



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CAMILA BIANCO PIMENTEL

**ESTUDO DOS EFEITOS CELULARES E VASCULARES DA
CRIOCIRURGIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO, NA PELE DE
RATOS, POR MÉTODO HISTOPATOLÓGICO.**

**CAMPINAS
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CAMILA BIANCO PIMENTEL

**ESTUDO DOS EFEITOS CELULARES E VASCULARES DA
CRIOCIRURGIA COM NITROGÊNIO LÍQUIDO, NA PELE DE
RATOS, POR MÉTODO HISTOPATOLÓGICO.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Clínica Médica na área de concentração Ciências Básicas. Sob orientação da Profa. Dra. Aparecida Machado Moraes

ORIENTADORA: Profa. Dra. APARECIDA MACHADO DE MORAES

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA LETÍCIA CINTRA

CAMPINAS / 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

P649e

Pimentel, Camila Bianco, 1977 -
Estudo dos efeitos celulares e vasculares da
criocirurgia com nitrogênio líquido, na pele de ratos,
por método histopatológico . / Camila Bianco
Pimentel. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Aparecida Machado Moraes
Coorientador: Maria Letícia Cintra
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual
de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Criocirurgia. 2. Úlcera Cutânea. 3.
Cicatrização. 4. Neovascularização. I. Moraes,
Aparecida Machado. II. Cintra, Maria Letícia. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. VI. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: The study of cellular and vascular effects of cryosurgery with liquid nitrogen, in rat skin, using the histopathological method

Palavra-chave em inglês:

Cryosurgery

Skin Ulcer

Healing

Neovascularization

Área de Concentração: Ciências Básicas - Dermatologia

Titulação: Mestre em Clínica Médica

Banca examinadora:

Aparecida Machado de Moraes [Orientador]

Celina Wakisaba Maruta

Renata Ferreira Magalhães

Data da defesa: 06-12-2011

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Camila Bianco Pimentel

Orientador: Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes

Membros:

1. Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães

2. Profa. Dra. Celina Wakisaka Maruta

3. Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/12/2011

Dedico este trabalho...

Aos meus pais **Paulo e Tânia**, que sempre acreditaram em meu potencial, por terem me ajudado a realizar o sonho de ser Médica Veterinária, por me apoiarem em minhas decisões, com conselhos e muito carinho, sempre prontos para me ajudar e dar colo.

Ao meu marido **Rafael**, meu companheiro de todos os momentos, pela paciência, ensinamentos, dedicação as filhas e a nossos animais na minha ausência, e pelo incentivo para seguir em frente.

A minha filha **Bruna**, que mesmo tão pequena precisou entender minha ausência, parecia saber da importância deste desafio.

A minha filha **Luana**, que na maior parte desta fase final não estava ao meu lado, mas dentro da minha barriga, por ter agüentado firme, que por muitas vezes deixou de ter momentos tranquilos, para enfrentar a correria e o cansaço, não é a toa que chegou antes da hora!

Aos meus irmãos, **Glauco e Fernanda**, que mesmo distantes, estão sempre torcendo pelo meu sucesso profissional e pessoal.

Ao meu padrinho **Eugênio**, que me proporcionou conhecer o mundo da Dermatologia, por ter confiado e acreditado no meu potencial. Certa vez disse a ele que um dia teria orgulho de mim, acho que este dia chegou.

Ao eterno mestre **Ronaldo Lucas**, que permitiu que eu o acompanhasse, acreditou em meu potencial e foi fundamental para que eu me tornasse uma Dermatologista Veterinária. Nunca vou esquecer suas palavras, que para muitos podem soar estranho, mas para mim é motivo de muito orgulho: “Te transformei de carvão em diamante”.

AGRADECIMENTOS

A **Professora Dra. Aparecida Machado de Moraes**, orientadora desta pesquisa, por ter acreditado no meu potencial, pelos ensinamentos e ajuda durante todo estudo. Além de ter me aceitado como orientada, me deu a oportunidade de acompanhá-la no ambulatório de criocirurgia, proporcionando mais aprendizado.

A **Professora Dra. Maria Letícia Cintra**, co-orientadora desta pesquisa, que sempre estava disposta a me ajudar. Pela paciência nos ensinamentos, pelas palavras animadoras e elogios a cada etapa vencida.

Ao **Prof Dr. Erich Vinicius de Paula** do Departamento de Hematologia, por ter me recebido e me orientado sobre pesquisa envolvendo angiogênese

Aos meu amigos, **Guilherme e Bicudo**, pela ajuda com as traduções, e a amiga **Érika** pela ajuda com as tabelas e gráficos. A todos os outros amigos que de alguma forma contribuíram para o sucesso do meu projeto, seja diretamente ou em pensamento.

Ao colega e amigo **Marcelo Conteyri** pela ajuda e conselhos.

À todos do **Departamento de Patologia** por terem me recebido de braços abertos, em especial às pós-graduandas **Ana Flávia** e **Tania**, sempre prontas para esclarecer minhas dúvidas, pelos conselhos e ajuda, e às funcionárias **Claudia** e **Luzia**, do Laboratório de Imunohistoquímica, que não mediram esforço para que este trabalho desse certo. A vocês um agradecimento especial pelo carinho que sempre tiveram por mim.

Aos funcionários **William, Miguel, Waldemir** e **Ana**, do Núcleo de Cirurgia Experimental da Unicamp, e ao funcionário **Aparecido** do Departamento de Patologia, pela atenção e ajuda que foram fundamentais para execução do experimento e elaboração dos materiais.

Ao funcionário **Adilson** do Departamento de Patologia, pela ajuda com as fotos, para que o trabalho tivesse imagens de excelente qualidade.

Aos funcionários do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, em especial à **Cleide**, pela análise e elaboração das tabelas e gráficos dos resultados do estudo.

Às secretárias **Maria do Carmo** e **Beth** do Departamento de Cirurgia e às funcionárias Cris e Paula da pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, por toda ajuda.

À Universidade Estadual de Campinas – **UNICAMP**, por ter aberto suas portas, dando condições para execução do projeto e a oportunidade de conhecer não só profissionais extremamente competentes, mas pessoas maravilhosas que fazem parte desta instituição.

À **FAEPEX** (Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão) pelo auxílio pesquisa concedido, garantindo subsídios para execução desta pesquisa.

Ao **Departamento de Dermatologia**, pela ajuda financeira no início da pesquisa.

Aos **animais**, fundamentais para realização da maioria das pesquisas, que inocentes dão suas vidas para o aprendizado, desenvolvimento e melhoria da vida dos seres humanos e outros animais. Podem ter certeza, não foi nada fácil para mim!!!

AGRADEÇO, **a todos** que de alguma forma, contribuíram para a realização e sucesso desta pesquisa, e que não estão aqui citados.

*"A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter,
e quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."*

Arthur Schopenhauer

"Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha,
é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra!

Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha
e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si
e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela
responsabilidade da vida e a prova de que
as pessoas não se encontram por acaso."

Charles Chaplin

RESUMO

RESUMO:

A criocirurgia é uma técnica terapêutica muito eficaz no tratamento de diversas lesões cutâneas benignas e malignas. O principal mecanismo de ação desta técnica está relacionado aos seus efeitos vasculares no tecido tratado. Após o procedimento criocirúrgico ocorre a formação de um tecido de granulação exuberante no local da aplicação, provavelmente por estímulo angiogênico do criógeno e da resposta inflamatória, particularmente nas células endoteliais. Objetivos: avaliar e comparar os efeitos angiogênicos da criocirurgia, por método histopatológico (hematoxilina-eosina), na pele normal e previamente submetida a injúria experimental de ratos, utilizando-se o nitrogênio líquido como criógeno de escolha. Métodos: Foram realizadas duas feridas experimentais no dorso de 20 ratos, machos, linhagem Lewis, adultos jovens, com peso entre 180 e 220gramas, utilizando-se *punch* de 5mm, distantes 2 cm uma da outra. Após 3 dias, foi realizada criocirurgia com nitrogênio líquido em uma delas, utilizando-se a técnica do *spray* aberto por 15 segundos. Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos de dez animais. Após 7 dias (grupo I) e 14 dias (grupo II), as amostras foram coletadas e encaminhadas para análise histológica, para avaliação da celularidade (angiogênese) local nos diferentes momentos e situações. Resultados: Foi possível comprovar que a criocirurgia, apesar de promover morte celular logo após sua aplicação e um processo inflamatório local acentuado, induz em um segundo momento, uma rápida proliferação celular e a manutenção desta taxa de celularidade, quando comparada ao mesmo fenômeno na cicatrização tecidual sem este procedimento. Conclusão: Estes achados, juntamente com o conhecimento de que existe uma relação direta entre as células mononucleares e neovascularização, e que há o desenvolvimento de um rico sistema de novos vasos em injúria causada pelo frio, sugerem que a criocirurgia, apesar de levar a uma cicatrização completa em um tempo mais prolongado, possui estímulo angiogênico.

Palavras-chave: Criocirurgia; úlcera cutânea; cicatrização; neovascularização

ABSTRACT

ABSTRACT:

Cryosurgery is a very efficient therapeutic technique to treat benign and malignant cutaneous diseases. The primary active mechanism of cryosurgery is related to vascular effects in treated tissue. After a cryosurgical procedure, exuberant granulation tissue is formed at the injection site, probably as a result of angiogenic stimulation of the cryogen and inflammatory response, particularly in endothelial cells. The objective of this study is to evaluate the angiogenic effects of freezing, as part of the phenomenon of healing rat skin subjected to previous injury. Methods: 20 young adult Lewis strain male rats were used, weighing between 180 and 220 grams. Each rat received two wounds that were administered 2 cm apart using a 5mm punch. After 3 days, cryosurgery with liquid nitrogen for 15 seconds, using the open spray technique, was done in one of them. These rats were divided randomly into two groups of 10 animals, group I (GI) and group II (GII). After 7 days (GI) and 14 days (GII), samples were collected cut and stained to realize histopathological examination, to assess the local angiogenesis in different moments and situations. Results: It was possible to demonstrate that cryosurgery, in spite of promoting cell death and accentuated local inflammation soon after its application, induces a more rapid cell proliferation in the affected tissue and maintenance of this rate in a second phase, than in tissue healing without this procedure. Conclusion: These findings, together with the knowledge that there is a direct relationship between mononuclear cells and neovascularization (the development of a rich system of new vessels in injury caused by cold), suggest that cryosurgery possesses angiogenic stimulus, even if taking longer for complete healing to occur.

