a conduta de excisão e enxertia precoce, ao lado de outras medidas mais agressivas de suporte fisiológico, imunológico, nutricional, fisioterápico, tem sido adotadas pelos centros de queimados em contraste com a era anterior. Estes centros têm procurado diminuir seu tempo de tratamento e de internação através de rotinas que visem treinar a equipe e aparelhar seus serviços buscando o debridamento e enxertia precoce das queimaduras o que em última análise é passo definitivo para o retorno ao equilíbrio do meio interno ,rompido com a perda da proteção cutânea conseqüente ao trauma(Herndon ; Spies, 2001).

Há relatos antigos datados de 1891 de tentativas bem sucedidas de excisão e enxertia precoce da pele na pálpebra de pacientes queimados no 6º.dia pós-queimadura (Raehlman, 1891 *apud in* Settle, 1996). Neste sentido as contribuições desde Wilms em 1901, passando por Jackson em 1954, Janzeckovic, na década de 70 , e Monafo, nos EUA que, buscando fazer a excisão do tecido queimado e enxertia cutânea precoce representaram uma notável evolução no tratamento das queimaduras, ainda em tempos modernos. O benefício desse tratamento é bem aceito nos pacientes com área corporal queimada até de 20 a

25%, mas torna-se polêmico em pacientes com áreas maiores que 30% e contraindicado em pacientes cujas condições clínicas ameaçam a vida (Heimbach et al., 1988; Herndon, 1997; Herndon et al., 1989). As limitações deste método são:

1) perda de sangue excessiva, o que requer boa reserva fisiológica do paciente e um bom banco de sangue disponível na instituição (é recomendado reservar 500ml de sangue para cada 5% de área excisada). Necessário se faz adotar medidas para evitar perda de sangue como: utilização de torniquetes para excisões em membros e compressas embebidas em soluções de adrenalina, por exemplo.

2) tempo cirúrgico prolongado, também contribui para aumentar a espoliação inerente ao procedimento (hipotermia, p.ex). Em geral deve-se limitar a um tempo máximo de 90 minutos, incluindo o curativo.

3) quando proposta em pacientes maiores uma correta avaliação da disponibilidade de área doadora de pele para autoenxertia.

As vantagens relatadas por Janzekovic são: a ferida é fechada (enxerto autólogo) antes de se tornar colonizada, considerando que sua cobertura ocorreria em um período entre o 3º e 5º dia pós-queimadura; a cicatriz é de melhor qualidade; menos contratura é esperada sendo possível iniciar a fisioterapia mais precocemente; reduz-se o período de internação e também o número de curativos, o que facilita os cuidados de enfermagem (Jackson, 1991; Janzekovic, 1970; Settle, 1996).

Os enxertos de pele foram inicialmente descritos por Reverdin, um estudante suíço em 1869, como método para acelerar a cicatrização de feridas, transferindo pequenas ilhas de pele com 1 a 2mm de diâmetro, retiradas de uma determinada área doadora e colocando-as num leito de ferida de pele com tecido de granulação (Reverdin, 1869, *apud in* Settle, 1996). Sua descoberta despertou muito interesse evoluindo posteriormente para os enxertos mais largos, em faixas como são usados hoje. Ainda é hoje a principal e definitiva técnica para cobertura de feridas de grandes extensões como são as queimaduras: os enxertos autólogos.

Historicamente os materiais para retirada desses enxertos evoluíram de instrumentos manuais como os dermatômos manuais criados por Blair e Humby, os quais são usados ainda hoje, tanto para os debridamentos como para a coleta de enxertos de pele parcial de espessuras fina e média, até os dermatômos elétricos

do tipo Brown mais precisos, que são usados principalmente para retirada de enxertos de pele parcial com calibragem definida previamente variando de 0.2mm até 0.5-0.6mm, chegando mesmo a retirar enxertos de pele total com 1mm de espessura(Settle, 1996).

Os enxertos podem ser tratados por métodos de expansão ou dilatadores de pele (mesh-graft) para aumentar sua área de cobertura no sítio receptor (a queimadura), devendo ser usados em situações especiais, especialmente em queimados com grandes áreas. Também podem ser associados a matrizes dérmicas de regeneração como o Integra. (Settle, 1996; Barret ; Herndon, 2002).

3 - AS ÁREAS DOADORAS DE AUTOENXERTO

Os enxertos são retirados das chamadas áreas doadoras de pele parcial com facas de controle manual (p.ex., faca de Humby ou Blair) ou com dermatômos elétricos tipo Brown que permitem selecionar precisamente a espessura do enxerto a ser retirado.

Os locais de doação de enxerto de pele parcial variam de caso a caso. As áreas mais comuns são os membros inferiores e também são elegíveis os membros superiores, tronco, dorso e couro cabeludo. A cicatrização dessas áreas depende da espessura do enxerto retirado, local, idade e patologias associadas. Em um grande queimado com área doadora escassa é importante que essas áreas doadoras cicatrizem o mais rápido possível, pois pode ser necessária uma nova retirada nestas áreas durante o mesmo período de internação.

Para a reepitelização destas áreas vários curativos são propostos. Existem curativos com pomada de óxido de zinco, gazes vaselinadas (Rayon p.ex.), curativos biológicos (p.ex, membrana amniótica, pele de cadáver, pele de porco, etc), curativos sintéticos ou semi-sintéticos ou até folhas de vegetais(Tan; Roberts ; Sinclair, 1993; Gore ; Akolekar, 2003; Horch ; Stark, 1998). A depender do método essas áreas alcançam a reepitelização entre 8 a 15 dias.

Atualmente na nossa unidade de atendimento utilizamos rotineiramente o curativo com gazes Rayon vaselinadas ou pomada de Óxido de Zinco, o que nos permite uma reepitelização de cerca de 15 a 20 dias.

É fundamental a prevenção de infecção e da desidratação, para que não se interrompa o processo de cicatrização. A falha no tratamento médico acresce de complicações à difícil recuperação do paciente queimado.

4 – OS SUBSTITUTOS DE PELE

Com a melhora da sobrevida, por evolução do suporte a metabólico, nutricional, imunológico e cardiorespiratório observado nos últimos anos, pacientes queimados com 80 a 90% de ACQ sobrevivem ao tratamento inicial, permanecendo com áreas desprotegidas por cobertura cutânea, e naturalmente com áreas doadoras de pele para enxertos escassas. Esse quadro requer alternativas de substitutos de pele para cobertura temporária da ferida diminuindo susceptibilidade a infecções, perdas hídricas e protéicas, enquanto não se consegue uma cobertura definitiva com enxertos autólogos, que, como já mencionado, é o método de eleição nas reparações de espessura total.

Também no tratamento das áreas doadoras, que são feridas de espessura parcial, os substitutos de pele tornam-se um importante item no sentido de conduzi-las com normalidade à regeneração, diminuindo infecções, dor, perdas líquidas e protéicas, e tornando-as potencialmente reutilizáveis em menos tempo.

Vem da antiguidade a tentativa de utilização de promotores da cicatrização das perdas cutâneas. A utilização de pele de sapo é descrita no papiro de Ebers, em 1500 a.C.(Pruitt, Jr., 1997) .

Os curativos biológicos, sintéticos ou biossintéticos disponíveis atualmente no mercado incluem membrana amniótica, pele de cadáver humano, pele de porco, e uma grande variedade de materiais disponibilizados hoje pela moderna indústria farmacêutica através da bioengenharia de tecidos . Mas é difícil ainda prever a disponibilidade de tais materiais em quantidade suficiente para atender este item do tratamento tendo em vista outras já mencionadas necessidades de recursos igualmente urgentes nestes centros.(Jones; Currie ; Martin, 2002)

Extensa literatura mostra a pesquisa de diferentes materiais testados como curativos biológicos ou substitutos de pele temporários no manejo de pacientes queimados, incluindo pele humana oriunda dos bancos de pele, pele de porco,

membrana amniótica das placentas humanas, folhas vegetais(Gore ; Akolekar, 2003) ou mesmo outros elaborados pela bioengenharia de tecidos, tais como silicone e nylon(Biobrane™);ou com colágeno de tecidos de neonatos(Transcyte);cultura de queratinócitos autólogos (Epicel®),entre outros(Jones; Currie ; Martin, 2002; Shakespeare ; Shakespeare, 2002) (Tabela 1).

TABELA 1 – Variedade de substitutos de pele

Nome Comercial	Camadas	Custo por cm ² (R\$)
Biobrane	Silicone Malha de nylon Colágeno	2,41
Transcyte	Silicone Malha de nylon Colágeno c/ fibroblastos neonatais	39,63
Apligraf	Queratinócitos neonatais Colágeno c/ fibroblastos neonatais	71,50
Dermagraf	Ácido poliglicólico(Dexon) ou poligalactínico(Vycril) C/ fibroblastos neonatais	35,95
Integra	Silicone Colágeno e glicosaminoglican	16,71
Alloderm	Derme de cadáver de-epitelizada e acelular	29,71
Epicel	Cultura de queratinócitos autólogos	nt
Laserskin	Cultura de querat, autol.	nt
Aloenxerto de cadáver (banco de pele)	Criopreservada Liofilizada Glicerolisada	3,021

FONTE.: Adaptado de: *British Journal of Plastic Surgery* (2002), 55, 185–193)

A utilização da pele humana oriunda dos bancos de tecidos como aloenxertos depende no Brasil, da implantação de política e serviços especializados com estrutura normatizada e adequados para o controle na seleção dos doadores. A possibilidade de transmissão viral é preocupante(Kealey, 1997). São desvantagens, as possibilidades de contaminação bacteriológica e a menor vida útil do material preservado.(May; Wainwright ; DeClement, 1985).

A antigenicidade deste material é fator limitante na sua aplicação. Em função dessas dificuldades, surgiram os curativos desenvolvidos a partir de colágeno em forma de gel, esponja e filmes, e são apontados como bons materiais na promoção da cicatrização(Balasubramani; Kumar ; Babu, 2001).

A alternativa mais acessível aos países em desenvolvimento tem sido a utilização da membrana amniótica. Vários estudos demonstraram suas propriedades benéficas na cicatrização de feridas e a ação antibacteriana deste material (Ganatra ; Durrani, 1996; Mehta; Parekh; Bhatnagar ; Rai, 1983b; Eldad; Stark; Anais; Golan ; Ben Hur, 1977).

O substituto cutâneo ideal tem sido motivo de muitas formulações com o propósito de encontrar um material que mimetize as características morfológicas e funcionais da pele e que possa ser utilizado nas feridas de espessura total e parcial, assim como nas áreas doadoras de pele promovendo cicatrização rápida e eficiente. (Alsbjorn, 1992; Tavis; Thornton; Danet ; Bartlett, 1978; Stanton ; Billmire, 2002; Shakespeare ; Shakespeare, 2002; Shakespeare, 2001; Maciel et al., 2004; Settle, 1996).

Entre as propriedades ideais de um substituto de pele ressaltam-se:

- 1) não dificultar a cicatrização;
- 2) reduzir a dor;
- 3) possibilitar a troca indolor;
- 4) reduzir perdas líquidas e protéicas;
- 5) baixo custo;
- 6) a permeabilidade a água deve ser semelhante a pele normal;
- 7) facilidade de aplicação;
- 8) resistência mecânica;
- 9) impedir a colonização bacteriana;
- 10) ser atóxico, não alergênico, não carcinogênico;
- 11) não propiciar formação de quelóides;
- 12) Preparar o leito receptor de enxerto;
- 13) Não impedir movimentos articulares;
- 14) Armazenamento prolongado em perfeita conservação

A capacidade de propiciar um ambiente úmido no curativo também tem sido apontada como uma propriedade favorável a cicatrização.(Vanstraelen, 1992; Vanstraelen, 1992).

Os curativos biológicos, também denominados, substitutos de pele, podem ser classificados como temporários ou permanentes. Os permanentes são capazes

de estimular e facilitar a reparação tecidual, permanecendo integrados ao tecido regenerado. Já os curativos temporários, após exercerem seu papel estimulador da reparação tecidual, não permanecem integrados ao leito receptor exigindo remoção (Sheridan ; Tompkins, 1999).

De maneira geral esses curativos têm sua principal utilização em: (1) como curativos de áreas doadoras de pele facilitando o controle da dor e reepitelização a partir dos anexos cutâneos; (2) curativos de feridas limpas com perda de espessura parcial; (3) curativo de feridas limpas de espessura total enquanto aguarda autoenxerto propiciando ambiente mais fisiológico após excisão completa de debris e tecido desvitalizado(Sheridan ; Tompkins, 1999).

É unânime a opinião de que um substituto de pele com todas estas características não existe apesar dos incansáveis esforços de pesquisa médica. Seria impossível citar todos tipos de curativos ou substitutos de pele que são atualmente usados nas áreas doadoras. Cada um deles apresenta vantagens e desvantagens na sua aplicação, sempre na tentativa de assemelhar ao máximo à pele íntegra.

5 – O USO DA PELE DE RÃ

Rana catesbeiana é um anfíbio, originário da América do Norte, de onde os ranicultores brasileiros importaram, mais especificamente, do Canadá há 30 anos e que hoje participa de um grande comércio de exportação de carne de rã

A América do Sul exporta para os EUA cerca de 1.000.000 de animais por ano. Isso requer atenção à medidas sanitárias rigorosas exigidas pelas autoridades internacionais, exigindo a atuação de equipe veterinária capacitada no tratamento e profilaxia de doenças transmissíveis(Mazzoni, 2003).

Conforme já citado anteriormente, em textos datados de 1500 a.C. há descrição da utilização de pele de sapo no tratamento de queimaduras (papiro de Ebers, 1500 a.C. *apud in* Pruitt, Jr., 1997) . Alguns relatam aceleração no processo de cicatrização em experimentos em cobaias e estudos da biologia animal revelam vantagens em sua aplicação devida a presença de peptídeos com ação

antimicrobiana e estrutura de colágeno com potencial aplicação na bioengenharia de tecidos (Sai, 1995; Sai KP et al, 2001; Kumar KV et al, 2002).

Em 1995 Sai et al, em experimento com ratos Wistar, verificou aumento de hidroxiprolina, ácido urônico e hexosamina, no processo de cicatrização de feridas, utilizando curativo de pele de rã (*Rana tigerina*) comparado ao curativo com gazes e solução salina em grupo controle com níveis significativos indicando a necessidade de detalhamento na investigação científica do poder cicatrizante deste material atribuído pela tribo Naga (Longukmar, Y., 1992 *apud* in Sai, 1995), na Índia. Em 2001 este mesmo autor demonstrou a presença de peptídeos antimicrobianos nesta mesma espécie de anfíbios.(Sai KP et al, 2001).

Em um estudo in-vitro Giacometti e colaboradores demonstraram ação antimicrobiana de nisina e relaxina, dois peptídeos catiônicos, isolados da pele de *Rana catesbeiana*, contra muitas cepas de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MARSA), tanto quando testados isoladamente ou em combinação com amoxicilina, clavulanato de amoxicilina, imipenem, claritromicina, ciprofloxacina, rifampicina e vancomicina. Estudos clínicos futuros poderão demonstrar o efeito bactericida desses peptídeos no combate a tais infecções(Giacometti; Cirioni; Barchiesi ; Scalise, 2000).

Sobre a ação antimicrobiana da pele de rã existem vários estudos demonstrando a presença de peptídeos nas secreções cutâneas de várias espécies rana(Sai KP et al, 2001; Goraya; Knoop ; Conlon, 1998; Minn; Kim ; Kim, 1998; Clark; Durell; Maloy ; Zasloff, 1994; Sonnevend et al., 2004).

No Brasil verificamos uma literatura escassa sobre o uso deste material, e sentimos-nos motivados a pesquisar sua segurança e suas vantagens de aplicação como substituto temporário de pele em variadas situações de trauma cutâneo, seja queimadura ou outra condição de injúria ao tegumento de pele ou como curativo biológico, caracterizando-o como estimulador ou promotor da cicatrização das feridas.

Embora escassa a pesquisa deste material e sua interação com o ser humano, incluindo aspectos de biosegurança e compatibilidade, verificamos em congressos das especialidades envolvidas na questão um crescente interesse em usar este produto como curativo biológico no tratamento de feridas agudas e

crônicas. Há mesmo relatos de ampla e rotineira utilização para tratamento de queimaduras em renomados serviços especializados. (Piccolo, 2002).

Estudo em cães utilizando curativo pele de *Rana catesbeiana* em comparação a grupo controle neutro (gazes vaselinadas) em feridas causadas por queimaduras no dorso dos animais não verificou resultados benéficos neste procedimento atribuindo seus resultados a uma possível reação de rejeição, apesar de não ter realizado reações de prova cruzada de histocompatibilidade ou exames imunohistoquímicos, como considera o autor(Falcão, 2002).

