



**Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista**



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Efeitos da insulina no tecido cartilágneo do fêmur de ratos jovens submetidos à lesão térmica

Santos – SP

2021



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ANNY ROCHA PEREIRA

**Efeitos da insulina no tecido cartilagíneo
do fêmur de ratos jovens submetidos à
lesão térmica**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Flavia de Oliveira

Coorientadora: Ma. Mariana Cruz Lazzarin

Santos – SP

2021



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Ficha catalográfica elaborada por sistema automatizado
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R672e Pereira, Anny Rocha.
Efeitos da insulina no tecido cartilagíneo do
fêmur de ratos jovens submetidos à lesão térmica. /
Anny Rocha Pereira; Orientadora Flavia de Oliveira
; Coorientadora Mariana Cruz Lazzarin. -- Santos,
2021.
40 p. ; 30cm

TCC (Graduação - Fisioterapia) -- Instituto Saúde
e Sociedade, Universidade Federal de São Paulo, 2021.

1. lesão térmica. 2. insulina. 3. cartilagem. 4.
colágeno. 5. morfometria. I. de Oliveira, Flavia,
Orient. II. Título.

CDD 615.82



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

*As meus pais e maiores incentivadores,
que tanto admiro, dedico o resultado do
esforço realizado ao longo deste percurso.*



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã Lívia, que são acalanto e fonte vívida de amor. Vocês são minhas motivações, são morada em meu coração e responsáveis por me manter em terra firme.

Ao Luiz Eduardo, por estar quando preciso, me apoiar e caminhar ao meu lado.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Flávia de Oliveira por acreditar em mim, por ser o maior exemplo de profissional que já conheci, por ser paciente, atenciosa e retirar sempre o melhor de mim mesmo que nem eu acreditasse que era capaz. Sem dúvidas uma das maiores inspirações que já conheci em minha formação acadêmica e humana. Foi uma honra estar aprendendo tanto ao seu lado, meu desejo é que todas as pessoas possam ter alguém em quem confiar como tive você.

À minha coorientadora Ms. Mariana Lazzarin, por não medir esforços para que todos à sua volta aprendam, por me fazer entender a responsabilidade e rigor que a pesquisa exige. Obrigada por sempre demonstrar amor e carinho, você é exemplo para todos que cruzam seu caminho.

Ao Ms. José Fontes, que garantiu risadas e aprendizados imensuráveis. Sou extremamente grata por ter as melhores pessoas que já pude imaginar em meu percurso. Você sem dúvidas fez com que minha pesquisa fosse ainda mais completa.

À Profa. Dra. Hananiah Quintana, por me acolher e dispor seu tempo para me auxiliar.

À minha amiga Leticia Garcia, que prontamente esteve ao meu lado e vibrou comigo todas as conquistas.

Às minhas amigas Amanda Miranda, Deborah Inocêncio, Maria Fernanda Paiva, Mariana Nobrega e Karen Mariano que tornaram a graduação mais bonita e feliz. Obrigada por estarem ao meu lado na construção de minha jornada.



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

RESUMO

Introdução. As lesões térmicas que ocorrem em crianças por derramamento de líquidos quentes estão entre os acidentes mais comuns no mundo. Quando superiores a 40% da extensão corporal são consideradas extensas e, além de respostas locais, levam a repercussões sistêmicas. **Objetivo.** O objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos do tratamento com insulina em curto e longo prazo após lesão térmica, na morfologia do tecido ósseo e cartilágneo do fêmur de ratos Wistar jovens. **Metodologia.** Para isso, foram utilizados 40 ratos Wistar de 21 dias, machos, distribuídos nos grupos: Controle (C), Controle com tratamento diário de insulina (C+I), submetidos à Lesão Térmica por Escaldadura (LTE) e submetidos à Lesão Térmica por Escaldadura com tratamento diário de insulina (LTE+I). Os animais foram eutanasiados após 4 ou 14 dias da lesão ou simulação da mesma. A epífise proximal do fêmur foi submetida à análise histopatológica, morfométrica (mensuração das camadas da cartilagem articular e das camadas da lâmina epifisial, densidade e área do perfil celular dos condrócitos) e de avaliação das fibras colágenas tipos I e III. Realizou-se ainda a análise imunoistoquímica para as proteínas RANX-2 e RANK-L. Foi realizada a análise estatística por meio de análise de variância (ANOVA) com três fatores. **Resultados.** A lâmina epifisial do fêmur dos animais que sofreram a lesão térmica, em longo prazo apresentou menor tamanho que o controle, independente do tratamento com insulina, essa diminuição se dá nas zonas proliferativa e hipertrófica+calcificada. Os efeitos da insulina só foram verificados em curto prazo após a lesão apenas nas zonas hipertrófica+calcificada. A cartilagem articular sofreu diminuição tanto em longo quanto em curto prazo como efeito da lesão térmica. A insulina diminuiu drasticamente a espessura da cartilagem articular nos grupos C+I, essa diminuição ocorreu em grau mais moderado nos grupos LTE+I também em longo e curto prazo, portanto o efeito modulador da insulina foi diferente na presença da lesão térmica. A interferência da lesão e do tratamento com insulina ocorreu principalmente nas camadas Média+Profunda. Em relação a área dos condrócitos foram observados resultados somente em animais LTE+I de 4 dias que evidenciaram área menor que grupo C+I, demonstrando que ação da



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

insulina foi diferente na presença da lesão térmica. A análise de fibras colágenas da cartilagem articular evidenciou diminuição na coloração de colágeno e comprometimento na malha pantográfica dos animais LTE, após 14 dias da administração de insulina LTE+I apresentou organização semelhante ao grupo C, evidenciando ação positiva da insulina em longo prazo. A avaliação imunoistoquímica para os fatores de regulação osteogênica RUNX-2 e RANK-L não evidenciaram diferença entre os grupos experimentais. No entanto, salienta-se que houve dificuldades na realização da técnica imunoistoquímica. **Conclusão.** A insulina causou diminuição da cartilagem articular. Já quanto à avaliação do colágeno, a insulina foi capaz de recuperar o padrão em malha pantográfica do colágeno tanto da cartilagem articular quanto da lâmina epifisial.

DESCRITORES: lesão térmica, insulina, cartilagem, colágeno, morfometria.



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ABSTRACT

Introduction. Thermal injuries that occur in children by spilling hot liquids are among the most common accidents in the world. When greater than 40% of the body extension, they are considered extensive and, in addition to local responses, lead to systemic repercussions. **Objective.** The aim of the present study was to analyze the effects of insulin treatment in the short and long term after thermal injury, on the morphology of bone and cartilage tissue of the femur of young Wistar rats. **Methodology.** For that, 40 male Wistar rats of 21 days were used, distributed in the groups: Control (C), Control with daily insulin treatment (C + I), submitted to Thermal Injury by Scald (SBI) and submitted to Thermal Injury by Scald with daily insulin treatment (SBI + I). The animals were euthanized after 4 or 14 days of injury or simulation. The proximal epiphysis of the femur was submitted to histopathological, morphometric analysis (measurement of the layers of the articular cartilage and layers of the epiphysial lamina, density and area of the cell profile of the chondrocytes) and evaluation of collagen fibers types I and III. Immunohistochemical analysis was performed for RANX-2 and RANK-L proteins. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) with three factors. **Results.** The epiphyseal lamina of the femur of animals that suffered thermal injury, in the long run, was smaller than the control, regardless of insulin treatment, this decrease occurs in the proliferative and hypertrophic + calcified zones. The effects of insulin were only seen in the short term after the injury only in the hypertrophic + calcified areas. Articular cartilage suffered a decrease in both long and short term as an effect of thermal injury. Insulin dramatically decreased the thickness of articular cartilage in groups C + I, this decrease occurred to a more moderate degree in groups SBI + I also in the long and short term, so the insulin modulating effect was different in the presence of thermal injury. Injury and insulin treatment interference occurred mainly in the Middle + Deep layers. Regarding the area of chondrocytes, results were observed only in SBI + I animals of 4 days that showed an area smaller than group C + I, demonstrating that insulin action was different in the presence of thermal injury.



Ministério da Educação
Universidade Federal de São Paulo
Campus Baixada Santista



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

The analysis of collagen fibers of the articular cartilage showed a decrease in the collagen staining and impairment in the pantographic mesh of the SBI animals, after 14 days of the administration of insulin SBI + I showed a similar organization to group C, showing positive action of insulin in the long term. The immunohistochemical evaluation for osteogenic regulation factors RUNX-2 and RANK-L did not show any difference between the experimental groups. However, it should be noted that there were difficulties in performing the immunohistochemical technique. **Conclusion.** Insulin caused a decrease in joint cartilage. As for the evaluation of collagen, insulin was able to recover the pantographic mesh pattern of collagen from both the articular cartilage and the epiphyseal lamina.

KEY-WORDS: burn injury, insulin, cartilage, collagen, morphometry.



CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Sumário

1.0. INTRODUÇÃO	1
1.1 Caracterização do problema	1
1.2 Tecido ósseo	2
1.3 Cartilagem articular	3
1.4 Crescimento ósseo: lâmina epifisial	4
1.5 Lesão térmica e crescimento ósseo.....	6
1.6 Lesões térmicas e resistência à insulina.....	7
1.7 Fatores de regulação osteogênica: RUNX-2 e RANK-L	8
2.0. OBJETIVO E METAS	9
3.0. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO	9
3.1 Formação dos grupos experimentais	10
3.2 Procedimento de realização da lesão térmica por escaldadura	11
3.3 Tratamento com insulina e análise do nível de glicose sanguínea.....	12
3.4 Teste de tolerância à glicose e resistência à insulina	12
3.5 Eutanásia e obtenção dos tecidos a serem processados.....	13
3.6 Procedimentos para Análise Histopatológica e Análise das fibras colágenas tipo I e tipo III da cartilagem articular	13
3.7 Procedimentos para as Análises Morfométricas da lâmina epifisial e da cartilagem articular	14
3.8 Densidade Celular e Área dos Condrócitos da Cartilagem Articular	16
3.9 Imunohistoquímica dos fatores de regulação osteogênica RUNX-2 e RANKL.	17
3.10 Procedimento para Análise Estatística dos Dados	18
4.0. RESULTADOS	18
4.1 Análise da Lâmina Epifisial	18
4.2 Análise da cartilagem articular	21
4.4 Análise das fibras colágenas tipo I e III da cartilagem articular e lâmina epifisial	25
4.5 Análise imunoistoquímica dos fatores de regulação osteogênica RUNX-2 e RANK-L	28
5.0. DISCUSSÃO	29
6.0. CONCLUSÃO	35
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8.0. ANEXO 1	41

1.0. INTRODUÇÃO

1.1 Caracterização do problema

As lesões térmicas extensas são designadas pela extensão da área a ser agredida, sendo que se a mesma for maior de 40% de sua superfície corporal total provocará resposta sistêmica. Tais lesões podem ser provocadas por exposição a chamas, líquidos quentes, superfícies quentes, frio, substâncias químicas, eletricidade, radiação, atrito ou fricção (HETTIARATCHY e DZIEWULSKI, 2004).

As lesões térmicas podem ser classificadas, de acordo com a profundidade de acometimento, em lesões de primeiro, segundo e terceiro grau. As queimaduras de primeiro grau são superficiais e afetam somente a epiderme, geralmente são acompanhadas de vermelhidão, não ocasionam bolhas e não deixam sequelas. As queimaduras de segundo grau podem ser superficiais ou profundas e acometem a epiderme e partes variáveis da derme. Os sinais são vermelhidão, possíveis bolhas e dor e, no caso da lesão de segundo grau profunda, pode acometer mais gravemente terminações nervosas. Já as de terceiro grau ou de espessura total afetam toda a epiderme e derme, podendo atingir tecidos subcutâneos como fáscia, músculo e osso (BISHOP, 2004; KRISHNAMOORTHY *et al*, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018), a maior parte das queimaduras ocorre em países de baixa renda, locais em que a taxa de morte é 7 vezes maior que nos demais países. Na Índia, mais de 1 milhão de pessoas sofrem de lesões térmicas moderadas ou severa todos os anos; quase 173 mil crianças de Bangladesh são moderadas ou severamente queimadas todos os anos (OMS, 2018).

Nos Estados Unidos 1,2 milhões de pessoas sofrem lesões térmicas por ano, sendo que 50.000 são vítimas de lesões térmicas graves (KADDOURA *et al*, 2017). No ano de 2017 o Brasil registrou 24.728 casos de internações por queimaduras, sendo 34 % (8.345) desse total crianças de idade menor de 1 ano a 14 anos (Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações hospitalares do SUS (SIH/SUS)). Quase um quarto das queimaduras ocorre em crianças menores de 16 anos, dos quais a maioria ocorre aos 5 anos (KRISHNAMOORTHY *et al*, 2012). No mundo a lesão térmica causa 300.000 mortes por ano (BARRETT *et al*, 2019).

No período entre janeiro de 2019 e janeiro de 2020 no Brasil, houve 17.908 casos de internações em decorrência de lesões térmicas entre homens e mulheres

com faixa etária de 15 a 49 anos. No mesmo período o número de casos entre crianças, menores de 1 a 14 anos foi de 8.522. Desta maneira têm-se que seriam 407 casos de queimaduras por ano de idade em adultos e 608,71 casos de lesão térmica sofridos por crianças por ano (DATASUS, 2020). Os dados comprovam que acidentes no Brasil são em sua maioria sofridos por crianças, em decorrência da hiperatividade e curiosidade em fase de desenvolvimento.

Além desse fator, a pele é um dos maiores órgãos do corpo humano sendo que em um adulto seu tamanho varia entre 1,5 a 2 metros quadrados, já o de um recém-nascido apenas 0,2 a 0,3 metro quadrado (CHURCH *et al*, 2006). No caso de derramamento de líquidos quentes, por exemplo, uma quantidade considerada pequena para a superfície corporal do adulto pode ser considerada grande para uma criança, atingindo uma porcentagem grande da superfície corporal. Soma-se a isso o fato de crianças pequenas bem como os adultos idosos terem a camada dérmica da pele mais fina que a de um adulto, resultando em uma maior propensão para queimaduras profundas (CHURCH *et al*, 2006).

1.2 Tecido ósseo

O tecido ósseo desempenha funções fundamentais no corpo: locomoção, proteção de órgãos, reserva de cálcio, fosfato e da medula óssea (FLORENCIO-SILVA *et al*, 2015). É um tecido ativo, está constantemente sofrendo reabsorção por osteoclastos e remodelação por osteoblastos (DATTA *et al*, 2008).

O osso é dividido macroscopicamente em osso trabécula e osso cortical, distribuídos de maneiras diferentes pelos ossos do corpo. Os ossos longos também são formados por uma haste que recebe o nome de diáfise e duas epífises. É nas epífises que se localizam as placas epifisárias, a diáfise composta por osso cortical e a epífise osso trabecular revestido por osso cortical (CLARKE, 2008). O osso trabecular e cortical são formados por um padrão lamelar, e as fibras colágenas são depositadas em diferentes direções, garantindo grande resistência ao tecido. Já o osso imaturo tem a deposição de colágeno desorganizada, isso resulta em um tecido menos resistente (CLARKE, 2008).

As células que compõem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos e osteoblastos. Os osteoblastos são células com retículo endoplasmático e complexo de Golgi abundante evidenciando grande produção proteica e, portanto, pela

deposição de componentes da matriz óssea (CAPULLI, PAONE, RUCCI, 2014). Os osteócitos são células abundantes no tecido ósseo e garantem por meio de seus prolongamentos o transporte de nutrientes entre o tecido, são células com menor produção proteica. Por fim, os osteoclastos são células multinucleadas responsáveis pela remodelação da matriz óssea (FLORENCIO-SILVA *et al*, 2015).

1.3 Cartilagem articular

A principal função da cartilagem articular é a absorção e diminuição de impacto (TEMENOFF E MIKOS, 2000). De sua composição 60-85% de seu peso corresponde a água, 1-5% as células denominadas condrócitos e outras células específicas. Os condrócitos são as células responsáveis por secretar a matriz extracelular (CLASSEN, SCHICHT, PAULISEN, 2010). A cartilagem articular é hialina e constituída especialmente por fibras colágenas, proteoglicanos, glicoproteínas e outras proteínas não colágenas (FOX, BEDI, RODEO, 2009). A cartilagem hialina possui pouca capacidade regenerativa, é avascular de modo que seus nutrientes e oxigenação dependem da difusão pelo líquido sinovial (PEARLE, WARREN, RODEO, 2005).

A cartilagem articular pode ser dividida em zonas superficial, média, profunda e calcificada (POOLE *et al*, 2001). A zona superficial, compreende de 10% a 20% da espessura da cartilagem articular, as fibras colágenas estão dispostas paralelamente à superfície articular e nesta zona há uma grande quantidade de condrócitos dispostos de maneira achatada. A zona superficial é principalmente responsável pela manutenção e proteção das zonas adjacentes e é nesta que há a secreção de proteoglicano-4 ou lubrina que garante lubrificação à cartilagem articular (CORREA E LIETMAN, 2016).

A zona média, observada sob a superficial, representa de 40% a 60% do volume da cartilagem. Esta permite uma ponte entre a zona superficial e profunda. As fibras colágenas possuem espessura grossa e estão dispostas obliquamente, os condrócitos possuem forma esférica, esta zona é a primeira linha de resistência a forças compressivas (FOX, BEDI, RODEO, 2009), quando a cartilagem sofre compressão grandes volumes de água são liberados da zona média em direção à zona superficial e espaço sinovial. Quando há a descompressão o líquido volta à cartilagem (CORREA E LIETMAN, 2016).

A zona profunda representa 30% do volume da cartilagem, as fibras colágenas estão dispostas de maneira perpendicular à superfície articular, possuem maior diâmetro, os condrócitos são arredondados e estão organizados paralelos às fibras (POOLE *et al*, 2001). Essa é a zona menos deformável (CORREA E LIETMAN, 2016).