Keywords: cryosurgery; skin ulcer; healing; neovascularization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Procedimento anestésico nos animais	39
Figura 2: Marcação individual dos animais	40
Figura 3: Demonstração das áreas controle (AC) e tratada (AT).	40
Figura 4: Antissepsia dos animais.....	41
Figura 5: Marcação das áreas a serem submetidas à ferida experimental	41
Figura 6: Realização das feridas experimentais.....	42
Figura 7: Dimensionamento horizontal das áreas	43
Figura 8: Aplicação do NL com auxílio de cone protetor	43
Figura 9: Acondicionamento do fragmento após coleta	44
Figura 10: Após coleta das amostras AC e AT com punch 8mm	44
Figura 11: Ocular do microscópio óptico	46
Figura 12: Gratícula Ciclóide	46
Quadro 1: Análise descritiva e comparação da quantidade de núcleos celulares na AC e na AT no GI D7	49
Figura 13: A: AC (controle) no 7° dia após a injúria; B: AT (tratada) no 7° dia após a injúria.....	49
Quadro 2: Análise descritiva e comparação da quantidade de núcleos celulares na área controle (AC) no GI (D7) e GII (D14).....	50
Figura 14: A: AC no 7° dia após a injúria; B: AC no 14° dia após a injúria.....	50
Quadro 3: Análise descritiva e comparação da quantidade de núcleos celulares na AT no GI (D7) e GII (D14)	51
Figura15: A: AT no D7 após a injúria; B: AT no D14 após a injúria.....	51
Gráfico 1: Dispersão da quantidade de núcleos celulares entre tratamentos e grupos	52
Quadro 4: Análise descritiva e resultados da comparação da quantidade de núcleos celulares entre tratamentos e grupos.....	53
Gráfico 2: Análise qualitativa quanto o grau de reepitelização da AC no D7	54
Gráfico 3: Análise qualitativa quanto o grau de reepitelização da AT no D7.....	54
Gráfico 4: Análise qualitativa quanto a presença de crosta na AC no D14	55

Gráfico 5: Análise qualitativa quanto a presença de crosta na AT no D14	55
Gráfico 6: Análise qualitativa quanto o grau de depressão residual da derme na AC no D14.....	56
Gráfico 7: Análise qualitativa quanto o grau de depressão residual da derme na AT no D14	56
Gráfico 8: Análise qualitativa quanto o grau de depressão residual da derme na AC no D14.....	57
Gráfico 9: Análise qualitativa quanto o grau de depressão residual da derme na AT no D14	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Área Controle
AT	Área Tratada
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
COEBA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
D0	Dia zero
D3	Dia três
D7	Dia sete
D14	Dia catorze
DAP	Departamento de Anatomia Patológica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
GI	Grupo I
GII	Grupo II
HE	Hematoxilina-eosina
IB	Instituto de Biologia
IFN-c	Interferon c
IL-4	Interleucina - 4
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina - 12
NL	Nitrogênio Líquido

LISTA DE NOTAÇÕES

° C	Grau Celsius
cm	Centímetros
Kg	Kilograma
mg	Miligramas
mm	Milímetros
μ	Micrômetros
n	Quantidade de animais
p	Nível de significância
X	Vezes
%	Porcentagem

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Definição de criocirurgia	21
1.2. História da criocirurgia	21
1.3. Princípios da criocirurgia	23
1.4. Técnicas de criocirurgia	26
1.5. Criolesão	27
1.6. Criocirurgia e angiogênese	29
1.7. Criocirurgia e celularidade	31
2. PROJETO PILOTO	33
2.1. Objetivos	34
2.2. Materiais e Métodos	34
2.3. Resultados	35
2.3.1. Observações clínicas e histopatológicas	35
2.3.2. Observações imunohistoquímicas	35
2.4. Conclusão	36
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivos gerais	38
3.2. Objetivos específicos	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Aspectos éticos da pesquisa	40
4.2. Protocolo Anestésico	40
4.3. Grupos Experimentais	41
4.4. Fases do Experimento	42
4.4.1. Primeira fase:	42
4.4.2. Segunda fase:	45
4.4.3. Terceira fase:	46
4.4.3.1. Morfometria Celular	46
4.4.3.2. Análise do processo de cicatrização	47
4.5. Análise Estatística	48

4.5.1. Objetivos	48
4.5.2. Metodologia Estatística	48
5. RESULTADOS	49
5.1. Celularidade	50
5.1.1. Área Controle X Área Tratada no D7.....	50
5.1.2. Área Controle no D7 e D14	51
5.1.3. Área Tratada no D7 e D14	52
5.1.4. Área Controle e Área Tratada no D7 e D14	53
5.2. Outros resultados	55
5.2.1. Grau de reepitelização no D7	55
5.2.2. Presença de Crosta no D14	56
5.2.3. Grau de Depressão Residual da Derme no D14	57
5.2.4. Espessura final da epiderme no D14	58
6. DISCUSSÃO:	59
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS	67
9. ANEXOS	71
10. APÊNDICES	73

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Definição

Um dos primeiros conceitos sobre a criocirurgia foi referido por Withrow em 1980, como sendo o uso de baixas temperaturas, induzindo a morte celular ¹. Com o passar do tempo e pesquisas relacionadas à criocirurgia, vários conceitos surgiram para definir e explicar o que ela representa.

Em 1994, Drake *et al.*, a classificaram, como um procedimento que utiliza agentes criogênicos para tratar várias desordens cutâneas, onde as temperaturas de congelamento destes agentes, aplicadas direta ou indiretamente sobre a pele causam destruição do tecido local ².

Atualmente, a criocirurgia pode ser definida como uma técnica que utiliza substâncias (criógenos) que produzem temperaturas baixas nos tecidos, para o tratamento de diversas lesões, por meio de mecanismos imediatos, tardios e imunomoduladores.

1.2. História da Criocirurgia

A criocirurgia ou crioterapia esta datada desde 2500 A.C., por ancestrais egípcios, que observaram que a aplicação do frio exercia um efeito calmante no local do trauma e reduzia a inflamação ³.

Em 1851, James Arnott alcançou temperaturas de – 24°C, empregando solução de gelo com sal. Foi pioneiro no uso de refrigeração para o congelamento de tumores, e ficou famoso por apresentar, no mesmo ano, alguns equipamentos para esta finalidade, em uma feira em Londres. É frequentemente descrito como o pai da criocirurgia moderna ^{4,5}.

Em 1877, Calliet *et al.*, alcançou temperaturas extremamente baixas ao utilizar o oxigênio e o monóxido de carbono como agentes criógenos, baseado no princípio do efeito Joule Thomson. Este efeito foi descoberto em 1852, observando-se que um gás sofre expansão no vácuo, e descreve a mudança de temperatura de um gás ou líquido quando são forçados através de uma válvula ou de conexões porosas, enquanto são mantidos isolados, para que nenhum calor seja trocado com o meio ambiente ⁴.

O primeiro uso significativo de agentes refrigerantes, com temperaturas extremamente baixas, para o tratamento de desordens médicas foi atribuído a White em 1899. Inicialmente, ele mergulhou aplicadores com extremidade de algodão em ar liquefeito e reportou com sucesso o tratamento de verrugas, nevus e várias condições cutâneas pré-cancerígenas. Ele também tratou várias condições malignas de pele com bons resultados ⁵.

Em 1951, Alington utilizou o Nitrogênio Líquido (NL) no tratamento de doenças dermatológicas e ginecológicas, devido à observação de que, os princípios do nitrogênio líquido eram semelhantes aos do oxigênio e monóxido de carbono⁴.

A era moderna da criocirurgia se deu quando Irving Cooper, um neurocirurgião, desenvolveu o primeiro sistema de sonda criogênica fechado. Inicialmente este sistema foi utilizado pelo Dr. Cooper no tratamento da doença de Parkinson, e a partir daí, a criocirurgia passou a ser utilizada no tratamento de tumores de diversas regiões do corpo ⁶.

Em 1985, Zacarian desenvolveu a sonda de cobre, atingindo temperaturas ainda mais baixas, proporcionando o uso da criocirurgia com NL para o tratamento de lesões mais profundas ⁴.

Desde o surgimento da criocirurgia, vários criógenos foram utilizados,

obtendo-se nos tecidos diferentes temperaturas, dióxido de carbono (-78,5°C), oxigênio (-187,5°C), óxido nitroso (-89,5°C) ⁷. Nas últimas décadas, o nitrogênio líquido tem sido o criógeno de escolha, tanto para congelamentos superficiais como para profundos de diversas condições dermatológicas. O NL na fase líquida está a -196°C, é de fácil armazenamento em pequenas quantidades, de baixo custo e não poluente para atmosfera ⁵.

Um grande avanço da criocirurgia, ocorreu no final do século XX, com o uso do gás argônio e desenvolvimento de equipamentos de monitoramento e imagem do procedimento criocirúrgico. O que permitiu no século XXI, a aplicação da criocirurgia no tratamento de diversos tumores cavitários, baseada em um sistema operacional denominado *Argon- helium knife*, que utiliza o gás argônio para o congelamento e o gás hélio para o aquecimento, obtendo-se um controle na formação da bola de gelo ⁴.

1.3. Princípios da Criocirurgia

As indicações da criocirurgia estão voltadas para os quadros estomato, oftalmo, procto e dermatopáticos ¹. Atualmente muitos trabalhos mostram a efetividade da criocirurgia com NL também em alguns casos de neoplasias hepáticas. Segundo Koushafar, em 1997, imagens intraoperatórias do congelamento, podem ser obtidas com ultra-som e ressonância magnética, o que tem produzido um novo impulso para o uso da criocirurgia no tratamento de tumores sólidos e profundos no corpo, como tumores de fígado e próstata ^{4,8}.

A grande dificuldade com relação à criocirurgia é a determinação do limite da destruição lesional. O ultra-som e a ressonância magnética são técnicas que têm sido avaliadas e têm se mostrado como importantes ferramentas para determinação precisa do tamanho e profundidade lesional na borda da bola de

gelo⁹. Lucas, em 1997, também referiu tomografia computadorizada como técnica para o acompanhamento do congelamento de tecidos em pacientes submetidos a criocirurgia¹.

Apesar da borda da bola de gelo, que está a $-0,5^{\circ}\text{C}$, poder ser visualizada por ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética, meios para identificar a “zona de morte” dentro da bola de gelo, são uma necessidade urgente. Também tem se mostrado como um grande interesse dos pesquisadores, a utilização de adjuvantes moleculares para aumentar a criosensibilidade do tecido na borda da bola de gelo, o qual, ao contrário, permaneceria viável. Desta forma, a destruição tecidual causada pela criocirurgia poderia ser conseguida não só no centro da bola de gelo, mas também em sua borda¹⁰.

Os efeitos destrutivos do congelamento tecidual ocasionado pela criocirurgia são baseados em fatores que podem ser agrupados em dois grandes mecanismos, um imediato, e o outro retardado. A causa imediata da injúria é o efeito deletério do ciclo congelamento e descongelamento sobre as células. Após o descongelamento do tecido, o mecanismo retardado da injúria, a falência progressiva da microcirculação e por fim a estase vascular. A importância relativa destes dois mecanismos tem sido motivo de longos debates. Além disto, sua complexidade causa considerável dificuldade em pesquisas *in vivo*. Um terceiro ponto a se considerar é o efeito imunoestimulante que a criocirurgia desencadeia. Foi observado, através de estudos, que ao se tratar um tumor primário com a criocirurgia, houve uma redução no tamanho dos tumores metastáticos. Tal fato sugere um benefício sistêmico a partir de uma terapia local^{11,12}.

Estudos recentes para a determinação do principal mecanismo pelo qual a criocirurgia pode modular o sistema imunológico, têm sido de grande interesse dos pesquisadores. Tal poder pode ser demonstrado tratando-se um tumor primário (induzido), e após um período de tempo apropriado, redessafiar o

animal a uma segunda dose tumorigênica, com a ausência do crescimento de um tumor secundário, evidencia-se a resposta imune. Esta ação imunológica também pode ser demonstrada devido um aumento significativo de IL-12 sérica e IFN- γ logo após o congelamento, alterações na concentração sérica de IL-4 e IL-10 não foram observadas ¹².

Gazzaniga, *et al* em 2001, evidenciaram um aumento na reatividade dos anticorpos as células tumorais de melanoma humano implantado em ratos, através do ELISA ¹³.

A criocirurgia produz um dano celular profundo através do congelamento do tecido. Se temperaturas suficientemente baixas (-50°C) não forem alcançadas no tecido tumoral, a destruição poderá ser incompleta, e as células neoplásicas remanescentes podem ser a fonte para a recidiva tumoral. É importante salientar que a completa criodestruição do tecido tumoral será alcançada se cuidados forem tomados para assegurar temperaturas suficientemente baixas no tecido ¹⁴.

A perda da circulação e anóxia celular, são comumente considerados por serem os principais mecanismos da injúria na criocirurgia. Experimentos em vários tecidos tem demonstrado que alterações vasculares são vistas em temperaturas de - 20°C. A resposta inicial para o congelamento do tecido é vasoconstricção e uma diminuição do fluxo de sangue. Com o congelamento, a circulação cessa. Assim que o tecido descongela e a temperatura atinge 0°C, a circulação retorna, agora com vasodilatação. O dano endotelial resulta no aumento da permeabilidade da parede do capilar, edema, agregação plaquetária, e formação de microtrombos, que resultam na estagnação da circulação em aproximadamente 45 minutos. A perda do suprimento sanguíneo priva todas as células de nenhuma possibilidade de sobreviverem e resulta em uma necrose uniforme do tecido, exceto na periferia que antecedente ao volume congelado ¹¹.