Em dissertação de mestrado apresentada no Instituto de Ciências Biológica da Universidade de Brasília em 2002, Oliveira e Schwartz, demonstraram em estudo experimental com coelhos, ser o curativo com pele de rã não-oclusivo, ter boa resistência mecânica e acelerar o processo de cicatrização. Ainda neste estudo demonstrou-se que o curativo de pele de rã possui atividade antimicrobiana contra *Acinetobacter baumani*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*(Oliveira ; Schwartz, 2002).

Sendo um xenotransplante, duas preocupações advêm de seu uso, quais sejam: uma possível resposta imunológica adversa e a eventual transmissão de doenças quando usado em humanos. Cooper já externou essa inquietação sobre a utilização da pele de porco como curativo biológico e os riscos de transmissão de retrovírus endógenos do animal para o ser humano ou até mesmo de zoonoses através de bactérias e fungos, não havendo relatos científicos de transmissão espontânea de prions desta espécie . O monitoramento contínuo desses animais com controle seguro do ambiente onde são criados possibilita a utilização desse material livre de microrganismos patológicos (Cooper, 1998).

Com o advento de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes, tais como SIDA, “gripe do frango”(Influenza Aviária),”doença da vaca louca” (Encefalopatia Espongiforme Transmissível, Síndrome da Angústia Respiratória(SARS) em estreita relação com hábitos e práticas profissionais ou culturais facilitadoras em sua transmissão, surgem cuidados adicionais de biosegurança frente a proposta de utilização de material biológico no arsenal terapêutico das doenças humanas(Daszak; Tabor; Kilpatrick; Epstein ; Plowright, 2004).

Conforme expressado por Cooper quanto à utilização da pele suína como xenotransplante, não há relato de transmissão de prions pelos anfíbios, nem tampouco sobre a transmissão de bactérias e fungos, desde que obedecidas as regras de criação deste anuro estabelecidas segundo o Código de Conduta para o Desenvolvimento Sustentável e Responsável de Cultivo de Rãs (Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca/Presidência da República--SecretariaBrasil/2002).

No ano de 2001, fez-se na Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte - UQ/HRAN da Secretaria de Estado da Saúde do Distrito Federal - SES/DF, um estudo piloto utilizando xenoenxerto de pele de rã num grupo de 16 pacientes em que se verificou, clinicamente (por inspeção visual), a aceleração no reparo de feridas limpas de áreas doadoras de enxerto reduzindo-o em média para 8,8 dias comparado ao método tradicional, aquela época, com óxido de zinco em que a reparação da mesma ferida foi verificada em 2 a 3 semanas (dados não publicados apresentados no III Congresso Brasileiro de Queimaduras – P.Alegre 2001).

Diante do possível uso da pele de rã como curativo biológico no tratamento das feridas, essa promissora aplicação exigiu comprovação. Em teoria seria um produto de fácil disponibilidade, pois a criação de rã encontra no Brasil clima propício, agrega valor aos criadouros, considerando que a pele da rã não tem destinação final de produto conhecido. Partimos da hipótese, que alcançaríamos um produto (curativo) com poderes cicatrizantes, de acordo com a crença de sociedades mais antigas e primitivas, agregado de ação antimicrobiana a um custo mais baixo que os outros materiais disponíveis para este propósito. Ainda do ponto de vista econômico o produto poderá ser desenvolvido pela nossa própria indústria evitando, portanto, a importação de tecnologia e produtos.

Os produtos similares que temos no mercado alcançam preços bastante elevados como vemos em publicações recentes na literatura (Jones; Currie ; Martin, 2002; Shakespeare, 1999).

Com estes dados é clara a necessidade de se elaborar um estudo clínico específico para definir e caracterizar a utilização da pele de rã no tratamento das feridas em geral, como adjuvante no complexo processo de reparação tecidual chamado amplamente de cicatrização.

6 – A REPARAÇÃO DOS TECIDOS

Facilitar o processo de cicatrização é uma propriedade preciosa dos materiais destinados aos curativos. Objetivamente o reparo tecidual significa substituir células mortas ou recuperar células danificadas. Neste processo estão envolvidos dois mecanismos distintos (Cotran; Kumar ; Collins, 2000):

1. Regeneração, que implica em substituição das células lesadas por células do mesmo tipo, sem deixar vestígio residual da lesão anterior e;
2. Substituição por tecido conjuntivo ou fibrose, que deixa uma cicatriz permanente.

Este processo biológico é dinâmico e interativo envolvendo uma série de mediadores solúveis no líquido extra e intracelular (citosol ou nuclear), matriz extracelular e células parenquimatosas didaticamente dividido em 3 fases: inflamação, formação de tecido e remodelação.

O processo de regeneração é um processo que implica em proliferação e migração celular, estimulada por lesão, morte ou deformação mecânica dos tecidos. A replicação de células é em grande parte controlada por fatores químicos inibidores ou estimulantes, presentes no micro ambiente da área a ser reparada, regulando a população celular com interferência direta nas fases do ciclo celular e sua capacidade proliferativa (Baserga,R.;1985 *apud in* (Cotran; Kumar ; Collins, 2000))

Em relação ao ciclo celular as células do corpo humano são divididas em 3 grupos (Cotran; Kumar ; Collins, 2000) :

- Células lábeis – são células em divisão contínua; ou que estão sendo constantemente destruídas; incluem as células dos epitélios de superfície: pele cavidade oral, vagina; epitélio do intestino, trato urinário, medula óssea e sistema hematopoiético. A maioria são *células primordiais*, que tem uma capacidade ilimitada de proliferação e podem passar por várias vias de diferenciação;

- Células quiescentes – baixo nível de replicação; sofrem rápida divisão em resposta a estímulos; encontram-se na fase G₀, quando estimuladas passam a fase G₁. São as células dos órgãos glandulares do corpo, como o fígado, rins, pâncreas e as células mesenquimatosas, como os fibroblastos e músculo liso, bem como as células endoteliais vasculares.

- Células que não se dividem (permanentes) – deixam o ciclo celular e são incapazes de sofrer divisão na vida pós-natal: são os neurônios, células da musculatura esquelética e musculatura cardíaca.

Todos esses eventos do ciclo celular obedecem a vias intercelulares e moleculares, tanto ordenando o crescimento celular normal (reparação ou regeneração), quanto as aberrações nessas vias que constituem o crescimento descontrolado (câncer), ou uma variedade de respostas anormais que se traduzem em diferentes patologias(Hunter,T.;1997 *apud in* Cotran; Kumar ; Collins, 2000).

Um sistema de receptores na superfície das células, associados a moléculas que desencadeiam a ativação de vias de transdução, as quais acionam vias de transcrição e alteram a expressão gênica (os proto-oncogenes), envolvida no controle do crescimento normal. Quando ocorrem alterações na estrutura desses proto-oncogenes eles podem se transformar em oncogenes, sendo por conseguinte responsáveis pelo crescimento anormal e descontrolado que caracteriza o câncer(Hunter,T.;1997 *apud in* Cotran; Kumar ; Collins, 2000)

Existem três tipos de sinalização intercelular classificadas, com base na distância em que atua o sinal (Sporn,M.B.,Roberts,A.B.;1992 *apud in* Cotran; Kumar ; Collins, 2000):

- Sinalização autócrina - as células respondem a substâncias que elas mesmas produzem (fatores de crescimento ou citocinas);
- Sinalização parácrina – a célula produz moléculas que afetam a célula-alvo em estreita proximidade; muito comum em reparação de tecido conjuntivo, em que determinado tipo celular (macrófago) exerce seu efeito em células adjacentes diferentes (p.ex. fibroblasto);

- Sinalização endócrina – os hormônios são sintetizados (glândulas endócrinas) e exercem seu efeito em células-alvo distantes, por via hemática, p.ex.

7 - RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

As três maiores classes de receptores de superfície celular são aqueles ligados a canais iônicos, ligados a proteína-G e os ligados a enzimas.

Estes receptores são proteínas que agem como transdutores de sinais do ambiente extracelular para o interior das células que alteram seu comportamento. São ativados por substâncias sinalizadoras das funções celulares determinando em regras gerais sua sobrevivência, divisão, diferenciação ou mesmo sua morte programada, chamada de apoptose (Alberts et al., 2002).

O crescimento celular no processo de reparação dos tecidos dá-se por um agente sinalizador (em geral um fator de crescimento ou citocina), que se liga a proteínas receptoras localizadas na superfície celular, no citoplasma ou no núcleo. São receptores com especificidade de ligação a determinados ligantes. Ligação esta que ativa, através de sinais moleculares determinadas vias de transdução de sinal. Algumas delas são vias exclusivas para determinados receptores, ou família de receptores, outras são compartilhadas.

Os principais receptores de superfície celular envolvidos na proliferação tecidual são os:

1. Receptores com atividade intrínseca de cinase;
2. Receptores sem atividade catalítica intrínseca;
3. Receptores ligados à proteína G.

Estes receptores estão envolvidos com o crescimento celular através de ligação a ligantes, o que culmina com reações no citosol, enviando sinais ao núcleo

por vias de transdução de sinais. Nem sempre são vias exclusivas, podendo ser partilhadas com outras não exclusivas.

O fator de crescimento epidermal (EGF) e vários outros peptídeos relacionados a fatores de crescimento como TGF- α , anfiregulina, peptídeo derivado de macrófago semelhante ao EGF, tenascina e fator de crescimento vaccínia vírus se ligam a um receptor específico conhecido como EGF (EGFr). A identificação do receptor de EGF durante os estágios evolutivos da reparação de tecidos sugere um mecanismo direto de envolvimento deste receptor, bem como de outros conhecidos e já citados, e da via da proteína-cinase C a qual pode modular a expressão do EGFr ou sua atividade. Distribuídos numa seqüência temporal do 1^o. ao 16^o. dia de injúria e reparação o EGFr pode ser medido nas margens das feridas ou nos anexos epidérmicos das lesões parciais por imunorreação (Wenczak; Lynch ; Nanney, 1992).

Este receptor com atividade intrínseca de cinase é o principal receptor de superfície celular envolvido no processo de crescimento celular. Outros receptores descritos contribuem para esta função: os *receptores sem atividade catalítica intrínseca* e também chamados de *superfamília de receptores de citocinas*, que possuem um domínio extracelular para a ligação do ligante, uma região transmembrana e um domínio citosólico que se associa diretamente a uma ou mais tirosina cinases citosólicas, ativando-as (Ihle, J.N.; 1995 *apud in* Cotran; Kumar ; Collins, 2000); e os *receptores ligados à proteína G*, contém sete alças transmembrana e por isso também são denominados *receptores de sete alças*, participam indiretamente ativando importantes funções como receptores das quimiocinas inflamatórias, hormônios epinefrina e glucagon (Neer, E.J.; 1995 *apud in* Cotran; Kumar ; Collins, 2000)

8 – RECEPTORES COM ATIVIDADE INTRÍNSECA DE CINASE

Os fatores de crescimento epidérmico (EGF), o fator transformador de crescimento- α (TGF- α) compartilham um mesmo receptor. O “receptor EGF” representa, na verdade, um grupo de receptores com atividade tirosina cinase que respondem ao EGF, TGF- α e outros ligantes da família EGF (Carpenter G, 2000 *apud* in Kumar; Abbas ; Fausto, 2005)

O receptor do EGF (EGFR), também chamado de HER (human epidermal receptor) ou c-erbB1, foi o primeiro receptor descrito a possuir atividade tirosina cinase e uma superfamília foi descrita a partir de então, caracterizada por um domínio extracelular para ligantes, uma única região transmembrana e um domínio citosólico, que podem exibir atividades tirosinoquinases, e outras poucas ações de exceção, as quais são requeridas para funções celulares. A partir de sua ativação, por um processo de dimerização desses sítios, seguidos de autofosforilação do receptor, uma cascata de respostas celulares, por vias ainda não muito bem definidas, sinalizam o comprometimento irreversível da célula na fase S do ciclo celular, resultando em última análise em ações que incluem proliferação, migração e diferenciação celular (Wells, 1999).

9 – TRANSDUÇÃO DE SINAL

Os sinais extracelulares captados por receptores na superfície da célula são então convertidos pelos sistemas descritos até aqui em sinais intracelulares. Redes de proteínas cinases seqüenciais estão envolvidas na regulação destes sinais intracelulares gerando respostas específicas: sistema de proteína-cinase ativada por mitógeno (MAP-cinase), a PI-3-cinase, o inositol-lipídio (IP3), o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e o sistema de sinalização JAK/STAT (Wilkinson M.G., 2000; Aaronson D.S., 2002; Levy D.E.; 2002 *apud* in Kumar et al., 2005)

O resultado desta cadeia de eventos seqüenciais de sinais intracelulares altera proteínas alvo, as quais alteradas modificam o comportamento das células determinando alterações no seu metabolismo, na sua expressão gênica ou ainda

na forma e movimentos da célula. São chamados de segundo mensageiros, já que os primeiros são os que alcançam a superfície da célula (Alberts et al., 2002).

A MAP-quinase é uma das vias mais importantes envolvidas na sinalização dos fatores de crescimento. A sua ativação completa requer a fosforilação de dois radicais: tirosina e treonina. A proteína quinase que tem essa função específica é denominada MAP-quinase-quinase (chamada de MEK), que por sua vez é fosforilada por uma outra enzima catalisadora formada por um componente de 3 módulos denominada Raf (MAP quinase-quinase-quinase). Esta última é ativada por ação da Ras, uma super família de GTPases monoméricas. A ligação de um fator de crescimento ao sítio ligante do receptor de tirosinoquinase na superfície da célula, determina sua dimerização e consequente fosforilação seguido de ligação de uma série de proteínas adaptadoras (proteínas GRB-2) no compartimento citosólico da célula, acoplando-se a proteína Ras na forma GDP (forma inativa) e ativando-a para forma GTP (Ras ativa), a qual inicia ativação de toda a cascata das MAP-quinases (Cotran; Kumar ; Collins, 2000; Alberts et al., 2002).

Uma vez ativada a Map-quinase (denominada agora de MAP quinase distal ou ERK) é translocada para o núcleo e também por fosforilação de fatores de transcrição (os quais contêm domínios de ligação ao DNA permitindo o acoplamento de seqüência curta do DNA) que regulam a proliferação celular. Dentre os fatores transcricionais que fazem tal regulação estão os produtos de vários genes que promovem o crescimento celular, como c-MYC e c-JUN e genes inibidores do crescimento celular, como o p53 (Ryan KM et al; 2001 *apud* in Kumar et al., 2005).

Para ativações mais rápidas, que não requerem a síntese de novos fatores transcricionais existem reações que formam a proteína ativadora-1 (AP-1) do fator de transcrição, formadas a partir da dimerização dos produtos das proto-oncogenes c-FOS e c-JUN (Shaulian E; 2001 *apud* in Kumar et al., 2005)

Existem evidências de que nas queimaduras ocorrem expressão aumentada dos proto-oncogenes c-FOS, c-MYC e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) correlacionando a expressão gênica com fases importantes da cicatrização (Fu et al., 2003)

Outras vias são importantes no desenvolvimento e crescimento celular. Os fatores de crescimento quando acoplam em seus receptores na superfície celular podem enviar outros sinais como, por exemplo, a ativação da via da PI-3-cinase (via da fosfoinositídeo-3-cinase), que está correlacionada com a sobrevivência celular, como aumento da síntese de glicogênio. Ou a ativação da via do Inositol-lipídio através da ativação dos receptores de proteína-G (sete alças), os quais ativam a proteína-cinase C, fosforilando uma série de componentes celulares importantes para o crescimento e metabolismo celular. A ligação de hormônios ou de quimiocinas ao receptor de proteína G (sete alças) podem determinar níveis aumentados de cAMP, que após ativarem a proteína-cinase A estimulam a expressão de genes-alvo. A superfamília de receptores de citocina sem atividade intrínseca de cinases ativa as chamadas Janus-cinase (JAK), os quais ativam proteínas citosólicas distais (STAT) com poderes de atuação sobre fatores de transcrição, correlacionando o sistema JAK/STAT como mediadores de respostas funcionais (Cotran; Kumar; Collins, 2000).

10 - FATORES DE CRESCIMENTO ENVOLVIDOS NA CICATRIZAÇÃO DAS FERIDAS

Junto com outros elementos definidos como "sinais" no local de injúria tissular, ou da arquitetura dos tecidos, ocorre migração imediata de plaquetas ativadas.