A última zona da cartilagem articular é a calcificada, essa garante fixação da cartilagem ao osso e ancora as fibras de colágeno da zona profunda ao osso, nessa zona o número de células é muito pequeno (FOX, BEDI, RODEO, 2009).

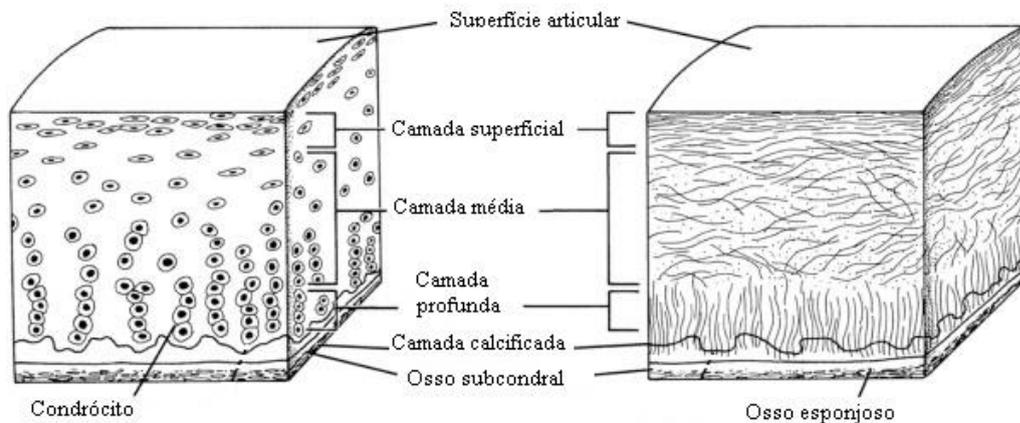


Figura 1: Camadas observadas na cartilagem articular, disposição das fibras colágenas em cada zona (Adaptado de CORREA E LIETMAN, 2016).

1.4 Crescimento ósseo: lâmina epifisial

O processo de crescimento ósseo ocorre de duas maneiras: através da ossificação intramembranosa na qual os osteoblastos se diferenciam a partir de células mesenquimais e formam diretamente o osso, e a ossificação endocondral, na qual há crescimento do osso longo a partir de cartilagem (TAKIGAWA, 2013).

Na vida pós-natal, o crescimento endocondral é responsável pelo aumento longitudinal de ossos longos e se dá a partir de um molde de cartilagem hialina (CLARKE, 2008). O processo tem início com a ossificação da parte central do molde de cartilagem, conhecido como centro de ossificação primário, sendo que o desenvolvimento ósseo se dá no sentido oposto, ou seja, centro/extremidades, formando-se a diáfise a partir do centro do molde (DOWNEY e SIEGEL, 2006). Logo em seguida, é formado o centro de ossificação secundária nas extremidades, esse é formado nas epífises e resulta na formação de uma placa de cartilagem entre as ossificações, chamada de lâmina epifisial responsável pelo crescimento

longitudinal do osso e que permanece até a maturidade física, quando a cartilagem é substituída por osso, unindo a diáfise e as epífises (TAKIGAWA, 2013).

A lâmina epifisial se divide em quatro zonas (Figura 2), distintas pela taxa de proliferação, estado de diferenciação e morfologia celular. A zona de repouso possui condrócitos esféricos, que se dividem com pouca frequência, até que alguns condrócitos entram em um ciclo celular para dividirem-se e formarem a próxima camada celular (ABAD, 2002). A zona proliferativa contém condrócitos empilhados com maior taxa proliferativa e dispostos de maneira longitudinal. A zona pre-hipertrófica ou zona de transição, contém condrócitos um pouco maiores, com pouca capacidade de divisão celular, mas com grande capacidade de síntese de proteínas. Os produtos excretados por células desta camada transmitem sinais para os condrócitos no desenvolvimento inicial e para matriz adjacente. Por fim, a zona hipertrófica contém condrócitos hipertróficos, os quais secretam grande quantidade de proteínas da matriz, é nos septos intercelulares que ocorre a calcificação da matriz (LAMPL E SCHOEN, 2017).

Ocorrem mudanças na composição da matriz que ocasionam a atração de vasos sanguíneos e células ósseas, assim então há a remodelação da cartilagem em tecido ósseo (EERDEN, KARPERIEN, WIT, 2003).

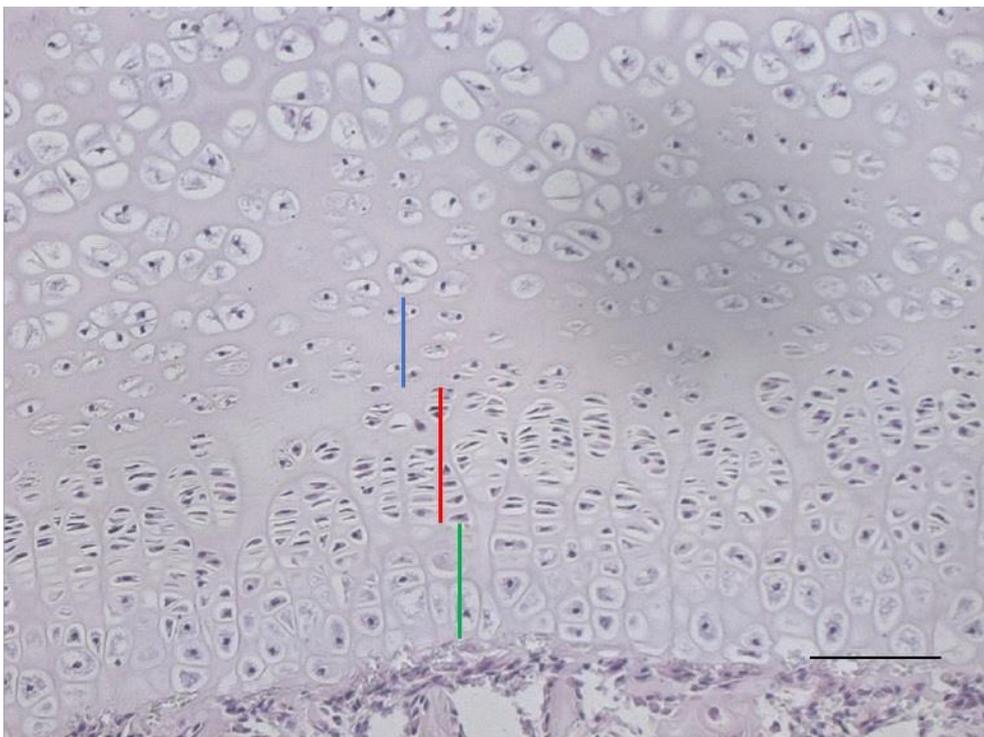


Figura 2: Camadas da lâmina epifisial do fêmur de ratos Wistas machos, de 25 dias de vida. Corada

em Hematoxilina-Eosina. Linha azul representa zona de repouso, linha vermelha zona proliferativa e linha verde zona hipertrófica mais a zona calcificada. Barra de calibração = 200 µm.

1.5 Lesão térmica e crescimento ósseo

Uma grave lesão térmica resulta em condições catabólicas e hipermetabólicas, identificadas pelo acréscimo de gasto metabólico em repouso. Crianças que sofreram lesão térmica maior que 30 a 40% da superfície corporal, possuem contínuo estado metabólico de 3 a 4 anos pós lesão (ATIYEH, JANON, 2014).

Bline *et al* (2013) afirmam que crianças que sofreram graves queimaduras - em mais de 40% da superfície corporal - possuem atraso no crescimento. Ainda segundo esses autores, a massa corporal pode declinar também, contudo retorna ao normal em até 3 anos após o trauma, já o crescimento pode sofrer defasagem por mais tempo.

Prelack *et al*, (2007) realizou um estudo com 159 indivíduos de idades de 1 mês a 13 anos com mais de 50% da superfície corporal lesionada. Após 6 meses os indivíduos apresentavam diminuição de altura, essa permaneceu abaixo de percentis da curva de crescimento padrão do *National Center for Health Statistics* de 1977 por até 5 anos após queimadura. Os *déficits* de altura variaram de 1,6 a 5,8 cm.

Tomé *et al* (2019) analisou 28 ratos jovens divididos em 2 grupos, sendo esses: grupo controle e grupo submetido a lesão térmica. Os autores identificaram diminuição de todas as camadas da lâmina epifisial do grupo submetido a lesão térmica, resultado que pode significar precoce declínio do crescimento. Os animais submetidos a lesão térmica também apresentavam ausência do centro de ossificação secundário diferente dos controles, esse dado evidencia outro sinal de possível defasagem no crescimento ósseo.