Bellman e Adams-Ray em 1956 , já demonstraram os efeitos vasculares após injúria pelo frio na orelha de ratos, através da microangiografia. Foi concluído que o trauma pelo frio envolvendo rápido congelamento seguido por rápido descongelamento, danifica menos o tecido do que um rápido congelamento e descongelamento lento ¹⁵.

Na criocirurgia, em qualquer simples ciclo congelamento-descongelamento, os fatores letais da técnica incluem o tempo de congelamento, a temperatura mais baixa alcançada, a duração do congelamento e a tempo de descongelamento. Qualquer destes fatores pode produzir a morte celular. A determinação da importância relativa de cada um destes fatores é difícil em condições criocirúrgicas, especialmente devido os ciclos de congelamento serem comumente repetidos e a isquemia tecidual ter a maior importância no mecanismo de morte tecidual ¹⁶.

Pesquisas *in vitro* não fornecem informações sobre o efeito das mudanças no fluxo sanguíneo, mas são importantes para entender a injúria criogênica em relação aos efeitos deletérios diretos do congelamento sobre as células ¹¹.

Para que se tenha sucesso no emprego da criocirurgia, é necessário atentar para as variantes: tecido a ser congelado, temperatura alcançada no tecido, técnicas e equipamentos utilizados, dimensões da lesão, rápido congelamento e lento descongelamento, e a repetição do ciclo ¹⁹.

1.4. Técnicas de Criocirurgia

O criógeno (NL) pode ser pulverizado, derramado no tecido, ou usado por meio de sondas de metal resfriadas durante a aplicação. As técnicas do *spray*

(pulverização) ou do derramamento são aplicadas somente para lesões superficiais, mas as sondas são mais versáteis e podem ser utilizadas de forma limitada para o congelamento de algumas lesões localizadas mais profundamente. A temperatura na superfície da sonda comumente está entre -165°C e -195°C , dependendo do diâmetro da sonda ⁷.

1.5. Criolesão

A resposta do tecido ao procedimento criocirúrgico varia desde uma resposta inflamatória, quando a aplicação é realizada por poucos segundos e um único ciclo, até a destruição do tecido (morte celular), quando a criocirurgia é mais agressiva, por mais tempo e mais de um ciclo¹¹.

O curso clínico-físico da criolesão na pele se inicia com a fase do congelamento, seguida por um eritema na periferia que ocorre imediatamente e até 30 minutos após a exposição ao criógeno. A área tratada se torna edemaciada entre alguns minutos e algumas horas do procedimento. A bolha se forma entre 1 a 3 dias. Em procedimentos mais agressivos, onde a aplicação do criógeno se dá por períodos mais longos, haverá exsudação por pelo menos uns 14 dias, seguida da mumificação da lesão. Desta forma, uma crosta é formada a partir da segunda a quarta semana após o tratamento ¹⁸.

Os efeitos deletérios da baixa temperatura na célula começam conforme a temperatura cai para faixa de hipotermia e a função e estrutura celular, inclusive de seus constituintes (proteínas e lipídeos), são alterados. Conforme a temperatura cai, o metabolismo celular também cai progressivamente. Se continuar por tempo suficientemente longo, a célula é tão prejudicada pela hipotermia que a morte pode ocorrer, mesmo que a célula não tenha sido submetida à temperatura de congelamento. A célula sobrevive a 0°C não mais do

que poucos dias e mesmo exposição curta a temperaturas não muito baixas podem matar a célula¹¹.

É a partir da formação de cristais de gelo extra e intracelulares que ocorre a morte celular através da danificação da membrana citoplasmática ¹⁴. Conforme a temperatura cai, a água vai se cristalizando, o que gera conseqüências mais sérias do que o resfriamento anterior. A formação dos cristais de gelo se dá primeiramente no espaço extracelular. A retirada da água deste espaço cria um ambiente hiperosmótico extracelular, que, por sua vez, atrai água das células, predominantemente em congelamentos moderados de cerca de -20°C. Conforme o processo continua, o cristal de gelo cresce, as células encolhem, e a membrana e os constituintes celulares são danificados. Dado determinado tempo, o aumento da concentração de eletrólitos é suficiente para destruição celular. Com resfriamento adicional, cristais de gelo podem se formar dentro da célula. A formação de cristais intracelulares ocorre mais comumente com rápido congelamento, o que não permite tempo para que a água saia da célula. O efeito deletério da desidratação e concentração de soluto nem sempre é letal para a célula, mas a formação do gelo intracelular gera uma séria ameaça para a viabilidade celular e quase sempre letal ¹¹.

O efeito da criocirurgia nas células neoplásicas cutâneas é maior do que nas células normais. Porém, células tumorais de metástase hepática têm se mostrado mais resistentes às baixas temperaturas do que tecidos hepáticos saudáveis, provavelmente devido à menor susceptibilidade à desidratação celular. Estudos recentes, *in vivo*, têm evidenciado que em fígado normal, a temperatura de 0°C é suficiente para completa perda da microcirculação hepática, resultando em morte celular e necrose tecidual. A temperatura de congelamento requerida para completa perda da microcirculação tumoral, por outro lado, ainda não foi determinada ¹⁹.

Um dos efeitos adversos da criocirurgia é hipopigmentação, mas estudos e a experiência clínica, indicam que repigmentação frequentemente ocorre ao longo de vários meses, devido aos melanócitos intactos dentro do folículo piloso, ou pela migração de melanócitos a partir da borda da zona congelada. No entanto, a previsibilidade da repigmentação em pacientes individuais é incerta ²⁰.

1.6. Criocirurgia e angiogênese

A vasculogênese, desenvolvimento do sistema vascular fetal, é um dos primeiros eventos do processo de organogênese. No embrião humano, esse processo se inicia pela migração de células do folheto mesodérmico entre o 15° e 18° dia de vida, dando origem às ilhotas sanguíneas. Várias etapas posteriores são necessárias para formação do sistema vascular funcional ²¹.

A angiogênese é definida como neoformação vascular, que ocorre em decorrência de estímulos desencadeados por fatores de crescimento específicos. É essencial para o crescimento tecidual e para os processos proliferativos celulares tanto fisiológicos como patológicos. É comumente determinada por meio da avaliação clínica, bem como da quantificação ou expressão de fatores de crescimento, citocinas, moléculas de adesão e migração de macromoléculas endoteliais, que podem estimular ou inibir este processo ²².

São freqüentes as situações em que a angiogênese ocorre na vida pós-embrionária. Em situações fisiológicas, exemplos clássicos incluem o ciclo ovulatório (formação e regressão do corpo lúteo) e o processo de cicatrização de feridas. Além disso, várias situações patológicas estão associadas ao aumento da angiogênese, tais como a inflamação, adaptação à isquemia, retinopatia proliferativa e o crescimento e disseminação de tumores ²¹. A visão corrente do

processo de crescimento vascular pós-natal baseia-se na premissa de que muitos dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário do sistema vascular são recapitulados no período pós-natal ²³.

Giampapa, em 1981, pesquisou os efeitos vasculares da injúria pelo frio, na tentativa de propor técnicas de criocirurgia para hemostasia em hemorragias gastrointestinais agudas. Segundo os autores, pode existir uma relação entre tamanho do vaso e tempo de congelamento envolvidos na estagnação vascular. O fluxo sanguíneo de pequenos vasos e capilares (< 0.33mm) cessa imediatamente com o congelamento. No entanto, médios (> 0.3 e < 1.0 mm) e grandes (> 1.0 e < 1.5 mm) vasos não são afetados até 2 a 5 dias após. Os maiores vasos requerem mais tempo para estagnação vascular ²⁴.

A formação de novos vasos após uma injúria causada pelo frio já é observada entre 24 a 48 horas após o trauma, com uma boa quantidade de vasos bem finos. Passados alguns dias, estes vasos já podem ser identificados na periferia da lesão. Vasos sanguíneos maiores, com diâmetro em torno de 0,3mm aparecem no centro da lesão em 3 a 4 dias. Possuem formato serpinginoso e a maioria irradia da periferia da lesão para grandes vasos sanguíneos no tecido envolvente. Foi comprovado que o tecido submetido ao frio não precisa morrer para que os pequenos vasos sejam danificados e permanentemente excluídos da circulação. Isto prova que o tecido pode ter nutrição suficiente através de mera difusão dos vasos da área ao redor e do rápido desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Baseado no resultados de diversos experimentos, concluiu-se que logo após o trauma pelo frio ocorre uma oclusão permanente dos pequenos vasos do tecido, seguido pelo desenvolvimento de um rico sistema de novos vasos entre o tecido envolvido e a parte externa da lesão, e que mais tarde a lesão causada pelo frio é revascularizada ¹⁵.

1.7. Criocirurgia e celularidade

A liberação dos constituintes sanguíneos a partir dos vasos danificados é o início do processo de cicatrização tecidual. Os componentes teciduais que estão envolvidos na cicatrização são: vasos sanguíneos, epiderme, derme, anexos, incluindo pêlos e glândulas, nervos, e tecido subcutâneo. Conseqüentemente, os tipos celulares envolvidos incluem principalmente células endoteliais, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, queratinócitos epidérmicos, fibroblastos, células da bainha radicular externa, neurônios e adipócitos ²⁵. É possível afirmar que existe uma relação direta entre a quantidade de células mononucleares e vasos neoformados no tecido ²⁶.

A fase de proliferação do processo de cicatrização é caracterizada pela formação do tecido de granulação, que é composto por novos vasos que migram para dentro da lesão (angiogênese / neovascularização), acúmulo de fibroblastos e matriz dermal, além das células endoteliais que desempenham o papel mais importante na angiogênese ^{25,26}.

Gazzaniga, em 2001, estudou, em modelos experimentais (orelha de ratos), as alterações inflamatórias que ocorrem nas primeiras horas e dias após a criocirurgia. Leucócitos polimorfonucleares foram densamente recrutados horas após a criocirurgia, infiltrando a área peritumoral e atingindo a concentração máxima no 3° dia. Macrófagos se tornaram abundantes a partir do 3° dia, atingindo o pico no 7° dia e mantendo-se até 15° dia. Além destas observações ¹³.

Trabalhos sobre cicatrização de feridas em ratos, utilizaram o exame histopatológico para avaliar, de forma qualitativa, quantitativa ou semiquantitativa, a presença de vasos sanguíneos, fibroblastos, leucócitos, mono e polimorfonucleares, reepitelização e produção de colágeno ²⁷. Também foram publicados trabalhos empregando o método imunohistoquímico, com o uso de marcadores específicos, para avaliar a expressão dos fatores angiogênicos,

número de vasos pré-existentes ou neoformados, bem como vasos linfáticos, sendo útil para a determinação da angiogênese local ²⁸.

2. PROJETO PILOTO

2. PROJETO PILOTO

2.1. Objetivos

Obter informações sobre a evolução clínica do processo cicatricial, tempo de congelamento ideal, estudo da celularidade por método histopatológico e análise da eficácia dos anticorpos selecionados (CD-34, CD-105, 1A4), para avaliação da angiogênese por método imunohistoquímico, no modelo experimental selecionado.

2.2. Material e Métodos

Foram utilizados dois ratos, linhagem Lewis, machos, de mesma idade e pesos semelhantes, sendo denominados grupo I (GI) e grupo II (GII), mantidos em gaiolas individuais com água e comida a vontade, durante todo o experimento.

No dorso de cada animal foram realizadas duas feridas experimentais, utilizando *punch* de 8mm, distantes 2cm uma da outra, sendo determinadas como ÁREA CONTROLE (AC), ferida cranial, e ÁREA TRATADA (AT), ferida caudal. Após a injúria experimental, foi realizada na AT do GI e GII, criocirurgia com nitrogênio líquido (NL), técnica do spray aberto durante 1 minuto, em jato contínuo até a formação da bola de gelo de 8mm, e após, jatos intermitentes para manutenção do congelamento e não extensão da bola de gelo.

