

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pós – Graduação em Medicina e Ciências da Saúde  
Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Caroline Berg

**Descrição de uma Lesão Cartilaginosa  
Crônica em um Modelo Animal**

Porto Alegre  
2013

**DADOS DE CATALOGAÇÃO**

B493d Berg, Caroline

Descrição de uma lesão cartilaginosa crônica em um modelo animal / Caroline Berg. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

49 f.: tab.; graf. Inclui artigo científico encaminhado para publicação no periódico Experimental Biology and Medicine.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Luis Braga da Silva.

Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

1. LESÃO CRÔNICA. 2. CARTILAGEM. 3. MODELO ANIMAL. 4. ENGENHARIA CELULAR. 5. CÉLULAS-TRONCO. 6. ESTUDO EXPERIMENTAL, CONTROLADO, CEGADO E REALIZADO EM MODELO ANIMAL. I. Silva, Jefferson Luis Braga da. II. Título.

CAROLINE BERG

**Descrição de uma Lesão Cartilaginosa Crônica em um  
Modelo Animal**

Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre pelo  
Programa de Pós-Graduação da  
Faculdade de Medicina da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do  
Sul.

Orientador: Jefferson Luis Braga da Silva

Porto Alegre  
2013

## **Dedicatória**

Aos meus pais, Egon e Marli Berg. Meu conforto e apoio. Sou fã.

Ao meu irmão e cunhada, Andre e Adriana Berg. Meus melhores amigos e companheiros eternos de muitas viagens.

Ao amor da minha vida, o meu melhor presente, meu Edinho.

## **Agradecimentos**

A Deus, quem não vivo sem.

Ao Dr . Jefferson Braga da Silva por me proporcionar esta oportunidade.

Ao Dr. Vinícius Duval da Silva pela vital participação no projeto.

Aos meus mestres, Dr. Nédio Steffen, Dr. Oswaldo Carpes e Dr. Gerson Maahs, pelo acolhimento, carinho e exemplo profissional.

À empresa Widex, personificada pelo Sr. Kjeld Roslyng Jensen, pelo suporte ao meu trabalho.

À fonoaudióloga Nara Elisa de Welles Cardoso e à gerente comercial Rosangela Silva Biasi, pela confiança em meu trabalho.

Ao apoio incondicional dos meus amigos.

*“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em seu próprio entendimento.”*

Provérbios 3:5

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>19</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>41</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>42</b>
<b>ANEXO A. Ata de Apresentação de Dissertação .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO B. Artigo.....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Ratos em decúbito ventral.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2. Medição das lesões com régua (cm).....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3. Caixa molde para registro fotográfico.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4. Caixa molde para registro fotográfico.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5. Programa Adobe Photoshop CS6 Extended.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6. Corte da lesão com ferramenta laço.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 7. Imagem (em branco) da marcação do corte da lesão.....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8. Lesão final para análise dos dados.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 9. Necrose da borda externa de lesões de 10mm.....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 10. Análise histológica da orelha normal do rato (HE 5x).....</b>	<b>29</b>
<b>Figura 11. Análise histológica orelha com lesão de 10mm (HE 5x).....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 12. Análise histológica orelha com lesão de 8mm (HE 5x).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 13. Análise histológica orelha com lesão de 6mm (HE 5x).....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 14. Análise histológica orelha com lesão de 4mm (HE 5x).....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 15. Análise histológica orelha com lesão de 2mm (HE 5x).....</b>	<b>32</b>



## **Resumo**

Lesões cartilaginosas crônicas, como as perfurações septais e auriculares, são facilmente encontradas no consultório do otorrinolaringologista. Seu tratamento é um desafio tanto para o médico quanto para o paciente, devido a poucas alternativas e sucesso limitado.

Com o objetivo de diminuir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos, cada vez mais têm sido estudados métodos alternativos para a regeneração completa dos defeitos cartilaginosos. O uso de terapia celular já está sendo utilizado em alguns casos, porém não há protocolos de lesões cartilaginosas crônicas bem descritos na literatura médica a fim de se obter comparações adequadas desses resultados.

Este trabalho tem por objetivo descrever uma lesão cartilaginosa crônica em um modelo experimental, para estudos futuros com terapia celular.

## **Abstract**

Chronic cartilage lesions, like septal and auricular perforations, are easily found at the otolaryngologist office. Its treatment is a challenge for physicians and patients, due to few alternatives and limit success.

With the objective to decrease the surgical procedures, it's been studying alternative methods for the total regeneration of the cartilaginous defects. The use of cellular therapy had been used in some cases, but there are no chronic cartilaginous protocols well written in the medical literature to compare the different results.

This paper has the objective to describe a chronic cartilaginous lesion in an experimental model, for future studies with cellular therapy.

## 1. INTRODUÇÃO

Os defeitos de cartilagens são muito comuns na prática médica.

Na área da otorrinolaringologia, lesões cartilaginosas do nariz, orelha, laringe e traqueia causam grande desconforto para o paciente. A principal causa dessas alterações é o trauma, porém, os tumores e os defeitos congênitos, cirúrgicos e infecciosos também são encontrados.

Apesar de ainda não se conhecer a exata incidência da perfuração septal, esta é uma apresentação muito encontrada no consultório médico. A sua principal causa é iatrogênica, porém quadros infecciosos, tumores ou abuso de drogas ilícitas também contribuem para o seu achado<sup>1</sup>.

A cirurgia para correção de desvios septais (septoplastia) é um dos procedimentos mais realizados na otorrinolaringologia. O descolamento da mucosa septal para a correta correção deve ser realizado sob o pericôndrio e o periósteo. Muitas vezes, isso não ocorre, causando destruição da trama vascular em uma ampla área, resultando, com isso, defeitos necróticos.

Alguns pacientes que apresentam perfuração septal, se queixam de formação de crostas, obstrução nasal, epistaxe, odor fétido, dor, sibilância, anosmia, desconforto facial, alterações estéticas, entre outros.

O tratamento para essa deformidade varia desde o fechamento primário, até interposição de cartilagem. Não há consenso entre os cirurgiões a respeito da melhor técnica. Sabe-se porém, que nenhum método apresenta resultado 100% satisfatório. Ao contrário, a conclusão dos mesmos são sempre desanimadoras, principalmente naquelas lesões maiores de 2cm (recorrência de 30-70% dos casos)<sup>2,3</sup>.

Defeitos da cartilagem auricular também são encontrados na prática diária do otorrinolaringologista. A principal causa dessas alterações são tumores ou traumas.

A sua correção deverá contemplar, além do fechamento da lesão, a correção estética da mesma, uma vez que as orelhas são importantes unidades na composição harmônica da face. Reconstruções dessa estrutura anatômica constituem um grande desafio cirúrgico, uma vez que se necessitam de textura, cor, tamanho e função semelhantes à região lesada. Inicialmente, os cirurgiões utilizavam áreas doadoras da

região pré e pós-auricular. Porém, nem sempre se conseguia atingir um resultado estético favorável em lesões de médio a grande tamanho<sup>4</sup>.

Defeitos cartilagosos do septo nasal e orelha têm como princípio de reconstrução a reestruturação da cartilagem e seus tecidos subjacentes, tais como o subcutâneo e a pele.

Muitos estudos já foram descritos para a reconstrução desses, com retalhos e enxertos, mas todos demonstram altas taxas de complicações, principalmente a rejeição local e cicatrização anormal da região doadora.

A capacidade do corpo de substituir células lesadas ou mortas e de proceder ao reparo dos tecidos após a inflamação é crítica para a sobrevivência<sup>5</sup>. O reparo dos tecidos envolve 2 processos distintos: a regeneração e a substituição por tecido conjuntivo (isto é, fibrose). O processo de reparo e cicatrização é complexo, mas é determinada por mecanismos essencialmente similares, envolvendo a migração, proliferação e diferenciação celular.

Com o objetivo de diminuir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos, cada vez mais têm sido estudados métodos alternativos para a regeneração completa dos defeitos cartilagosos<sup>5</sup>.

O reparo da perda ou do dano de cartilagem tem sido um desafio nos últimos anos. Estudos mais recentes têm sido realizados focando a engenharia tecidual e a sua integração com os tecidos<sup>6</sup>.

Esforços consideráveis têm sido realizados para melhoria à eficácia dos retalhos e enxertos cartilagosos dessas lesões na área da otorrinolaringologia<sup>7</sup>.

Os melhores estudos foram realizados com engenharia tecidual implantada em tecido subcutâneo<sup>13,14,16</sup>. Entretanto, ao se analisar os estudos, percebe-se que o modelo de terapia foi, na maioria das vezes, realizado no momento da realização do defeito, ou seja, logo após a lesão aguda. Pode-se questionar quanto ao resultado de alguns desses estudos, uma vez que a angiogênese criada durante uma lesão aguda ajuda na

regeneração tecidual. Além disso, sabemos que um dos grandes problemas para a reconstrução dos defeitos cartilagosos do septo nasal e concha auricular se deve ao caráter crônico em que eles se apresentam.

Ainda não há na literatura, protocolo em animais experimentais para a caracterização de uma lesão cartilaginosa crônica. Além disso, em uma situação ideal, a terapia para fechamento de defeitos cartilagosos deveria ser realizada sob as condições mais reais possíveis. Entretanto, estudos na região septal, na laringe ou no joelho são tecnicamente difíceis num modelo experimental devido à sua difícil localização e abordagem cirúrgica. Na procura de uma localização adequada para a descrição e análise, a região auricular é de fácil acesso e visualização.

Desta forma, com o objetivo de facilitar futuros estudos de métodos alternativos para a regeneração cartilaginosa, um estudo desse porte ajudaria na análise mais fidedigna dessas alterações crônicas, sem a intervenção dos processos cicatriciais agudos. Deseja-se, com isso, criar um protocolo de lesão cartilaginosa crônica em um modelo animal.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A Embriologia e Anatomia da Orelha Externa

Todos os tecidos do embrião são originários de três estruturas básicas: o ectoderma, o mesoderma e o endoderma.

O ectoderma é o revestimento externo do qual se originará a pele e seus anexos. O mesoderma originará todo o tecido conjuntivo, músculos, ossos, cartilagens e vasos sanguíneos. O endoderma originará as mucosas.

Os arcos branquiais são arcos mesodérmicos que se formam na região cefálica do embrião. Externamente são cobertos pelo ectoderma e, internamente pelo endoderma. Nos mamíferos, os arcos branquiais se modificam para sistemas de comunicação, como o auditivo e o fonatório (orelhas externa e média e laringe).

O pavilhão auditivo é formado pela fusão de seis tubérculos mesenquimais, três originados do 1º arco branquial e três do 2º. Os do primeiro arco originam, apenas, o trágus e a parte ascendente da hélix, e os do segundo originam o restante do pavilhão auditivo.

O pavilhão auditivo possui uma anatomia peculiar que se repete em todos os seres humanos, mas com individualidade própria<sup>8</sup>.

A orelha externa é constituída pelo pavilhão auricular, canal auditivo externo e porção epitelial da membrana timpânica.

O pavilhão auricular apresenta esqueleto cartilaginoso de forma característica, revestido de pele. Na estrutura cartilaginosa, pode-se identificar os seguintes acidentes: hélice, anti-hélice, trago, antítiago, concha, fossa triangular e lóbulo<sup>9</sup>.

O suprimento vascular da orelha externa é derivado de ramos das artérias temporal superficial e retroauricular, ambos provenientes da carótida externa.

O suprimento venoso ocorre pela veia retroauricular, a qual drena para o sistema jugular externo.

A drenagem linfática se dá primariamente para linfonodos da região preauricular, infraauricular e mastoideo.

A orelha externa é inervada pelo sistema espinhal e craniano. Eles incluem o nervo grande auricular (C2-3), o nervo auriculotemporal (V3), o nervo occipital menor (C2-3) e ramos do nervo vago (X)<sup>4</sup>.

O genoma do rato foi completamente sequenciado e assemelha-se em 80% homogêneo ao genoma humano. Especialmente em envolvimento na audição<sup>10,11</sup>.

## **2.2 A Histologia do Tecido Cartilaginoso**

A cartilagem é um tecido conjuntivo único, idealmente preparado para servir como absorvedor elástico de choques e é resistente ao desgaste. É encontrada principalmente no nariz, nos anéis traqueais, na orelha externa e na epiglote.