Em estudo realizado por Klein *et al* (1995), observou-se aumento das incidências fraturas após alta hospitalar de pacientes lesionados térmicos, devido às consequências relacionadas à redução da formação e aumento da reabsorção ósseas, alterações essas que persistem em longo prazo. Com o rompimento da pele permite a entrada de microorganismos que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL- 1 β e IL-6), essas estimulam a produção do ligante RANK-L pelos osteoblastos e osteócitos, o ligante por sua vez estimula as células estromais (células-tronco) da medula a diferenciarem-se em osteoclastos, resultando em um

aumento da reabsorção óssea (KLEIN, 2015). Pacientes que sofreram lesões térmicas graves podem desenvolver baixa taxa de vitamina D, que resultará no declínio da densidade mineral, podendo prejudicar o crescimento ósseo (BLINE *et al*, 2013).

A produção de citocinas inflamatórias e glicocorticóides influenciam os osteoclastos a produzirem o ligante RANK-L que estimulam a produção de osteoclastos na medula óssea. Devido a resposta da lesão perdurar próximo a um ano, pós trauma, glicocorticóides podem causar apoptose dos osteoblastos, não permitindo que o tecido ósseo recupere as perdas ocasionadas pela absorção (KLEIN, 2012).

1.6 Lesões térmicas e resistência à insulina

A hiperglicemia é um estado recorrente em pacientes que sofreram lesão térmica, de modo a liberar glicose para órgãos vitais, quadro que gera danos na cicatrização de feridas, perda de enxerto de pele, aumento do catabolismo de proteínas musculares e aumento da incidência de infecções - esses fatores contribuem para a mortalidade de pacientes que sofreram lesão térmica (GAUGLITZ *et al*, 2009).

Estudos recentes indicam que a resistência à insulina desenvolvida em pacientes que sofreram lesão térmica extensa pode estar envolvida em grande parte pelo *feedback* negativo, devido a fosforilação que desacopla o receptor de insulina ou as proteínas associadas a este, alterando a ação da insulina (GAUGLITZ *et al*, 2010).

Hormônios catabólicos como cortisol, glucagon, epinefrina, norepinefrina e dopamina aumentados no indivíduo com lesão térmica extensa, são contribuintes para o fraco controle glicêmico, tais hormônios estimulam a gliconeogênese, resistência à insulina, lipólise e cetogênese no fígado, assim a insulina induzida pelo estresse contribui para anormalidades metabólicas por meio da falha da supressão da gliconeogênese hepática, e utilização periférica de glicose celular periférica pelo músculo esquelético e tecido adiposo (BENGALA-COSTA *et al*, 2020).

As catecolaminas aumentam a gliconeogênese hepática e diminuem a

captação de glicose mediada pela insulina no músculo esquelético e tecido adiposo. Esse fenômeno leva ao aumento dos níveis de glicose e insulina no sangue, evento comumente chamado de resistência a insulina. A liberação desses mediadores se opõe a ação anabólica da insulina (GAUGLITZ *et al*, 2009).

As catecolaminas modificam a sinalização da insulina e translocação do transportador de glicose- 4 no tecido muscular levando a resistência periférica à insulina. As catecolaminas podem ainda estimular a p38 MARK causando a liberação de TNF, IL-6 e MPC-1, esse por sua vez, ativa o inibidor nuclear do fator nuclear-kB-quinase- β que leva a inibição da ação da insulina por meio de modificações durante a sinalização. Os níveis séricos de MPC-1 permanecem altos até 36 meses após a lesão térmica (GAUGLITZ *et al*, 2009).

Estudos recentes relacionam a resistência à insulina ao catabolismo proteico muscular, visto que a insulina exógena mostrou melhorar a perda de proteína muscular em pacientes com mais de 60% da superfície corporal queimada (HOLM *et al*, 2004). Em uma lesão térmica extensa a síntese e degradação de proteínas são elevadas, entretanto, a degradação excede a síntese, ocasionando perda de líquido e proteínas (ATIYEH, GUNN, DIBO, 2008). Estudos mostram que a administração de insulina para crianças que sofreram graves LTs atenua a resposta inflamatória e também diminui episódios infecciosos (ROUSSEAU *et al.*, 2013).

1.7 Fatores de regulação osteogênica: RUNX-2 e RANK-L

Conhecido como um regulador durante o desenvolvimento osteogênico, o RUNX-2 faz parte da família *runt-related transcription factor* (RUNX) composta por RUNX-1, RUNX-2 e RUNX-3 e são importantes no desenvolvimento do esqueleto. O fator RUNX-2 exerce função determinante no processo de remodelação óssea através da diferenciação e regulação dos osteoblastos (SUN *et al*, 2016).

A remodelação óssea é um processo contínuo, a qual se dá em decorrência da necessidade da manutenção da homeostase mineral desse tecido, a fim de manter a integridade morfológica e funcional. Esse processo é altamente controlado a partir da coordenação das células que compõem esse tecido e regulado por uma série de sinais celulares que têm como alvo membros da super

família do RANK, RANK-L e da OPG (MULCAHY *et al*, 2011).

Pereira *et al* (2011) explicam que o RANK-L é um ligante do receptor RANK e da OPG e está envolvido na diferenciação e função dos osteoclastos. Sua função principal é a inibição da apoptose dos osteoclastos e a estimulação da diferenciação e ativação dessas células. O RANK-L é uma proteína transmembranácea do tipo II que é expressa em osteoblastos, células do mesênquima, condrócitos hipertróficos e em células T ativas, podendo a sua expressão ser potencializada por fatores de reabsorção óssea como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucina 1 (IL1). O RANK é um importante regulador de precursores de osteoclastos. A OPG é uma proteína secretada pelos osteoblastos que pode ligar-se a RANKL, levando ao bloqueio da ligação de RANKL e RANK e a inibição da osteoclastogênese (SUN *et al*, 2016).

Baseado nas descrições acima, o estudo das proteínas de regulação osteogênica, RUNX-2 e RANK-L, pode auxiliar no esclarecimento dos mecanismos relacionados às alterações ósseas e cartilagueas decorrentes das lesões térmicas bem como compreender se a insulina interfere nesse processo.

2.0. OBJETIVO E METAS

Avaliar os efeitos do tratamento com insulina em curto e longo prazo após lesão térmica, na morfologia do tecido ósseo e cartilagueo do fêmur de ratos Wistar jovens. Especificamente pretende-se ainda avaliar parâmetros morfométricos da cartilagem articular, o arranjo de fibras colágenas tipo I e III dessa cartilagem e, finalmente, investigar os fatores de regulação osteogênica (RUNX-2 e RANK-L) do fêmur.

3.0. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

A seguir, serão descritos os métodos já estabelecidos de padronização da lesão térmica por escaldadura (LTE) e das análises experimentais no tecido ósseo e cartilagueo do fêmur. Cabe salientar que, baseado no “Princípio dos 3Rs”, os espécimes a serem investigados são compartilhados dos mesmos animais de estudos anteriores.

3.1 Formação dos grupos experimentais

Os grupos experimentais a serem descritos tiveram a metodologia aprovada pelo CEUA-UNIFESP (4343120319), Anexo 1.. Após a aprovação da CEUA, foram utilizados 40 espécimes de fêmeas coletados dos *Rattus Norvegicus* da linhagem *Wistar*, machos, com 21 dias de vida extrauterina e massa corporal entre 50 e 70g. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Biociências da UNIFESP Baixada Santista, com temperatura controlada a 22°C e ciclo claro-escuro a cada 12 horas, com água e ração *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos: Controle (C) e submetidos à Lesão Térmica por Escaldadura (LTE), ambos associados ou não ao tratamento diário de insulina (C+I e LTE+I). Cada um destes grupos ainda foi subdividido em dois (n=05 cada) com diferentes períodos de eutanásia, 4 e 14 dias.

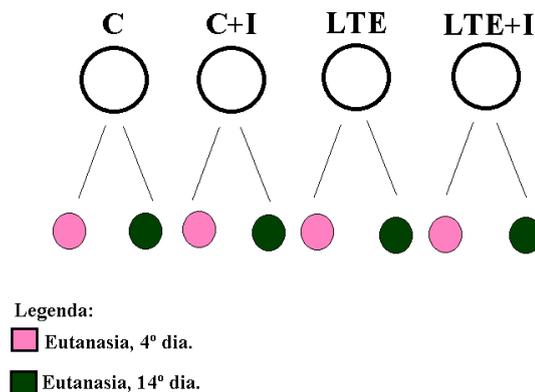


Figura 3: Distribuição dos quatro grupos experimentais. Grupo C (controle), C+I (controle submetido ao tratamento diário de insulina), LTE (submetidos à lesão térmica por escaldadura), LTE+ I (submetidos a lesão térmica escaldadura e tratamento diário de insulina). Os grupos foram ainda distribuídos em animais que sofreram eutanásia ao 4º ou 14º dia pós lesão.

Os animais tratados com insulina diária receberam suplementação com 5% de sacarose diluída na água *ad libitum* para manutenção da euglicemia, conforme protocolo utilizado por: Solomon *et al.* (2000), Solomon *et al.* (2002), Banta *et al.* (2004), Madihally *et al.* (2006), Emanuele *et al.* (2007), Xu *et al.* (2013).