Após três dias foram coletadas as amostras do GI e após 14 dias as amostras do GII, utilizando *punch* de 8mm, que foram envolvidas em papel manteiga, acondicionadas em cassetes e guardadas em formalina tamponada por 12 horas, a seguir colocadas em solução de álcool 70% por mais 12 horas, e encaminhados para o Departamento de Anatomia Patologica (DAP) - Unicamp. As amostras foram emblocadas em parafina e confeccionadas as lâminas para estudo histopatológico e imunohistoquímico.

2.3. Resultados

2.3.1. Observações clínicas e histopatológicas

✓ A criocirurgia atingiu o tecido muscular, uma vez que, a injúria experimental provocada anteriormente através do *punch* removeu as camadas da pele e o subcutâneo.

✓ As amostras da área controle (AC), coletadas do GI (D3), apresentavam sinais de reepitelização.

✓ As amostras da área tratada (AT), coletadas do GI (D3), apresentaram necrose tecidual excessiva.

✓ As amostras controle (AC), coletadas do GII (D14) demonstraram cicatrização completa.

✓ As amostras não apresentavam tecido sadio, o que prejudicou a boa fixação e confecção de lâminas de qualidade.

2.3.2. Observações Imunohistoquímicas

✓ CD-34 e CD-105: não houve coloração das células endoteliais.

✓ 1A4: corou células endoteliais de músculo liso de forma insatisfatória e também corou outras células.

2.4. Conclusões

2.4.1. A criocirurgia será realizada na AT três dias após a injúria experimental, quando já há indícios de reepitelização.

2.4.2. A coleta das amostras do GI deverá ser realizada após quatro dias da última injúria (criocirurgia), evitando a presença de células polimorfonucleares.

2.4.3. O tempo de aplicação do criógeno deverá ser reduzido, evitando necrose excessiva.

2.4.4. A coleta das amostras do GII pode ser mantida catorze dias após a injúria experimental, tempo suficiente para avaliação da cicatrização completa na AC.

2.4.5. Necessidade de amostras com tecido sadio incluso, desta forma, deve-se diminuir o diâmetro da área de injúria experimental e da área a ser congelada, ou aumentar a margem de coleta das amostras.

2.4.6. Devido a não eficácia dos anticorpos selecionados, mesmo após vários testes, a angiogênese será determinada pela relação direta existente entre a quantidade de células mononucleares e vasos neoformados, por meio de estudo histopatológico, através da morfometria.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O objetivo do trabalho é estudar a relação entre o efeito do congelamento do tecido, por meio do nitrogênio líquido e a indução da angiogênese local, na pele de ratos, por meio da avaliação clínica e método histopatológico.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar, de forma comparativa, a cicatrização espontânea e a cicatrização após criocirurgia, em ratos, por meio da quantificação das células do processo inflamatório pelo estudo morfométrico (histometria), e análise qualitativa e semiquantitativa, por meio da análise do grau de reepitelização, presença de crosta, espessura da epiderme jovem e grau de depressão residual, nos cortes histológicos de amostras coletadas no 7^o e 14^o dias após lesão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e Métodos

4.1. Aspectos éticos da pesquisa

O experimento foi realizado com ratos, linhagem Lewis, adultos jovens, com peso entre 180 e 220gramas, fornecidos pelo biotério central da Unicamp, no laboratório de Cirurgia Experimental da Unicamp, respeitando os princípios éticos na experimentação animal estabelecido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, sendo previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA – IB (Instituto de Biologia) / Unicamp (Nº. do protocolo: 1666-1) (anexo1).

4.2. Protocolo Anestésico

Todos os animais foram submetidos à anestesia dissociativa com Ketamina (75mg/Kg) e Xilazina (10mg/Kg), por via intraperitoneal, uma vez que esta técnica fornece bom relaxamento muscular e boa analgesia parietal por até 20 minutos, para realização da ferida experimental e da criocirurgia. Não foi necessária a realização de analgesia após os procedimentos, pois estes não causam desconforto que exija tal conduta (figura 1).



Figura 1: Procedimento anestésico nos animais.

4.3. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos de 10 animais, baseado no momento da coleta das amostras para análise histopatológica: GRUPO I (GI) amostras coletadas no 7° dia e GRUPO II (GII) amostras coletadas no 14° dia. Os animais do GI foram identificados como IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH, II, IJ, e os animais do GII como IIK, IIL, IIM, IIN, IIO, IIP, IIQ, IIR, IIS, IIT. Para que não houvesse erro na identificação dos animais, cada um recebeu uma marcação já padronizada pelo Núcleo de Cirurgia Experimental (figura 2).

No dorso de cada animal foram realizadas duas feridas experimentais, sendo determinadas como ÁREA CONTROLE (AC), ferida cranial, e ÁREA TRATADA (AT), ferida caudal (figura 3).

Os animais forma mantidos em gaiolas individuais com água e comida a vontade.



Figura 2: Marcação individual dos animais.

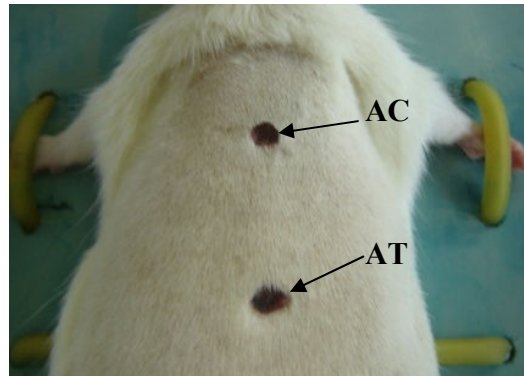


Figura 3: Demonstração das áreas controle (AC) e tratada (AT).

4.4. Fases do Experimento

4.4.1. Primeira fase - Procedimento nos animais

Realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Compreende os procedimentos com os animais em 4 momentos distintos: Dia zero (D0); Dia 3 (D3); Dia 7 (D7); Dia 14 (D14)

➤ **Dia zero (D0):** Realização das feridas experimentais nos animais dos dois grupos

Os animais foram anestesiados, conforme descrição já detalhada no item 4.2. A pele do dorso dos animais foi tricotomizada, utilizando-se máquina apropriada. Os animais foram posicionados e fixados em tábua de contenção em decúbito esternal, e a região dorsal devidamente preparada com clorexidina alcoólica 0,5%. Foram delimitadas, com caneta cirúrgica, 2 áreas de 1,0cm de diâmetro cada, distantes 2,0 cm uma da outra (AC e AT) (figuras 4 e 5).

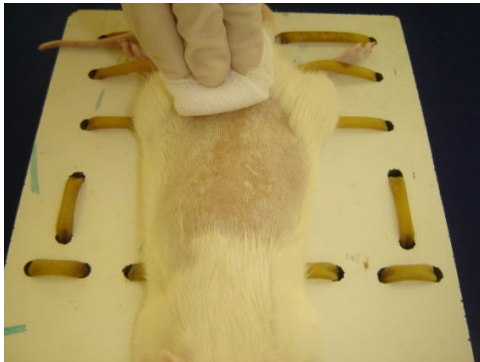


Figura 4: Antissepsia dos animais.

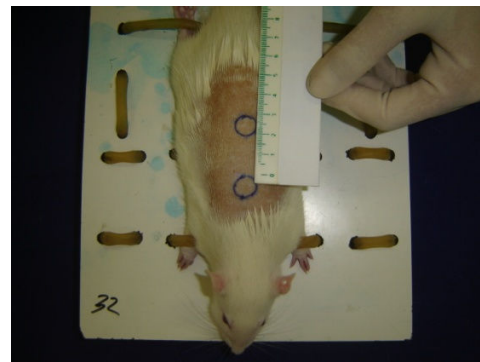


Figura 5: Marcação das áreas a serem submetidas à ferida experimental.

A seguir, foram realizadas as feridas experimentais (AC e AT), com *punch* de 5mm (estéril e descartável para cada animal) no centro de cada área marcada (figura 6).



Figura 6: Realização das feridas experimentais.

As amostras coletadas da AC foram envolvidas em papel manteiga e acondicionadas em cassetes. Após, foram mantidas em formol 10% por 12 horas, e solução de álcool 70% por mais 12 horas, para confecção dos blocos de parafina, e utilizadas como amostras controle.

➤ **Dia três (D3):** Avaliação clínica e dimensionamento da AC e AT, e realização de criocirurgia na AT nos animais dos dois grupos (GI e GII).

No terceiro dia da injúria experimental, os animais dos dois grupos (GI e GII) foram novamente submetidos ao procedimento anestésico. As feridas foram avaliadas por meio de inspeção clínica, preenchendo-se os dados numa ficha protocolar e dimensionadas no eixo horizontal (apêndice 1) (figura 7). A AT dos animais dos dois grupos, já em processo de cicatrização, foi submetida a criocirurgia com NL, técnica do *spray* aberto com o aparelho Cry-AC[®], por um período de 15 segundos. Um cone protetor de acrílico de 5 mm de diâmetro de abertura foi posicionado no local para restringir a área a ser submetida ao procedimento (figura 8). A AC foi mantida intocada para se avaliar o processo de angiogênese espontânea na cicatrização cutânea.

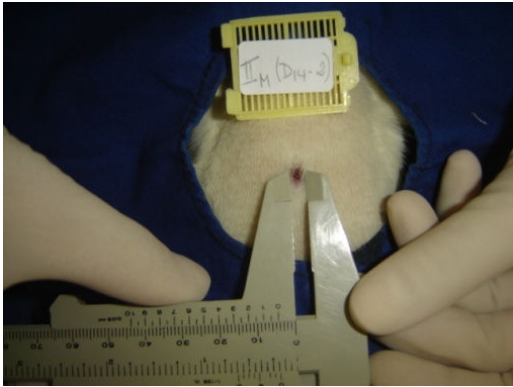


Figura 7: Dimensionamento horizontal das áreas.



Figura 8: Aplicação do NL com auxílio de cone protetor.

➤ **Dia sete (D7):** Avaliação clínica, dimensionamento das feridas e coleta das amostras. Procedimento nos animais do G1.

No sétimo dia da injúria experimental, os animais do G1 foram eutanasiados pela aplicação de tiopental intravenoso (veia dorsal da cauda). As feridas (AC e AT) foram avaliadas por meio de inspeção clínica, preenchendo-se os dados numa ficha protocolar e dimensionadas (apêndice 2). As amostras da AC e AT foram coletadas por meio de *punch* 8mm, que englobou o tecido cicatricial e 3mm de tecido normal adjacente à ferida (figuras 9 e 10). As amostras coletadas foram envolvidas em papel manteiga, acondicionadas em cassetes e guardadas em formol 10% por 12 horas, a seguir colocadas em solução de álcool 70% por mais 12 horas, para confecção dos blocos de parafina, para avaliação da celularidade (angiogênese) local na AC e AT, por meio de estudo histopatológico no sétimo dia após a injúria experimental.

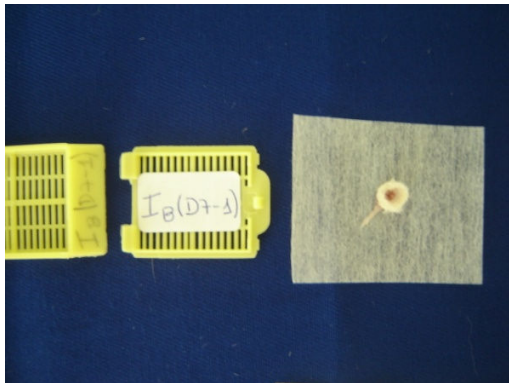


Figura 9: Acondicionamento do fragmento após coleta.