Existem 3 tipos de tecido cartilaginoso: hialina (a mais abundante do corpo). A fibrosa (suporta altas pressões e está mais concentrada nos discos intervertebrais) e a elástica (pequena quantidade de colágeno e grande quantidade de fibra elástica).

Não possui suprimento sanguíneo e nem apresenta drenagem linfática ou inervação.

A cartilagem hialina compõe-se de água, proteoglicanas, colágeno do tipo 2 e condrócitos, e cada qual desempenha funções específicas.

A água e a proteoglicanas conferem à cartilagem hialina seu turgor e elasticidade, exercendo um papel importante na limitação da fricção.

Já os condrócitos, sintetizam e digerem enzimaticamente a matriz, variando de semanas a anos, proteoglicanas e colágeno tipo 2 respectivamente.

As fibras de colágeno são arranjadas em arcos, de modo que, próximo à superfície, se posicionam em uma orientação horizontal – permitindo que a cartilagem resista a estresses de tração e cargas verticais<sup>12</sup>.

## **2.3 A Cicatrização da Cartilagem**

A capacidade do corpo de substituir células lesadas ou mortas e de proceder ao reparo dos tecidos após inflamação é crítica para a sobrevivência.

A cartilagem é um tecido altamente diferenciado e, portanto, tem uma capacidade limitada para auto-regeneração<sup>13,14</sup>.

Defeitos compostos da cartilagem resultam em lesões da camada subcondral, causando ruptura dos vasos sanguíneos e consequente formação de hematoma no local do dano. Nesses casos, uma resposta cicatricial é iniciada que resulta na formação de reparo fibrocartilagenoso. Entretanto, esse tecido apresenta mecanismos de reparo inferior comparado com a cartilagem hialina primária: é desorganizada e contém grande quantidade de colágeno tipo I, suscetível a ruptura<sup>15,16</sup>.

A destruição tecidual, com lesão das células parenquimatosas e do arcabouço de estroma, ocorre na inflamação necrotizante e constitui uma característica fundamental da inflamação crônica. Em consequência, o reparo não pode ser efetuado exclusivamente através da regeneração das células parenquimatosas, mesmo naqueles órgãos cujas células têm capacidade de regeneração. Por conseguinte, ocorrem tentativas de reparo da lesão tecidual através da substituição das células parenquimatosas não-regeneradas por tecido conjuntivo, o qual, com o decorrer do tempo, produz fibrose e formação de cicatriz. Esse processo é constituído de quatro componentes: 1. Angiogênese; 2. Migração e proliferação de fibroblastos; 3. Deposição de Material Extra-Celular (MEC); 4. Maturação e organização do tecido fibroso (remodelamento)<sup>12</sup>.

O processo de reparo começa logo no início da inflamação. Algumas vezes, dentro de apenas 24 horas após a lesão, se não houver resolução, os fibroblastos e as células endoteliais vasculares começam a proliferar para formar (em 3-5 dias) um tipo especializado de tecido, que constitui a marca da cicatrização, denominado tecido de cicatrização. O termo deriva do seu aspecto granular, da coloração rósea e da consistência amolecida.

A substituição do tecido de granulação por uma cicatriz envolve transições na composição do MEC. Alguns dos fatores de crescimento que estimulam a síntese de colágeno e de outras moléculas do tecido conjuntivo também modulam a síntese e a ativação das metaloproteinases, enzimas cuja ação consiste em degradar esses componentes do MEC. O resultado final entre a síntese versus a degradação do MEC consiste num remodelamento do arcabouço do tecido conjuntivo – importante característica da inflamação crônica e do reparo de feridas<sup>5</sup>.



## 2.4 A Cicatrização Cartilaginosa em Animais Experimentais

Há poucos livros que descrevem a anatomia da orelha externa dos animais. Devido à pouca importância da orelha externa no processo evolutivo dessas espécies, pouco é o interesse por esse órgão.

Entretanto, alguns autores iniciaram o estudo da capacidade regenerativa da orelhas de alguns animais.

O primeiro autor a realizar uma lesão cartilaginosa em um animal foi Markelova, em 1953, sendo descrito por Vorontsova e Liosner em 1960. Estes, descreveram alterações macroscópicas de diferentes dias após lesões nas orelhas de coelhos<sup>17</sup>.

Logo após, Joseph e Dyson descreveram as alterações histopatológicas em um defeito composto realizado em orelhas de coelhos. Nenhum apresentou fechamento completo, porém todos apresentaram diminuição da lesão por contração cicatricial<sup>18</sup>.

Em 1972, Goss e Grimes foram os primeiros autores a descreverem lesões completas (pele anterior, cartilagem e pele posterior) em orelhas de coelhos. Após 6 semanas, nenhuma lesão apresentou fechamento completo de suas bordas<sup>19</sup>.

Também em 1972, Skoog e autores descreveram o caráter regenerador do pericôndrio ao se visualizar completa recuperação de lesões em orelhas de coelhos após remoção somente do tecido cartilaginoso, mantendo o pericôndrio e pele<sup>20</sup>.

Em todos os estudos vistos acima, o coelho foi o animal de escolha, uma vez que a capacidade regenerativa desse animal é reconhecida em seus órgãos.

Em 1975, Goss e Grimes realizaram lesões, semelhantes às dos coelhos, em ovelhas e cachorros, porém não encontraram resultados satisfatórios, alegando a falta de tecido epidérmico desses animais<sup>21</sup>.

Em 1985, Patsy Williams-Boyce e J. C. Daniel realizaram lesões em orelhas de diversos animais (coelhos, chinchilas, vacas, porcos, ratos, macacos, ovelhas, cachorros) para analisar as diferentes formas de regeneração de cada espécie. Destas, os melhores resultados foram os coelhos (70% de fechamento), chinchilas (60%), vacas (67%) e porcos (67%). Os ratos apresentaram 20% de fechamento das lesões. Nesse estudo, os autores concluíram que não apenas os coelhos apresentam o fenômeno de regeneração tecidual. Eles também afirmaram que, apesar da taxa de

recuperação dos ratos não ser excelente, apresenta reação tecidual limítrofe na análise histológica. Concordaram também com o estudo de Goss, ao perceber que cachorros e ovelhas não apresentam nenhuma regeneração tecidual<sup>22</sup>.

## **2.5 Justificativa**

Tendo em vista a necessidade do estudo de novas formas de recuperação e regeneração de tecido cartilaginoso e que a tendência atual é atingir um reparo tecidual cartilaginoso sem o efeito fibrocartilaginoso recém relatado, faz-se necessário o estudo contínuo de técnicas em engenharia tecidual em animais experimentais.

Vários foram os animais já estudados. Porém, todos já relatados são de difícil aquisição e cuidado e, além de tudo, muito onerosos para qualquer estudo. Além disso, de todos os estudos realizados com o objetivo de novas terapêuticas na regeneração cartilaginosa, nenhum descreveu alternativas em lesões crônicas, mas em agudas, aumentando assim, o viés de confusão.

Os ratos são animais muito utilizados para estudos médicos, uma vez que seu genoma já foi totalmente decodificado e é muito semelhante ao do ser humano, é relativamente barato e apresenta pouca chance de infecção e morte.

Ainda não há na literatura, descrição de um protocolo de lesão cartilaginosa crônica nesse animal.

Uma vez que as lesões cartilaginosas de difícil terapêutica nos humanos são lesões crônicas e não há na literatura protocolo para o problema semelhante a esse, optamos por desenhar esse dano em ratos.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Geral**

Descrever uma lesão cartilaginosa crônica em um modelo animal.

#### **3.2 Específicos**

Determinar o tamanho mínimo para a manutenção da lesão.

Descrever alterações histopatológicas de cada tamanho de lesão.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### **Delineamento**

Trata-se de um estudo experimental, controlado, cegado e realizado em modelo animal.

#### **Amostra**

Foram utilizados 5 ratos albinos da espécie Wistar, machos, isogênicos, pesando entre 250 e 300g.

Os animais foram adquiridos no biotério da PUCRS, dispostos em gaiolas individuais e receberam água e ração *ad libidum*.

Foi respeitado ciclo biológico claro/escuro de 12 horas.

A manipulação dos animais foi realizada somente pelo pesquisador e pelo bioterista, em ambiente silencioso e com temperatura controlada de 22°C.

O experimento foi realizado no Laboratório de Microcirurgia da Faculdade de Medicina da PUCRS.

O cálculo amostral foi definido a partir de estudos em reparação cartilaginosa de ratos.

#### **CrITÉrios de Exclusão**

Não há critérios de exclusão no estudo

### 4.2 MÉTODOS

#### **Preparação dos animais**

Cada animal selecionado foi disposto em uma gaiola individual e devidamente identificada.

#### **Protocolo anestésico**

A indução anestésica foi realizada com o animal sob contenção e em decúbito dorsal. Os anestésicos foram aplicados por via intraperitoneal, utilizando seringa e

agulha de insulina. Foram administrados 0,2mg de clorpromazina associado à 0,8mg de quetamina (4mg/kg).

### **Protocolo cirúrgico**

Os animais foram dispostos em decúbito ventral (figura 1).



Figura 1.

Foi posicionado o microscópio óptico (D. F. Vasconcelos ®) na orelha direita para a realização da primeira lesão seguida, logo após, pela orelha esquerda.

Foram escolhidos 5 tamanhos diferentes de lesões (2mm, 4mm, 6mm, 8mm e 10mm). Em cada orelha, uma lesão era realizada. Ao total, foram realizadas 10 lesões.

Para obter-se um conjunto de lesões com menor viés de aferição, foi definido que a média da soma das duas lesões de cada animal deveria ser igual.

Sendo assim,

Rato 1: lesão na orelha direita de 2mm e orelha esquerda de 10mm

Rato 2: lesão na orelha direita de 4mm e orelha esquerda de 8mm

Rato 3: lesão na orelha direita de 6mm e orelha esquerda de 6mm

Rato 4: lesão na orelha direita de 4mm e orelha esquerda de 8mm

Rato 5: lesão na orelha direita de 2mm e orelha esquerda de 10mm

<b>Ratos</b>	<b>OD (mm)</b>	<b>OE (mm)</b>	<b>Média das lesões (mm)</b>
<b>1</b>	2	10	6
<b>2</b>	4	8	6
<b>3</b>	6	6	6
<b>4</b>	4	8	6
<b>5</b>	2	10	6

As lesões eram realizadas com bisturi de biópsia *punch* (Colplast ®) específicas para cada tamanho. O defeito era sempre completo, sendo removida a pele (anterior e posterior) e o tecido conjuntivo.

A localização de cada lesão era determinada pelo seu centro, a 0,5cm do bordo livre da orelha do animal (figura 2).

Não foi necessário o uso de eletrocautério. Nos casos de maiores sangramentos, apenas uma compressão com gaze era suficiente.

### **Protocolo de Pós-operatório**

Após o procedimento, cada animal ficava em observação por uma hora. Foram devolvidos para a gaiola quando bem acordados e com débito urinário presente.

A analgesia pós-operatória era realizada com paracetamol gotas (1gota/Kg), diluído em água.

### **Protocolo de avaliação**

A cada 24 horas, durante 28 dias, os animais eram novamente anestesiados, porém com doses menores a da primeira indução, a fim de se obter registro fotográfico de cada lesão.

Os animais eram novamente posicionados em decúbito ventral e uma régua era colocada para posterior análise da dimensão da lesão (figura 2).

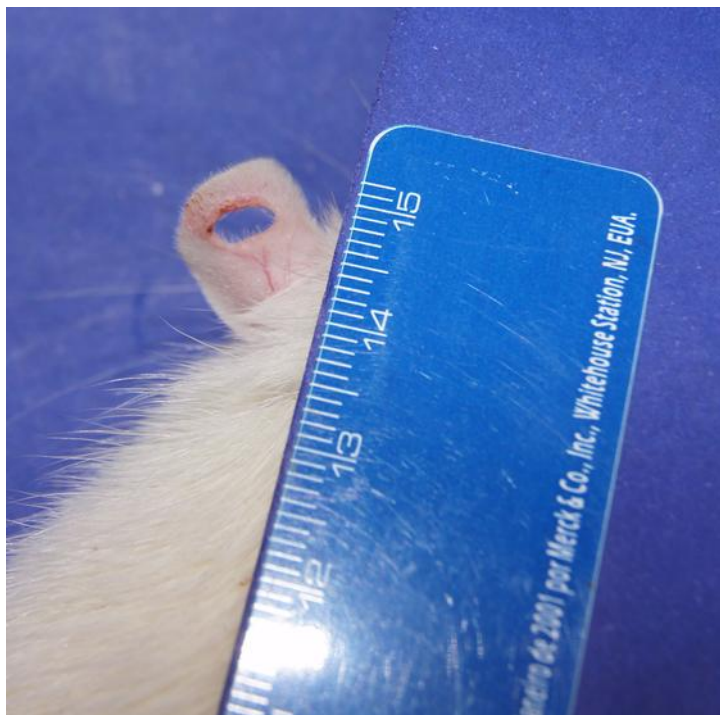


Figura 2.