3.2 Procedimento de realização da lesão térmica por escaldadura

Apenas os animais do grupo LTE foram submetidos à escaldadura. Previamente à LTE os animais passaram por anestesia com Ketamina (50 mg/ml) Xilasina (10 mg/ml), via intraperitoneal (IP). Para evitar interferência do anestésico entre os grupos, tanto animais C quanto LTE foram anestesiados, conforme preconizado por Ibebunjo e Martyn (2000).

Em seguida ocorreu a tricotomia da região dorsal e ventral de todos dos animais e após esse procedimento, a pele exposta dos ratos do grupo LTE foi imersa em água a 87° C por um período de tempo pré-fixado: 10 segundos para o dorso e 3 segundos para a região ventral. A padronização do tempo de imersão na água foi o preconizado por Newman *et al.* (1982).

A área corporal submetida à LTE foi de 30% no dorso e 15% no tórax do animal. Esta extensão baseou-se na padronização feita através do cálculo da massa corporal dos animais (30% da área corporal equivale a $10 \cdot W^{2/3}$, onde W = massa corporal), preconizada por Walker e Mason (1968). A LTE foi realizada com o auxílio de um dispositivo confeccionado para este fim, conforme o adaptado de Walker e Mason (1968) e ainda utilizado em outros trabalhos do grupo de pesquisa: Quintana *et al.*, (2014); Da Silva *et al.* (2015); Quintana *et al.*, (2015); Bortolin *et al.* (2016).

Imediatamente após a lesão térmica ou simulação da mesma, com água a temperatura ambiente, os animais de todos os grupos passaram por analgesia com o opiáceo Buprenorfina 0,2 mg/kg IP, a qual foi repetida 24 horas depois quando o animal ainda está anestesiado, para evitar o estresse da manipulação e ainda garantir que ao acordar, o animal estivesse sob o efeito do analgésico.

Além dessas duas aplicações, o analgésico também foi aplicado, sempre que necessário, quando os animais apresentavam sinais de dor (CALOEIRO *et al.*, 2008; SOTOCINAL *et al.*, 2011). A partir de então, os animais continuaram sendo mantidos em gaiolas individuais para a avaliação metabólica da massa corporal, ingestão alimentar e hídrica. Tais parâmetros foram avaliados durante todos os dias ao longo do tempo de experimento.

3.3 Tratamento com insulina e análise do nível de glicose sanguínea

Conforme protocolo estabelecido por Klein *et al.* (2004), imediatamente após a LT ou simulação da mesma, os animais dos grupos C+I e LTE+I receberam administração subcutânea (5 UI/Kg/dia) de insulina glargina (ação lenta) Lantus® (Sanofi, Brasil), sendo liberada no decorrer de um período de 24 horas. A administração de insulina ou soro fisiológico continuou diariamente sempre no mesmo horário ao longo do 3° e 13° dias pós lesão.

Foi necessário que houvesse um grupo controle que recebeu tratamento com insulina (C+I) para a obtenção de parâmetros relacionados aos efeitos da insulina em animais não submetidos à LTE. A utilização desse tipo de grupo experimental também foi utilizada por outros autores: Banta *et al.*, 2004; Madihally *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2013.

No penúltimo dia experimental (3° e 13° dia de acordo com cada grupo de tratamento), transcorrida 1 hora e 8 horas após a administração de insulina, de acordo com o grupo, foi realizada dosagem do nível de glicemia por meio de punção de sangue da cauda dos animais de todos os grupos (C, LTE, C+I e LTE+I) e verificado pelo Medidor de glicose Accu-Chek® Active (Roche, Brasil) pelo processo de tiras teste para glicose sanguínea.

3.4 Teste de tolerância à glicose e resistência à insulina

O teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado com os animais no 4° ou no 14° dia, durante duas horas antes da eutanásia. Foram respeitadas 24 horas da última administração de insulina antes dos animais passarem por 8 horas de jejum, após esse período foi coletado a glicemia do tempo 0, para em seguida ser administrada uma dose de glicose de 2g/Kg de peso corporal a uma concentração de 40% (4g/10ml), via intraperitoneal. Após 30, 60, 90 e 120 minutos foram coletadas amostras de sangue obtidas a partir do corte da ponta da cauda de cada animal, para determinação da concentração de glicose por meio de glicosímetro, e foi calculada a média da área abaixo da curva dos valores glicêmicos de cada grupo (BOWE *et al.*, 2014).

E o nível de insulina no soro sanguíneo, no tempo zero após o jejum, foi visto

por meio do Teste de Elisa. Imediatamente após a coleta do sangue da ponta da cauda dos animais, o plasma foi separado por meio de centrifuga e para determinação de insulinemia foi utilizado o kit Elisa Enzyme-linked Immunosorbet Assay (Merck, EZRMI-13K, EUA) e analisado no *software* SoftMax Pro 5.4.1 no espectrofotômetro SpectraMax M5.

Os resultados de sensibilidade à insulina foram calculados utilizando o índice de Homa (HomaIR). Para tal foram utilizados os valores da glicemia de jejum (GJ) (mg/dl) e insulina (I) (μ UI/ml) onde o índice HomaIR foi representado pelo produto da GJ e I dividido por uma constante, conforme a seguinte fórmula: $HomaIR = (GJ \times I) / 2,430$ (CACHO *et al.*, 2008).

Devido as análises sorológicas variarem amplamente na literatura, o grupo C fornece valores de referência (PIDCOKE *et al.*, 2014) para o nível de glicemia, insulinemia, tolerância a glicose e a sensibilidade à insulina.

3.5 Eutanásia e obtenção dos tecidos a serem processados

Decorridos 4 ou 14 dias da lesão, os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico Ketamina (150 mg/ml) e Xilasina (30 mg/ml) via IP. Foram verificados indicativos da confirmação da morte caracterizados pela perda dos reflexos, ausência de movimentos respiratórios e de batimentos cardíacos. A este procedimento, em cada um dos dias padronizados, ocorreu a dissecação dos dois membros pélvicos e a retirada dos tecidos a serem investigados, dentre eles o fêmur.

O fêmur cuidadosamente obtido foi dividido em três terços e fixado em formaldeído tamponado, sendo que o terço a ser utilizado no presente estudo será o proximal. Nesse espécime serão estudadas a cartilagem articular, a substância óssea e a lâmina epifisial.

3.6 Procedimentos para Análise Histopatológica e Análise das fibras colágenas tipo I e tipo III da cartilagem articular

O fêmur fixado em formaldeído tamponado foi lavado por 12 horas em água

corrente e em seguida descalcificado (MORSE, 1945) em EDTA (ácido etineldiaminotetraédico-acético) durante 3 meses com troca de solução a cada 2 dias. Após a descalcificação completa o tecido foi lavado 3 vezes a cada 30 min com água corrente e em seguida armazenado no álcool 70%. Os espécimes foram então desidratados em etanol (70-100%), diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast® para finalmente serem obtidos cortes longitudinais de 3µm em micrótomo Leica®, os quais foram dispostos em lâminas histológicas.

Os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina-Eosina e analisados em microscópio de luz para análise histopatológica da epífise proximal, da cartilagem articular, do trocânter femoral, da lâmina epifisial e da substância óssea adjacente. Para a análise do tecido conjuntivo associada à identificação dos tipos das fibras colágenas, foi utilizado o método de Picro-Sírius (JUNQUEIRA *et al.*, 1979).

As fotomicrografias com o método Picro-Sírius foram realizadas com e sem luz polarizada para a evidenciação do colágeno do tipo I e III. As imagens foram obtidas por microscopia de luz com uma câmera acoplada ao microscópio¹.

3.7 Procedimentos para as Análises Morfométricas da lâmina epifisial e da cartilagem articular

As lâminas histológicas coradas com Hematoxilina-Eosina foram submetidas às análises morfométricas da Lâmina Epifisial e suas camadas, bem como da Cartilagem Articular da cabeça do fêmur e as medidas da espessura de cada camada que a compõe (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

Para a investigação da lâmina epifisial da epífise proximal do fêmur foi realizada a análise através de um sistema de imagem computadorizado Axio Visio (Zeiss®), em que foram escolhidos 3 dos cortes corados com Hematoxilina-Eosina de cada animal estudados e fotografados 3 campos de cada um dos cortes com objetiva de 40x. Foram realizadas medidas da espessura (em µm) das zonas celulares (De Oliveira *et al.* 2013) que compõem a lâmina epifisial, a saber: zona de

¹ Axioscope 40, AxioCam HRc, Zeiss, Alemanha

repouso, zona de proliferação e zona hipertrófica+zona calcificada (**Figura 4**).