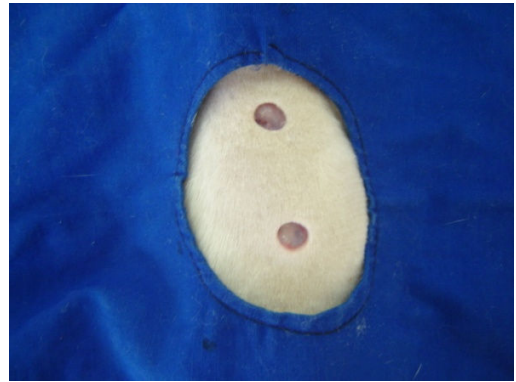


Figura 10: Após coleta das amostras AC e AT com *punch* 8mm.

➤ **Dia quatorze (D14):** Avaliação clínica, dimensionamento das feridas e coleta das amostras das duas áreas. Procedimento nos animais do GII.

No décimo quarto dia da injúria experimental, os mesmos procedimentos realizados nos animais do GI no D7 foram realizados nos animais do GII, e as amostras também submetidas à mesma metodologia acima citada, para avaliação da celularidade (angiogênese) local na AC e AT, por meio de estudo histopatológico no décimo quarto dia após a injúria experimental (apêndice 3).

4.4.2. Segunda fase - Preparo das amostras para análise histopatológica:

Realizada no Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, por profissionais qualificados e com experiência neste setor. Compreende a montagem dos blocos.

Após a fixação das amostras por 12 horas em formol 10%, seguida por um período de mais 12 horas em álcool 70%, as mesmas foram encaminhadas para o DAP, para processamento no autotécnico e inclusão em parafina. A seguir, foram obtidos cortes em micrótomo na espessura de 4 μ e as lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE).

4.4.3. Terceira fase - Análise Histopatológica

Realizada no Departamento de Anatomia Patológica (DAP) da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, pela pesquisadora e co-orientadora.

4.4.3.1. Morfometria Celular

O estudo morfométrico é uma técnica amplamente utilizada para o dimensionamento e quantificação de estruturas biológicas geométricas (células e tecidos), por meio de coleta e análise de resultados obtidos em pesquisas laboratoriais e/ou clínicas, com auxílio da microscopia. Tem por finalidade relacionar e correlacionar estas estruturas com suas funções e alterações. A Histometria se baseia no uso de grades de “superposição” (gratículas histométricas) associadas ao microscópio óptico, que permite a quantificação das áreas, dos volumes e do número de estruturas. (Pardini e Assis, 2005).

A contagem dos núcleos celulares foi realizada através de histometria, acoplado-se uma gratícula ciclóide à ocular de um microscópio Olympus CBA, com magnificação de 400x (ocular de 10X, conjugada a objetiva de imersão de 40X). A definição dos campos histometrados foi determinada como sendo 10 campos por amostragem sistemática na derme alta a partir da área mais celular,

evitando-se estruturas anexas e áreas necróticas, onde todos os núcleos que incidiam nos ciclóides foram contados (figura 11 e 12).

A gráticula ciclóide, possui linhas curvas que atenuam o efeito da distribuição mais paralela das fibras e portanto das células presentes. O teste se dá pelo cruzamento de pontos (Pardini e Assis, 2005).



Figura 11: Ocular do microscópio óptico.

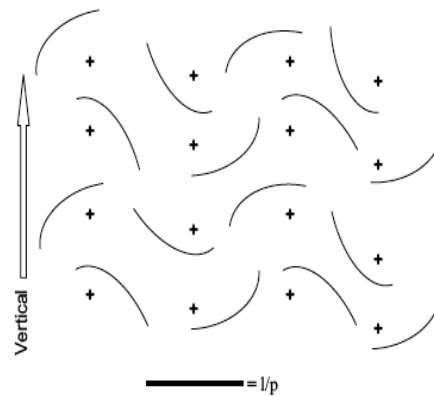


Figura 12: Gráticula Ciclóide.

4.4.3.2. Análise do processo de cicatrização

O processo de cicatrização foi analisado de forma qualitativa e semiquantitativa em microscópio Olympus CBA, com magnificação de 100x, 200x e 400x (ocular de 10X, conjugada a objetiva de 10x, 20x e 40X), através dos seguintes aspectos:

- ✓ grau de reepitelização
- ✓ presença de crosta (presente ou já descamada)
- ✓ espessura da epiderme jovem
- ✓ grau de depressão residual

4.5. Análise Estatística

Após a tabulação dos resultados, estes foram encaminhados para o departamento de Bioestatística da Unicamp, onde foram analisados através de estudos estatísticos por profissionais altamente qualificados.

4.5.1. Objetivos

Descrever e comparar as medidas avaliadas entre tratamentos (AC e AT) e grupos (GI e GII).

4.5.2. Metodologia Estatística

Foi realizada análise descritiva com apresentação de medidas de posição e dispersão para variáveis numéricas e tabelas de frequências para variáveis categóricas.

Para comparação das medidas numéricas entre tratamentos (AC e AT) e grupos (GI e GII) foi utilizada a ANOVA para medidas repetidas com transformação por postos.

Para comparação da quantidade de núcleos foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas.

Para comparação de proporções entre os tratamentos (AC e AT) foram utilizados o teste de McNemar e o teste de Simetria (teste de Bowker).

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Celularidade

5.1.1. Área Controle (AC) X Área Tratada (AT) no sétimo dia (D7):

Houve diferença significativa entre a quantidade de núcleos, células mononucleares, da área controle e área tratada no D7. A AC apresenta-se mais celular que a AT (quadro 1). Isto ocorre devido à destruição tecidual (necrose) intensa na derme alta da AT, causada pela criocirurgia (figura 13).

Quadro 1: Análise descritiva e comparação da quantidade de núcleos celulares na área controle (AC) e na área tratada (AT) no GI (D7).

VARIÁVEL	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MEDIANA	MÁXIMO	P-VALOR *
AC	8	31.125	2.626	26.100	30.900	43.400	
AT	8	20.013	5.876	12.400	22.550	27.800	
							0,0034

* teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (Hipótese nula: mediana da diferença=0)

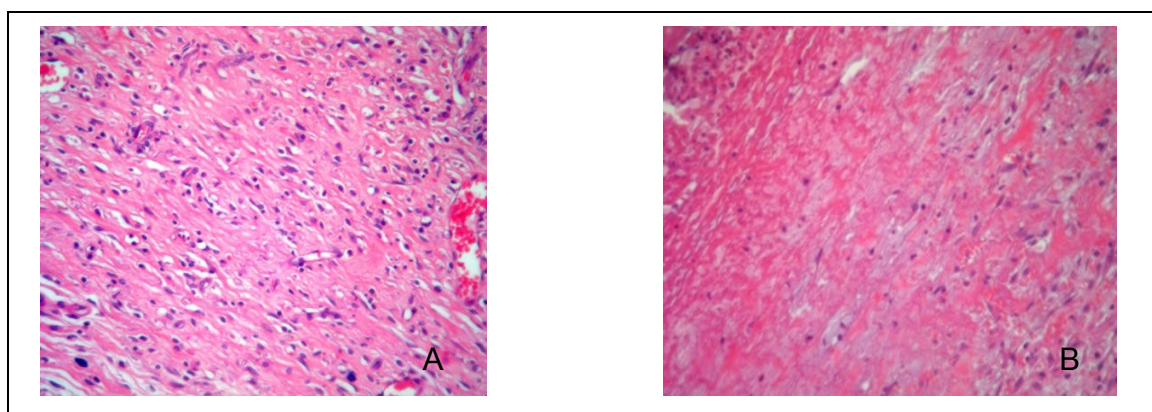


Figura 13: A: AC (controle) no 7º dia após a injúria – celularidade alta; B: AT (tratada) no 7º dia após a injúria – baixa celularidade com intensa necrose tecidual.

5.1.2) Área Controle (AC) no sétimo dia (D7) e décimo quarto dia (D14):

Houve diferença significativa na quantidade de núcleos da AC no D7 e D14. É possível observar uma queda acentuada da quantidade de células da AC (quadro 2). Tal queda na celularidade também pode ser observada através da análise qualitativa das amostras (figura 14).

Quadro 2: Análise descritiva e comparação da quantidade de núcleos celulares na área controle (AC) no GI (D7) e GII (D14).

VARIÁVEL	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MEDIANA	MÁXIMO	P-VALOR *
GI (D7)	8	31.125	2.626	26.100	30.900	34.400	
GII (D14)	9	18.740	4.096	12.857	18.250	26.000	
							0,0001

* Resultados da ANOVA para medidas repetidas

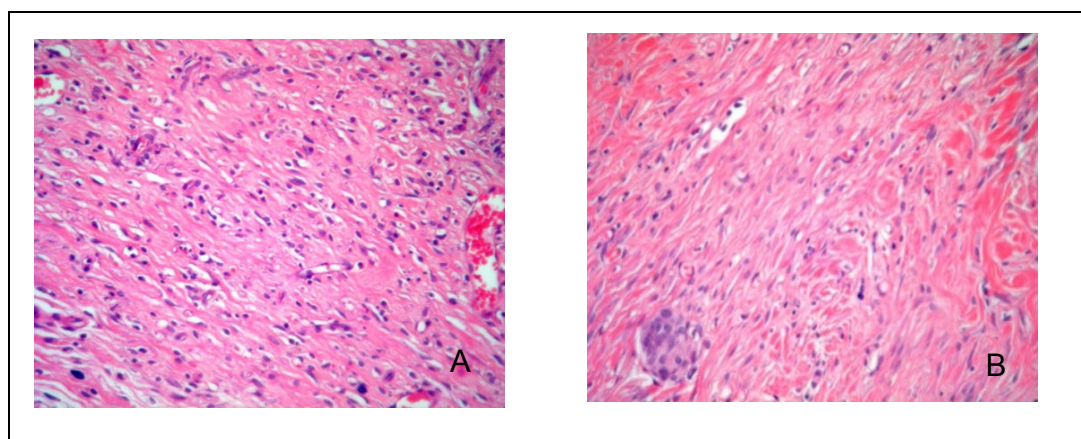


Figura 14: A: AC no 7º dia após a injúria – celularidade alta e grande quantidade de vasos; B: AC no 14º dia após a injúria – celularidade mais baixa e poucos vasos.

5.1.3. Área Tratada (AT) no sétimo dia (D7) e décimo quarto dia (D14):

Não houve diferença significativa na quantidade de núcleos da AT no D7 e D14 (quadro 3).

É possível afirmar a partir da observação histopatológica de grande necrose tecidual, que a celularidade na AT seria ainda menor, e que houve um intenso aumento da quantidade de células nesta área (figura 15). Tais dados não puderam ser demonstrados estatisticamente, pois foi determinado na metodologia do estudo, que a contagem celular seria realizada na derme alta evitando-se áreas de necrose e anexos.

Quadro 3: Análise descritiva e comparação da quantidade de núcleos celulares na área tratada (AT) no GI (D7) e GII (D14).

VARIÁVEL	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MEDIANA	MÁXIMO	P-VALOR *
GI (D7)	8	20.013	5.876	12.400	22.550	27.800	
GII (D14)	9	19.576	2.900	16.375	19.600	24.444	
							0,6905

* Resultados da ANOVA para medidas repetidas

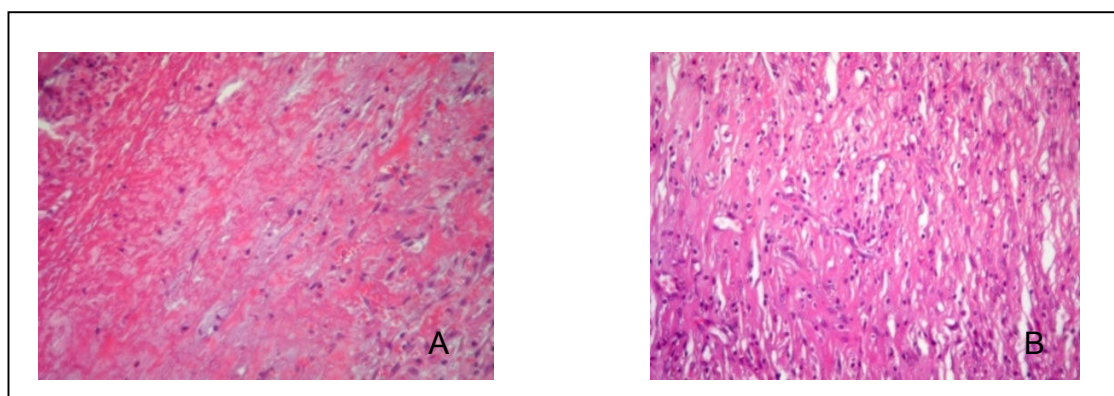


Figura15: A: AT no 7º dia após a injúria – baixa celularidade com intensa necrose tecidual; B: AT no 14º dia após a injúria – alta celularidade.