As imagens eram captadas pela câmera digital Sony DSLRA580L 18-55mm F3.5-5.6 Lens® sempre no mesmo horário do dia para se evitar mudanças de iluminação.

Todos os animais eram posicionados em uma caixa confeccionada pelo autor (50cm<sup>3</sup>), com fundo azul escuro para a aquisição de imagens semelhantes e facilitar a digitalização fotográfica posteriormente (figuras 3 e 4).

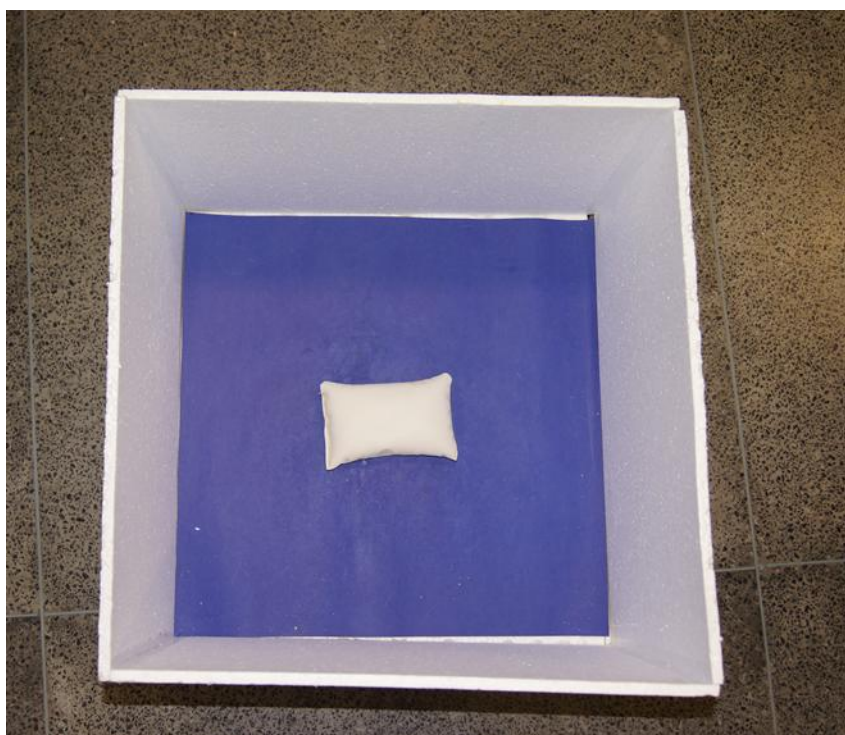


Figura 3.

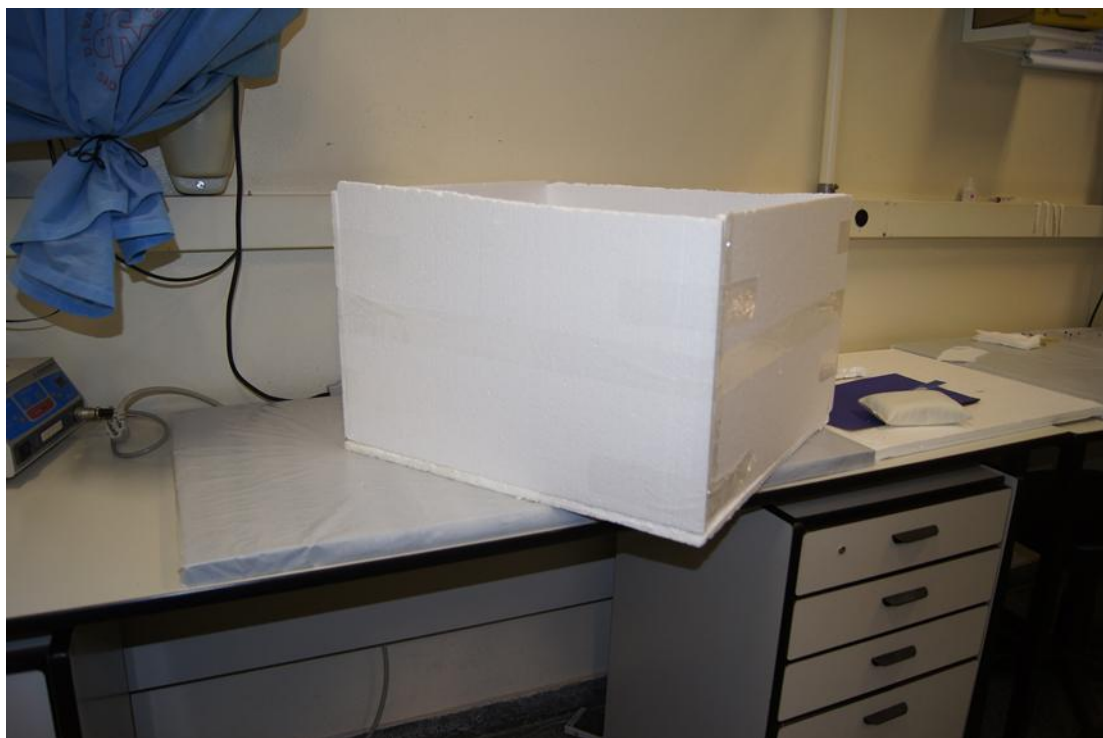


Figura 4.

Os registros fotográficos eram então salvos em um banco de dados, separados de acordo com o dia e lado da lesão.

Após 28 dias (280 registros fotográficos), os animais eram novamente anestesiados. As orelhas eram ressecadas e enviadas em frascos separados para posterior análise histológica.

Nenhum rato necessitou de eutanásia. Todos foram disponibilizados para outros estudos em andamento no Laboratório de Microcirurgia.

### **Protocolo de avaliação histológica**

Cada lesão enviada em Formalina tamponada a 10%, processada em por técnica histológica convencional em cortes de 5micrometros e corada por Hematoxilina-Eosina (HE).

Dois observadores experientes e sem conhecimento do tamanho ou lado de cada lâmina examinada fizeram a análise histológica.



As lâminas foram avaliadas por patologistas do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS através da microscopia óptica. Inicialmente foi utilizado pequeno aumento (40X) para identificação de todos os campos e a seguir em aumentos de 100 e 400 vezes.

Foram observados os seguintes critérios morfológicos: hiperplasia epitelial, infiltrado inflamatório, proliferação de fibroblastos, edema reacional e angiogênese.

Para uma comparação histológica mais adequada das alterações das orelhas lesadas, uma vez que não há descrição da anatomia normal da orelha do rato, foi analisada uma orelha sem lesão.

### **Protocolo de Análise de Imagem Digital**

Cada imagem fotográfica foi inserida no programa Adobe Photoshop CS6 Extended® e ampliada em 100 vezes (figura 5).

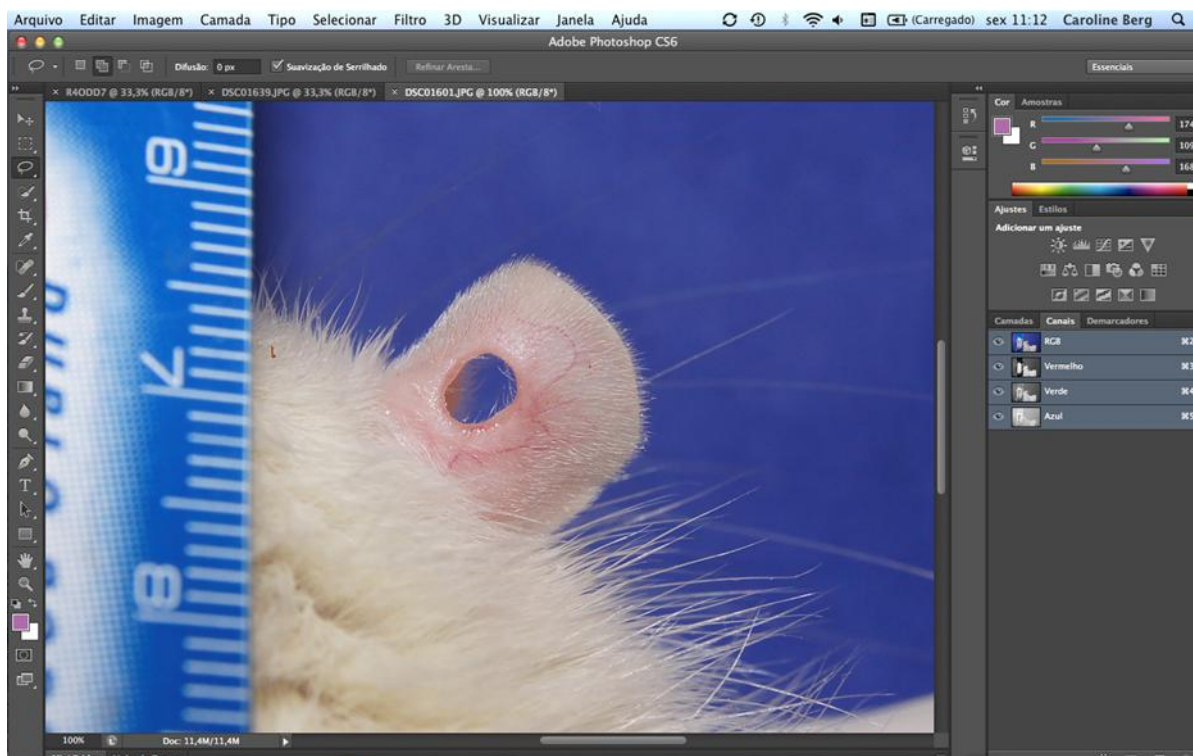


Figura 5.

Com a utilização da ferramenta *laço*, cada lesão era demarcada em sua borda interna e recortada. Depois, salva em um banco de dados (figuras 6, 7 e 8).

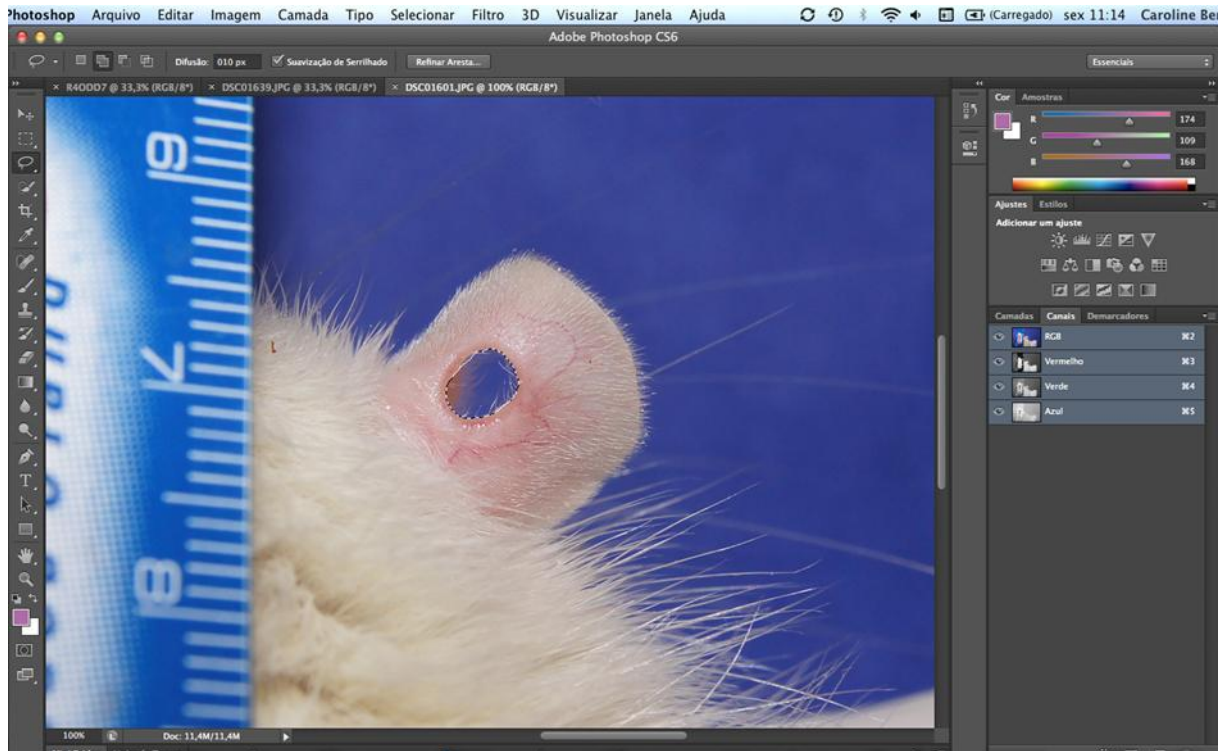


Figura 6.