Os fatores de crescimento são substâncias biologicamente ativas que surgem na etapa macrofágica da fase inflamatória do processo cicatricial. São definidos como polipeptídeos produzidos pelas células com a finalidade de transmitir mensagens intercelulares (Bose, 1979).

Existem 5 famílias de fatores de crescimento (FC) investigados até o momento com papel importante na cicatrização das feridas. São eles: fator de crescimento epidermal (EGF-epidermal growth factor); fator de crescimento transformador B (TGF β -transforming growth factor-beta); fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-insulin like growth factor); fator de crescimento derivado

das plaquetas (PDGF-platelet derived growth factor) e; fator de crescimento fibroblástico (FGF- fibroblast growth factor) (Sheridan ; Tompkins, 1999).

Na cicatrização das feridas ocorre uma coordenação precisa de migração e proliferação de células, tecido conjuntivo e angiogênese. Isto requer a participação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais. Vários fatores de crescimento e seus receptores são ativados e aceleram a cicatrização das feridas. Na proliferação e migração de queratinócitos os mais importantes fatores de crescimento envolvidos são a família do EGF, incluindo o fator transformador de crescimento alfa (TGF- α), fator de crescimento epidermal ligado a heparina (HB-EGF), epiregulina e amfiregulina. São produzidos e secretados por queratinócitos e agem como fatores de crescimento autócrinos. Existem evidências de que nas queimaduras ocorre a expressão aumentada dos protooncogenes c-fos , c-myc e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) correlacionando a expressão gênica com fases importantes da cicatrização(Fu et al., 2003)

Em estudos sobre curativos biológicos com cultura de células alógenas conclui-se que o chamado efeito do curativo biológico (so-called biological dressing effect) é mediado pela produção de fator de crescimento epidermal (EGF) e sua família(Shirakata; Tokumaru; Yamasaki; Sayama ; Hashimoto, 2003; Somers et al., 1996).

Quando as feridas de espessura parcial sofrem um processo de reepitelização das suas margens ou das glândulas sudoríparas e folículos pilosos restantes, tem sido aceito que os receptores de EGF estão presentes, ou participam do processo de proliferação celular como parte integrante do processo de cicatrização(Wenczak; Lynch ; Nanney, 1992). Li et al, mostrou em estudo consistente, que a expressão de receptores de EGF depende da expressão de protooncogenes c-jun na liderança do efeito margem de cicatrização(Li et al., 2003).

Em animais adultos o EGFr tem sido postulado como importante no reparo epitelial, com dois alvos principais: proliferação e migração celular. Com evidências quantitativas do EGFr na ferida temos a sinalização da ocorrência de proliferação e migração celular. O estudo do EGFr na reparação dos tecidos pode ajudar na

avaliação de novos produtos com esse fim na indústria farmacêutica(Wells, 1999; Schulz; Davis ; Eiferman, 1988).

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi apresentado ao Conselho de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília em 15 de Maio de 2004 recebendo aprovação para sua execução em 1º de Julho de 2004 (anexo 1).

Foi realizado em pacientes devidamente consentidos e internados na Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte, pertencente a Secretaria de Estado de Saúde do Governo do Distrito Federal entre 18 de Agosto de 2004 e 02 de Fevereiro de 2005.

PACIENTES

Foram selecionados por adesão voluntária 24 pacientes, vítimas de queimaduras e internados na Unidade de Queimados do Hospital Regional da Asa Norte, a serem tratados com enxertos de pele.

Um grupo de 16 pacientes tiveram suas áreas doadoras tratadas com curativo de pele de rã. Denominado de grupo de estudo foram 10 do sexo masculino e 6 do sexo feminino, com média de idade de 37,6 anos (variando entre 16 e 63 anos), com área corporal queimada(ACQ) média de 12,8% (variando entre 1 a 32 %ACQ). Os agentes etiológicos neste grupo foram fogo-chama direta (8), gasolina(3), álcool(2) e líquido viscoso(1).

O grupo controle foi metade do grupo de estudo, 8 pacientes, com suas áreas doadoras de enxertos tratadas com curativos com gazes tipo Rayon, esterilizadas e untadas com vaselina. Foram 6 pacientes do sexo masculino e 2 de sexo feminino, com média de idade de 38,7 anos (variando entre 27 e 51 anos). Área corporal média de 10,37% (máxima de 40% e mínima de 3%). Os agentes responsáveis pelo trauma térmico foram álcool(4), eletricidade(2), chama direta(1) e líquido quente(1).

Crítérios de Inclusão: para participarem como voluntários na pesquisa os pacientes necessitavam de (1) estarem internados na Unidade de Queimados do HRAN para tratamento da fase aguda de queimaduras por diferentes agentes etiológicos, em condições clínicas de realização de cirurgia para autoenxerto de pele, conforme rotina do serviço ;(2) com área corporal queimada (ACQ) entre 1 e 60% da superfície corporal total; (3) áreas doadoras de primeira doação (virgens de

cirurgia anterior no mesmo local escolhido para estudo) e (4) idade entre 12 e 65 anos.

Crêterios de exclusão: foram excluídos como voluntários os pacientes com (1) doenças degenerativas cutâneas e/ou sist micas que reconhecidamente interferem no tempo de cicatrização (Diabetes Melitus, Doença vascular, colagenose, desnutrição, e sepse sist mica) ou problemas locais específicos em áreas de doação de pele tais como infecções e alergias., (2) pacientes que viessem a apresentar reações adversas ao uso do curativo com pele de r  (curativo teste) ou desistência voluntária durante a pesquisa.

Foram incluídos 24 pacientes, sendo 16 constituindo o grupo de estudo com curativo com pele de r  e 8 pacientes no grupo controle recebendo curativos com gazes rayon vaselinadas. Foi um estudo aberto, não foi utilizado nenhum critério de randomização na escolha dos participantes.

ÁREAS DOADORAS DE AUTOENXERTO E BIÓPSIAS

Considerando que o objetivo do estudo era averiguar ação cicatrizante através de comparação do curativo com gaze rayon vaselinada (método convencional)-grupo controle - com o novo curativo com pele de r  – grupo de estudo, escolhemos as áreas doadoras de pele parcial para autoenxerto, por ser considerada uma área limpa e de espessura de lesão homog nea, sofrendo menor interferência de fatores locais perturbadores da cicatrização

Os enxertos foram retirados com dermatomo manual (tipo faca de Humby, marca Richter) conforme técnica habitual e nestas áreas, conforme o grupo pertencente, os curativos eram realizados seqüencialmente com o mesmo curativo inicialmente eleito (gaze rayon ou pele de r ) até ser alcançada a reepitelização.

As biópsias foram colhidas com punch de 5mm de metal , esterilizados em autoclave, nas margens da ferida. Os fragmentos foram tingidos com tinta Nanquim na sua face dérmica, para facilitar identificação da mesma após inclusão em parafina.

Após a coleta eram acondicionadas em frascos com solução de formol 10% e identificadas segundo nome, data da biópsia e número de seqüência (1  e 4  biópsia).

Foram realizada biópsias no dia da retirada do autoenxerto (1º dia) e seqüencialmente entre 3º e 5º dias; 6º e 8º; 9º e 12º, sendo respectivamente denominados grupos B1, B2, B3 e B4.

CURATIVOS COM GAZE

Os curativos com gazes rayon foram preparados em embalagem cirúrgica (grau cirúrgico) e esterilizadas em autoclave. Na hora de aplicar são untadas com vaselina e aplicadas sobre a área doadora de pele e coberto com coxins de algodão e enfaixados com faixa crepom.

CURATIVOS COM PELE DE RÃ

As peles de rã são oriundas de ranário especializado em cultivo deste anuro para obtenção de produtos e subprodutos de qualidade seguindo o “Código de Conduta Responsável de Cultivo de Rãs”, documento elaborado pela Secretaria de Aquicultura e Pesca da Presidência da República (SEAP/PR) em 2002 (anexo 2).

A obtenção da pele é feita através de animais sadios que são abatidos em moderna instalação de processamento industrial, sendo fiscalizada pelo órgão de Inspeção Federal que avalia tanto a carne quanto os subprodutos (peles, cordões e material adiposo).

A pele é retirada manualmente e após o descarte, é devidamente sanificada e sofre um processo de osmose. O material é untado com óleo, obtido dos corpos gordurosos do próprio animal e transferido para uma estufa a 38°C, após etapa de desidratação passa por uma nova seleção. Os espécimes selecionados são acondicionado em embalagens plásticas seladas e esterilizadas por radiação Gama (20KG γ), conforme normas da empresa EMBRARAD licenciada pela Comissão de energia Nuclear e Ministério da Saúde, estando prontas para a utilização (anexo 3).

No momento do curativo procede-se a rehidratação com soro fisiológico 0,9% por 5 a 10 minutos.

TESTES REALIZADOS

Histologia – o material a ser examinado após fixado em formol a 10%, incluído em parafina e seccionado em micrótomo rotativo na espessura de 5 μ m. As secções foram coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina e examinadas em microscópio óptico Carl Zeiss por um único patologista.

A morfologia da reação inflamatória e do epitélio presente foi descrito quantitativamente conforme escala abaixo:

Epi 0 - Ausência de epitélio

Epi 1 - Esboço de epitélio: uma ou duas camadas de células epiteliais regeneradas

Epi 2 - Epitélio em maturação: espessura com predomínio das camadas basal e para-basal

Epi 3 – Maduro: desenvolvimento completo do epitélio

Hpe - Hiperplasia pseudoepiteliomatosa: proliferação das células epiteliais com alongamentos das cristas epiteliais: Tipo 1: discreta. Tipo 2: moderada. Tipo 3 acentuada (indistinguível do Ca epidermóide)

Dpj - Papila dérmica constituída por conjuntivo constituído, predominantemente por colágeno tipo III (tipo embrionário)

Ri 0 – Reação inflamatória: ausência

Rea – Reação Inflamatória exsudativa aguda: exsudação predominante de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos - + (discreta); ++ (moderada); +++ (acentuada) –

Rec – Reação Inflamatória exsudativa crônica: exsudação predominante de células mononucleares - + (discreta); ++ (moderada); +++ (acentuada)

Rcg – Reação Inflamatória crônica granulomatosa: exsudação predominante de células mononucleares associada à presença de células gigantes - + (discreta); ++ (moderada); +++ (acentuada)

Abs - Abscesso: coleção de leucócitos polimorfonucleares neutrófilos íntegros e desintegrados

Eos – Exsudação de Eosinófilos - + (discreta); ++ (moderada); +++ (acentuada)

Imunohistoquímica – para os testes de imunorreação foi utilizado anticorpo anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor, Clone H11, Code Nº M3563, LOT Nº 091, produzido pela DAKO CORPORATION, USA.. A técnica utilizada foi a de

imunohistoquímica em tecidos incluídos em Parafina (Técnica Básica) utilizando Kit estreptoavidina Peroxidase conforme a seqüência de 1 a 11 que se segue:

1. Procedimento inicial: Organizar um mapa especificando as reações a serem realizadas.

2. Hidratação das lâminas : desparafinizar as secções em banho de xilol (Eco-k) na estufa a 37° durante 15 minutos e continuar a desparafinização em outro banho de xilol (Eco-k) à temperatura ambiente, também durante 15 minutos. Hidratar as secções em quatro banhos de Álcool (álcool absoluto, álcool a 95%, 90%, 80%) e, sem passar em água, levar as secções diretamente para o bloqueio da peroxidase endógena.

3. Bloqueio da peroxidase endógena: Água Oxigenada a 3%, três banhos de 10 minutos cada, com troca da solução após cada banho. Observação: em cuba da bateria, preparar solução de Água Oxigenada a 3% (equivalente à Água Oxigenada de 10 volumes).

Solução de Água Oxigenada: Água Oxigenada(Peróxido de Hidrogênio a 30%(51ml) e Água Destilada (460ml)

4. Pré-tratamento da lâminas: as lâminas serão distribuídas em suportes plásticos e colocadas no Vaporizador (Steamer, marca T-Fal) imersas em solução de Tampão Citrato pH 6 ou Tampão EDTA aos pH 8 ou 9 – de acordo com a exigência requerida pelo tipo de anticorpo primário utilizado – a 97° C, durante 30 minutos. Fora do vaporizador, deixar esfriar as secções ainda dentro da solução utilizada por, aproximadamente, 15 minutos.

Tampão de Citrato, 10 mM,pH 6: Ácido Cítrico, monohidratado (2,1g) e Água Destilada (1000ml).

Tampão de EDTA, 10mM,pH8 (para CD-4): Etilenodiaminotetraacetato de Sódio (EDTA) (1,86g), Água Destilada (5.000ml) e NaOH2N (2 a 2,5ml); ajustar pH com NaOH ou HCl 1N.

Tampão de EDTA/TRIS,pH 9,9: Etilenodiaminotetraacetato de sódio (EDTA) (0,3722g); Tampão Tris 0,1MpH 9,5 (1,211g); Água Destilada (1.000ml) e ajustar pH pR 9,9.

5. Reagentes Primários : As lâminas serão distribuídas sobre espumas de borracha, umedecidas com água, que são acondicionadas em cubas plásticas dotadas de tampas. Lavar cada lâmina com TBS. Secar as lâminas,

cuidadosamente com lenço de papel e retirar o excesso de Tampão TBS que está sobre as secções e gotejar sobre elas os Reagentes Primários, previamente diluídos, seguindo o mapa. Deixar por toada noite, na geladeira.

6.Reagente Secundário (Kit Dako K-0690-LSAB+): Lavar cada lâmina com TBS. Retirar das lâminas, cuidadosamente com lenço de papel o excesso de Tampãp TBS, gotejar o Reagente Secundário (frasco amarelo do Kit LSAB+) o suficiente para cobrir toda a secção. Incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente.

7.Reagente Streptoavidina Peroxidase (Kit Dako K-0690): lavar cada lâmina com TBS. Retirar das lâminas cuidadosamente co lenço de papel o excesso de Tampão TBS, gotejar o Reagente Stretoavidina Peroxidase (Frasco vermelho do Kit LSAB+) o suficiente para cobrir toda a secção. Incubar durante 30 minuto à temperatura ambiente.

8.Preparo da Solução de DAB líquido (K-3466): 3,3"- Diaminobenzidine (DAB) – 1 gota; Tampãp que acompanha Kit DAB líquido- 1ml; e homogenizar.

9 Solução DAB: Lavar cada lâmina com TBS.retirar das lâminas, cuidadosamente comlenço de papel o excesso de Tampão TBS e gotejar a Solução DAB o suficiente para cobrir toda a secção. Incubar durante 10 minutos.

10 Hematoxilina: Retirar as lâminas das Bandejas de Coloração, coloca-las em cuba papra coloração e lava-las em água corrente. Colocar na cuba para coloração Hematoxilina de Harris. Deixar 20 segundos. Lavar, em seguida, com Água Amoniaca e, a seguir, com água corrente.

11 Montagem das lâminas: Desidratar, diafanizar e montar as lâminas com Resina Sintética – Entellan.

Os resultados da imunohistoquímica foram analisado por um único patologista e classificados conforme legenda que se segue: Não foi possível mascarar a análise do patologista pela evidência ou não da pele de rã à microscopia que já identifica ao qual grupo pertence o material em exame

Quantificação da pesquisa de EGFR:

0 – ausência de imunorreatividade em padrão membrana em mais de 90% das células;

+ - imunorreatividade discreta, em padrão membrana – quase imperceptível – , em mais de 10% das células;

++ - imunorreatividade discreta a moderada, em padrão membrana, em mais de 10% das células;

+++ - imunorreatividade intensa e completa, em padrão membrana, em mais de 10% das células.

Obs. Positividade acrescida da letra “b” significa positividade em nível de células basais.

ANÁLISE ESTATÍSTICAS

Para todos os cálculos e gráficos estatísticos utilizamos o GraphPad Prism version 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA – www.graphpad.com).

Por ser a amostra muito pequena e diferenças de tamanho das amostras (Grupo Pele de Rã com 16 pacientes e Grupo Gaze Rayon com 8 pacientes) utilizamos para análises estatísticas para comparação entre os dois grupos valores percentuais em tabela de contingência, considerando significante valores $p < 0,05$. Com esse objetivo realizou-se teste de Fischer com “p” bidirecional para estudo do crescimento epitelial (Gráfico 2) e teste do Quiquadrado (“for trend”) para análise comparativa da imunorreação com anti-EGFr entre os dois grupos(Gráfico 3)

Para análise conjunta entre os dois grupos (estudo e controle), em todos os tempos de cicatrização foi utilizado o teste ANOVA (one-way),

Para análise da intensidade de marcação do EGFr no Grupo Pele de Rã, utilizou-se teste de variância simples (“One-way Analysis of Variance”) – ANOVA (Gráfico 4).