5.1.4. Área Controle (AC) e Área Tratada (AT) no sétimo dia (D7) e décimo quarto dia (D14):

Quando comparamos estatisticamente a celularidade na AC e AT nos diferentes momentos (D7 e D14), observa-se uma queda significativa da celularidade da AC e a manutenção da celularidade da AT (Gráfico 1 e Quadro 4).

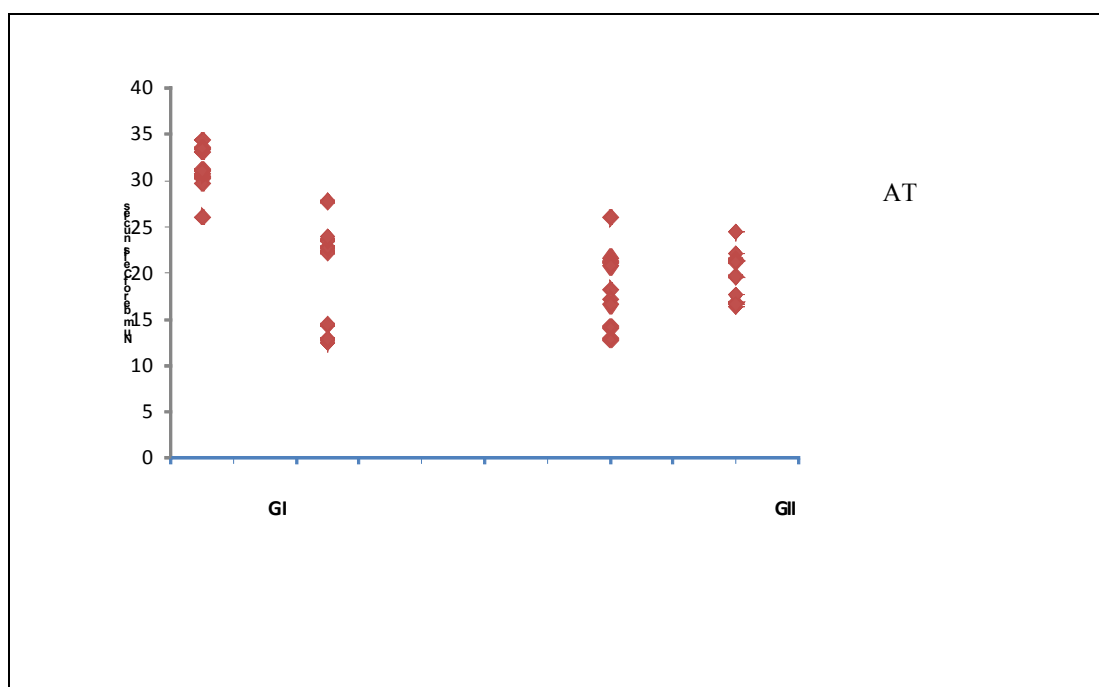


Gráfico 1: Dispersão da quantidade de núcleos celulares entre tratamentos e grupos.

Quadro 4: Análise descritiva e resultados da comparação da quantidade de núcleos celulares entre tratamentos e grupos.

GRUPO	VARIÁVEL	N	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MEDIANA	MÁXIMO
GI (D7)	AC	8	31.125	2.626	26.100	30.900	34.400
GI (D7)	AT	8	20.013	5.876	12.400	22.550	27.800
GII (D14)	AC	9	18.740	4.096	12.857	18.250	26.000
GII (D14)	AT	9	19.576	2.900	16.375	19.600	24.444

Fixando tratamento e comparando os grupos:

TRATAMENTO	P-VALOR
AC	< 0.0001 (GI mais núcleos que GII)
AT	0.6905 (GI igual a GII)

Fixando grupo e comparando os tratamentos:

GRUPO	P-VALOR
GI (D7)	0.0034 (AC mais núcleos que AT)
GII (D14)	0.6297 (AC igual a AT)

	EFEITO DO TRATAMENTO	EFEITO DO GRUPO	EFEITO DA INTERAÇÃO TRATAMENTO X GRUPO
P-VALOR	0.0137	0.0009	0.0033

5.2. Outros resultados

5.2.1. Grau de reepitelização no D7:

Estatisticamente não houve diferença significativa entre AC e AT quanto ao grau de reepitelização da epiderme no D7. Tal fato não era esperado, já que a criocirurgia promove necrose tecidual e conseqüentemente a permanência da crosta. Isto provavelmente se deve ao n baixo. Porém ao observarmos as porcentagens dos casos ulcerados, parcialmente reepitelizados e totalmente reepitelizados, podemos verificar diferença entre AC e AT (Gráfico 2 e 3)

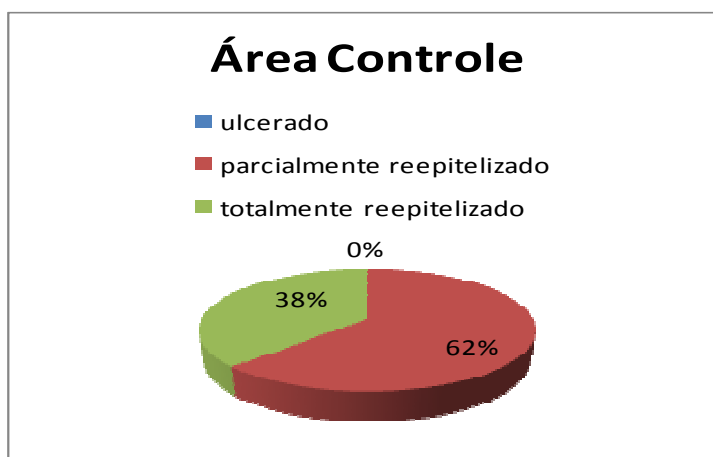


Gráfico 2: Análise qualitativa quanto o grau de reepitelização da AC no D7

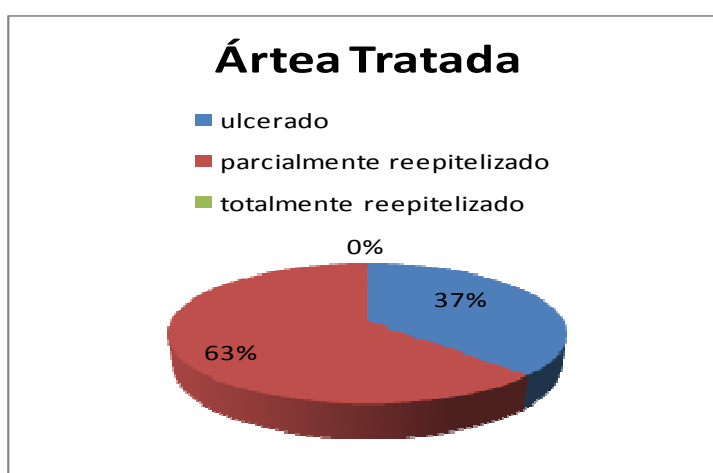


Gráfico 3: Análise qualitativa quanto o grau de reepitelização da AT no D7

5.2.2. Presença de Crosta no D14:

Houve diferença significativa entre AC e AT quanto à presença de crosta. Tal dado é diretamente relacionado ao grau de reepitelização da epiderme, uma vez que a crosta se destaca quando a reepitelização se completa. (Gráficos 4 e 5) .

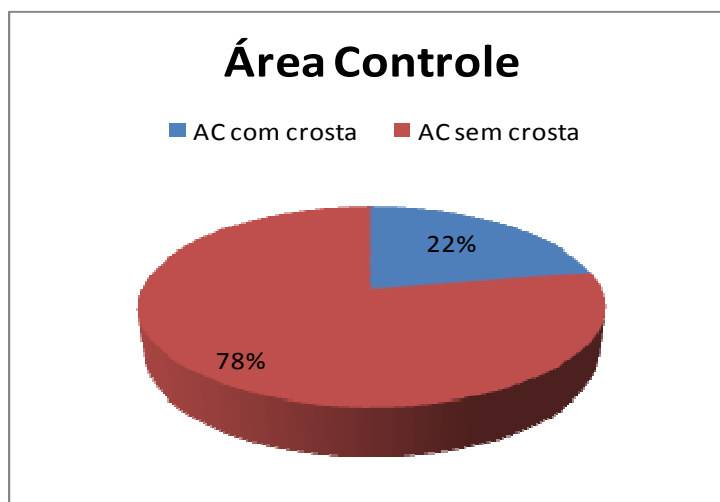


Gráfico 4: Análise qualitativa quanto a presença de crosta na AC no D14.

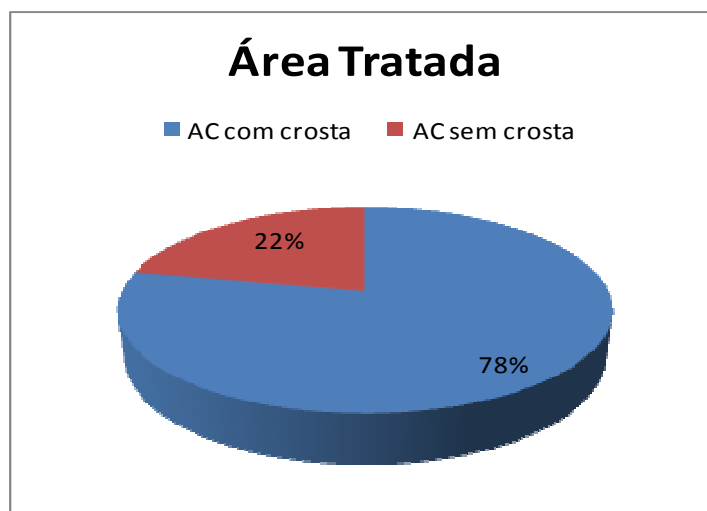


Gráfico 5: Análise qualitativa quanto a presença de crosta na AT no D14.

5.2.3) Grau de Depressão Residual da Derme no D14:

Houve diferença significativa entre AC e AT quanto o grau de depressão residual da derme. A criocirurgia induz a depressão da derme. Tal fato é clinicamente observado com a formação de uma cicatriz atrófica (Gráficos 6 e 7)

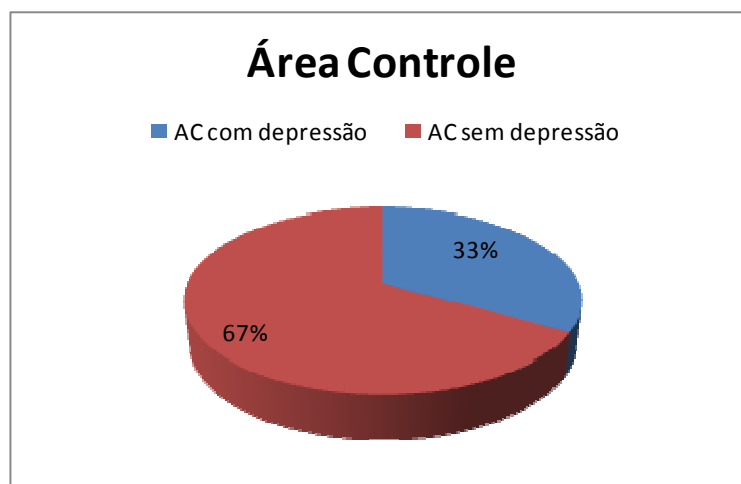


Gráfico 6: Análise qualitativa do grau de depressão residual da derme na AC no D14.