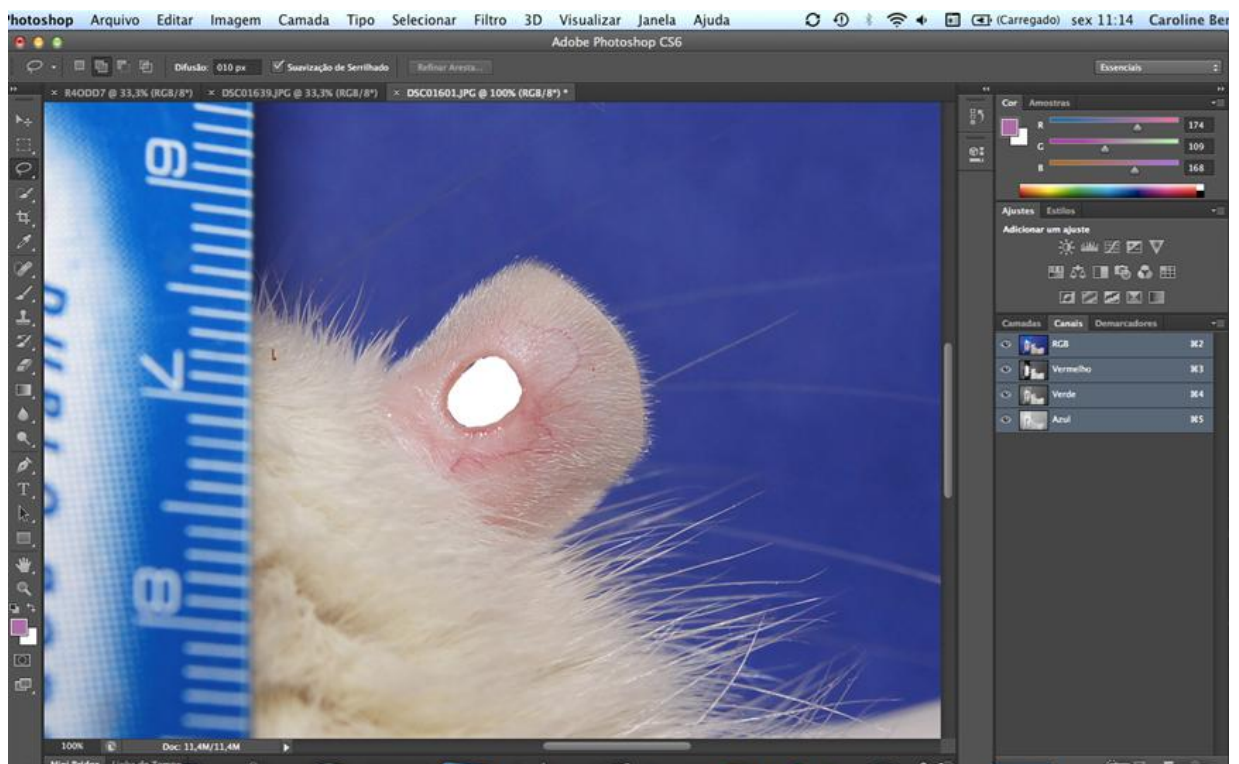


Figura 7.

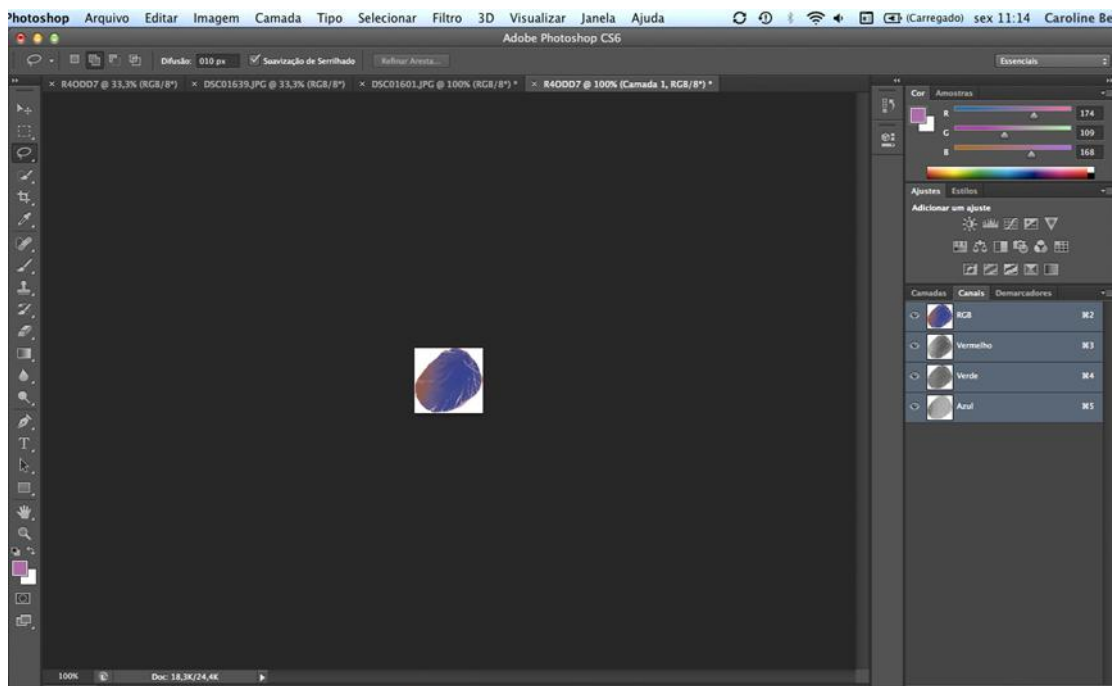


Figura 8.

Com as 280 imagens devidamente selecionadas, uma nova análise digital, cegada, era realizada no programa Image Pro plus 4.5.1 Mediacybernetics Bethesda Rockfield, EUA, para determinar a área, perímetro, área/box (razão entre a área do objeto e o quadro que circunda o mesmo) e box x/y (razão entre a largura e a altura do quadrado que circunda o objeto).

O uso das variáveis área e perímetro determina, quantitativamente, as alterações de cada dia em cada tamanho diferente de lesão.

Uma vez que as imagens de cada lesão não apresentam bordas regulares, foram escolhidas as variáveis área/box e box x/y para evitar, também, possíveis erros de medida e comparar com os achados da área e do perímetro.

Com os dados de cada lesão devidamente datados, foi realizada a análise estatística.

#### 4.3 Análise Estatística

Foi realizada Regressão Linear com análise de covariância entre os diferentes tamanhos de lesões.

O nível de significância utilizado foi  $p=0,05$  e poder estatístico de 95%..

Os dados obtidos na pesquisa foram digitados em uma planilha eletrônica (Microsoft Office Excel 2010, Microsoft Corporate, Redmond, EUA), checados quanto à consistência dos dados a fim de corrigir possíveis erros de digitação.

As análises histológicas foram somente descritivas.

#### **4.4 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o protocolo de pesquisa nº 11/00264.

A pesquisa foi realizada com base nas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)<sup>23</sup>.

Também seguiu a Lei número 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece normas para o uso científico de animais<sup>24</sup>.

## 5. RESULTADOS

### **Análise Macroscópica das Lesões**

Nenhuma lesão fechou seus bordos.

Ao se analisar macroscopicamente, as lesões de 2mm foram de difícil identificação, devido a seu pequeno tamanho. Nos 3 primeiros dias seguidos à lesão, estas apresentaram uma crosta local – que não foi removida para evitar qualquer alteração no processo de cicatrização- dificultando a visualização do orifício. No 28º dia, porém, elas permaneceram abertas, sem mudança do seu tamanho original.

As lesões de 10mm apresentaram reação tecidual importante no 8º e 10º dia, orelha esquerda dos ratos 1 e 5 respectivamente, apresentando necrose de suas bordas (figura 9).

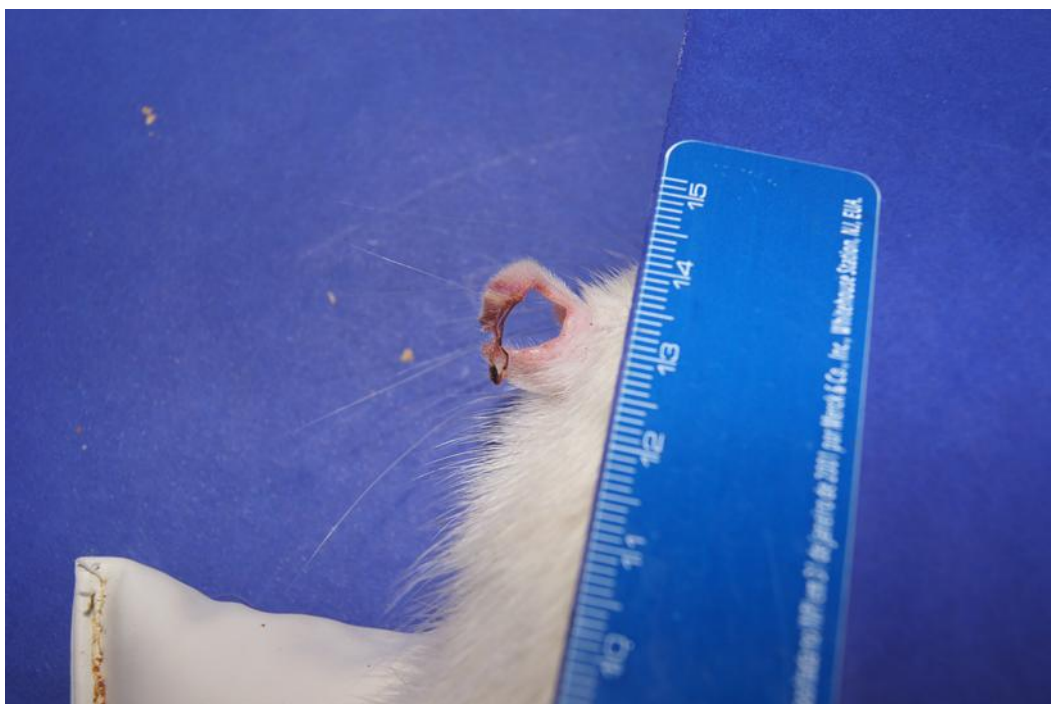


Figura 9.

Em um rato (rato 4 orelha esquerda), a lesão de 8mm apresentou necrose de sua borda no 12º dia. No outro rato com a mesmo tamanho (rato 2 orelha esquerda), visualizou-se uma hiperemia reacional durante os 7 primeiros dias após a lesão que foi diminuindo com o passar dos dias.

As perfurações de 4mm e 6mm se mantiveram estáveis durante todo o processo de análise, sem alteração de sua forma ou cor.

### **Análise Histológica**

Na análise histológica da orelha normal, foi visualizada uma linha central de 3-4 condrócitos e anexos – tecido conjuntivo, músculo e cartilagem. O padrão da cartilagem da orelha do rato é de maneira sesamóide, não apresentando um tecido único característico encontrado nos humanos (figura 10).