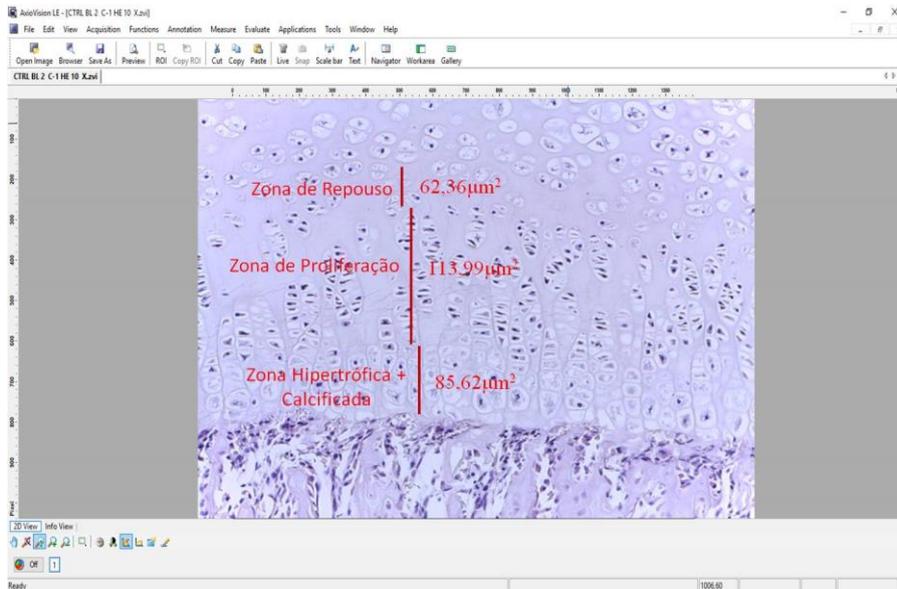


Figura 4. Lâmina epifisial da cabeça do fêmur de rato do grupo Controle com 4 dias. Destaca-se na imagem realizada no programa Axio Visio (Zeiss®) a metodologia empregada para a medida da zona de repouso= 62,36μm, da zona de proliferação= 113,99μm e das zonas hipertrófica+calcificada= 85,62μm. Coloração: Hematoxilina-Eosina.

Já para a investigação da cartilagem articular, através desse mesmo sistema de imagem computadorizada, foram realizadas cinco medidas lineares (em μm) da espessura das camadas (De Oliveira *et al.* 2010) que compõem cartilagem articular da cabeça do fêmur. As camadas da cartilagem articular investigadas foram as camadas superficial e média+ profunda (**Figura 5**).

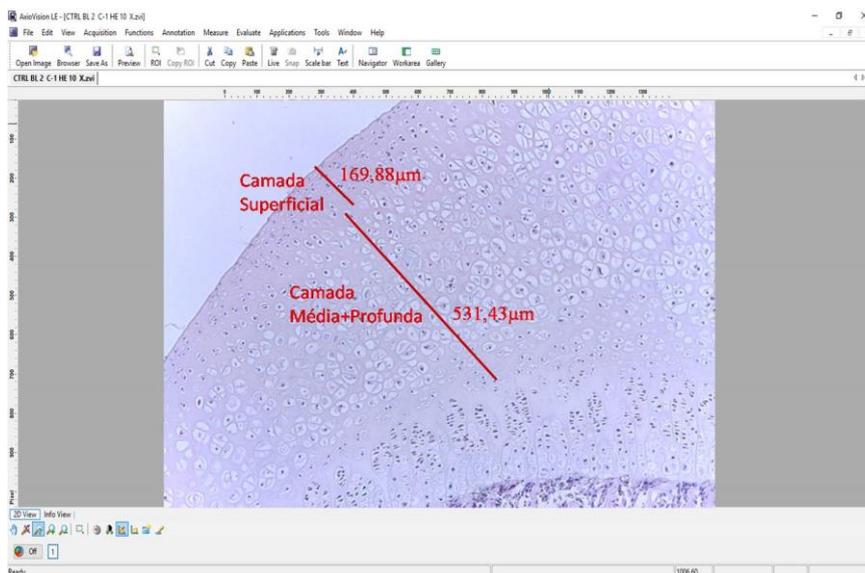


Figura 5. Cartilagem articular da cabeça do fêmur de rato do grupo Controle com 4 dias. Destaca-se na imagem realizada no programa Axio Visio (Zeiss®) a metodologia empregada para a medida da

camada superficial=169,88 μ m e da camada média+ profunda= 531,43 μ m. Coloração: Hematoxilina-Eosina.

3.8 Densidade Celular e Área dos Condrócitos da Cartilagem Articular

Na camada média da cartilagem articular, foi determinada a densidade celular (número de células por mm²), através da escolha de dois dos cortes histológicos do fêmur de cada animal, corados com Hematoxilina-Eosina. Foram fotografados três campos de cada corte com objetiva de 40x, totalizando seis cortes por animal. Foi utilizado um sistema-teste de área conhecida, sendo que dois lados deste quadrado apresentavam linhas contínuas, consideradas “linhas proibidas”, e os outros dois lados apresentavam linhas pontilhadas, consideradas linhas permitidas (De Oliveira *et al.* 2010). As células contidas no interior desse quadrado foram quantificadas, sendo que as células que tangenciarem a “linha proibida” foram desconsideradas e as que tangenciarem a linha pontilhada, foram contadas (Figura 6).

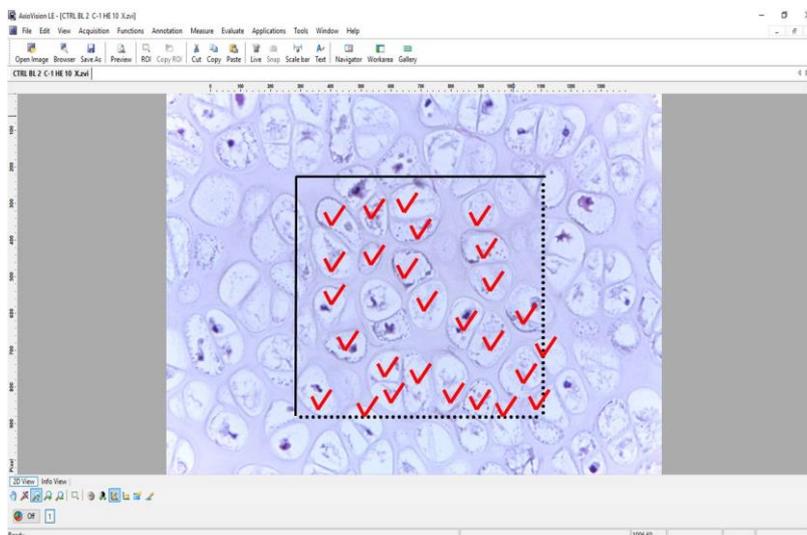


Figura 6. Camada Média da cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratos controle de 4 dias. Destaca-se na imagem obtida pelo programa Axio Visio (Zeiss®) a metodologia a ser empregada para contagem da densidade de condrócitos. As células marcadas são contabilizados por estarem fazendo parte do quadrante de 100 μ m x 100 μ m. No referido quadrante as linhas cheias representam as “linhas proibidas” e as pontilhadas as “linhas permitidas”.

Nessas mesmas imagens foram mensuradas as áreas do perfil celular, em μ m², dos condrócitos que estiveram dentro da área conhecida do sistema-teste (Figura 7).

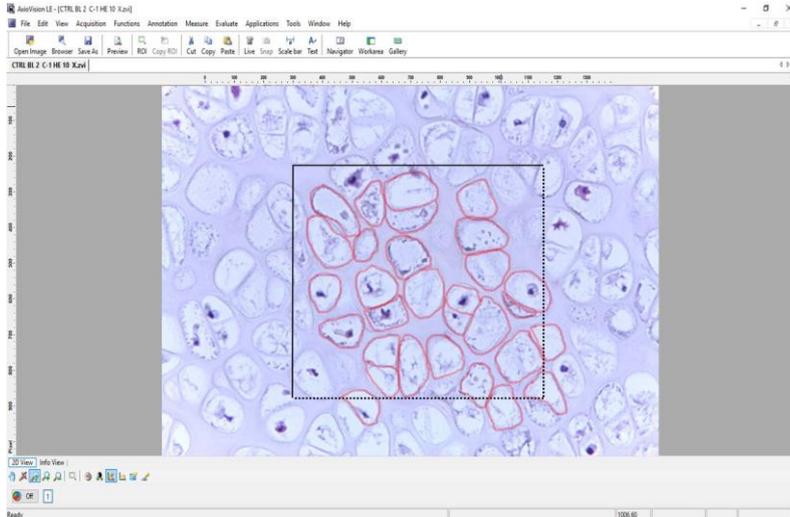


Figura 7. Camada Média da cartilagem articular da cabeça do fêmur de ratos controle de 4 dias. Destaca-se na imagem obtida pelo programa Axio Visio (Zeiss®) a metodologia a ser empregada para a determinação da área dos condrócitos. As células marcadas são medidas por estarem fazendo parte do quadrante de 100 μm x 100 μm . No referido quadrante as linhas cheias representam as “linhas proibidas” e as pontilhadas as “linhas permitidas”.

3.9 Imunohistoquímica dos fatores de regulação osteogênica RUNX-2 e RANKL.

As regiões de cartilagem e as regiões ósseas foram avaliadas quanto as proteínas de regulação osteogênica.

Para isso foi realizado primeiramente a recuperação antigênica com Tampão Citrato (pH6.0). Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 0,3%, o bloqueio de proteínas com leite desnatado 0,3% diluído em PBS e incubação com o anticorpo primário (Tabela 1) em PBS-BSA 0,1% *overnight*.