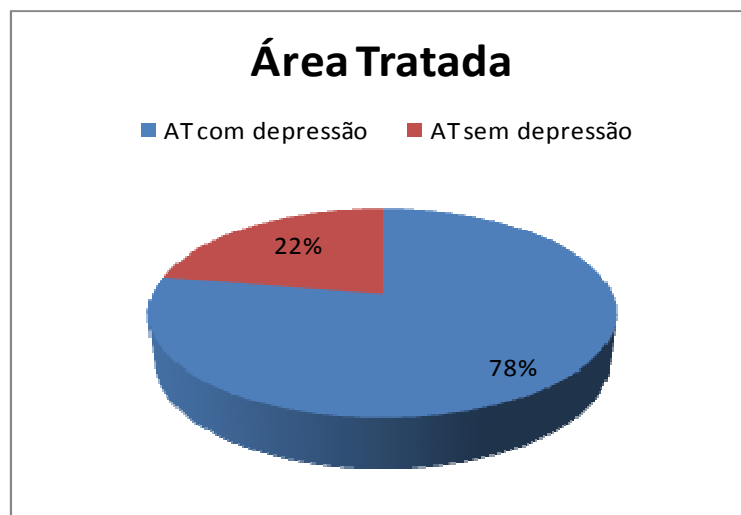


Gráfico 7: Análise qualitativa do grau de depressão residual da derme na AT no D14.

5.2.4) Espessura final da epiderme no D14:

Não houve diferença significativa entre AC e AT quanto à espessura final da epiderme. A criocirurgia não altera a espessura final da epiderme. (Gráficos 8 e 9) .

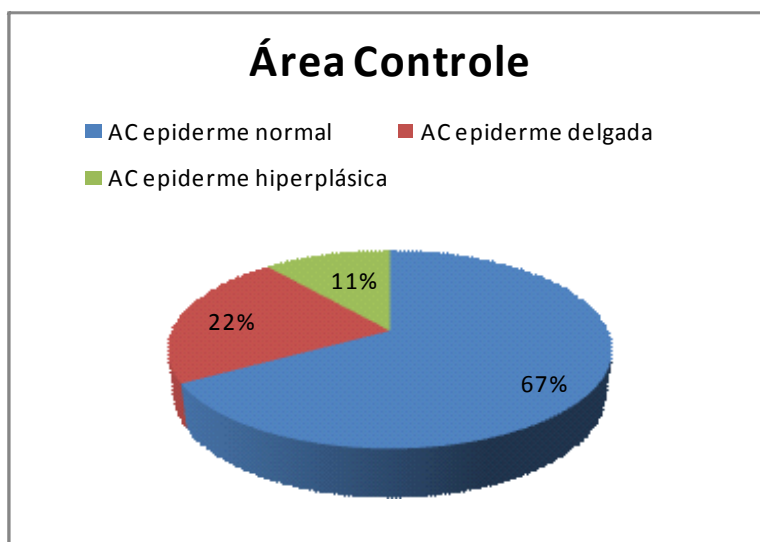


Gráfico 8: Análise qualitativa da espessura final da epiderme na AC no D14.

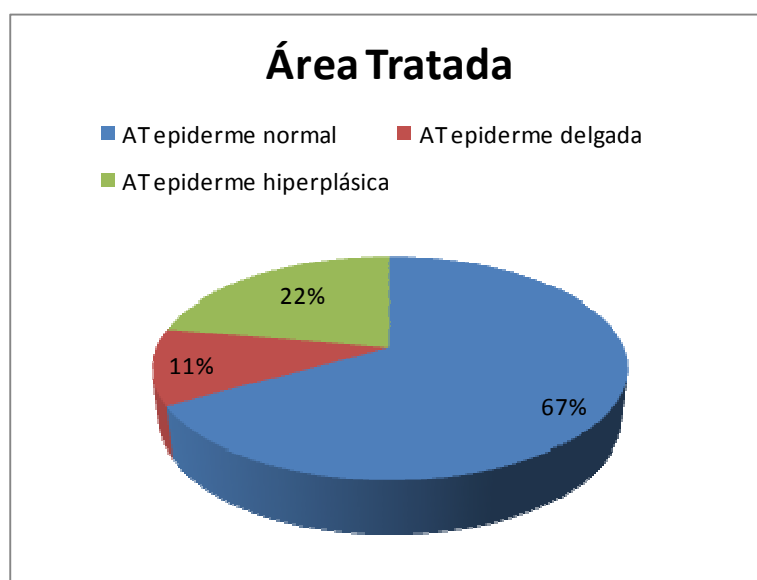


Gráfico 9: Análise qualitativa da espessura final da epiderme na AT no D14.

6. *DISCUSSÃO*

6. DISCUSSÃO:

A criocirurgia é um procedimento seguro, de baixo custo e eficaz no tratamento de diversas lesões benignas e malignas da pele e outros órgãos. Durante os anos, muitos avanços com relação aos efeitos diretos e indiretos da criocirurgia foram alcançados, principalmente no que diz respeito aos seus efeitos vasculares.

Dos primeiros resultados apresentados nesta pesquisa, nota-se evidente destruição celular, no D7, nos fragmentos que foram submetidos à criocirurgia. Este resultado mostra evidente ação destrutiva do frio na pele, com destruição celular em relação às feridas de controle. Estes resultados podem inferir a grande capacidade do método no tratamento de lesões cutâneas descritas por vários autores ^{3, 11, 18,20}.

As amostras das feridas de controle, que tiveram somente o corte, sem aplicação de ações físicas destrutivas ou provocadoras da inflamação, responderam com manutenção da celularidade e queda no 14º dia. O processo de cicatrização se estabelece mais cedo nesta situação. Há estudos que demonstram a interferência dos agentes físicos na manutenção do processo inflamatório e conseqüente demora na cicatrização ²⁶.

É observado pelos autores deste estudo e pelos profissionais atuam na criocirurgia que, na prática diária, após congelamentos extensos e duradouros, ocorre a formação de tecido de granulação exuberante. Apesar de se obter uma boa cicatriz, o tempo de cicatrização é mais longo do que em uma ferida gerada por cirurgia convencional ^{11, 18, 26}.

Estas observações fizeram o questionamento de que, se um dos passos iniciais da crionecrose é a estase e a lesão vascular, como haveria o desenvolvimento de numerosos vasos neoformados e que persistem até a completa cicatrização da ferida? Assim, foi possível supor-se a ação angiogênica marcante gerada pela criocirurgia. O conhecimento e comprovação objetiva desta

ação poderiam, posteriormente, ser aplicados para outras finalidades, inclusive como recurso de estímulo para o crescimento vascular.

O conhecimento da lesão vascular no congelamento está consagrado na literatura ²⁹, porém os estudos que avaliam o desenvolvimento vascular após o evento da necrose são restritos.

Giampapa *et all*, em 1981, demonstraram existir uma relação entre tamanho do vaso e tempo de congelamento envolvidos na estagnação vascular. Talvez, haja um efeito reativo de desenvolvimento dos pequenos vasos após a obstrução vascular. Os autores deste estudo observaram que as feridas provocadas pelo corte sem ação do congelamento não desenvolveram o tecido de granulação exuberante e tiveram menor tempo de cicatrização.

Em 1998, Gage e Baust, demonstraram que o efeito vascular é direto e resulta na perda da circulação e anóxia celular. Os autores deste estudo comprovaram o efeito vascular, a partir da baixa celularidade e grande necrose local, observada na área tratada no terceiro dia após a realização da criocirurgia.

Apesar de estudos para avaliar a relação da criocirurgia com uma possível ação angiogênica ainda serem escassos, Bellman e Adams-Ray, em 1956 já demonstraram o desenvolvimento de um rico sistema de novos vasos em injúrias causadas pelo frio. Além disto, após a criocirurgia, observa-se clinicamente um processo inflamatório muito intenso, maior do que em processos inflamatórios induzidos por outros fatores, consequência da grande lesão vascular, além de um tecido de granulação exuberante.

Yamaguchi e Yoshikawa, em 2001, referiram que a fase de proliferação no processo de cicatrização de feridas é caracterizada pela formação do tecido de granulação, que consiste de novos vasos que migram para dentro da lesão (angiogenese/neovascularização), acúmulo de fibroblastos, matriz dermal e células endoteliais, as quais têm um papel importante no processo de neoangiogênese.

Carmeliet, em 2003, também cita o processo de cicatrização de feridas, processo inflamatório e adaptação a isquemia, como sendo situações onde a angiogênese pós-fetal ocorre. Tais fatos, associados ao conhecimento da ação direta sobre os vasos e a formação de um tecido de granulação exuberante após a criocirurgia, reforçam seu provável efeito angiogênico.

Há que se reforçar o efeito intensamente exsudativo após a aplicação do criógeno por tempo prolongado, por exemplo, 60 segundos de congelamento sobre a pele. Apesar de ser um efeito esperado, trata-se de uma reação desconfortável e que deve ser cuidadosamente orientada ao paciente. Exige trocas de curativos freqüentes até a diminuição deste efeito exsudativo^{11, 12, 18, 29}. Provavelmente, a intensa exsudação, conseqüente à lesão vascular, acúmulo líquido e estruturas celulares nos tecidos povoem, em grande quantidade, a área e permita maior proliferação tecidual, relatada na literatura e observada no presente estudo.

Dawber em 2002 atribui que as oclusões vasculares são prioritariamente capilares e venulares nos tratamentos por congelamentos na prática clínica dermatológica. Este autor alega que oclusões arteriais são difíceis de ocorrer e requerem ciclos de congelamento repetidos com longos períodos de descongelamento. Entretanto, discutindo esta assertiva, não foi escopo deste trabalho definir o segmento vascular mais acometido pelo congelamento, porém, se mesmo, somente capilar ou venular, houve intensa resposta proliferativa.

A partir da relação direta entre a quantidade de células mononucleares e vasos neoformados no tecido, já afirmada por Calvin em 1998, e baseado nos resultados obtidos deste estudo, onde a área tratada com criocirurgia apresentou manutenção da hiper celularidade, sugere-se que a criocirurgia induz a angiogênese.

Os resultados obtidos com o projeto piloto, na tentativa de marcar, por imunohistoquímica, o padrão de células vasculares em proliferação, não foram consistentes, pois os marcadores utilizados (CD34, CD105 e 1A4) não foram

reprodutíveis de forma satisfatória na pele de ratos. Este achado, embora negativo, pode colaborar em pesquisas que tentem utilizar estes marcadores na pele animal e, certamente, para vasos, poderão ter resultados falsos negativos.

Outro efeito da criocirurgia que tem sido de grande interesse dos pesquisadores, é seu efeito imunológico. Este efeito foi também reconhecido neste estudo considerando que a manutenção da hiper celularidade inflamatória está relacionada a uma resposta imunológica local e sistêmica.

Este efeito, hoje reconhecido, pode proporcionar grande benefício como adjuvante no tratamento de doenças neoplásicas e infecciosas ^{12, 13, 30}.

Sabel em 2009 demonstrou este efeito ao submeter animais com uma segunda dose tumorigênica, após a realização da criocirurgia em um primeiro tumor e constatou a ausência do crescimento do segundo tumor. Também identificou o aumento de IL-12 e IFN- γ .

Gazzaniga et al em 2001, também demonstraram o efeito imunológico da criocirurgia, por meio do aumento na reatividade dos anticorpos as células tumorais de melanoma humano através do ELISA. Estudaram as alterações inflamatórias que ocorrem nas primeiras horas e dias após a criocirurgia. Demonstraram que os leucócitos polimorfonucleares foram densamente recrutados horas após a criocirurgia, infiltrando a área peritumoral e atingindo a concentração máxima no 3° dia, depois começaram a diminuir. Os macrófagos se tornaram abundantes a partir do 3° dia, atingiram o pico no 7° dia e mantiveram-se até 15° dia. Embora o escopo do presente estudo não tenha sido identificar o efeito imunológico do congelamento, assim como Gazzaniga, et al, foi possível demonstrar a manutenção da celularidade de mononucleares entre o 7° o 14° dias na área tratada pela criocirurgia.