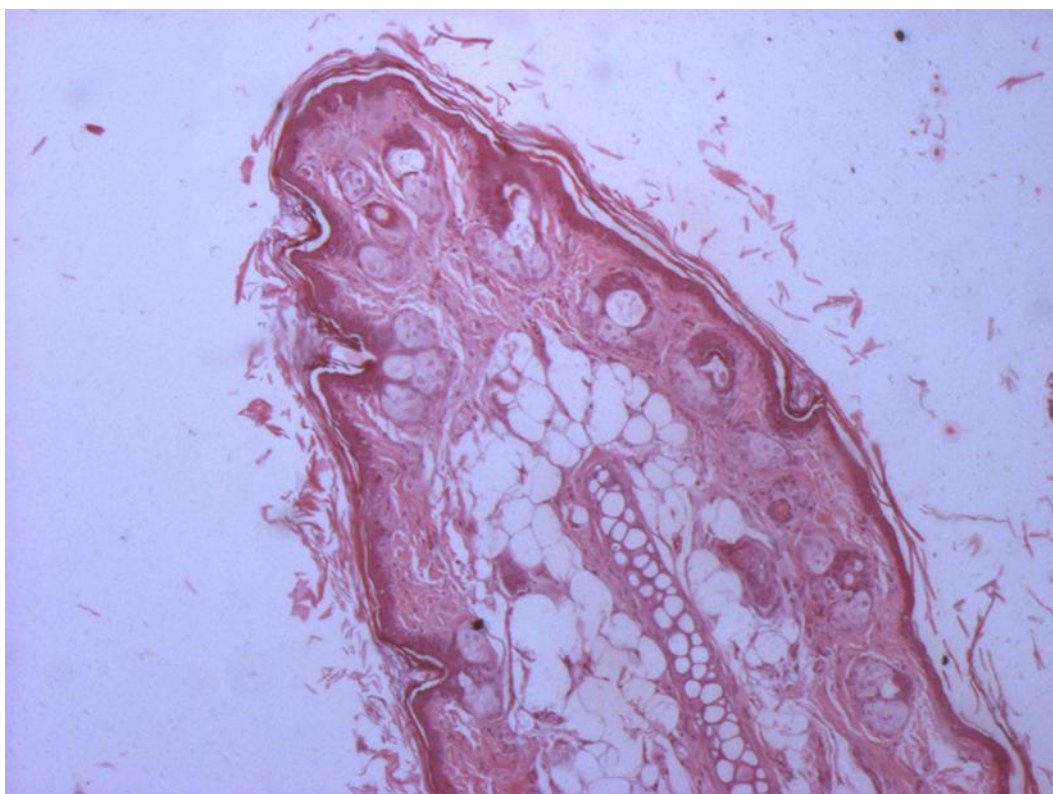


Figura 10. Análise histológica da orelha normal do rato (HE 5x).

Todas as 10 orelhas foram enviadas para análise histológica após 28 dias de lesão. O padrão histológico foi semelhante em todas as lesões.

Foram visualizadas linhas centrais de condrócitos e discreta hiperplasia epitelial.

O edema de conjuntiva era mínimo em todas as lesões.

Todas as lâminas apresentavam discreta proliferação de fibroblastos e pouca reação inflamatória local.

Em todas as orelhas, as bordas eram limpas, sem evidência de infecção.

Nas lesões de 8mm e 10mm, visualizou-se um padrão necrótico nas bordas teciduais externas das orelhas dos ratos, compatível com a análise macroscópica das mesmas. Entretanto, os bordos ainda eram limpos e apresentavam características histológicas semelhantes a do outros tamanhos.

A angiogênese foi considerada praticamente ausente, devido a seu pequeno achado nas lâminas.

Não houve diferenças nas características histológicas entre as lesões (figuras 11, 12, 13, 14 e 15).

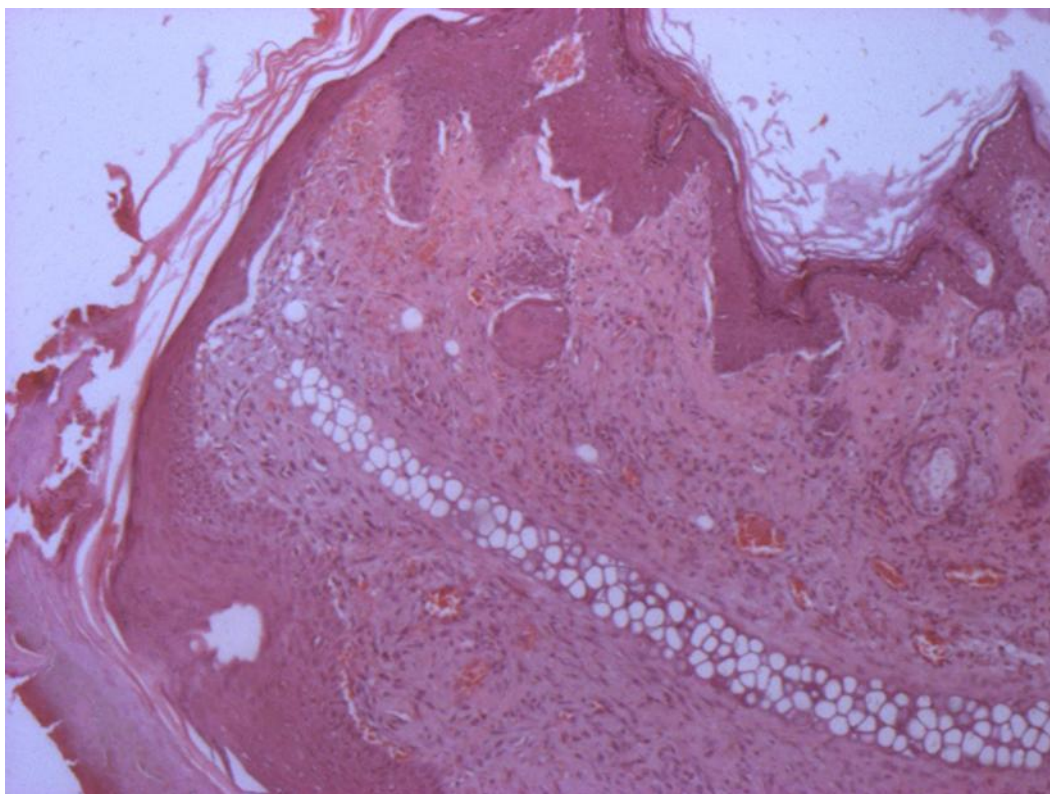


Figura 11. Análise histológica orelha com lesão de 10mm (HE 5x).

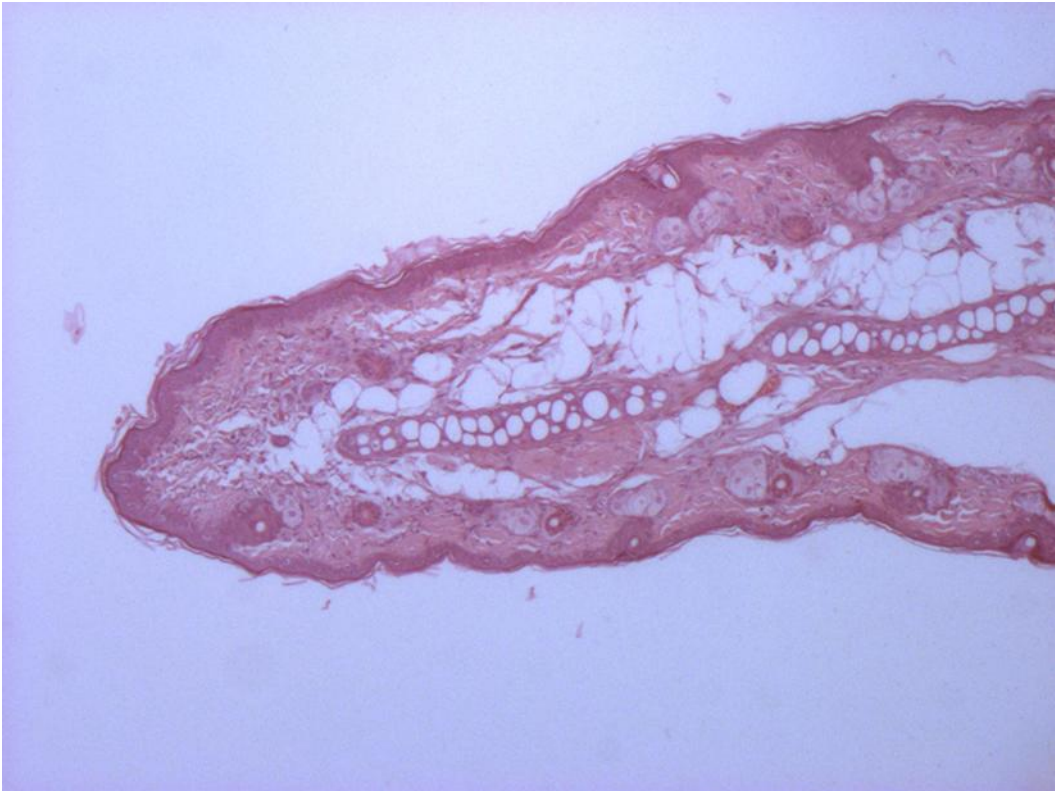


Figura 12. Análise histológica orelha com lesão de 8mm (HE 5x).

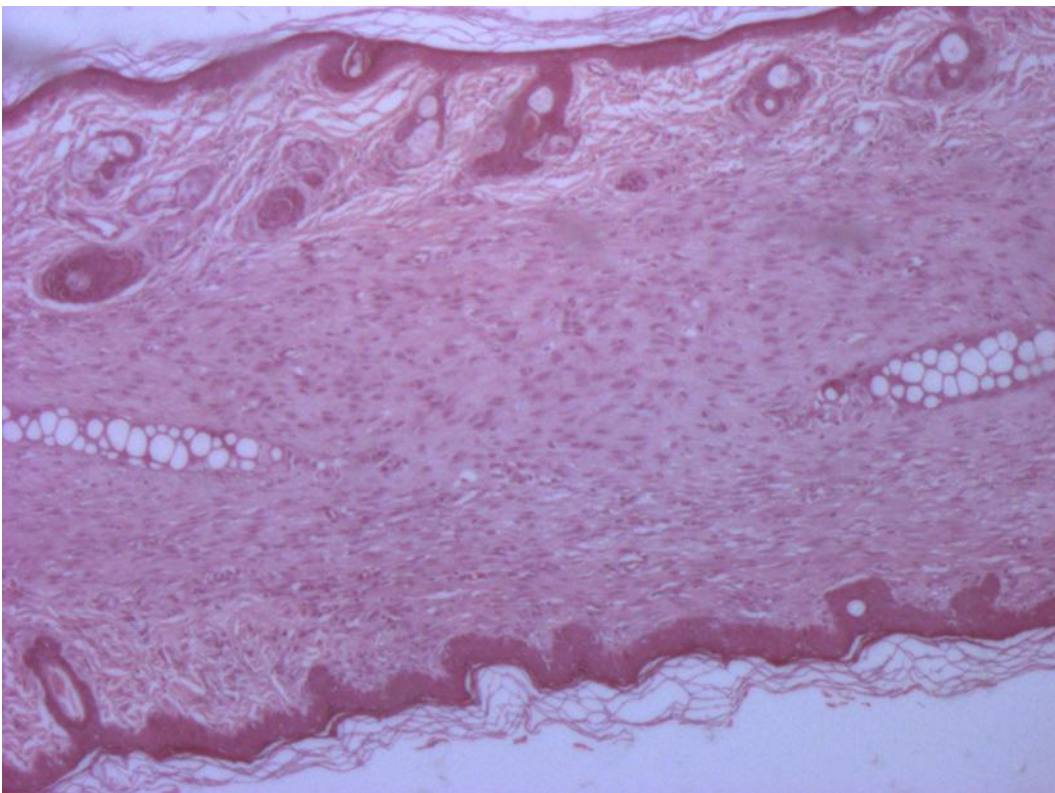


Figura 13. Análise histológica orelha com lesão de 6mm (HE 5x).