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na Tabela 2 estão dispostos os resultados quantitativos de todos os testes histológico e imunohistoquímico, dividindo-os por grupos de biópsias seriadas conforme legenda explicativa em rodapé da referida tabela abaixo.

Tabela 2: Resultados da quantificação de Histologia e Imunohistoquímica entre curativo com PR e GR nos 4 grupos de biópsias (B1,B2,B3 e B4)

Grupos	Métodos	Resultados	B1	B2	B3	B4	Total (-B1)	
Pele de Rã	Histologia	Epi 0	16	3	2	0	5	
		Epi 1	0	9	3	1	13	
		Epi 2	0	2	10	7	19	
		Epi 3	0	0	1	7	8	
		Total	16	14	16	15	45	
	Imunohistoquímica	Egf 0	16	3	0	0	3	
		Egf 1	Egf 1	0	8	13	13	34
			Egf1b	0	0	1	1	2
		Egf 2	Egf 2	0	0	0	1	1
			Egf2b	0	0	0		0
		Egf 3	0	0	0	0	0	
		Total	16	11	14	15	40	
Gaze	Histologia	Epi 0	8	3	2	0	5	
		Epi 1	0	3	4	2	9	
		Epi 2	0	1	2	6	9	
		Epi 3	0	0	0	0	0	
		Total	8	7	8	8	23	
	Imunohistoquímica	Egf 0	8	0	0	2	2	
		Egf 1	Egf 1	0	4	4	5	13
			Egf1b	0	0	0	0	0
		Egf 2	Egf 2	0	0	0	0	0
			Egf2b	0	0	2	1	3
		Egf 3	0	0	0	0	0	
		Total	8	4	6	8	18	

Legenda: Quantificação do epitélio : **Epi0**-ausência de epitélio; **Epi1**-esboço de epitélio (uma ou duas camadas de células epiteliais regeneradas); **Epi2**-epitélio em maturação (espessura com predomínio das camadas basal e parabasal); **Epi3**-maduro (desenvolvimento completo do epitélio). Quantificação da imunorreacção : **Egf0** – ausência de imunorreatividade am padrão membrana em mais de 90% de EGFR células; **Egf1**-imunorreatividade discreta, em padrão membrana em mais de 10% das células; **Egf2**- imunorreatividade discreta e moderada, em padrão membrana, em mais de 10% da células . A letra “b” em Egf1 e Egf2 significa positividade em nível de células basais. **B1**(biópsias no dia da lesão);**B2**(biópsias entre 3º e 5º dia);**B3**(biópsias entre 6º e 8º dias);**B4**(biópsias entre o 9º e 12º dias)

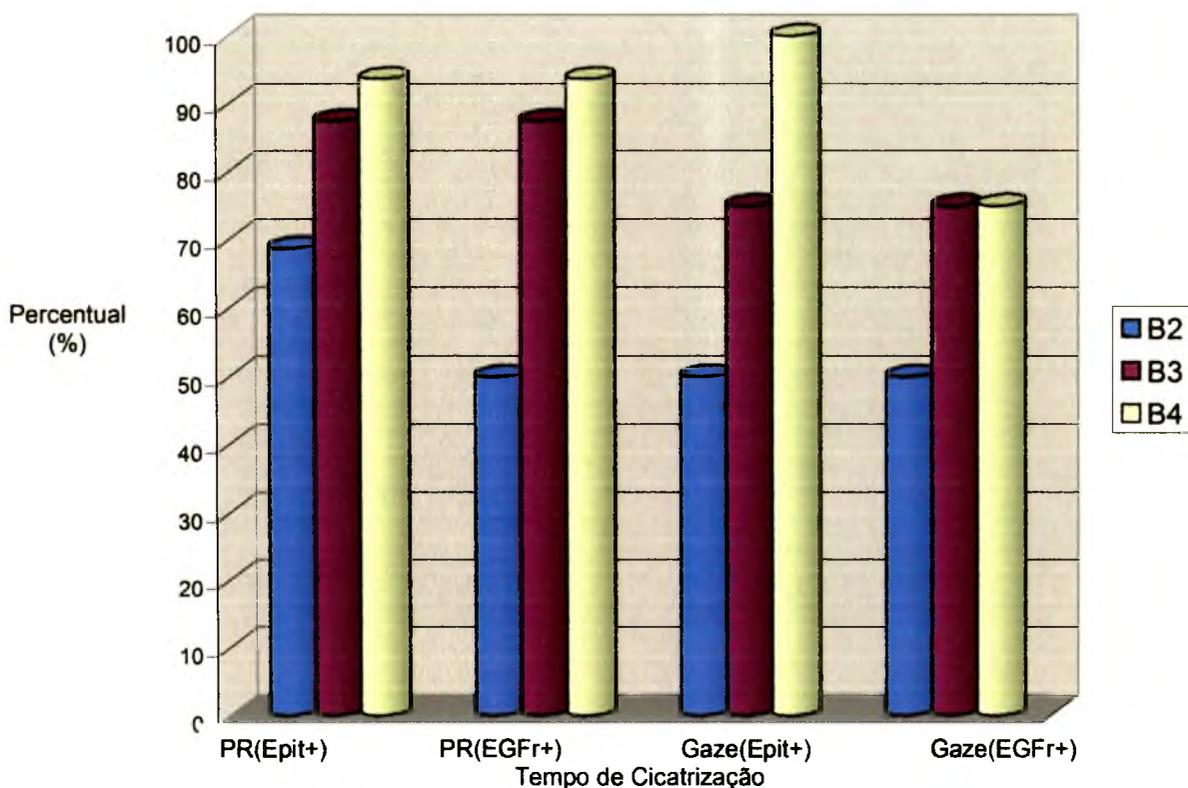
Nota: No Grupo Pele de rã, coluna B2, 2 biópsias foram prejudicadas não sendo realizados testes. Na coluna B2 do Grupo Gaze 1 biópsia foi prejudicada. Na coluna B4 não foi colhida a 4ª biópsia, resultando em 15 biópsias Observe que nos grupos em que não houve crescimento de epitélio (Epi0), não há conseqüentemente marcação imunohistoquímica justificando número menor de resultados na linha dos totais destes testes, além de se considerar as biópsias prejudicadas conforme relatadas.

1 – Análise Histológica

Em geral a histologia mostrou crescimento de epitélio regenerado tanto no grupo de estudo (Grupo Pele de Rã-PR), quanto no grupo controle (Grupo Gaze Rayon –GR).

Ao fazermos análise estatística pelo método ANOVA (Two-way), quando se compara a distribuição percentual do crescimento epitelial e imunorreação do grupo Pele de Rã versus o grupo Gaze Rayon entre todas as séries de biópsias (B2, B3 e B4), não se verifica valor significativo ($p < 0,15$), mas revela $p < 0,0013$ entre os tempos diferentes de cicatrização (B2, B3 e B4) do mesmo grupo (Gráfico 1).

GRÁFICO 1 -DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL(%) DE CRESCIMENTO DE EPITÉLIO E IMUNORREAÇÃO COM EGFr ENTRE PELE DE RÃ E GAZE



Observando as figuras 2 e 3 podemos verificar um exemplo dessa diferença entre 2 biópsias com o mesmo tempo de evolução (8 dias) dos dois grupos de estudo, evidenciando uma diferença histológica evidente de regeneração e mostrando epitélio maduro na ferida tratada com curativo de pele de rã, enquanto a biópsia tratada com gaze apenas esboça a formação de epitélio, mas estatisticamente não revelou se significativa.

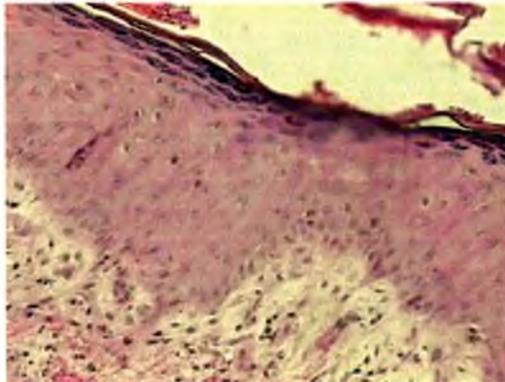


FIGURA 1 – Seção histológica de biópsia de ferida tratada com curativo com PR com 8 dias de evolução mostrando epitélio regenerado maduro (Epi3) com 1/3 superior e médio da derme (epitélio completo) e restos de pele de rã na superfície.

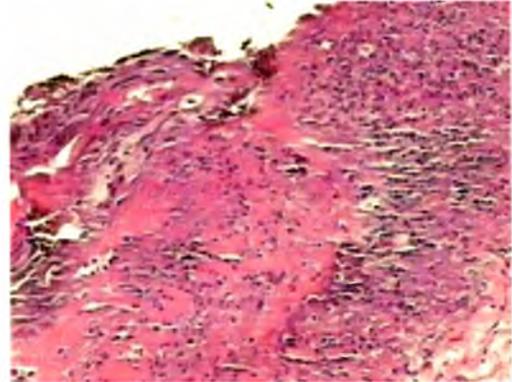
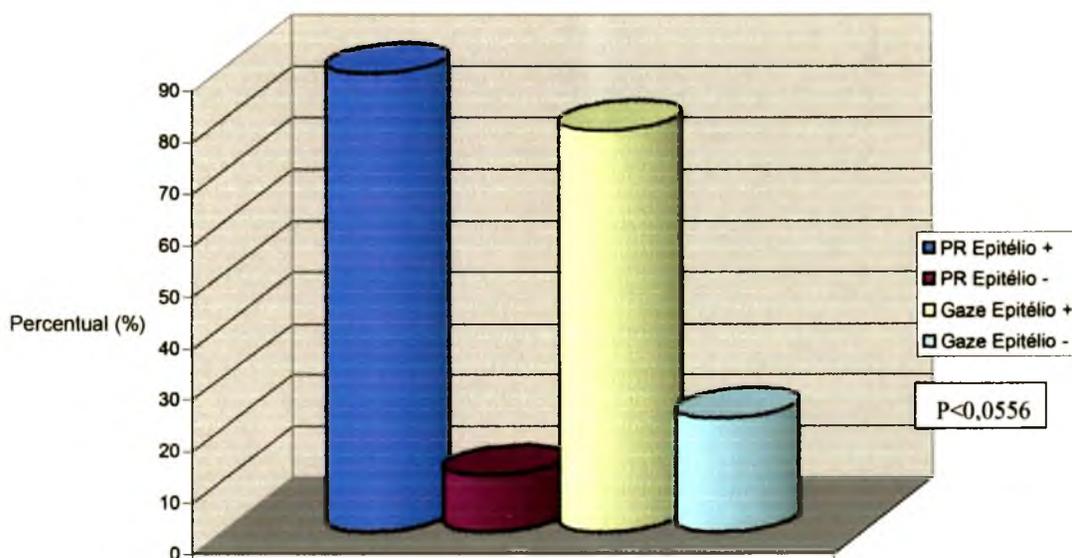


Figura 2 – Seção histológica de biópsia de ferida tratada com GR com 8 dias de evolução mostrando apenas esboço de epitélio (Epi1) e fibrina (exsudato pseudo-membranoso)

Ao compararmos o percentual de crescimento epitelial entre o grupo PR e GR com teste de Fischer considerando o valor de 0,05 para “p” bicaudal, as diferenças observadas não são significantes. (Gráfico 2).

GRÁFICO 2 - COMPARAÇÃO PERCENTUAL DE CRESCIMENTO DE EPITÉLIO ENTRE PELE DE RÃ E GAZE RAYON



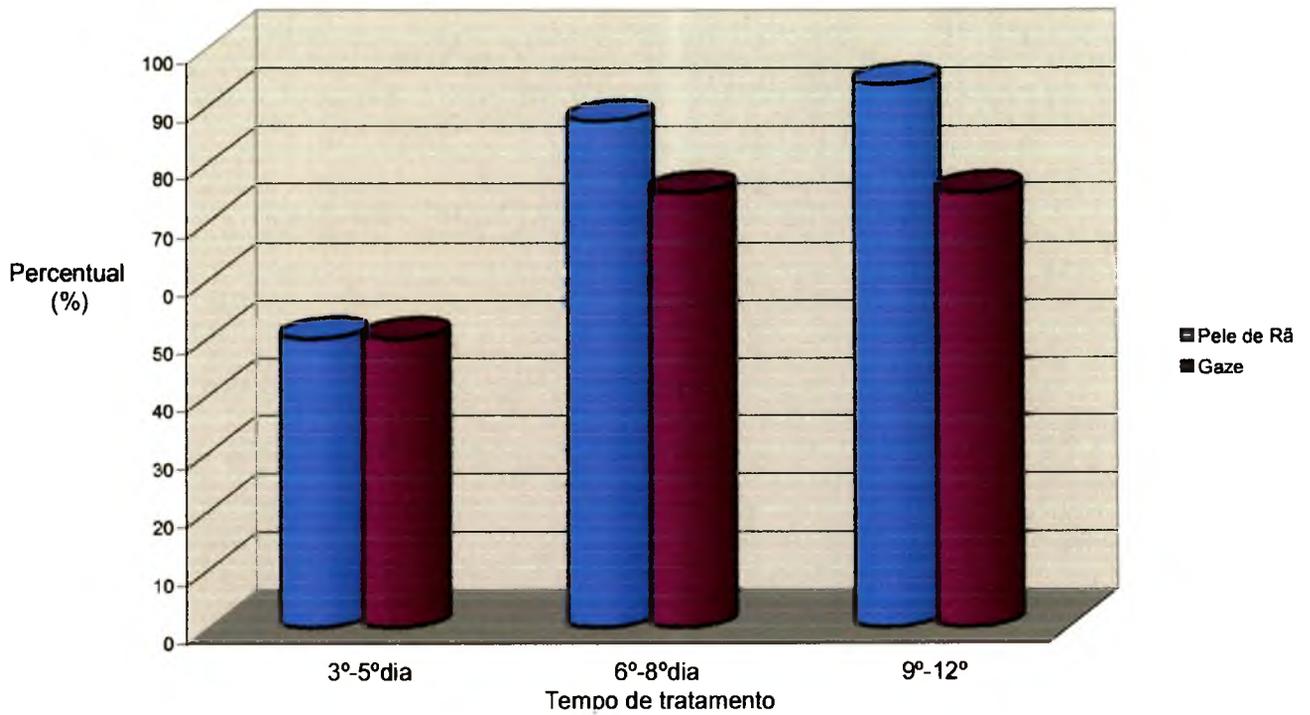
Apesar de diferenças isoladas observadas entre as biópsias, estatisticamente o crescimento de epitélio entre o grupo tratado com Pele de Rã não demonstrou diferença significativa em relação ao grupo tratado com Gaze Rayon, O mesmo se verificou em relação entre àqueles em que não houve crescimento epitelial, com valor $p=0,0556$.

2 – ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA COM ANTI_RECETOR DE EGF (anti-EGFr)

Não houve marcação intensa utilizando o anti-EGFr, e aqui também não se verifica diferença significativa entre os grupos Pele de Rã quando comparado com o grupo Gaze Rayon.

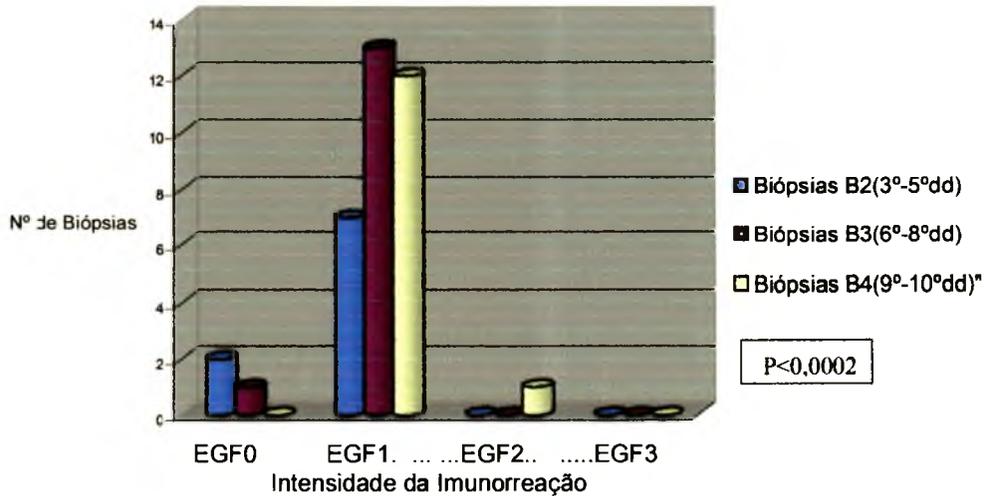
Ao analisarmos com teste Quiquadrado (“Quisquare for trend”) para verificar se há diferença significativa ($\alpha < 0,05$), mesmo com a fraca marcação do EGFr, observa-se $p=0,3899$, considerado não significativo (Gráfico 3).