Tabela 1. Anticorpos utilizados no estudo e respectivas características.

Anticorpo Primário	Titulação	Estrutura investigada
RUNX-2 (C-19), Santa Cruz Biotechnology-8566	1/100	Diferenciação de osteoblastos
RANKL (N-19), Santa Cruz Biotechnology-7628	1/100	Diferenciação de osteoclastos

Após a lavagem foi realizada a incubação com o anticorpo secundário biotilado² e em seguida a incubação com streptoavidina peroxidase³. A revelação foi feita com cromógeno DAB e a coloração com hematoxilina de Harris.

3.10 Procedimento para Análise Estatística dos Dados

A massa corporal bem como todos os dados morfométricos foram apresentados na forma de tabelas e gráficos ilustrando a média e o desvio padrão dos dados dos grupos. Foi utilizado o teste ANOVA com dois fatores: lesão e tratamento com insulina. O nível de significância aceito será de $p \leq 0,05$.

4.0. RESULTADOS

4.1 Análise da Lâmina Epifisial

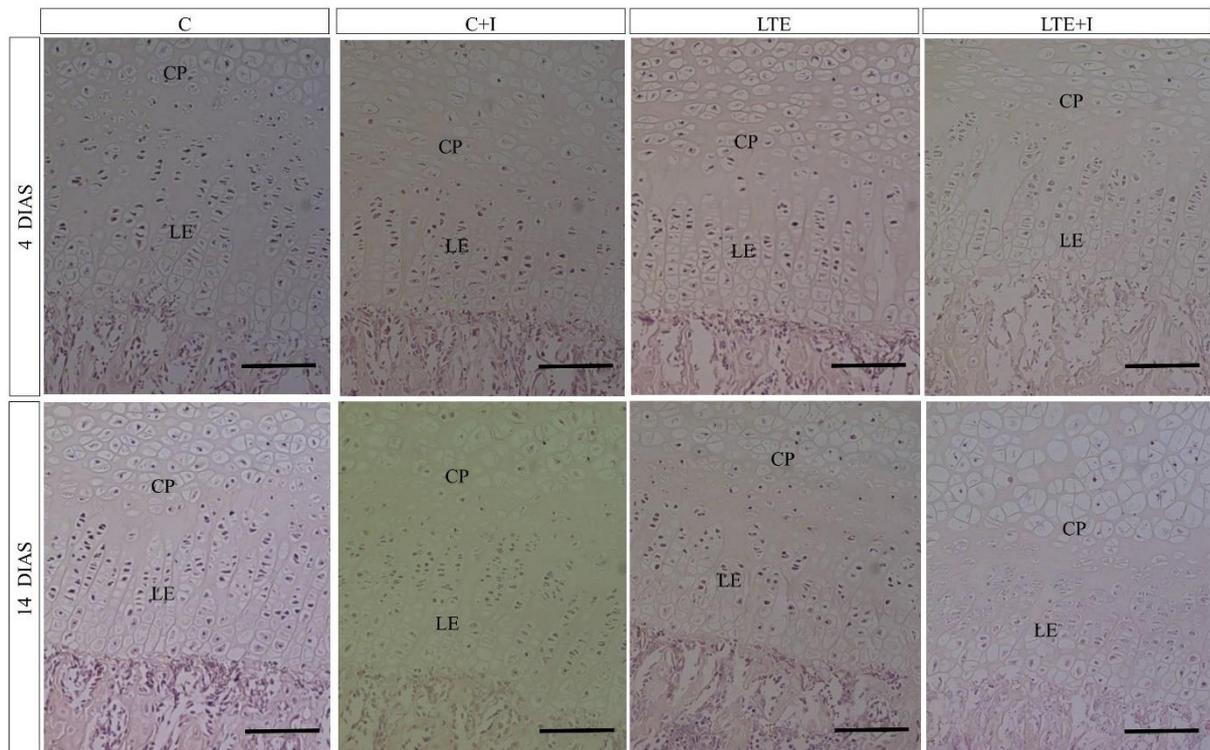


Figura 8: Lâmina epifisial (LE) e Camada profunda (CP) da cartilagem articular do fêmur de ratos dos

² Kit LSAB Dako

³ Kit LSAB

grupos C, C+I, LTE e LTE+I com 4 ou 14 dias após a lesão. As imagens revelam a presença de todas as camadas da LE nos grupos investigados. Nos grupos LTE e LTE+I após 14 dias da lesão, há a diminuição da celularidade da camada proliferativa. Barra=200µm.

A lâmina epifisial, bem como suas camadas, foi observada em todos os grupos experimentais (**Figura 8**). Observou-se a diminuição da celularidade da camada proliferativa nos grupos LTE e LTE+I após 14 dias de lesão. Tal dado será a seguir comprovado pelos gráficos da **Figura 9**.

Os resultados da lâmina epifisial referentes à análise da sua espessura total, bem como a análise individual de cada zona celular que a compõe (Zona de Repouso, Proliferativa e Hipertrófica+Calcificada), estão apresentados a seguir. Quanto à espessura total da lâmina epifisial, verificou-se que os grupos avaliados após 4 dias de lesão ou simulação da mesma, não apresentaram diferença estatística significativa. Diferentemente do observado nos animais 14 dias, no qual os grupos Lesão Térmica por Escaldadura (LTE e LTE+I), independente do tratamento, apresentaram menor valor de espessura total quando comparado aos grupos Controle (C e C+I), com $p < 0,05$, **Figura 9.A**.

Já a análise da zona de repouso da lâmina epifisial não evidenciou diferença estatística significativa entre os grupos, em ambos os períodos de tratamento (4 e 14 dias), **Figura 9.B**.

Os resultados da zona proliferativa da lâmina epifisial dos grupos de 4 dias, não revelou diferença estatística significativa. No entanto, ao analisar os grupos 14 dias, observou-se que os grupos que passaram pela lesão térmica (LTE e LTE+I), independente do tratamento, apresentaram menor espessura de zona proliferativa quando comparado aos grupos Controle (C e C+I), com $p < 0,05$, **Figura 9.C**.

Diferentemente do observado nas outras zonas da lâmina epifisial, os resultados da zona Hipertrófica+Calcificada nos animais 4 dias revelaram que os grupos LTE (LTE e LTE+I) possuem menor espessura quando comparado ao grupo Controle (C e C+I), $p < 0,05$. Além disso, observou-se que o tratamento com insulina influenciou a zona Hipertrófica+Calcificada, diminuindo sua espessura tanto nos animais Controle (C+I<C), quanto nos animais LTE (LTE+I<LTE), com $p < 0,05$, **Figura 9.D**.

Para os animais com 14 dias, observou-se que os grupos LTE (LTE e LTE+I), independente do tratamento com insulina, apresentaram menor espessura de zona Hipertrófica+Calcificada quando comparado com o grupo Controle (C e C+I), com $p < 0,05$, **Figura 9.D**.