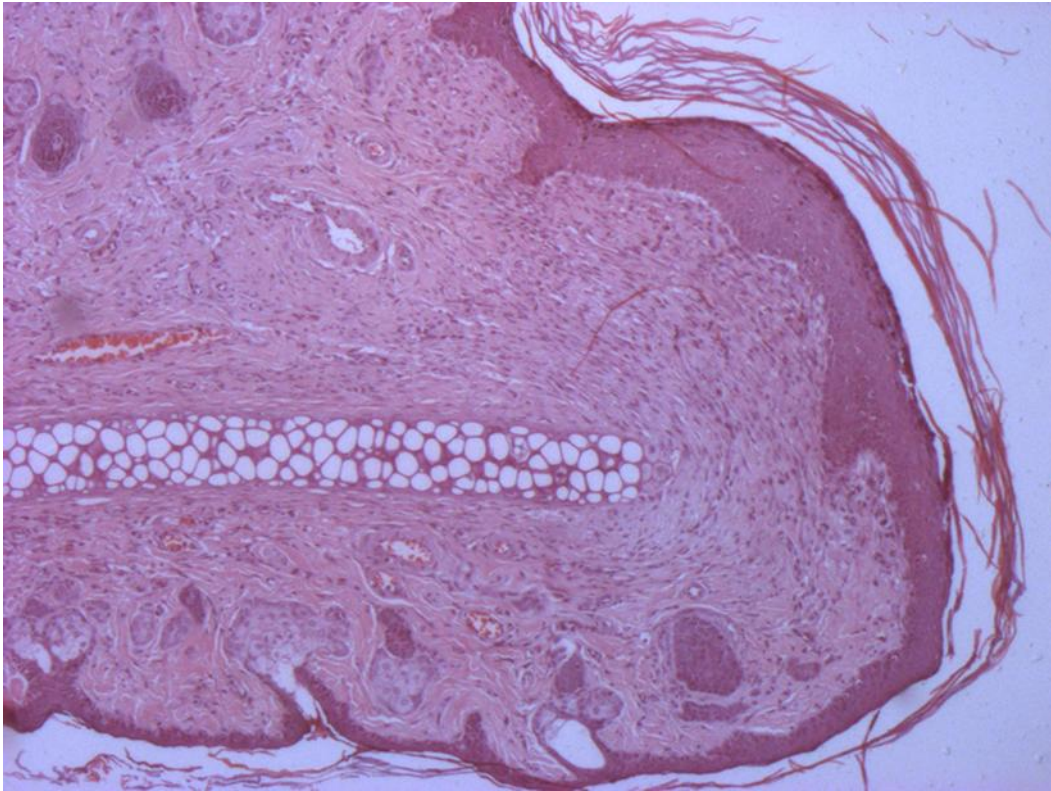


Figura 14. Análise histológica orelha com lesão de 4mm (HE 5x).

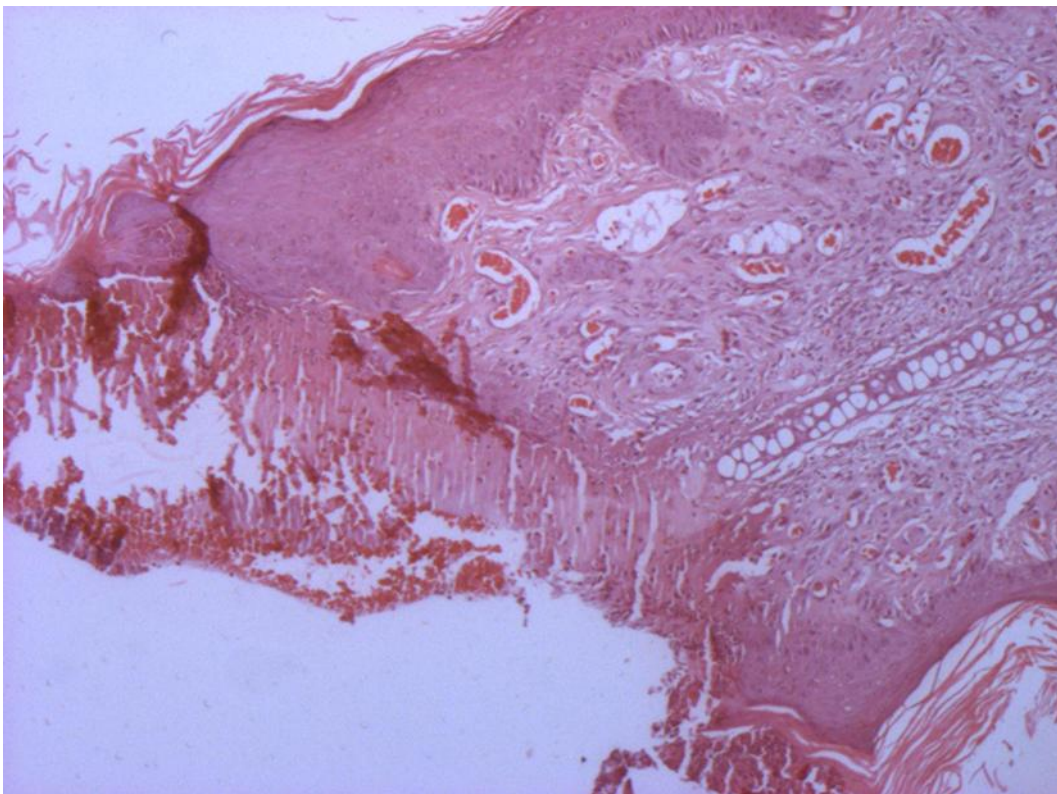


Figura 15. Análise histológica orelha com lesão de 2mm (HE 5x).

### **Análise Imagem Digital.**

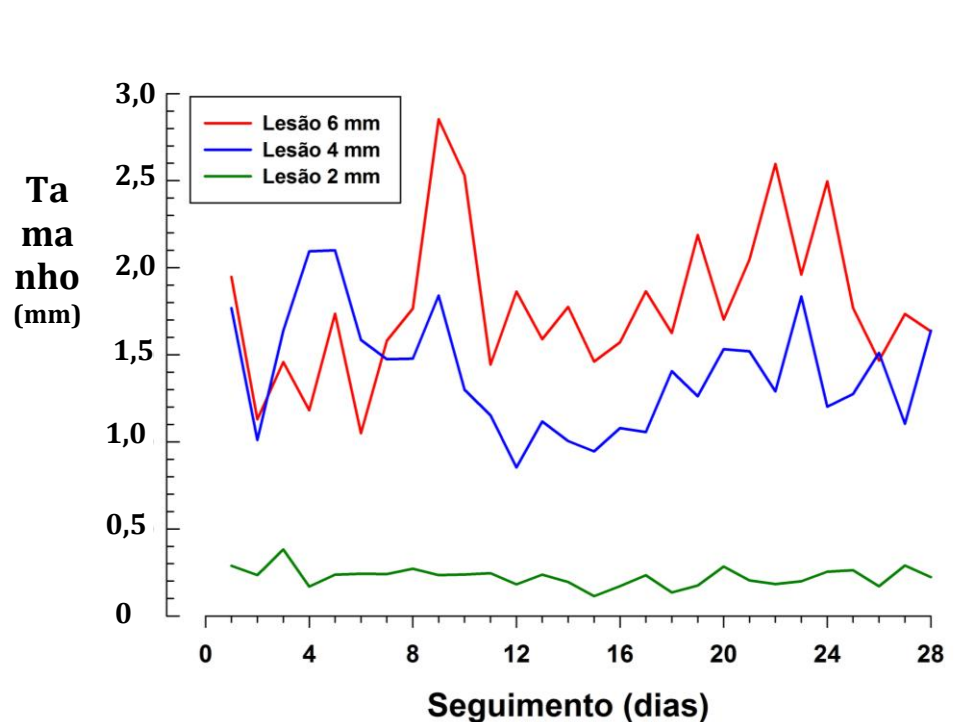
Foram estudados 4 parâmetros para a quantificação das lesões: área, área/box, box x/y e perímetro. Essas variações são determinadas pelo programa Image Pro plus 4.5.1 Mediacybernetics Bethesda Rockfield, EUA.

As lesões de 8mm e 10mm foram removidas da análise digital, uma vez que elas apresentaram necrose de suas bordas, perdendo assim o padrão de recorte no programa do Photoshop.

Com isso, foram realizadas as análises das lesões de 2mm, 4mm e 6mm.

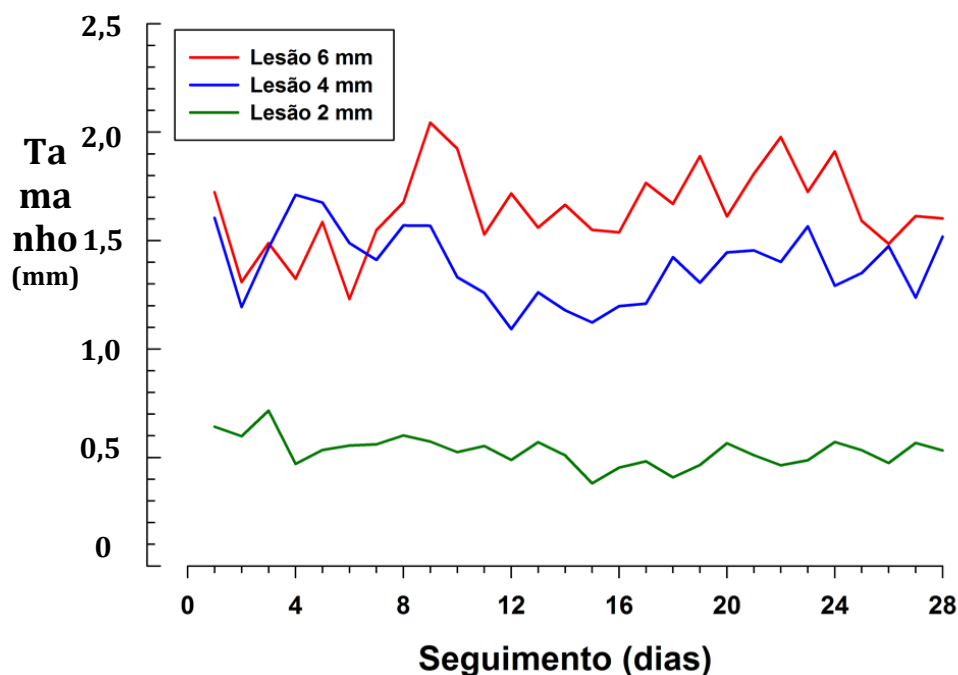
### **Área**

Na análise das alterações das áreas de cada lesão durante os 28 dias, não foi identificada diferença estatística das mesmas ( $p=0,187$ ,  $p=0,198$  e  $p=0,156$  nas lesões de 2mm, 4mm e 6mm respectivamente).



### Perímetro

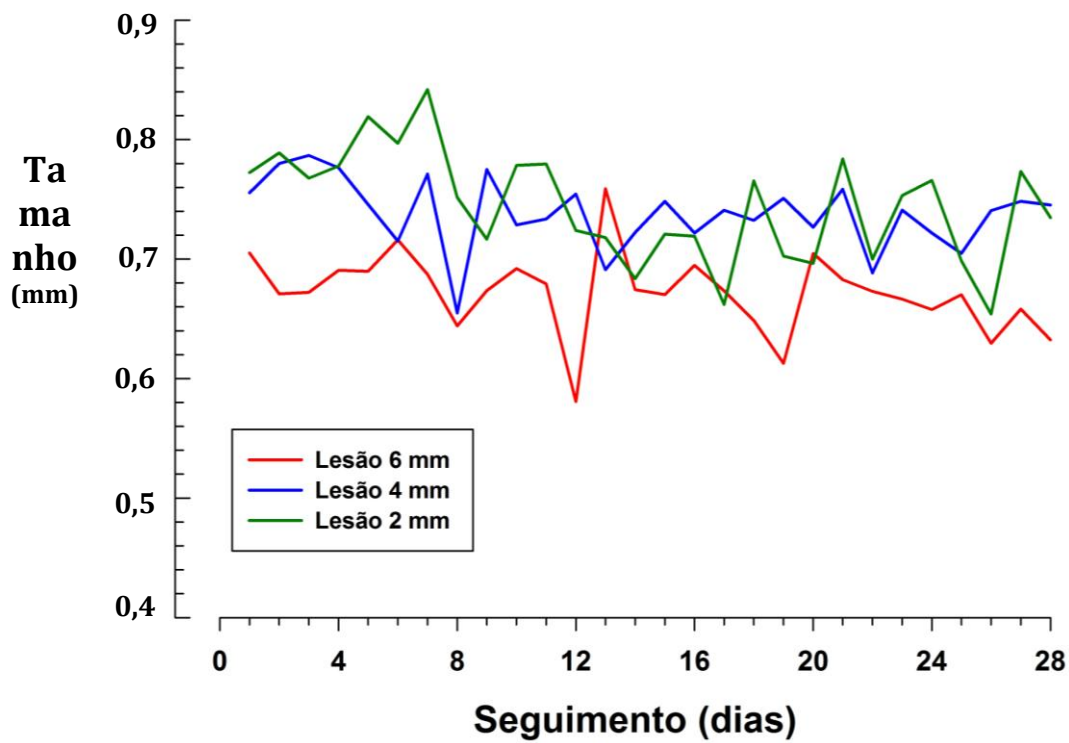
Apesar do  $p$  ser significativo nas lesões de 2mm e 6mm ( $p=0,025$  e  $p=0,088$ ), essas não apresentam efeito estatístico devido ao intervalo de confiança inespecífico (-0,67 a -0,05 e -1,26 a 1,69, respectivamente).