GRÁFICO 3 - DISTRIBUIÇÃO PERCENTUAL DA IMUNORREAÇÃO (EGFr) POSITIVA ENTRE PELE DE RÃ E GAZE RAYON



Verifica-se que a marcação com EGFr teve uma expressão de discreta intensidade, concentrando-se expressivamente em EGF1 – Gráfico 4.

GRÁFICO 4 – INTENSIDADE DE MARCAÇÃO DO EGFr no GRUPO PELE DE RÃ



Este gráfico (ANOVA One way) apenas nos mostra que a expressão da imunomarcção com EGFr ocorreu principal e quase que exclusivamente em EGF1, ou seja de fraca intensidade quando comparada entre os diferentes tipos de marcação: com valores de p diferenciados:

- EGF0 vs EGF1 p<0,001 (s) s(significante)
- EGF0 vs EGF2 p>0,05 (ns) ns(não sigificante)
- EGF0 vs EGF3 p>0,05 (ns)
- EGF1 vs EGF2 p<0,001 (s)
- EGF1 vs EGF3 p<0,001 (s)
- EGF2 vs EGF3 p>0,05 (ns)

Os resultados significantes (s) são apenas quando comparados com EGF1, reforçando a expressiva imunomarcção de fraca intensidade em todas as biópsias.

Quando se compara as quantificações de imunomarcção entre os dois grupos (Pele de Rã versus Gaze Rayon) não encontramos diferença significativa, expressando o grupo gaze o mesmo padrão de marcação que o grupo Pele de Rã. Resultado este evidenciado no Gráfico 1.

A imunorreação mais predominante foi do tipo discreta conforme mostra a figura 3 a seguir. As outras imunorreações foram caracterizadas como ausentes ou moderadas conforme mostram as figuras 4 e 5 logo abaixo. Não houve uma marcação intensa.



Figura 3 – esse tipo discreto de imunorreação foi o que predominou nos 2 grupos, sem diferença significativa entre os dois curativos(EGF1)

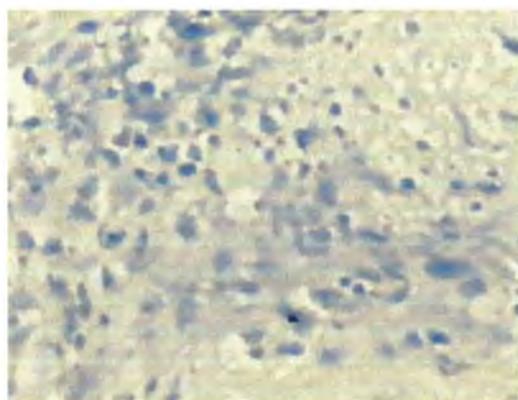


Figura 4 – ausência de imunorreação (EGF0)



Figura 5 – imunorreação moderada (EGF2)

4 – ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

TABELA 3 – Quantificação da resposta inflamatória

Intensidade da Resposta Inflamatória	Rea		Rec		Rcg	
	PR	Gaze	PR	Gaze	PR	Gaze
+	9	4	25	12	1	1
++	4	4	4	0		
+++	4	1	0	0		
Grupos	PR	Gaze	PR	Gaze	PR	Gaze

Verifica-se uma típica resposta inflamatória ao trauma com fase aguda e crônica (Tabela 3). O predomínio de reação inflamatória exsudativa crônica (Rec) em maior número na tabela justifica-se pelo tempo de avaliação que se estendeu até 12 dias pós-trauma, predominando leucócitos polimorfonucleares neutrófilos mais comuns no sítio de injúria a partir do 2º a 3º dias (Figura 6).

Curiosamente surge nas últimas biópsias (8º-12º dias) a presença de papila dérmica constituída por colágeno tipo III, também nos dois grupos (Figura 7).

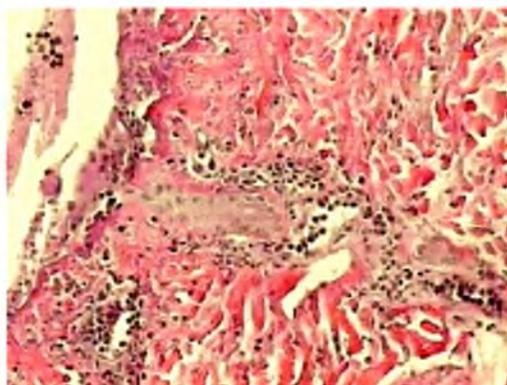


Figura 6 – reação inflamatória exsudativa crônica (Rec) com predomínio de células polimorfonucleares da fase crônica da inflamação

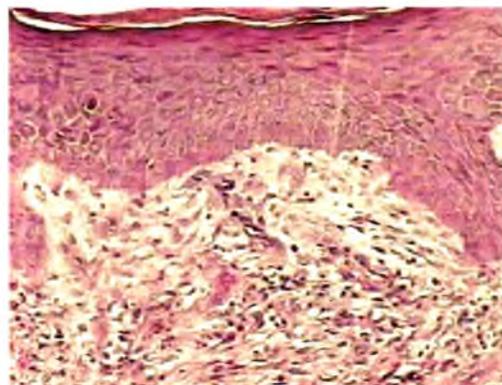


Figura 7 – presença de epitélio neoformado com derme papilar jovem com colágeno tipo III

Em apenas uma lâmina do exame histológico do grupo pele de rã observa-se uma formação de abscesso com células polimorfonucleares desintegradas (Figura 8), sem manifestação clínica de infecção.

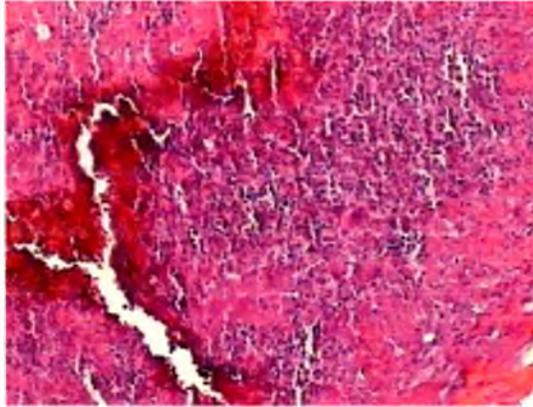


Figura 8 – tecido epitelial com formação de abscesso. Polimorfonucleares desintegrados.

Nas lâminas com curativo de pele de rã verificou-se o epitélio humano neoformado e na margem superior do mesmo a presença evidente do epitélio residual do anfíbio que constitui o curativo aplicado (Figura 9). Nota-se a pouca reação inflamatória no tecido humano à presença do curativo com pele de rã.

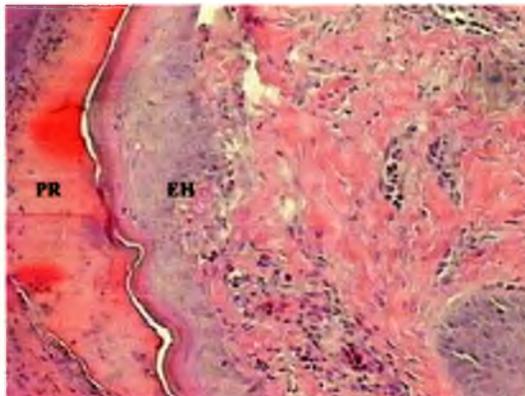


Figura 9 – epitélio humano (EH) neoformado na presença de curativo de pele de rã (PR)

DISCUSSÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e desempenha funções complexas. Por algum tempo foi considerada como um órgão com necessidades de proteção passiva, mas atualmente a pele é referida como órgão imunocompetente (Edelson,RL;1985 *apud* in Allgower et al., 1995). Encontrar um substituto cutâneo é um desafio pretensioso para os próximos anos.

Curativos com gazes ainda continuam sendo o tratamento padrão para a cobertura temporária das queimaduras , e o enxerto de pele autólogo como a melhor cobertura definitiva, mas ambos apresentam imperfeições. Dentre esses dois extremos um grande número de membranas designadas para coberturas definitivas ou temporárias tem sido motivo de altos investimentos da indústria farmacêutica na tentativa de suprir as imperfeições, assemelhando-se ao máximo à pele humana(Sheridan et al., 2004).

Os substitutos temporários são utilizados como curativo nas áreas doadoras de pele. A pele de cadáver continua sendo uma boa opção de membrana para cobertura temporária e a única que sofre vascularização., sendo o mais utilizado (Ninnemann; Fisher ; Frank, 1978b; Herndon, 1997).

Membrana amniótica é amplamente usada como substituto temporário da pele. Nos países em desenvolvimento as dificuldades de rastreamento das doenças virais limitam seu uso. Sua utilização beneficia a cicatrização de queimadura de espessura parcial e áreas doadoras de pele. Vem da Índia experiência de longa data, evidenciando seu baixo custo, eficiência no controle das infecções, diminuição da dor e auxiliando na promoção da cicatrização das áreas de injúria térmica (Ravishanker; Bath ; Roy, 2003; Bose, 1979; Mehta; Parekh; Bhatnagar ; Rai, 1983)no entanto o emprego deste material implica em necessidades especiais de armazenagem .

A pele de rã utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente como curativo biológico no tratamento das áreas doadoras apesar de não se evidenciar estatisticamente significativa em relação ao curativo com gaze vaselinada nos testes de histologia e imunohistoquímica, mas superior quando comparado a outros aspectos.

Por ser desidratado este curativo torna-se prático para o transporte e armazenagem, podendo ser guardado numa prateleira com tempo de estocagem estimada em 5 anos. A embalagem com material plástico transparente garante condições seguras de esterilização

Neste aspecto comparado com membrana amniótica e com a pele de cadáver apresenta grande superioridade, considerando as condições especiais de armazenagem deste dois últimos produtos para mantê-los livres de contaminação bacteriana (Ravishanker; Bath ; Roy, 2003; Ninnemann; Fisher ; Frank, 1978; Chua; Song; Chai; Chan ; Tan, 2004; Ganatra ; Durrani, 1996).

Clinicamente não foi verificado nenhum caso de infecção nos 2 grupos apesar de ter sido encontrado na histologia formação de abscesso em apenas uma das lâminas no grupo pele de rã. Esta lâmina mostra coleção de polimorfonucleares neutrófilos íntegros e desintegrados (Figura 8).

A ação antimicrobiana não foi objeto de investigação nesse estudo, mas é largamente conhecida a presença de polipeptídeos com ação antimicrobiana na pele da *Rana catesbeiana*. A ranalexina e 9 tipos de ranatuerinas já foram isolados. A ranalexina apresenta similaridade estrutural com polimixina (Clark; Durell; Maloy ; Zasloff, 1994; Darveau, 1991; Goraya; Knoop ; Conlon, 1998b; Sonnevend et al., 2004). Em 2002, Oliveira e Schwartz testaram especificamente esse curativo com pele de rã, como usado neste experimento (designado naquele estudo como Rarafilm) em relação a atividade antimicrobiana in vitro e relataram redução no crescimento de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiela pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Acinetobacter baumani*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) (Oliveira et al., 2002).

Acreditamos que esta ação esteja presente no curativo ora testado, pois o preparo deste curativo não envolve qualquer processo químico ou de temperatura elevada conforme descrito na metodologia que determine modificações biológicas ou físico-químicas naturais da pele de rã. Certamente protocolos clínicos devem futuramente ser objeto de estudo comprovando sua eficiência no controle do crescimento bacteriano das feridas parciais e profundas.

Ao manuseio apresenta boa resistência mecânica, mesmo após reidratado, com fácil aplicação à ferida. Essa propriedade também já foi motivo de teste anterior revelando ser mais resistente que curativo de poliuretano em filme e

filme adesivo de rayon/polietileno(Oliveira et al., 2002).Também aqui se mostra muito mais versátil para o uso do que a membrana amniótica que por ser muito fina exige mais cuidado e mais tempo em sua utilização.

No momento de sua aplicação já ocorre adesão ao leito receptor e no acompanhamento da ferida a pele de rã continua aderida, fato que pode ser percebido inclusive nos cortes histológicos em que se verifica a presença de restos da membrana cutânea do anuro na superfície da pele humana em regeneração conforme mostra a figura 9. A aderência do curativo biológico à ferida permanece ao longo dos dias e não precisa ser retirado ou trocado. Apenas acrescenta-se novo curativo nas regiões sem cobertura,se ainda for necessário, o que evita a dor envolvida na troca desse material.A eliminação do curativo com pele de rã da área em que foi aplicada é espontânea e ocorre na medida em que o tecido abaixo vai se regenerando, no caso das feridas parciais.

Após ser reidratado em soro fisiológico 0,9% torna-se uma membrana que se adapta aos diferentes relevos do corpo evitando deixar espaço morto entre a ferida e o curativo impedindo o acúmulo de secreções exsudativas. Essa maleabilidade não impede os movimentos articulares exigidos pela fisioterapia durante o tratamento das queimaduras.

Oliveira e Schwartzman em 2002 também já haviam estudado a taxa de evaporação deste curativo de pele de rã e o definiram como material permeável, não oclusivo, oferecendo resistência mínima à perda de água(Oliveira et al., 2002). Essa característica apresenta-se como vantagem, na medida em que essa porosidade facilita a passagem de oxigênio e evita acúmulo de líquido e secreções na ferida em reparação.

O xenoenxerto com pele de rã é avascular . Não existe integração do material com o tecido receptor (ferida em pele humana), o que o caracteriza como cobertura ou substituto de pele temporário. Nenhuma reação de rejeição foi verificada. A decomposição que se observa em alguns casos, atribuo ao ambiente úmido presente no curativo. Nas lâminas examinadas não foi verificada destruição do xenoenxerto, nem tampouco reação celular que pudessem caracterizar rejeição aguda ou crônica Na figura 9 verificamos uma aderência firme à área em que o curativo foi aplicado, sem qualquer reação celular na pele humana que caracterize

resposta celular de antigenicidade. Nota-se apenas, nesta mesma figura, o tecido epitelial regenerado.

Atribuo esse achado a 3 fatores: primeiro, por existirem evidências da boa tolerabilidade do material protéico da *Rana catesbeiana* pelo ser humano. A carne da rã é consumida em muitos países, assim se justifica a criação deste anuro em cativeiro para fornecimento de carne para o consumo. Em segundo lugar pelo tratamento de esterilização. A utilização dos Raios Gama (γ) diminui a antigenicidade do material. Outros materiais recebem esse tratamento com tal objetivo. (Lee et al., 2001). Em terceiro pelo quadro de imunossupressão que existe em pacientes queimados (Burke et al., 1975).

Falcão em 2002, aqui no Brasil, estudando o curativo de pele em cães sugeriu uma possível reação hiperaguda ou de hipersensibilidade ao xenoinxerto, mas atribuo o insucesso deste autor a metodologia aplicada ao material e nenhum método eficaz que pudesse alterar a antigenicidade do xenoinxerto por ele utilizado, como a radiação gama usada no presente estudo (Falcão, 2002).

Os achados histológicos de tecido epidérmico e dérmico regenerado conforme mostra o, evidenciaram a formação de tecido epitelial regenerado e em alguns com formação de papila dérmica com colágeno tipo III confirmando a evolução para epitélio maduro (Figura 1). Mas ao comparar o crescimento epitelial verificado nos dois grupos, não foi encontrada diferença estatística significativa ($p < 0,056$). Essa ausência de confirmação estatística do teste histológico pode ser atribuída à pequena amostra analisada. Justifica-se a realização de estudos com amostras populacionais mais amplas.

A análise morfológica em conjunto de todas as lâminas ao longo dos 12 dias revelou um predomínio de células mononucleares caracterizando uma reação inflamatória exsudativa crônica de discreta intensidade (Tabela 3) como predominante em ambos os grupos., o que era de se esperar dado o tempo de seguimento das feridas de 12 dias. Em duas lâminas (1 em cada grupo) notou-se uma reação inflamatória crônica granulomatosa, comum nas reações tipo corpo estranho, mas aqui não tem significado.