Dos outros achados, cabe a discussão quanto à reepitelização das feridas, que ocorreu de forma semelhante entre os casos tratados com criocirurgia e os controles. Tal fato não era esperado, já que a criocirurgia promove necrose

tecidual e, conseqüentemente, a permanência da crosta. Isto provavelmente se deve ao n baixo. Pode-se ainda considerar que, o animal escolhido no experimento, apresenta rápida taxa de multiplicação celular, principalmente na pele. As feridas cutâneas nestes animais tendem ao rápido fechamento e, certamente, o tempo atribuído para a avaliação e o tamanho das feridas provocadas teriam mesmo rápida resolução.

Entretanto, foi possível observar diferenças importantes na manutenção da úlcera nas áreas submetidas à criocirurgia. Notou-se esta diferença ainda no 14º dia.

Outro dado, concordante com os dados da literatura é a cicatriz atrófica resultante após a criocirurgia. Kuflik em 1994 e Dawber em 2002 relatam os achados de cicatrizes atróficas após a criocirurgia, nos casos de congelamentos mais intensos. Apesar da cicatrização se completar, adequadamente, do ponto de vista morfológico e funcional, observa-se atrofia na área tratada, o mesmo encontrado pelos autores desta pesquisa.

Há questões que não foram respondidas nesta pesquisa, como por exemplo, se a angiogênese aumentada ocorreria em qualquer área da superfície corporal do animal experimental. Ainda, se seria necessário a destruição arterial para que este fenômeno se sucedesse.

Finalmente, ainda não é possível afirmar que este efeito de angiogênese poderia ser utilizado, de forma terapêutica, em áreas isquêmicas ou em feridas de difícil cicatrização.

Entretanto, estudos futuros, usando marcadores específicos de células vasculares e testes de permeabilidade destes vasos serão complementares.

Também, a aplicação deste efeito para o desenvolvimento da resposta imune nos tecidos que necessitam este benefício poderá ser estendido.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O presente estudo pode concluir que:

- Pela análise morfométrica das células do processo inflamatório, há manutenção da hiper celularidade quando o tecido é submetido à criocirurgia.

- Pela relação direta entre a celularidade e a neovascularização, demonstrada por diversos autores citados, sugere-se que a criocirurgia tenha um possível efeito na indução da angiogênese.

- O tempo de cicatrização nas feridas submetidas à criocirurgia é mais lento em relação aos controles e as cicatrizes tendem à atrofia dérmica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

1- Lucas R. Avaliação e comparação de diferentes técnicas de criocirurgia com nitrogênio líquido em cães da raça Beagle, pela tomografia computadorizada, histologia e imunohistoquímica [Tese – Doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2001.

2- Drake LA, Chairman, Ceilley RI, Cornelison RL, Dobes WL, Dorner W, et al. Guidelines of care for cryosurgery. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1994;31(4):648-53.

3- Zacarian SA. Cryosurgery in the management of cutaneous disorders and malignant tumors of the skin. *Comprehensive Therapy*. 1994;20(7):379-401.

4- http://www.orienttumor.com/en_asp_new/cryosurgery_books.asp

5- Dawber R, Colver G, Jackson A. *Cutaneous Cryosurgery. Principles and Clinical Practice*. United Kingdom: Ed. Martin Dunitz Ltd. 1992. P.1-27.

6- Onik G. Critical reviews in oncology/hematology. *Cryosurgery*. 1996; 23:1-24.

7- Baust J, Gage AA, Ma H, Zhang C. Minimally Invasive Cryosurgery – Technological Advances. *Cryobiology*. 1997;34:373-84.

8- Koushafar H, Rubinsky, B. Chemical adjuvant cryosurgery with antifreeze proteins. *Journal of Surgical Oncology*. 1997;66:114-21.

9- Abramovits W, Pruiksma R, Bose S. Ultrasound-guided thermocouple placement for cryosurgery. *Dermatol Surg* 1996;22:771-3.

10- Jing Jiang, Raghav Goel, M. Arif Iftekhar, Rachana Visaria, John D. Belcher, Gregory M. Vercellotti, John C. Bischof. Tumor necrosis factor-A-induced

accentuation in cryoinjury: mechanisms in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(8):2547–55.

11- Gage AA, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology.* 1998;37:171-86.

12- Sabel MS. Cryo-immunology: A review of the literature and proposed mechanisms for stimulatory versus suppressive immune responses. *Cryobiology.* 2009;58:1-11.

13- Gazzaniga S, Bravo A, Goldszmid SR, et al. Inflammatory changes after cryosurgery-induced necrosis in human melanoma xenografted in nude mice. *Journal of Investigative Dermatology.* 2001;116(5):664–71.

14- Ninomiya T, Yosimura H, Mori M. Identification of vascular system in experimental carcinoma for cryosurgery – histochemical observations of lectin UEA-1 and alkaline phosphatase activity in vascular endothelium. *Cryobiology.* 1985;22:331-5.

15- Belman S, Adams-Ray J. Vascular reactions after experimental cold injury. *Angiology.* 1956;7:339-67.

16- Gage AA, Caruana JA Jr, Montes M. Critical temperature for skin necrosis in experimental cryosurgery. *Cryobiology.* 1982;19 273-82.

17- Gage AA, Augustynowicz S, Montes M, Caruana JA Jr, Whalen DA. Tissue impedance and measurements in relation to necrosis in experimental cryosurgery. *Cryobiology.* 1985;22:282-8.

18- Zouboulis CC. Cryosurgery in dermatology. *European Journal of Dermatology.* 1998;8:466-74.

19- Richter S, Pistorius G, Seidel R, Feifel G, Schilling MK, Vollmar B, et al. Arteriovenular shunting critically determines shutdown of microcirculation upon

cryotherapy in tumor-bearing rat liver. *Annals of Surgical Oncology*. 2005;12(4):303-12.

20- Andrews, MD. Cryosurgery for Common Skin Conditions. *Am Fam Physician*. 2004;15;69(10):2365-72.

21- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653-60.

22- Kumar P, Wang JM, Bernabeau C. CD 105 and Angiogenesis. *The Journal of Pathology*. 1996;178(4):363-6.

23- Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature*. 1996;383(6595):73-5.

24- Giampapa VC, OH C, Aufses AH. The vascular effect of cold injury. *Cryobiology*. 1981;18:49-54.

25- Yamaguchi Y, Yoshikawa K. Cutaneous Wound healing: an update. *Journal of Dermatology*. 2001;28(10):521:34.

26- Calvin, M. Cutaneous wound repair. *Wounds*. 1998;10(1):12-32.

27- Fox SB, Harris AL. Histological quantitation of tumour angiogenesis. *Apmis*. 2004;112:413–30.

28- Fina L, Molgaard HV, Robertson D. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*. 1990;75:2417-26.

29- Kuflik EG. Cryosurgery update. *J Am Ac Dermatol*. 1994;31:925-44.

30- Dawber R. Cryosurgery: Unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol*. 2002;20:563-70.

9. ANEXOS



UNICAMP

CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1666-1**, sobre "**Estudo da angiogênese na pele normal de ratos submetidos à criocirurgia com nitrogênio líquido, através de métodos histopatológico, imuno-histoquímico e a reação em cadeia polimerase (PCR)**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Aparecida Machado de Moraes / Camila Bianco Pimentel**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de novembro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1666-1**, entitled "**Angiogenesis study in normal rat skin following cryosurgery with liquid nitrogen sing histopathology, immunohistochemistry and the polymerase chain reaction (PCR)**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **November 6, 2008**.

Campinas, 06 de novembro de 2008.

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1:

Acompanhamento clínico
(D3)

GI (D3)

IDENTIF.	MEDIDAS AC	ASPECTO AC	MEDIDAS AT	ASPECTO AT
IA	0,5cm		0,6cm	
IB	0,4cm		0,4cm	
IC	0,4cm		0,3cm	
ID	0,4cm		0,3cm	crosta hemática
IE	óbito			
IF	0,4cm		0,3cm	
IG	0,4cm	crosta hemática	0,3cm	
IH	0,4cm		0,3cm	
II	0,3cm		0,3cm	
IJ	óbito			

GII (D3)

IDENTIF.	MEDIDAS AC	ASPECTO AC	MEDIDAS AT	ASPECTO AT
IIK	0,3cm		0,4cm	
IIL	0,4cm		0,4cm	
IIM	0,4cm		0,4cm	crosta hemática
IIN	0,4cm		0,3cm	crosta hemática discreta
IIO	0,5cm		0,4cm	
IIP	0,5cm		0,3cm	crosta hemática discreta
IIQ	0,3cm	crosta hemática bem evidente	0,3cm	
IIR	0,4cm	crosta hemática	0,3cm	
IIS	0,4cm		0,3cm	
IIT	óbito			

OBS: medida horizontal

APÊNDICE 2:

Acompanhamento clínico
(D7)

GI (D7)

IDENTIF.	MEDIDAS AC	ASPECTO ACI
IA	0,3 x 0,2cm	
IB	0,4 x 0,4cm	
IC	0,2 x 0,3cm	pequena crosta
ID	0,2 x 0,3cm	crosta central discreta
IE	0,3 x 0,3cm	crosta central evidente
IF	0,4 x 0,4cm	crosta central discreta, quase 100% cicatrizada
IG	óbito	
IH	0,3 x 0,3cm	pequena crosta
II	0,2 x 0,2cm	crosta central se despreendendo
IJ	óbito	

OBS: 1a. medida vertical

GI (D7)

IDENTIF.	MEDIDAS AT	ASPECTO AT
IA	0,4 x 0,5cm	crosta hemorrágica bem proeminente
IB	0,5 x 0,6cm	crosta hemorrágica bem proeminente
IC	0,5 x 0,4cm	crosta hemorrágica bem proeminente
ID	0,4 x 0,4cm	crosta hemorrágica bem proeminente
IE	0,4 x 0,4cm	crosta hemorrágica bem proeminente
IF	0,4 x 0,5cm	crosta hemorrágica bem proeminente
IG	óbito	
IH	0,5 x 0,4cm	crosta hemorrágica bem proeminente
II	0,4 x 0,5cm	crosta hemorrágica bem proeminente
IJ	óbito	

OBS: 1a. medida vertical

APÊNDICE 3:

Acompanhamento clínico
(D14)

GII (D14)

IDENTIF.	MEDIDAS AC	ASPECTO AC
IIK	0,3 x 0,3cm	cicatrizado
IIL	0,3 x 0,3cm	cicatrizado
IIM	0,3 x 0,3cm	cicatrizado
IIN	0,3 x 0,3cm	cicatrizado
IIO	0,3 x 0,3cm	cicatrizado
IIP	0,3 x 0,4cm	cicatrizado
IIQ	0,2 x 0,3cm	cicatrizado
IIR	0,3 x 0,3cm	cicatrizado
IIS	0,3 x 0,4cm	cicatrizado
IIT	óbito	

OBS: 1a. medida vertical

GII (D14)

IDENTIF.	MEDIDAS AT	ASPECTO AT
IIK	0,5 x 0,4cm	centro mais eritematoso com crosta hemorrágica central de 0,3 x 0,3cm
IIL	0,4 x 0,5cm	crosta hemorrágica linear de 0,2 x 0,4cm
IIM	0,8 x 0,5cm	crosta hemorrágica central de 0,3 x 0,3cm
IIN	0,4 x 0,4cm	pequena crosta hemorrágica central e delgada 0,1 x 0,1cm
IIO	0,4 x 0,6cm	crosta hemorrágica central recobrindo toda área
IIP	0,6 x 0,5cm	cicatriz eritematosa evidente com pequena crosta hemorrágica central de 0,5 x 0,3cm
IIQ	0,4 x 0,3cm	crosta hemorrágica central recobrindo toda área
IIR	0,4 x 0,4cm	pequena crosta hemorrágica central 0,1 x 0,1cm
IIS	0,4 x 0,4cm	pequena crosta hemorrágica central 0,1 x 0,1cm
IIT	Óbito	

OBS: 1a. medida vertical