### Área/box

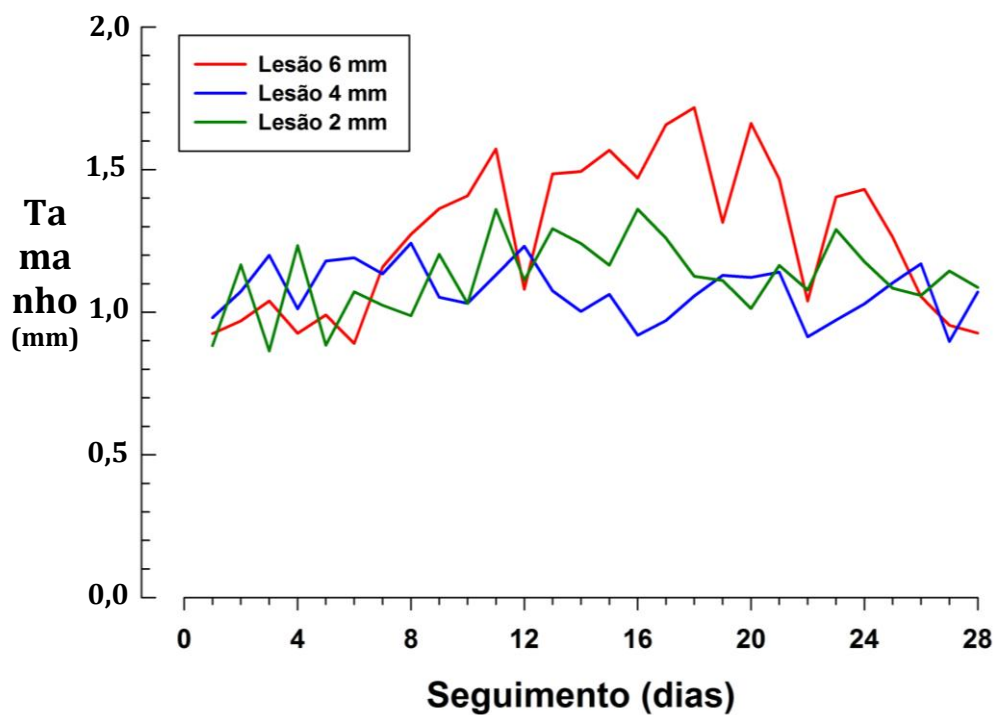
Da mesma forma, ao se analisar a diferença da área/box de cada lesão, não encontramos diferença estatística entre as lesões ( $p= 0,006$ ,  $p= 0,135$ ,  $p= 0,072$  nas lesões de 2mm, 4mm e 6mm respectivamente).

Apesar do  $p < 0,05$  nas lesões de 2mm e 6mm, não obtivemos um intervalo de confiança estatisticamente significativos (-0,05 a -0,001, -0,002 a 0,000 e -0,003 a 0,000, nas lesões de 2mm, 4mm e 6mm respectivamente).



**Box x/y**

Na análise box x/y, não encontramos resultados significativos entre as lesões ( $p=0,147$ ,  $p=0,126$  e  $p=0,172$ , nas lesões de 2mm, 4mm e 6mm respectivamente).



## 6. DISCUSSÃO

Os defeitos cartilagosos são achados frequentes no consultório médico, principalmente na área da otorrinolaringologia. As perfurações septais e defeitos auriculares são problemas que causam diversos prejuízos aos pacientes e grande desconforto aos médicos devido a sua difícil terapêutica.

Muitos cirurgiões vêm buscando soluções alternativas para a sua correção, com o uso de retalhos, enxertos e material externo, porém todos apresentam muitas complicações e resultados insatisfatórios.

A utilização de algumas terapias alternativas -como as células-tronco e engenharia tecidual- vem sendo discutida, porém poucos são os protocolos estabelecidos para seu uso<sup>25,26</sup>.

O objetivo inicial do presente estudo foi descrever uma lesão cartilaginosa crônica em um animal para, no futuro, utilizá-lo como modelo padronizado nas terapias alternativas.

O modelo animal escolhido foi o rato, uma vez que seu genoma está 100% codificado e se assemelha muito a dos seres humanos. Além disso, a anatomia da orelha deste animal é muito semelhante a dos humanos, caracterizado por pele, cartilagem e tecido conjuntivo.

Outro fator importante, e não menos essencial, é o fato de que este animal é de fácil aquisição e cuidado, apresenta excelente capacidade de cicatrização e poucas chances de infecção e morte.

Os animais desta pesquisa eram geneticamente iguais, do mesmo sexo e peso, evitando qualquer risco de viés de aferição.

O tempo de avaliação – 28 dias- foi baseado por outros estudos que analisaram a cicatrização de feridas em diferentes animais<sup>6,13,14,15,16,18</sup>. Estes variaram de 2 semanas a 6 meses. Devido a necessidade do uso de anestésico para permanecerem em decúbito

ventral para fotografia padronizada, não podíamos realizar esse procedimento por muito tempo, uma vez que estávamos sujeitos a desenvolver uma síndrome de dependência nos animais. Ainda não há na literatura estudo demonstrando o tempo de fechamento de feridas em ratos. Com isso, estabelecemos o período de 4 semanas para sua análise.

A análise fotográfica diária foi determinada para identificar a velocidade de cicatrização das lesões, principalmente nas de 2mm. Como não há na literatura protocolo semelhante para este estudo, decidimos evitar o maior número de viés possível e o controle fotográfico diário nos proporcionou tal êxito. As doses anestésicas eram muito inferiores à da primeira indução e nenhum animal foi ao óbito durante o estudo. Acreditamos então que o método foi seguro.

A escolha pelo tamanho das lesões ocorreu de forma aleatória. Há um estudo descrevendo perfurações de diversos animais entre 2 a 10mm, dependendo do tamanho das orelhas de cada espécie<sup>22</sup>. Decidimos realizar diferentes tamanhos (2mm, 4mm, 6mm, 8mm, 10mm) para se obter uma análise da resposta de cada um em um mesmo animal.

Cada orelha do rato recebia um tamanho específico de lesão, sendo a média das duas lesões igual a 6, fazendo com que todos os animais apresentassem o mesmo estímulo de cicatrização tecidual.

A hipótese dos autores seria de que as lesões de menor tamanho fechariam. Entretanto, esse achado não ocorreu.

Todas as lesões permaneceram abertas, com regeneração epidérmica de suas bordas. Uma das hipóteses seria a ausência de fibroblastos nos tecidos. Talvez o aspecto que mais claramente diferencia a cicatrização primária da secundária seja o fenômeno de contração da ferida, que ocorre em grandes feridas de superfície. Os grandes defeitos na pele de coelhos são reduzidos em 5 a 10% de seu tamanho original em cerca de 6 semanas, em grande parte por contração. A contração tem sido atribuída, pelo menos em parte, à presença de miofibroblastos<sup>5</sup>.

Outra possibilidade para a não cicatrização e regeneração dessas feridas seria a falta de tecido gerada pela perfuração. Quando não há uma solução de continuidade entre os tecidos, a capacidade regenerativa é muito limitada e insuficiente.

Como visto anteriormente, para que se ocorra a cicatrização, é necessária a angiogênese, os fibroblastos, a deposição de MEC e o remodelamento. Em nenhuma das lâminas histológicas foi identificado esse processo.

Ao se comparar nosso estudo com o de referência<sup>22</sup>, notamos uma discordância entre as conclusões do fechamento das perfurações. O único estudo que realizou avaliação semelhante com o mesmo animal refere uma taxa de cicatrização de 20%<sup>22</sup>. Todavia, no nosso estudo, nenhum rato apresentou regeneração. Podemos tentar explicar essa diferença pelo fato de que a espécie de ratos utilizado naquele estudo foi diferente do nosso. Em 2006, Metcalfe e col. demonstraram alteração de regeneração de orelhas entre ratos da espécie MRL/MpJ e C57BL/6<sup>27,28</sup>.

Ainda não há na literatura, estudo demonstrando a regeneração em orelhas de ratos da espécie Wistar.

Ao se analisar cada tamanho de lesão, encontramos dados reveladores:

1. Nas lesões de 2mm, a sua análise é dificultada pelo seu tamanho pequeno. A crosta formada logo após a perfuração impede também o acompanhamento da sua regeneração. Por essas características, os autores não recomendam esse tamanho para a sua padronização.
2. Nas lesões de 8mm e 10mm, a partir do 3º dia de pós-operatório, já se visualizava mudança na coloração das bordas externas da orelha. A partir do 15º dia, as orelhas já apresentavam necrose tecidual. Metade das perfurações realizadas com 8mm apresentou retração e necrose local. Todas as lesões com 10mm apresentaram necrose tecidual em sua forma aguda. Assim, esses tamanhos também não são ideais para a terapia de reconstrução local.
3. Nos tamanhos 4mm e 6mm, o padrão de lesão se estabilizou, sem hiperemia reacional ou necrose das suas bordas, sendo tamanhos aceitáveis para futuros estudos.

Na análise quantitativa do nosso estudo, não houve diferença estatística entre as lesões de 2mm, 4mm e 6mm.

Podemos identificar pelos gráficos de área e perímetro que as lesões permaneceram constantemente abertas, identificando uma reação de contração pouco significativa.

Uma vez que as lesões não eram simétricas, foi utilizada também a análise do área/box e box x/y. Nessa situação, também não houve diferença estatística entre as lesões, reafirmando os achados do gráfico da área e perímetro.

Algumas lesões apresentaram  $p < 0,05$ , porém esses não puderam ser considerados, já que o intervalo de confiança não foi estatisticamente significativo, não apresentando, assim, poder para uma conclusão mais enfática.



## 7. CONCLUSÃO

1. Foi descrita uma lesão cartilaginosa crônica em orelhas de ratos Wistar com bisturi de biópsia *punch*.
2. Não há lesão mínima para a manutenção da lesão. *Punchs* de 2mm, 4mm, 6mm, 8mm e 10mm mantêm-se sempre abertas. Entretanto, os tamanhos ideais para futuros estudos são os de 4mm e 6mm.
3. Não há diferenças na histologia entre os diferentes tamanhos de lesões.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kim, SW; Rhee CS. Nasal septal perforations repair: predictive factors and systematic review of the literature. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012; 20: 58-65.
2. Almeida, Washington Luiz e cols. Tratado de Otorrinolaringologia: Septoplastia. 1. ed. São Paulo: Roca, 2002. 239 p.
3. Vicenti, Alcioni Américo e cols. Tratado de Otorrinolaringologia: Cirurgia das Perfurações septais. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2002. 248 p.
4. Cheney. Mack L and cols. Local Flaps in Facial Reconstruction: Reconstruction of the auricle. 2. ed. USA: Elsevier, 2007. 581 p.
5. Cotran, RS; Kumar, V; Collins, T. Patologia Estrutural e Funcional: Reparo dos Tecidos: Crascimento Celular, fibrose e Cicatrização de Feridas. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 79 p.
6. Koppel, PG; Osch, GJVM; Verwoerd, CDA; Verwoerd-Verhoef, H. A new in vivo model for testing cartilage grafts and biomaterials: the rabbit pinna punch-hole model. *Biomaterials.* 2001; 22 (11): 1407 – 1414.
7. Nanda, A; Jain, V; Kabra, SK. Avenues for rehabilitation of auricular defects. *Indian Journal of Dental Research.* 2012; 23 (1): 87 – 91.
8. Ribeiro, FAQ. Tratado de Otorrinolaringologia: Embriologia da Orelha Humana. 1. ed. São Paulo: Rocca, 2002. 369 p.
9. Cruz, OLM e cols. Otologia Clínica e Cirúrgica: Anatomia Microcirúrgica das Orelhas Externa, Média e Interna. 1. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 1 p.
10. Pennachio, LA. Insights from human/mouse genome comparisions. *Mamm Genome.* 2003; 14 (7) 429-436.
11. Wadie, M; Sasaki, CT. Handbook of Laboratory Animal Science: Animal Models for Otolaryngological Disorders. 3. ed. USA: CRC Press, 2011. 185 p.
12. Rosenberg, A. Patologia Estrutural e Funcional: Ossos, Articulações e Tumores de Partes Moles. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000. 1087 p.
13. Cucchiarini M, Madry H. Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med.* 2005; 7(12):1495-509.
14. Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model. *Arthroscopy.* 2007; 23(2):178-87.

15. Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury*. 2008; 39 Suppl 1:S97-113.
16. Mola, F; Keskin, G; Ozturk, M; Muezzinoglu, B. The comparison of acellular dermal matrix (Alloderm), Gore-Tex, and autologous cartilage graft materials in an experimental animal model for nasal septal repair surgery. *Am J Rhinol*. 2007; 21 (3): 330 - 334.
17. Vorontsova, MA; Allen, PM; Billett, F; Liosner, LD. Asexual propagation and regeneration. Pergamon Press; 1960.
18. Joseph, J; Dyson, M. Tissue replacement in the rabbit's ear. *British Journal of Surgery*. 1966; 53: 327 - 380.
19. Goss, RJ; Grimes, LN. Tissue interactions in the regeneration of rabbit ear holes. *American Zoologist*. 1972; 12: 151 - 157.
20. Skoog, T; Ohlsean, L; Sohn, ST. Perichondrial potential for cartilaginous regeneration. *Scandinavian Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery*. 1972; 6: 123 - 125.
21. Goss, RJ; Grimes, LN. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *Journal of Morphology*. 1975; 146: 533 - 542.
22. Williams-Boyce, P. Daniel Jr, JC. Comparison of ear tissue regeneration in mammals. *J. Anat*. 1986; 149: 55 - 63.
23. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. Princípios éticos para o uso de animais de laboratório (Internet). Disponível em: <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20eticos>
24. Brasil. Presidência da República. Casa Civil. Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso de VII do § 1º art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei número 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Brasília. Disponível em: <http://www.jusbrasil.com.br/legislacao/anotada/2359840/lei-11794-08>
25. Cao, Y; Vacanti, JP; Paige, KT; Upton, J; Vacanti, CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg*. 1997; 100: 297 - 302.
26. Sterodimas, A. de Faria, J; Correa, WE; Pitanguy, I. Tissue Engineering and auricular reconstruction: A review. *J Plast Reconstructive Surg*. 2009;62(4):447 - 52.

27. Metcalfe, AD; Willis H; Beare, A; Ferguson, MWJ. Characterizing regeneration in the mammalian external ear. *J Anat.* 2006; 209: 439 – 446.
28. Rajnoch, C; Ferguson, S; Metcalfe, AD; Herrick, S, Ferguson, MWJ. Regeneration of the Ear After Wounding in a Mouse Strains Is Dependent on the Severity Wound Trauma. *Developmental Dynamics.* 2003; 226: 388 – 397.

# **ANEXOS**

## A. ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
FACULDADE DE MEDICINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

### ATA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 323

Aos quinze dias do mês de março do ano de dois mil e treze, no Curso de Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul foi concluído o processo de avaliação da dissertação intitulada "**DESCRIÇÃO DE UMA LESÃO CARTILAGINOSA CRÔNICA EM UM MODELO ANIMAL**" de autoria da pós-graduanda **Caroline Berg** sob a orientação do Professor Doutor **Jefferson Luis Braga da Silva**. A comissão examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Luiz Carlos Bodanese (PUCRS), Dr. Henrique Sarubbi Fillmann (PUCRS), Dr. Gerson Schulz Maahs (HCPA) e Dr. Gustavo Franco Carvalhal, suplente (PUCRS). A aluna foi **APROVADA**. Para constar, lavrou-se esta ata que deverá ser anexada à documentação exigida para posterior expedição do diploma. A presente ata foi assinada pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Porto Alegre, aos quinze dias do mês de março do ano de dois mil e treze.

Prof. Dra. Magda Lahorgue Nunes

## B. ARTIGO

### **Descrição de uma Lesão Cartilaginosa Crônica em um Modelo Animal**

Berg, Caroline; Silva, Jefferson LB; Silva, Vinícius D ;Prates, Thomas DB

#### **Introdução**

Os defeitos de cartilagens são muito comuns na prática médica, especialmente na área da otorrinolaringologia. Perfurações septais e defeitos da cartilagem auricular são grandes desafios tanto para o paciente quanto para o médico. O seu tratamento ainda é desafiador, uma vez que poucas são as técnicas bem estabelecidas e livres de complicações.

O estudo de novas terapias para defeitos cartilagosos vem sendo abordado entre os cirurgiões. Tratamentos com células-tronco ou engenharia tecidual são abordagens possíveis a serem realizadas. Entretanto, os estudos realizados com essa nova terapêutica descrevem lesões agudas como modelo de lesão, não sendo assim o melhor método de avaliação.

Ainda não foram descritos muitas lesões cartilagosas crônicas.

Em animais experimentais, os ratos Wistar são um dos melhores animais para terapia, uma vez que todo seu genoma já foi identificado e se assemelha com o do ser humano.

O objetivo desse trabalho é descrever uma lesão cartilaginosa crônica em orelhas de ratos Wistar.

#### **Material e Métodos**

Este é um estudo experimental, controlado e cegado. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o protocolo de pesquisa nº 11/00264.

A pesquisa foi realizada com base nas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 5 ratos albinos da espécie Wistar, machos, isogênicos, pesando entre 250 e 300g. Os animais foram adquiridos no biotério da PUCRS, dispostos em gaiolas individuais e receberam água e ração *ad libitum*. A indução anestésica foi realizada com o animal sob contenção e em decúbito dorsal. Os anestésicos foram aplicados por via intraperitoneal, utilizando seringa e agulha de insulina. Foram administrados 0,2mg de clorpromazina associado à 0,8mg de quetamina (4mg/kg).

Em cada orelha foram realizadas lesões com bisturi punch de tamanhos de 2mm, 4mm, 6mm, 8mm e 10mm. Todos os animais receberam analgesia pós-operatória paracetamol gotas (1gota/Kg), diluído em água.

Após, por 28 dias, foram tiradas fotografias com câmera digital Sony DSLRA580L 18-55mm F3.5-5.6 Lens® de cada lesão. Os registros fotográficos foram salvos em um banco de dados, separados de acordo com o dia e lado da lesão.

Após essa fase (280 registros fotográficos), cada orelha era ressecada e enviada em frascos com Formalina tamponada a 10%. As orelhas eram processadas por técnica histológica convencional em cortes de 5micrômetros e corada por Hematoxilina-Eosina (HE). Dois observadores experientes e sem conhecimento do tamanho ou lado de cada lâmina fizeram a análise histológica.

Cada imagem fotográfica foi inserida no programa Adobe Photoshop CS6 Extended® e ampliada em 100 vezes. Com as 280 imagens devidamente selecionadas,

uma nova análise digital, cegada, era realizada no programa Image Pro plus 4.5.1 Mediacybernetics Bethesda Rockfield, EUA, para determinar a área, área/box, box x/y e perímetro.

Com os dados de cada lesão devidamente datados, foi realizada regressão linear com análise de covariância entre os diferentes tamanhos. O nível de significância utilizado foi  $p=0,05$  e poder estatístico de 95%.

Os dados obtidos na pesquisa foram digitados em uma planilha eletrônica (Microsoft Office Excel 2010, Microsoft Corporate, Redmond, EUA), checados quanto à consistência dos dados a fim de corrigir possíveis erros de digitação.

#### Resultados:

Nenhuma lesão fechou completamente seus bordos após 28 dias. As lesões de 10mm apresentaram necrose da parte distal das orelhas no 8 e 10 dia (ratos 1 e 5 respectivamente).

Uma lesão de 8mm apresentou necrose da borda externa no 12 dia (rato 4-orelha esquerda).

As lesões de 6mm e 4mm se mantiveram estáveis durante todo o processo e análise, sem alteração de sua forma, cor ou tamanho.

As lesões de 2mm, apesar de não fecharem seus bordos, apresentaram crostas com difícil visualização macroscópica do orifício.

Na análise histológica, não se visualizou diferenças entre os diferentes tamanhos de lesões. Foram visualizadas linhas centrais de condrócitos e discreta hiperplasia epitelial. O edema de conjuntiva era mínimo em todas as lesões. Todas as lâminas apresentavam discreta proliferação de fibroblastos e pouca reação local. Não havia evidência de infecção local. A angiogênese foi considerada ausente, devido ao seu pequeno achado nas lâminas. Nas orelhas de 10mm e 8mm, visualizou-se um padrão necrótico nas bordas teciduais externas.

#### Discussão:

Os defeitos cartilagosos são achados muito encontrados no consultório médico, principalmente na área da otorrinolaringologia. As perfurações septais e defeitos auriculares são problemas que causam diversos prejuízos aos pacientes e grande desconforto aos médicos devido a sua difícil terapêutica.

A utilização de algumas terapias alternativas -como as células-tronco e engenharia tecidual- vem sendo discutida, porém poucos são os protocolos estabelecidos para seu uso.

O objetivo inicial do presente estudo foi descrever uma lesão cartilaginosa crônica em um animal para, no futuro, utilizá-lo como modelo padronizado nas terapias alternativas.

O modelo animal escolhido foi o rato, uma vez que seu genoma está 100% codificado e se assemelha muito a dos seres humanos. Além disso, a anatomia da orelha deste animal é muito semelhante a dos humanos, caracterizado por pele, cartilagem e tecido conjuntivo.

Outro fator importante, e não menos essencial, é o fato de que este animal é de fácil aquisição e cuidado, apresenta excelente capacidade de cicatrização e poucas chances de infecção e morte.

A hipótese dos autores seria de que as lesões de menor tamanho fechariam. Entretanto, esse achado não ocorreu.



Todas as lesões permaneceram abertas, com regeneração epidérmica de suas bordas. Uma das hipóteses, seria a ausência de fibroblastos nos tecidos. Talvez o aspecto que mais claramente diferencia a cicatrização primária da secundária seja o fenômeno de contração da ferida, que ocorre em grandes feridas de superfície. Os grandes defeitos na pele de coelhos são reduzidos em 5 a 10% de seu tamanho original em cerca de 6 semanas, em grande parte por contração. A contração tem sido atribuída, pelo menos em parte, à presença de miofibroblastos.

Outra possibilidade para a não cicatrização e regeneração dessas feridas seria a falta de tecido gerada pela perfuração. Quando não há uma solução de continuidade entre os tecidos, a capacidade regenerativa é muito limitada e insuficiente.

Como visto anteriormente, para que se ocorra a cicatrização, é necessária a angiogênese, os fibroblastos, a deposição de MEC e o remodelamento. Em nenhuma das lâminas histológicas foi identificado esse processo.

Ao se comparar nosso estudo com os de referência, notamos uma discordância entre as conclusões do fechamento das perfurações. O único estudo que realizou avaliação semelhante com o mesmo animal, refere uma taxa de cicatrização de 20%. Williams-Boyce, P. Daniel Jr, JC. Comparision of ear tissue regeneration in mammals. J. Anat 1986, 149, 55-63. Todavia, no nosso estudo, nenhum rato apresentou regeneração. Podemos tentar explicar essa diferença pelo fato de que a espécie de ratos utilizado naquele estudo foi diferente do nosso. Em 2006, Metcalfe e col. demonstraram alteração de regeneração de orelhas entre ratos da espécie MRL/MpJ e C57BL/6. Metcalfe AD, willis H, Beare A, Ferguson MWJ. Characterizing regeneration in the mammalian external ear. J. Anat 2006 209, pp 439-446. Ainda não há na literatura, estudo demonstrando a regeneração em orelhas de ratos da espécie Wistar.

### **Conclusão:**

Foi descrita uma lesão cartilaginosa crônica em um modelo animal. A lesão é realizada com bisturi de biópsia punch em ratos Wistar. Não há lesão mínima para a manutenção da lesão: Puncths de 2mm, 4mm, 6mm, 8mm e 10mm mantém-se sempre abertas. Entretanto, podemos afirmar que, para os autores, os tamanhos ideais para futuros estudos são os de 4mm e 6mm.