Desde que no processo de reepitelização de feridas de espessura parcial, como foram produzidos neste experimento, os processos de reparação se iniciam por migração e proliferação celular de queratinócitos a partir de suas margens e de

foliculo pilosos e glândulas sudoríparas viáveis, tem sido aceito o envolvimento de receptores de EGF neste processo. Experimentos usando cultura de células mostram a ligação do receptor de EGF com uma cascata de eventos reguladora de crescimento celular (Carpenter,G;1990 *apud in* Wenczak; Lynch ; Nanney, 1992)

Em estudos de regeneração de pele o receptor do EGF é um importante colaborador representando uma superfamília de receptores, que, identificados no tecido pesquisado, é um indicador de ação regenerativa, em períodos que variam do 1º dia de injúria até o 16º dia. Alterações em seu perfil quantitativo estão relacionadas com a atividade proliferativa dos tecidos com migração e proliferação celular (Adamson, 1990; Block; Matela; SundarRaj; Iszkula ; Klarlund, 2004; Danielsen ; Maihle, 2002; Wenczak; Lynch ; Nanney, 1992)

Neste estudo verificou-se uma discreta imunorreação positiva utilizando o anticorpo anti receptor do EGF(anti EGFr) para fazer esta análise. Encontramos uma imunomarcção de discreta intensidade no método imunohistoquímico (Figura 3), igualmente distribuida nos dois grupos, e aqui também sem expressão de significância estatística, verificados no Gráfico 1 e no Gráfico 3. A ampliação do tempo de análise das feridas talvez seja prudente para alcançarmos aspectos mais tardios desse fenômeno em um próximo estudo e também o aumento do tamanho da amostra

Mas, apesar de não confirmado estatisticamente, é positiva identificação do receptor de EGF nas margens das feridas em diferentes fases de reparação, nas feridas tratadas com curativos com pele de rã. Este achado sugere o envolvimento do receptor de EGF, o que implica na participação deste próprio fator de crescimento e/ou de outros mediadores deste receptor tais como TGF- α , fator derivado das plaquetas(PDGF) e da proteína cinase C que pode modular a expressão ou atividade do receptor(Wenczak; Lynch ; Nanney, 1992).

Outros estudos poderão acrescentar conhecimento em relação a outros fatores de crescimento que participam do fenômeno cicatricial. Assim como foi analisado o EGFr no presente estudo, com o objetivo de estudar proliferação e migração celular a pesquisa de outros fatores de crescimento como ,por exemplo, o VEGF, envolvendo a angiogênese poderia ser valiosa .

Pesquisas futuras poderão agregar conhecimento a este novo curativo, em relação a sua ação antibacteriana em feridas contaminadas como são as queimaduras.

Sendo este o primeiro estudo de reparação epitelial com metodologia histológica e imunohistoquímica da utilização do curativo de pele de rã em humanos acreditamos que o prosseguimento desta investigação ampliará a sua aplicação no tratamento de feridas em geral.

Os testes estatísticos aplicados bidirecionais nos afirmam que apesar de não significantes, há semelhança de reparação tecidual quando comparamos com o curativo de gaze rayon vaselinada. Ele só não se mostrou, nesta pequena amostra, ser superior ao grupo controle, mas não se revelou pior, ou como um método que impeça a regeneração do tecido. Podemos usar este argumento tanto para o teste histológico quanto para o exame imunohistoquímico realizados.

Observando o gráfico 1 verificamos que não são significantes as diferenças de crescimento epitelial e imunorreação observadas entre o grupo da pele de rã e gaze rayon ($p < 0,15$), mas revela-se significativa ($p < 0,0013$) as diferenças de crescimento epitelial e imunorreação positiva entre o tempo inicial de cicatrização (B2) e o o final da observação (B4) em cada grupo individualmente e igualmente no dois grupos. Há portanto regeneração tecidual importante nos dois grupos. Nesta amostra, o curativo com pele de rã não se mostrou superior ao grupo controle, mas também não foi pior.nestes testes

O Gráfico 2 compara as colunas de crescimento epitelial positivo, ou seja, o percentual de biópsias em que se observou a presença de tecido neoformado, e revela-se maior no grupo pele de rã que no grupo tratado com gaze, assim como é menor o percentual em que não se verificou crescimento epitelial no grupo pele de rã que no grupo gaze. Mas, apesar de não ser estatisticamente significativa quando submetemos os resultados ao teste de Fischer($p < 0,0556$), é um resultado bem próximo de significativa ($p < 0,05$).

Os Gráfico 3 e 4 dizem respeito as análises estatísticas das imunorreações com anti-receptor de EGF. Aqui encontramos uma grande uniformidade entre os dois grupos. A única curiosidade é a expressiva marcação de discreta intensidade (EGF1) mesmo em tempos mais tardios de reparação tecidual 9 do 6º ao 12º dias), que da mesma forma, verifica-se um percentual maior no grupo pele de rã (gráfico

3), mas por não haver significância estatística ($p=0,3899$) nos impede de afirmar superioridade em favor do grupo tratado com pele de rã.

Portanto, de um modo geral, foram fracas as diferenças entre os grupos, mas não se revelou impróprio ao tratamento das áreas doadoras com pele de rã, quando buscamos uma evidência significativa de regeneração tecidual através do estudo histológico e imunohistoquímico, mas em outros aspectos o curativo com pele de rã apresentou vantagens em relação a outros curativos propostos ao mesmo fim e não podemos deixar de ressaltá-las, apesar de não serem verdades estatísticas. São observações decorrentes da experiência do uso do material tais como a versatilidade do uso por ser desidratado; o tratamento sem troca de curativos, somente reposição, poupando o paciente de dores decorrentes do manuseio da ferida; o potencial antimicrobiano (peptídeos naturais) ainda não avaliado em feridas de humanos; a grande resistência mecânica verificada ao manuseio e testes específicos (Oliveira et al., 2002).

Estudos clínicos envolvem um grau de dificuldade maior, mas deve ser buscado pelos pesquisadores. Sendo este o primeiro estudo clínico controlado de reparação tecidual em humanos da literatura mundial utilizando pele de rã, é natural que a partir deste estudo possamos delinear estudo mais conclusivos. É uma amostra pequena para se chegar a conclusões extremamente favoráveis, mas mostrou-se benéfico ao propósito terapêutico. Estudos com um maior número de pacientes deverão ser realizados. O tempo de observação deveria ser ampliado para 3 semanas, por exemplo. Outros imunomarcadores importantes na regeneração tecidual devem ser testados como o fator de crescimento vasculoendotelial (VEGF) e TGF- α .

CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo clínico controlado de reparação tecidual utilizando o curativo com pele de rã em humanos na literatura mundial .O curativo de pele de rã pode ser caracterizado como promotor da cicatrização, por ser verificado crescimento epitelial nas lesões tratadas com este curativo comparativamente ao grupo controle com gaze sem ser observado atraso ou distúrbio na cicatrização das feridas observadas e analisadas utilizando aquele material. Não se mostrou estaticamente superior avaliando crescimento epitelial a nível histológico e imunohistoquímico comparado ao grupo controle mas mostrou-se um curativo de fácil aplicação, armazenagem simples e prolongada, atóxico, troca indolor, boa resistência mecânica e com atividade antibacteriana associada.

Nas análises realizadas e comparando com o conhecimento atual dos substitutos cutâneos relatados na literatura mundial o curativo de pele de rã *Rana catesbeiana* pode ser caracterizado como uma possível alternativa com o benefício econômico ao agregar valor à produção da carne de rã que já é comercializada resultando em custo final mais baixo destes curativos quando comparado com seus similares disponíveis no mercado,mas ainda requer estudos adicionais.

O presente estudo foi realizado com uma amostra pequena e revelou apenas uma possível utilização deste material como curativo biológico mas requer obrigatoriamente para melhor avaliação de seu potencial estimulador de fatores locais de crescimento epitelial estudos com amostras populacionais maiores e o envolvimento de outros marcadores imunohistoquímicos como VEGF.

REFERÊNCIAS

Lista por Autor - ABNT

1. ADAMSON, E. D. EGF receptor activities in mammalian development. **Mol.Reprod.Dev.**, v. 27, n. 1, p. 16-22, 1990.
2. ALBERTS, B.; JOHSON, A.; LEWIS, J. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 4a. New York USA: Garland Science, 2002. 1463 p.
3. ALLGOWER, M.; SCHOENENBERGER, G. A.; SPARKES, B. G. Burning the largest immune organ. **Burns**, v. 21 Suppl 1, p. S7-47, 1995.
4. ALSBJORN, B. F. Biologic wound coverings in burn treatment. **World J.Surg.**, v. 16, n. 1, p. 43-46, 1992.
5. ARTZ, C. P.; MONCRIEF, J. A.; PRUITT, B. A., Jr. **Queimaduras**. Curtis P.Artz, John A.Moncrief, Basil A.Pruitt. 1a. Rio de Janeiro,RJ,Brasil: Editora Interamericana, 1980. 515 p.
6. BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.;BABU, M. Skin substitutes: a review. **Burns**, v. 27, n. 5, p. 534-544, 2001.
7. BARRET, J. P.; HERNDON, D. **Tratamento das Queimaduras: Atlas em Cores**. J. P. Barret, D. Herndon2002. 184 p.
8. BLOCK, E. R.; MATELA, A. R.; SUNDARRAJ, N.; ISZKULA, E. R.;KLARLUND, J. K. Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints: role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling. **J.Biol.Chem.**, v. 279, n. 23, p. 24307-24312, 2004.

9. BOSE, B. Burn wound dressing with human amniotic membrane. **Ann.R.Coll.Surg.Engl.**, v. 61, n. 6, p. 444-447, 1979.
- 10.. . BURKE, J. F.; QUINBY, W. C.; BONDOC, C. C.; COSIMI, A. B.; RUSSELL, P. S.; SZYFELBEIN, S. K. Immunosuppression and temporary skin transplantation in the treatment of massive third degree burns. **Ann.Surg.**, v. 182, n. 3, p. 183-197, 1975.
12. CHUA, A.; SONG, C.; CHAI, A.; CHAN, L.; TAN, K. C. The impact of skin banking and the use of its cadaveric skin allografts for severe burn victims in Singapore. **Burns**, v. 30, n. 7, p. 696-700, 2004.
13. CLARK, D. P.; DURELL, S.; MALOY, W. L.; ZASLOFF, M. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. **J Biol Chem**, v. 269, n. 14, p. 10849-10855, 1994.
14. COOPER, D. K. The safety of xenotransplantation. **Transplant.Proc.**, v. 30, n. 5, p. 2461-2462, 1998.
15. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6a. Edição. Rio de Janeiro, RJ: Editora Guanabara Koogan, 2000.
16. DANIELSEN, A. J. ; MAIHLE, N. J. The EGF/ErbB receptor family and apoptosis. **Growth Factors**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 2002.
17. DARVEAU, R. P. [beta]-lactam antibiotics potentiate Magainin 2 antimicrobial activity in vitro and in vivo. **Antimicrob.Agents Chemother.**, v. 35, p. 1153-1159, 1991.
18. DASZAK, P.; TABOR, G. M.; KILPATRICK, A. M.; EPSTEIN, J.; PLOWRIGHT, R. Conservation medicine and a new agenda for emerging diseases. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 1026, p. 1-11, 2004.

19. ELDAD, A.; STARK, M.; ANAIS, D.; GOLAN, J.; BEN HUR, N. Amniotic membranes as a biological dressing. **S.Afr.Med.J.**, v. 51, n. 9, p. 272-275, 1977.

20. FALCÃO, S. C. e. a. Pele de Rana catesbeiana como curativo biológico oclusivo no tratamento de feridas cutâneas produzidas em cães. Alterações macroscópicas e microscópicas resultantes da interação desses tecidos. Estudo preliminar. **Acta Cir.Bras.**, v. 17, n. 3, 2002.

21. FU, X.; GU, X.; SUN, T.; YANG, Y.; SUN, X.; SHENG, Z. Thermal injuries induce gene expression of endogenous c-fos, c-myc and bFGF in burned tissues. **Chin Med.J.(Engl.)**, v. 116, n. 2, p. 235-238, 2003.

22. GANATRA, M. A. ; DURRANI, K. M. Method of obtaining and preparation of fresh human amniotic membrane for clinical use. **J.Pak.Med.Assoc.**, v. 46, n. 6, p. 126-128, 1996.

23. GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; BARCHIESI, F.; SCALISE, G. In-vitro activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant Staphylococcus aureus and interactions with clinically used antibiotics. **Diagn.Microbiol.Infect.Dis.**, v. 38, n. 2, p. 115-118, 2000.

24. GOMES, D. R.; SERRA, M. C.; MACIEIRA, L. J. **Condutas Atuais em Queimaduras**. 1a. Rio de Janeiro, RJ: Editora Revinter, 2001. 158 p.

25. GORAYA, J.; KNOOP, F. C.; CONLON, J. M. Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, Rana catesbeiana. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**, v. 250, n. 3, p. 589-592, 1998.

26. GORE, M. A. ; AKOLEKAR, D. Banana leaf dressing for skin graft donor areas. **Burns**, v. 29, n. 5, p. 483-486, 2003b.

27. GUEUGNIAUD, P. Y.; CARSIN, H.; BERTIN-MAGHIT, M.; PETIT, P. Current advances in the initial management pf major thermal burns. **Intensive Care Med.**, v. 26, p. 848-856, 2000.

28. HEIMBACH, D.; HERNDON, D.; LUTERMAN, A.; LEY, R.; BRCIC, A.; DIETCH, E. et al. Early excision of thermal burns--an international round-table discussion, Geneva, June 22, 1987. **J Burn Care Rehabil.**, v. 9, n. 5, p. 549-561, 1988.

29. HERNDON, D. **Total Burn Care**. D. Herndon. 2. London: W.B.saunders Company, 1997a. 597 p.

30. HERNDON, D. N. Perspectives in the use of allograft. **J Burn Care Rehabil.**, n. S6, p. 181997b.

31. HERNDON, D. N.; BARROW, R. E.; RUTAN, R. L.; RUTAN, T. C.; DESAI, M. H.; ABSTON, S. A comparison of conservative versus early excision. Therapies in severely burned patients. **Ann.Surg.**, v. 209, n. 5, p. 547-552, 1989.

32. HERNDON, D. N. ; SPIES, M. Modern burn care. **Semin.Pediatr.Surg.**, v. 10, n. 1, p. 28-31, 2001.

33. HETTIARATCHY, S. ; DZIEWULSKI, P. *ABC of burns Pathophysiology and types of burns*. **BMJ**, v. 328, n. 12, p. 1427-1429, 2004.

34. _____. ABC of Burns Introduction. **BMJ**, v. 328, n. 5, p. 1366-1368. 2004.

35. HOLUBEC ; KARFIK. [Importance of burn treatment centers]. **Cas.Lek.Cesk.**, v. 90, n. 4, p. 97-101, 1951.

36. HORCH, R. E. ; STARK, G. B. Comparison of the effect of a collagen dressing and a polyurethane dressing on the healing of split thickness skin graft (STSG) donor sites. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, v. 32, n. 4, p. 407-413, 1998.

37. JACKSON, D. M. The evolution of burn treatment in the last 50 years. **Burns**, v. 17, n. 4, p. 329-334, 1991.

38. JANZEKOVIC, Z. A new concept in the early excision and immediate grafting of burns. **J Trauma**, v. 10, n. 12, p. 1103-1108, 1970.
39. JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **Br.J.Plast.Surg.**, v. 55, n. 3, p. 185-193, 2002.
40. KEALEY, G. P. Disease transmission by means of allograft. **J.Burn Care Rehabil.**, v. 18, n. 1 Pt 2, p. S10-S11, 1997.
41. KOLLER, J. ; ORSAG, M. Our experience with the use of cerium sulphadiazine in the treatment of extensive burns. **Acta Chir Plast.**, v. 40, n. 3, p. 73-75, 1998.
42. KUMAR KV ET ALL. Application of frog (*Rana tigerina* Daudin) skin collagen as a novel substrate for cell culture. **J Biomed Mater Res.**, v. 61, n. 2, p. 197-202, 2002.
43. KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto. 7ª. Rio de Janeiro-RJ, Brasil: Elsevier Editora Ltda., 2005. 1592 p.
44. LEE, J. W.; KIM, J. H.; YOON, H. S.; KANG, K. O.; LEE, S. Y.; HWANG, H. J. et al. Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. **J Food Prot.**, v. 64, n. 2, p. 272-276, 2001.
45. LI, G.; GUSTAFSON-BROWN, C.; HANKS, S. K.; NASON, K.; ARBEIT, J. M.; POGLIANO, K. et al. c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. **Dev.Cell**, v. 4, n. 6, p. 865-877, 2003.
46. MACIEL, E.; SERRA, M. C. **Tratado de Queimaduras**. Edmar Maciel Lima Junior, Maria Cristina do Valle Freitas Serra. 1a. SÃO PAULO; RIO DE JANEIRO; BELO HORIZONTE: ATHENEU, 2004.
47. MAY, S. R.; WAINWRIGHT, J. F.; DECLEMENT, F. A. The role of sampling in the detection of microbial contamination on cadaveric

- allograft skin used as a biological wound dressing. **Burns Incl. Therm.Inj.**, v. 12, n. 1, p. 36-48, 1985.
48. MAZZONI, R. Emerging pathogen of wild amphibians in frogs (*Rana catesbeiana*) farmed for international trade. **Emerg.Infect.Dis.**, v. 9, n. 8, p. 995-998, 2003.
 49. MEHTA, N. N.; PAREKH, J. N.; BHATNAGAR, D.;RAI, P. Human amniotic membrane as a biological dressing in burn wounds. **J.Indian Med.Assoc.**, v. 81, n. 11-12, p. 189-191, 1983.
 50. MINN, I.; KIM, H. S.;KIM, S. C. Antimicrobial peptides derived from pepsinogens in the stomach of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. **Biochim.Biophys.Acta**, v. 1407, n. 1, p. 31-39, 1998.
 51. MONGE, G.; SPARKES, B. G.; ALLGOWER, M.;SCHOENENBERGER, G. A. Influence of burn-induced lipid-protein complex on IL1 secretion by PBMC in vitro. **Burns**, v. 17, n. 4, p. 269-275, 1991.
 52. NINNEMANN, J. L.; FISHER, J. C.;FRANK, H. A. Clinical skin banking: a simplified system for processing, storage, and retrieval of human allografts. **J.Trauma**, v. 18, n. 10, p. 723-725, 1978a.
 53. OLIVEIRA, C. R. & SCHWARTZ, E. N. F. **Propriedades Físicas e Biológicas do novo curativo constituído da pele da rã *Rana Catesbeiana***. 2002. - Universidade de Brasília/Instituto de Ciências Biológicas/Departamento de Ciências Fisiológicas/Pós Graduação em Biologia Animal, 2002.
 54. PICCOLO, N. e. a. Uso de Pele de Rã como curativo biológico como substituto temporário da pele em queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 2, n. 1, p. 18-24, 2002.
 55. PRUITT, B. A., Jr. The evolutionary development of biologic dressings and skin substitutes. **J.Burn Care Rehabil.**, v. 18, n. 1 Pt 2, p. S2-S5, 1997.

56. RAVISHANKER, R.; BATH, A. S.; ROY, R. "Amnion Bank"--the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. **Burns**, v. 29, n. 4, p. 369-374, 2003.

57. SAI KP ET ALL. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. **J Biol Chem**, v. 26, n. 4, p. 2701-2707, 2001.

58. SAI, K. e. a. Investigation on wound healing by using amphibian skin. **Indian J Exp Biol**, v. 33, n. 9, p. 673-676, 1995.

59. SCHEIDEGGER, D.; SPARKES, B. G.; LUSCHER, N.; SCHOENENBERGER, G. A.; ALLGOWER, M. Survival in major burn injuries treated by one bathing in cerium nitrate. **Burns**, v. 18, n. 4, p. 296-300, 1992.

60. SCHULTZ, G. S.; DAVIS, J. B.; EIFERMAN, R. A. Growth factors and corneal epithelium. **Cornea**, v. 7, n. 2, p. 96-101, 1988.

61. SETTLE, J. A. D. **Principles and Praticce of Burn Management**. J. A. D. Settle. 1a. London, U.K.: Churchill Livingstone, 1996. 496 p.

62. SHAKESPEARE, P. Skin substitutes--benefits and costs. **Burns**, v. 27, n. 5, p. vii-viii, 2001.

63. SHAKESPEARE, P. ; SHAKESPEARE, V. Survey: use of skin substitute materials in UK burn treatment centres. **Burns**, v. 28, n. 4, p. 295-297, 2002.

64. SHAKESPEARE, P. G. Cost effectiveness of skin substitutes. A commentary on the debate at the 10th ISBI Congress, Jerusalem 1998. International Society for Burn Injuries. **Burns**, v. 25, n. 2, p. 179-181. 1999.

65. SHERIDAN, R. L. ; TOMPKINS, R. G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v. 25, n. 2, p. 97-103, 1999.

66. _____. What's New in Burns and Metabolism? **J Am Coll Surg**, v. 198, n. 2, p. 243-263, 2004.
67. SHIRAKATA, Y.; TOKUMARU, S.; YAMASAKI, K.; SAYAMA, K.; HASHIMOTO, K. So-called biological dressing effects of cultured epidermal sheets are mediated by the production of EGF family, TGF-beta and VEGF. **Journal of Dermatological Science**, v. 32, n. 3, p. 209-215, 2003.
68. SOMERS, T.; VERBEKEN, G.; VANHALLE, S.; DELAEY, B.; DUINSLAEGER, L.; GOVAERTS, P. et al. Lysates from cultured allogeneic keratinocytes stimulate wound healing after tympanoplasty. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 116, n. 4, p. 589-593, 1996.
69. SONNEVEND, A.; KNOOP, F. C.; PATEL, M.; PAL, T.; SOTO, A. M.; CONLON, J. M. Antimicrobial properties of the frog skin peptide, ranatuerin-1 and its [Lys-8]-substituted analog. **Peptides**, v. 25, n. 1, p. 29-36, 2004.
70. SPARKES, B. G. Mechanisms of immune failure in burn injury. **Vaccine**, v. 11, n. 5, p. 504-510, 1993.
71. SPIES, M.; HERNDON, D. N.; SPARKES, B. G.; ALLGOWER, M. Skin toxicity induced by wet heat. **Burns**, v. 29, n. 3, p. 215-220, 2003.
72. STANTON, R. A. ; BILLMIRE, D. A. Skin resurfacing for the burned patient. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 29, n. 1, p. 29-+, 2002.
73. TAN, S. T.; ROBERTS, R. H.; SINCLAIR, S. W. A Comparison of Zenoderm with Duoderm Er in the Treatment of Split Skin-Graft Donor Sites. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 46, n. 1, p. 82-84, 1993.
74. TAVIS, M. J.; THORNTON, J.; DANET, R.; BARTLETT, R. H. Current status of skin substitutes. **Surg.Clin.North Am.**, v. 58, n. 6, p. 1233-1248, 1978.

75. TCHERVENKOV, J. I.; EPSTEIN, M. D.; SILBERSTEIN, E. B.; ALEXANDER, J. W. Early burn wound excision and skin grafting postburn trauma restores in vivo neutrophil delivery to inflammatory lesions. **Arch.Surg.**, v. 123, n. 12, p. 1477-1481, 1988.
76. VANSTRAELEN, P. Comparison of Calcium Sodium Alginate (Kaltostat) and Porcine Xenograft (E-Z Derm) in the Healing of Split-Thickness Skin-Graft Donor Sites. **Burns**, v. 18, n. 2, p. 145-148, 1992.
77. VIOLENCE AND INJURY PREVENTION DEPARTMENT -WORLD HEALTH ORGANIZATION **Magnitude of the problem.**: WHO Library Catalogue-in-Publications Data, 2002. Disponível em: www.who.int/mipfiles/2014/Burns1.pdf. Acesso em 5-2-2005.
78. WELLS, A. EGF receptor. **Int.J.Biochem.Cell Biol.**, v. 31, n. 6, p. 637-643, 1999.
79. WENCZAK, B. A.; LYNCH, J. B.; NANNEY, L. B. Epidermal growth factor receptor distribution in burn wounds. Implications for growth factor-mediated repair. **J.Clin.Invest**, v. 90, n. 6, p. 2392-2401, 1992e.

ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA



Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-FM/UnB
Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-900 – Brasília, DF
Telefone: (61) 307-2520

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do projeto: **CEP-FM 019/2004**

Título: **“Estudo da reparação tecidual em áreas doadoras de pele para auto-enxerto em pacientes queimados comparando a utilização de óxido de zinco em um novo curativo biológico: análise imunohistoquímica com anticorpo anti-receptor de fator de crescimento epidermal humano”**

Pesquisador responsável: **José Adorno**

Documentos analisados: **Folha de rosto, carta de encaminhamento, projeto de pesquisa, bibliografia pertinente, termo de consentimento.**

Data de entrada: **15/04/2004**

Proposição do(a) Relator(a):

Aprovação

Aprovação com pendências

Não aprovação

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: **05/05/2004**

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: **30/06/2004**

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS n.º 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, em sua **Reunião 06/2004**, realizada em 30/06/2004, decidiu **APROVAR**, de acordo com o parecer do(a) Relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

Observação:

- 1 - Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves.
- 2 - O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília-DF, 01 de julho de 2004.

2
Dra. Nanci Costa da Silva
Dr.^a Nanci Costa da Silva
Coordenadora do CEP-FM/UnB
Em Exercício

**ANEXO 2 – CÓDIGO DE CONDUTA PARA O DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL E RESPONSÁVEL DE CULTIVO DE RÃS**

**CÓDIGO DE CONDUTA PARA O
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E
RESPONSÁVEL DE CULTIVO DE RÃS**

Versão preliminar

Elaborado pela Secretaria Especial de Aqüicultura e Pesca
da Presidência da Republica

SEAP/PR

2002

CÓDIGO DE CONDUTA PARA DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL E RESPONSÁVEL DA RANICULTURA BRASILEIRA

Baseado nos princípios de BPA (Boas Práticas de Aqüicultura), nas Diretrizes da Aqüicultura Responsável (FAO) e no Código de Conduta pa Aqüicultura Européia, a SEAP/PR identificou a necessidade da promover a elaboração de um código de práticas responsáveis para a atividade de Ranicultura¹, em busca de um desenvolvimento sustentado no âmbito ambiental, social e econômico, que deve nortear o cultivo de rãs.

O "Código de Conduta para o Desenvolvimento Sustentável e Responsável da Ranicultura Brasileira" baseia-se na atitude, responsabilidade e compromisso do ranicultor de executar ações que respeitam o meio ambiente e o consumidor.

Utilizando como instrumentos um manejo eficaz, com desenvolvimento de tecnologias "limpas", através do profissionalismo dos produtores, resultando em um melhor combate e/ou diminuição dos impactos sociais, ambientais e econômicos. Os produtores, as cooperativas, as associações e as empresas que decidirem se engajar na ranicultura devem respeitar e seguir os princípios abaixo descritos.

- Proteger e preservar o meio ambiente;
- Utilizar os princípios de Biossegurança;
- Respeitar aos direitos e segurança de outros usuários de recursos hídricos;
- Obrigatoriedade de cumprir com as regulamentações impostas por órgãos normativos e licenciadores; e

Dispor de condições de segurança aos funcionários. Considerando que a implantação de novas tecnologias deve priorizar o aprimoramento de técnicas que possam ter ação preventiva no aspecto ambiental, objetivando diminuir e/ou eliminar os possíveis impactos ambientais.

Objetivo Geral:

Estabelecer normas claras para o desenvolvimento da atividade, visando a racionalidade e sustentabilidade social, ambiental e econômica.

Regulamentação

De forma a cumprir com os regulamentos impostos por órgãos normativos e licenciadores, os aqüicultores devem:

- 1) Cumprir todas as etapas de registro de aqüicultor e licenciamento ambiental, outorga e cessão de uso de águas da União, quando pertinente.
- 2) Assinar o Termo de Ajuste de Conduta e cumprir as orientações do Código de Conduta específico para sua modalidade de aqüicultura.

Frente ao panorama nacional da atividade destacamos os seguintes aspectos a serem considerados neste código: Avaliação e seleção de locais para projetos de construção dos ranários, alimento e práticas de arraçamento, biossegurança, agentes terapêuticos e outras substâncias químicas, técnicas de manejo, efluentes e resíduos, despesca e ao pré-processamento, comunidade local e funcionários.

Perante o "Código de Conduta para Ranicultura Responsável", os interessados no cultivo de rãs ao se registrar como aqüicultor pela SEAP/PR, assume o seguinte termo de compromisso:

¹ Ranicultura = Cultivo de Rãs

I. Avaliação e Seleção de Locais para Projetos

Legislação Pertinente

- Lei nº 6.938 de 30/08/81. Política Nacional do Meio Ambiente;
- Lei nº 6.902/81. Estações ecológicas e áreas de proteção ambiental;
- Decreto nº 2.869 de 09/12/1998. Uso das águas públicas, Ministério da Agricultura;
- Lei nº 9.605 de 12/02/1998. Sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente;
- Resolução CONAMA nº 004 de 18/09/85. Define reservas, áreas de preservação permanente e dá outras providências.

Este é um ponto de grande importância para a piscicultura, pois a partir dele o processo será delineado com sucesso ou insucesso, tanto econômico como ambiental e social. Nesta etapa visa-se à proteção dos ecossistemas para assegurar a manutenção da qualidade de vida, a preservação e a sustentabilidade ambiental, em relação às atividades desenvolvidas no local e áreas adjacentes.

Objetivo:

Minimizar os impactos adversos ao meio ambiente devido à implantação de empreendimentos em áreas impróprias para projetos aquícolas.

Compromissos:

a) Os projetos devem contemplar o conhecimento da hidrografia local para que sejam mantidas as características hídricas originais, incluindo os tipos de marés, a influência da água doce e as utilizações existentes dos recursos hídricos;

b) A qualidade da água para abastecer os empreendimentos deve ser avaliada e monitorada periodicamente quanto aos aspectos físico-químicos e biológicos;

c) Não devem ser construídos empreendimentos em áreas ecologicamente sensíveis de importância à preservação ambiental, nem em locais onde não seja viável corrigir problemas relacionados com solos.

e) Quando a implementação de canais exigir o uso de áreas de proteção ou interesse ambiental será proposta aos órgãos ambientais uma medida compensatória equivalente ao impacto gerado;

f) As fases de instalação e operação dos empreendimentos devem ser conduzidas de maneira que não interfiram nas atividades tradicionais de sobrevivência das comunidades locais que dependem do ambiente onde estão inseridas.

II. Construção de Ranários

Legislação Pertinente

- Resolução CONAMA nº 20 de 18/06/86 – Estabelece classificação das águas doces, salobras e salinas de modo a assegurar seus usos e qualidade.
- Resolução CONAMA nº 237 de 19/12/1997. Licenciamento ambiental;

Na fase de construção busca-se assegurar que os projetos estejam dispostos de forma harmônica aos ecossistemas e ao conjunto social predominante do entorno, utilizando métodos que sejam apropriados às condições locais e promovam a preservação ambiental.

Objetivo:

Minimizar os impactos adversos ao meio ambiente devido construção imprópria de empreendimentos aquícolas.

Compromissos:

- a) a) As baias de engorda devem ser suficientes cobertas para proteger os animais do sol, evitando o ressecamento e lesão da pele.
- b) O piso e paredes das baias de engorda devem ser de material impermeável, de fácil limpeza e higienização, sendo que estes procedimentos devem ser realizados com uma freqüência que consiga manter as baias em condições sanitárias favoráveis para o cultivo.
- c) As piscinas de água - nas baias - devem ser esgotadas com periodicidade para evitar acúmulo de resíduos.
- d) A renovação de água dos tanques deve ser realizada em volume e freqüência suficiente para eliminar os resíduos e impedir a fermentação do material.
- e) Na construção dos ranários devem ser dotados de sistemas hidráulicos distintos, com entrada e saída de águas independentes, não permitindo a comunicação entre eles, evitando o risco de contaminação;
- f) Os fundos dos tanques(de água) do ranário devem possuir declividade acentuada, suficiente para facilitar o escoamento do material sólido no seu interior e permitir a descarga para bacias de sedimentação ou outro método de tratamento de efluentes eficientes;
- g) A área do ranário e seu entorno deve ficar completamente limpa ao final da construção, sem acúmulos de terra ou quaisquer outros materiais não usados e lixo, estes resíduos devem ter destino adequado;

III. Alimento e às Práticas de Arraçoamento

Legislação Pertinente

- Decreto nº 55.871 de 26/03/65. Determina limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos que podem ser encontrados nos alimentos.
- Lei nº 6.198, de 26/12/1974. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal e dá outras providências
- Decreto nº 76.986, de 06/01/1976. Regulamenta a Lei n.º 6.198, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatória dos produtos destinados à alimentação animal e dá outras providências.
- Instrução Normativa 001/2003 SARC/MAPA – Regulamenta sobre higiene e Boas Práticas de Armazenagem de alimentos.

O cultivo de rãs deve possuir mecanismos de arraçoamento que possibilite evitar deposição de resíduos, prevenindo a poluição dos corpos d'água. A busca de alimentos ambientalmente amigáveis e práticas de manejo eficientes são essenciais para manutenção do ambiente de cultivo e meio adjacente, pois asseguram melhores condições para o sistema produtivo e a redução das cargas de resíduos sólidos e efluentes gerados pela atividade.

Objetivo:

Aumentar a eficiência dos alimentos, buscando assegurar a redução das cargas de resíduos nos efluentes gerados pela atividade.

Compromissos:

- a) O uso de rações devem ser aplicados na forma hidro-estáveis com concentrações adequadas de vitaminas, minerais, proteínas e demais nutrientes e livres de contaminantes químicos, toxinas microbianas ou outras substâncias adulterantes;
- b) O alimento a ser adquirido deve ser o mais recente e, por segurança, ser consumido antes do vencimento do seu prazo de validade;
- c) Os alimentos contaminados e ou estragados não devem ser utilizados, sob qualquer hipótese;
- d) O armazenamento dos alimentos deve utilizar a BPA (Boas Práticas de Armazenagem), respeitando alguns princípios básicos como armazenar em local fresco, com baixa umidade, em estrados apropriados e respeitando o distanciamento mínimo da parede e do solo, de forma a prevenir a ação de fungos e outras contaminações.
- e) As práticas de arraçoamento devem respeitar a frequência, quantidade e as técnicas existentes, permitindo o consumo racional do alimento pelas rãs, eliminando ou minimizando as perdas que possam ocorrer, evitando os riscos de provocar a sua decomposição e conseqüente degradação da qualidade da água e efluentes;
- f) O uso de alimento fresco deve ser originário de fontes que assegurem a qualidade da matéria prima e disponibilizado de maneira a amenizar a quantidade de resíduos gerados e manutenção da qualidade da água.

IV. Biossegurança

Legislação Pertinente

- Portaria nº 451 de 19/09/1997. Da Secretária Nacional de Vigilância Sanitária/MS

Deve ser implantado um sistema preventivo sanitário, visando assegurar a saúde dos animais cultivados, através de medidas rigorosas, evitando a introdução de enfermidades nos tanques. Tais mecanismos beneficiam o meio ambiente, protegem o consumidor e possibilitam que a atividade tenha condições de obter êxito.

Objetivo:

Adotar medidas que visam promover a diminuição e até eliminação de doenças através de ações preventivas, a fim de garantir a estabilidade da produção nacional de rã cultivado..

Compromissos:

- a) Os laboratórios de produção devem ter como obrigação a produção de pós-larvas em estado de saúde impecável, propiciando ao produtor a uniformidade das formas jovens e a segurança de adquirir indivíduos sem risco de contaminação biológica e/ou química;
- b) Os produtores devem adquirir as formas jovens, somente de locais que comprovadamente possuem condições de controle de qualidade e asseguram o estado sanitário dos animais.
- c) Manutenção de densidades populacionais eficientes e sustentáveis.
- d) O estado de saúde da rã cultivada tem que ser avaliado, periodicamente, e qualquer anormalidade deve ser comunicado as autoridades competentes para que sejam tomadas as medidas cabíveis;
- e) Identificado algum sinal de anormalidade no estado de saúde da rã deve ser feita a identificação do agente etiológico, os animais afetados devem ser mantidos em quarentena até que seja definido e realizado o tratamento recomendado;
- f) No caso de doenças infecciosas, os tanques e/ou baias afetadas devem ser isoladas e desinfetadas. A água destes locais deve ser desinfetada antes de ser descarregada no meio ambiente.
- g) No caso de ser identificada alguma doença ou organismo patogênico em um sistema de cultivo, deve-se evitar a transferência dos animais, do equipamento e da água afetada para outros sistemas.
- h) Promover práticas corretas de descarte de animais mortos, de forma a minimizar a probabilidade de propagação de doenças, parasitas e outros organismos patogênicos em ambientes naturais.
- i) Devem ser evitados alimentos de baixa qualidade e digestibilidade, e práticas inadequadas de alimentação e manejo.
- j) Os combustíveis, alimentos, produtos terapêuticos e outras substâncias serão armazenados de maneira responsável para

evitar riscos de contaminação ambiental.

- k) O lixo e outros resíduos deverão ser eliminados por meio de métodos ambientalmente aceitáveis.
- l) Promover pesquisa e programas de desenvolvimento de forma a expandir o conhecimento e entendimento sobre biossegurança nas atividades de cultivo aquícola e suas interações com o meio ambiente.

V. Controle de Fugas de Animais Cultivados para o Ambiente Natural

Legislação Pertinente

A fuga de animais cultivados para o ambiente natural é um fator preocupante, principalmente, do ponto de vista ambiental, já que as consequências são imensuráveis em se tratando de espécies exótica e animais confinados em sistemas de cultivo.

Objetivo:

Implantar mecanismos de prevenção afim de minimizar riscos em potencial de escape de camarões para o ambiente natural.

Compromissos:

- a) O ranário² deve possuir mecanismos de controle de fugas – evitar saída de animais cultivados para o ambiente - para todas as fases da produção, desde da forma larvária, juvenil até adulto, através de recipientes eficazes como caixas coletoras teladas (com malhas com abertura apropriadas para reter os animais).nos sistemas de escoamento de água em todos setores do ranário.
- b) A recolhimento de possíveis animais nas coletoras devem ser no mínimo diário, de preferência duas vezes ao dia.
- c) Promover oportunidades de treinamento e capacitação em prevenção de fugas de animais cultivados.
- d) Os ranicultores devem, em caso de fugas, cooperar e informar as autoridades competentes para assegurar que as ações apropriadas sejam tomadas;

² Estabelecimento de cultivo de rãs.

VI. Agentes Terapêuticos e Outras Substâncias Químicas

Legislação Pertinente

O uso de terapêuticos e substâncias químicas na água é uma ação que requer rigoroso controle, pois podem ser substâncias potencialmente tóxicas e produzir compostos bio-acumulativos comprometendo os animais e o meio ambiente. Algumas dessas substâncias são utilizadas por serem consideradas importantes no sistema de produção da atividade, porem deve ser exercido um controle rigoroso no emprego das mesmas para se obter uma produção de alimentos saudáveis para o consumidor e garantir a proteção do meio ambiente.

Objetivo:

Exercer um controle no manejo de agentes terapeuticos e outras substancias químicas visando a produção de alimentos saudáveis e a proteção do meio ambiente.

Compromissos:

- a) Minimizar e, onde por praticável, eliminar o uso de substâncias químicas.
- b) O uso de produtos terapêuticos e substâncias químicas devem ser evitados, prevenindo doenças por meio da minimização do estresse, utilização de práticas adequadas de manejo de nutrição, preparação de tanques, controle da qualidade da água;
- c) Devem ser usados nos tanques apenas os produtos aprovados pelos órgãos governamentais competentes obedecendo as recomendações de dosificação, período de validade, sistema de armazenagem, eliminação e outras limitações, incluindo precauções ambientais e de segurança humana;
- d) Os controles e registros específicos a respeito de uso de produtos terapêuticos e substâncias químicas nos tanques, serão mantidos sempre atualizados e disponíveis para solicitação e averiguação.
- e) Devem assegurar a descarga correta de substâncias químicas registradas.
- f) No caso de qualquer eventualidade os órgãos responsáveis devem ser informados, para que as medidas necessárias sejam conduzidas.

VII. Técnicas de Manejo

Legislação Pertinente

A tecnologia empregada nos sistemas de cultivo são essenciais para o bom andamento da atividade, além de evitar a eutrofização, salinização, reduções da biodiversidade e outras perturbações ambientais. O desenvolvimento de tecnologias de manejo é fundamental para o desempenho econômico do sistema de cultivo e manutenção da qualidade ambiental, justificando o investimento em material, pessoal capacitado e treinamento.

Objetivo:

Adotar e buscar técnicas de manejo eficientes de forma a minimizar e/ou eliminar impactos adversos ao meio ambiente.

Compromissos:

- a) As densidades de povoamento e taxas de alimentação não devem exceder à capacidade assimilativa do sistema de cultivo e medidas que garantam estas exigências devem ser adotadas, como: alimentos de boa qualidade e boas práticas de alimentação;
- b) A preservação da qualidade da água deve ser mantida de forma evitar renovação e se necessário utilizar taxas mínimas indispensáveis para manter as rãs em boas condições de saúde;
- c) Os fertilizantes, os materiais de calagem e todos os demais produtos, somente devem ser usados nas quantidades necessárias e de maneira responsável em relação ao meio ambiente;
- d) Efluentes, sedimentos e outros resíduos devem ser gerenciados responsabilmente, utilizando tratamento eficaz que assegure a manutenção da qualidade ambiental;
- e) O fundo dos tanques deve ser avaliado periodicamente e os tratamentos necessários aplicados para restabelecer as condições naturais do solo, os quais incluem o processo de secagem e a aplicação de corretivos.

VIII. Efluentes e Resíduos Sólidos

Legislação Pertinente

- Resolução CONAMA nº 001 de 23/01/86. Define impacto ambiental como qualquer alteração física, química e biológica do meio ambiente, causada por resultante de atividades humanas;
- Resolução CONAMA nº 20 de 18/06/86. Estabelece classificação das águas doces, salobras e salinas de modo a assegurar seus usos e qualidade.

Os empreendimentos aquícolas, devem possuir medidas preventivas e métodos de tratamento ambiental, possibilitando utilizar corretamente os recursos hídricos, minimizando a possibilidade de impacto sobre os ecossistemas adjacentes, promovendo a sustentabilidade da atividade.

Objetivo:

Adotar mecanismos de controle de qualidade e destino correto dos efluentes e resíduos oriundos do cultivo.

Compromissos:

- a) A taxa de renovação deve acompanhar a tendência de troca zero, buscando sistemas de recirculação e trocas mínimas, adaptando o modelo as condições locais do ranário;
- b) Devem ser usadas práticas de fertilização e alimentação eficientes que permitam promover a produtividade primária natural e minimizar a eutrofização, assegurando que o meio adjacente não apresente interferências;
- c) A drenagem dos tanques devem adotar medidas que minimizem a suspensão dos sedimentos, evitem a velocidade excessiva da água nos canais e nas comportas de saída e contemplem sistemas de redução de material em suspensão na água residual;
- d) O lixo, excrementos humanos e outros resíduos devem ser eliminados por métodos corretos, do ponto de vista sanitário e ambiental, respeitando as regulamentações governamentais;
- e) Os sistemas de tratamento de efluentes devem ser compatíveis com a estrutura e capacidade instalada, e ainda com a quantidade e qualidade de efluentes gerados, respeitando as regulamentações governamentais;
- f) O manejo e sistemas de tratamento de resíduos devem ser avaliados e melhorados, periodicamente, permitindo ajuste na eficiência dos métodos empregados.

IX. Direitos e Segurança de Outros Usuários de Recursos Hídricos

Legislação Pertinente

- Lei nº 9.433, de 08/01/1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos e cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos.

A água é um recurso natural limitado dotado de valor econômico, além de ser um bem de domínio público que deve ser gerenciado de forma a proporcionar usos múltiplos e assegurar, à atual e às futuras gerações, a disponibilidade necessária, em padrões de qualidade adequados aos respectivos usos.

Objetivo:

Adotar medidas necessárias que assegurem a disponibilidade da água de forma a respeitar os direitos e segurança dos outros usuários.

Compromissos:

- a) Reconhecer as necessidades e espaço de outros usuários dos mesmos recursos, promovendo uso de forma a minimizar conflitos;
- b) Reconhecer que o uso de recursos públicos implica em alta responsabilidade por parte do usuário;
- c) Promover a integração e a consulta com comunidades locais/vizinhas e outros usuários dos recursos, de forma que as problemáticas e preocupações levantadas sejam legítimas e que as soluções pertinentes sejam desenvolvidas;
- d) Assegurar a manutenção e a organização do empreendimento e localidades adjacentes, minimizando impactos visuais, sonoros, entre outros.
- e) Promover e divulgar para a comunidade os benefícios que são alcançados com o monitoramento e preservação do meio ambiente, levando a comunidade a ter uma participação ativa no processo.
- f) Assegurar a instalação de sinalização de navegação adequada nas mediações do cultivo, de forma a prevenir a ocorrência de acidentes.

X. Comunidade Local

Legislação
Pertinente

Ao instalar um empreendimento são analisados diversos fatores existentes no local e/ou região de abrangência, sendo necessário contemplar as comunidades locais e atividades econômicas já existentes.

Objetivo:

Promover boas relações e interações entre dirigentes e comunidades locais, desde a concepção do projeto até a concessão para instalação e operação.

Compromissos:

- a) Área regularizada quanto a posse, uso e licenças, evitando possíveis conflitos com vizinhos ou com a comunidade;
- b) Divulgar o empreendimento para comunidade local, contemplando estrutura montada, finalidade, legalidade do empreendimento, ações para minimização dos impactos ambientais e sociais;
- c) Informar e consultar comunidades locais/vizinhas de forma que as problemáticas e preocupações levantadas sejam legítimas e que as soluções pertinentes sejam desenvolvidas;
- d) Priorizar a utilização da mão de obra local, oferecendo empregos e benefícios sociais que venham a minimizar os impactos sociais e econômicos da localidade.

ANEXO 3 – PROCESSO DE TRATAMENTO COM RAIOS GAMA

PROCESSO TRATAMENTO ATRAVÉS RAIOS γ COBALTO-60 EXECUTADO POR EMBRARAD EMPRESA BRASILEIRA DE RADIAÇÕES

A radiação utilizada é a radiação gama emitida pelo radioisótopo Cobalto-60.

O material é processado em irradiadores modelos *JS-7500* e *JS 9600*, de procedência Canadense. O material é recebido em caixas de embarque totalmente lacradas, e assim processadas sem manuseio interno do produto.

O material é recebido, identificado e alocado no armazém de materiais não irradiados. Os armazéns de material não irradiado e irradiado são fisicamente segregados.

O Encarregado da Operação inclui o processamento do material na programação de acordo com a data de entrada do material e com a dose que este deve receber. Esta dose é especificada em testes iniciais anteriores ao processamento em rotina

Os materiais a serem irradiados são colocados em recipientes de alumínio que são transportados por uma esteira até a câmara onde se encontra a fonte, seguindo um trajeto pré determinado e fixo ao longo do qual acumulam a dose pré estabelecida. Após a irradiação são trazidos para fora da câmara também automaticamente. O tempo de irradiação é definido de acordo com o peso do material, a dose preconizada e a atividade da fonte radioativa.

O movimento dos recipientes é feito através de uma esteira com roletes na qual os mesmos são empurrados por pistões pneumáticos.

Tanto a esteira quanto o trajeto dentro da câmara de irradiação não permitem qualquer desvio dos recipientes, portanto a geometria de irradiação é sempre a mesma, fazendo com que o parâmetro que controla a dose recebida seja o tempo.

Antes de serem irradiados, os materiais recebem um selo radiossensível na sua embalagem externa que muda de cor (amarelo para vermelho) quando exposto à radiação. Ao saírem da máquina, os materiais recebem imediatamente uma etiqueta com a data de processamento, próxima ao selo radiossensível, que nesta etapa, está vermelho. Os materiais não são manuseados internamente. O processamento se dá já na embalagem final do produto. Devido a isso, a embalagem para processamento deve ser totalmente inviolável, pois é ela que garante que não haja recontaminação após o processo. Após o processamento, cada volume recebe uma etiqueta de "processado", com a data..

Além do selo radiossensível, o processo é monitorado com dosímetros, modelo Red Perspex 4034, calibrados no NPL (National Physics Laboratory) da Inglaterra.

Após o processamento, os materiais são colocados no armazém de materiais irradiados de onde serão expedidos.

Todos os equipamentos de apoio utilizados para controle do processo são calibrados, incluindo a balança e o cronômetro.

Todo o processamento é registrado em um log-book (“Registro de Irradiações”) numerado, permitindo a rastreabilidade de qualquer operação. Todos os dados da operação e dos equipamentos de apoio utilizados são registrados e arquivados por prazo pré-definido pelo sistema da qualidade.

A Embrarad fornece um certificado do processo realizado, que acompanha a Nota Fiscal.

A máquina é operada por técnico de nível médio com treinamento dado na própria empresa pelos supervisores de radioproteção.

O supervisor de radioproteção é o profissional responsável pela operação e segurança da máquina. É um profissional de curso superior, reconhecido e credenciado pela Comissão Nacional de Energia Nuclear. A EMBRARAD tem 4 Supervisores de Radioproteção qualificados, sendo as instalações licenciadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde e Polícia Federal.

O nosso sistema de qualidade é certificado segundo as Normas ISO 9001, pela DQS do Brasil e o sistema de dosimetria pela Agência Internacional de Energia Atômica, pelo serviço IDAS (International Dose Assurance Service).

Permanecemos ao dispor para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,

Beatriz Hutzler
EMBRARAD
08/2001.