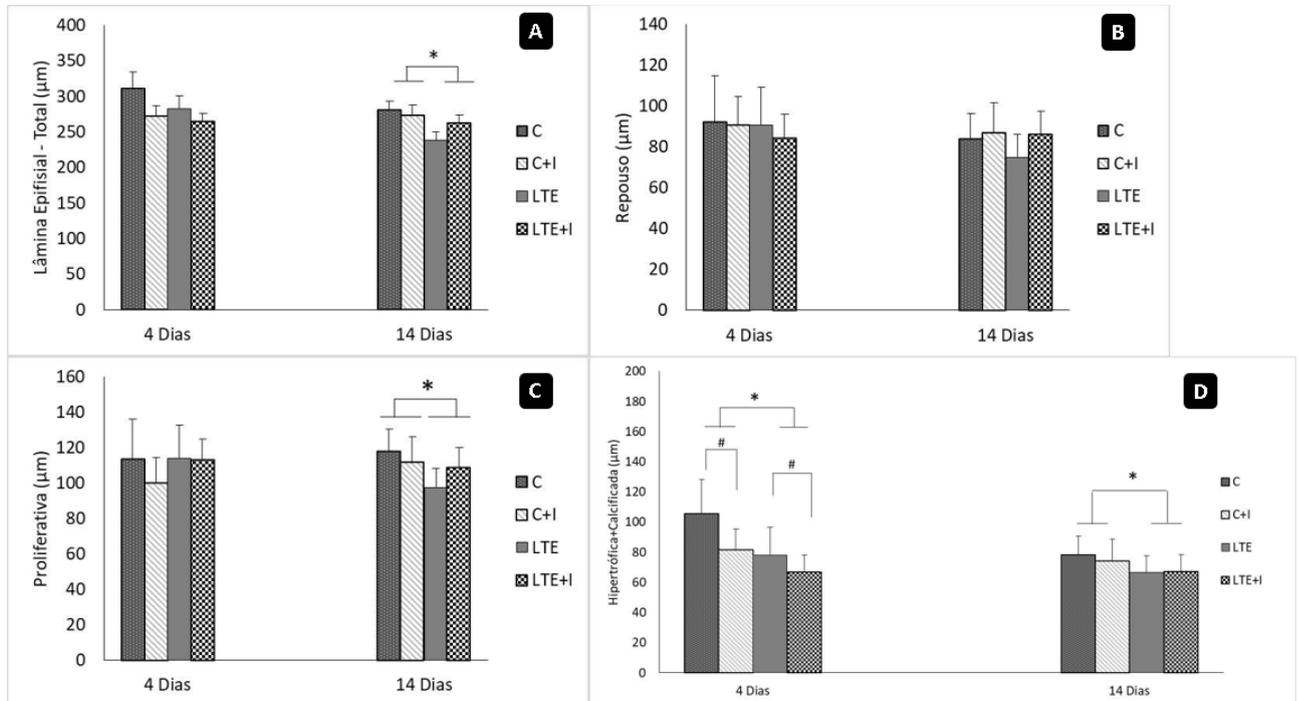


Figura 9: Lâmina epifisial total (A), Zona de Repouso (B), Zona Proliferativa (C) e Zona Hipertrófica+Calcificada (D) dos grupos Controle (C), Controle + Insulina (C+I), Lesão Térmica por Escaldadura (LTE) e Lesão Térmica por Escaldadura + Insulina (LTE+I). Em (A), os grupos LTE e LTE+I, independente do tratamento, apresentaram menor valor de espessura total da lâmina epifisial do que C e C+I, $*p < 0,05$. Na Zona de Repouso (B) não houve diferença entre os grupos. Na Zona proliferativa (C) os grupos LTE e LTE+I, independente do tratamento, apresentaram menor valor de espessura da zona proliferativa do que C e C+I, $*p < 0,05$. Já na Zona Hipertrófica+Calcificada (D) tanto aos 4 quanto aos 14 dias após a lesão, os grupos LTE e LTE+I, independente do tratamento, apresentaram menor valor de espessura das zonas hipertrófica+calcificada do que C e C+I, $*p < 0,05$. Ainda aos 4 dias, o tratamento com insulina diminuiu a espessura das zonas Hipertrófica+Calcificada tanto nos animais Controle (C+I < C), como nos animais LTE (LTE+I < LTE), $\#p < 0,05$.

4.2 Análise da cartilagem articular

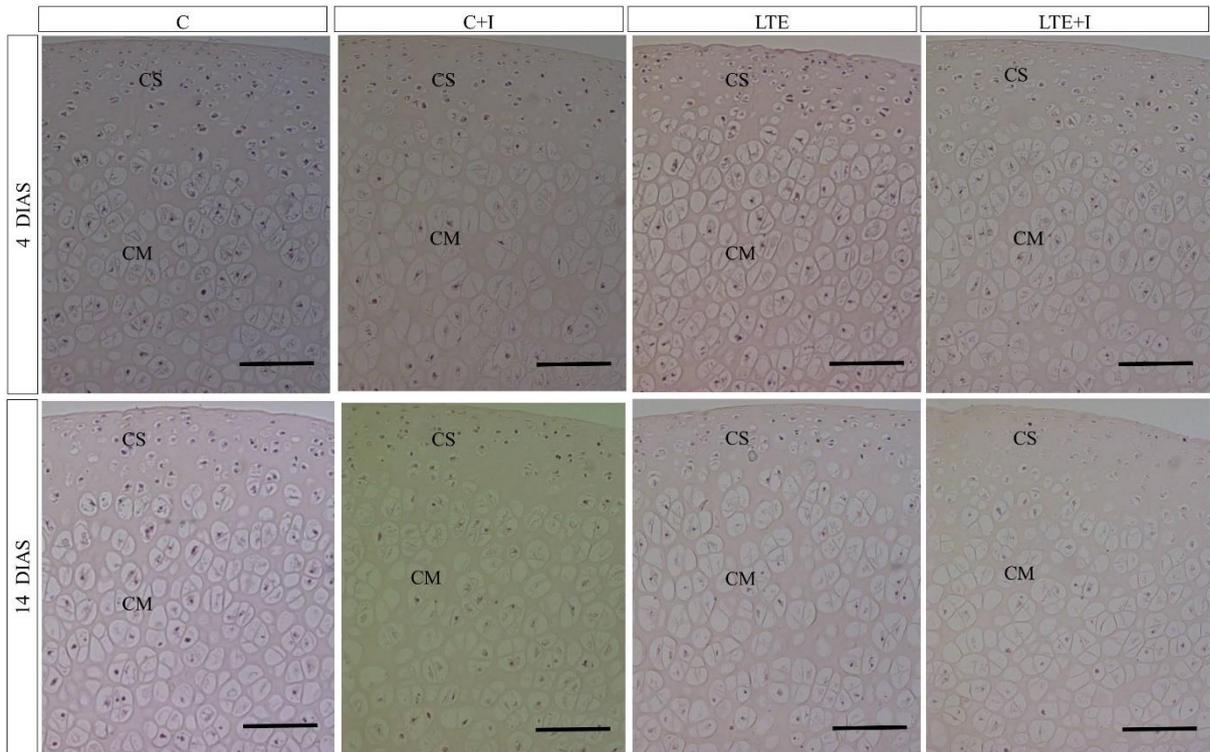


Figura 10: Camada superficial (CS) e Camada média (CM) da cartilagem articular do fêmur de ratos dos grupos C, C+I, LTE e LTE+I com 4 ou 14 dias após a lesão. As imagens revelam as referidas camadas em todos os grupos experimentais. Barra=200 μ m.

As imagens relacionadas à avaliação da cartilagem articular (**Figura 10**) foram observadas em todos os grupos experimentais, sendo que alterações no tamanho das camadas ou dos condrócitos somente foram evidenciadas através das análises morfométricas, como apresentado a seguir.

Os resultados da cartilagem articular referem-se à análise da sua espessura total, bem como a análise individual das camadas que a compõem (Camada Superficial e Camada Média+Profunda). A análise da espessura total da cartilagem articular dos animais 4 dias demonstrou que os animais LTE (LTE e LTE+I) apresentaram diferença comparado aos grupos Controle (C e C+I), com $p < 0,05$. Além disso, pode-se observar que os animais que receberam insulina, apresentaram menores espessuras de cartilagem articular quando comparado aos seus respectivos animais controles ($C+I < C$; $LTE+I < LTE$), com $p < 0,05$. Observou-se também que o grupo LTE+I teve maior espessura de cartilagem articular do que o grupo C+I, ($p < 0,05$), **Figura 11.A**.

Quanto aos animais avaliados 14 dias após a lesão, notou-se resultados bastante semelhantes aos encontrados nos animais 4 dias. O grupo LTE (LTE e LTE+I) também apresentou diferença na espessura da cartilagem articular quando comparado grupo Controle (C e C+I), com $p < 0,05$. Da mesma forma como os animais que receberam tratamento com insulina apresentaram menores valores quando comparado aos seus respectivos controles ($C+I < C$; $LTE+I < LTE$), $p < 0,05$. E por fim, o grupo LTE+I apresentou maior espessura de cartilagem articular que o grupo C+I, com $p < 0,05$, **Figura 11. A**.

Já a análise individual das camadas da cartilagem articular permitiu-nos observar que os animais após 4 dias de lesão térmica (LTE e LTE+I) apresentaram menor espessura de camada superficial da cartilagem articular em relação ao grupo Controle (C e C+I), independente do tratamento com insulina, ($p < 0,05$). Já os animais após 14 dias de lesão, apresentaram diferença estatística significativa apenas entre os grupos LTE e C, sendo a camada superficial da cartilagem articular do grupo LTE menor que a do grupo C, $p < 0,05$, **Figura 11.B**.

Em relação à análise da camada Média+Profunda da cartilagem articular nos animais após 4 dias de lesão, pôde-se observar que os animais LTE (LTE e LTE+I) apresentaram espessura da camada diferente dos animais Controle (C e C+I) ($p < 0,05$). Também se observou que o tratamento com insulina diminuiu a espessura da camada Média+Profunda da cartilagem articular tanto no grupo LTE ($LTE+I < LTE$) como no grupo Controle ($C+I < C$), com $p < 0,05$. Somado a isso, demonstrou-se diferença estatística significativa entre os grupos LTE+I e C+I, sendo que o grupo LTE+I apresentou maiores valores comparado ao grupo C+I ($p < 0,05$), evidenciando que mesmo com o tratamento com insulina, a lesão térmica influenciou as camadas Média+Profunda da cartilagem articular (**Figura 11.C**).

Nos animais avaliados após 14 dias de lesão, também os animais LTE (LTE e LTE+I) apresentaram espessura da camada diferente dos animais Controle (C e C+I) ($p<0,05$). O tratamento com insulina diminuiu a espessura da camada Média+Profunda da cartilagem articular tanto dos animais LTE (LTE+I<LTE) quanto nos animais Controle (C+I<C), $p<0,05$. Além disso, os resultados também mostraram diferença estatística significativa entre os grupos LTE e C, no qual LTE foi menor que C ($p<0,05$), **Figura 11.C**.

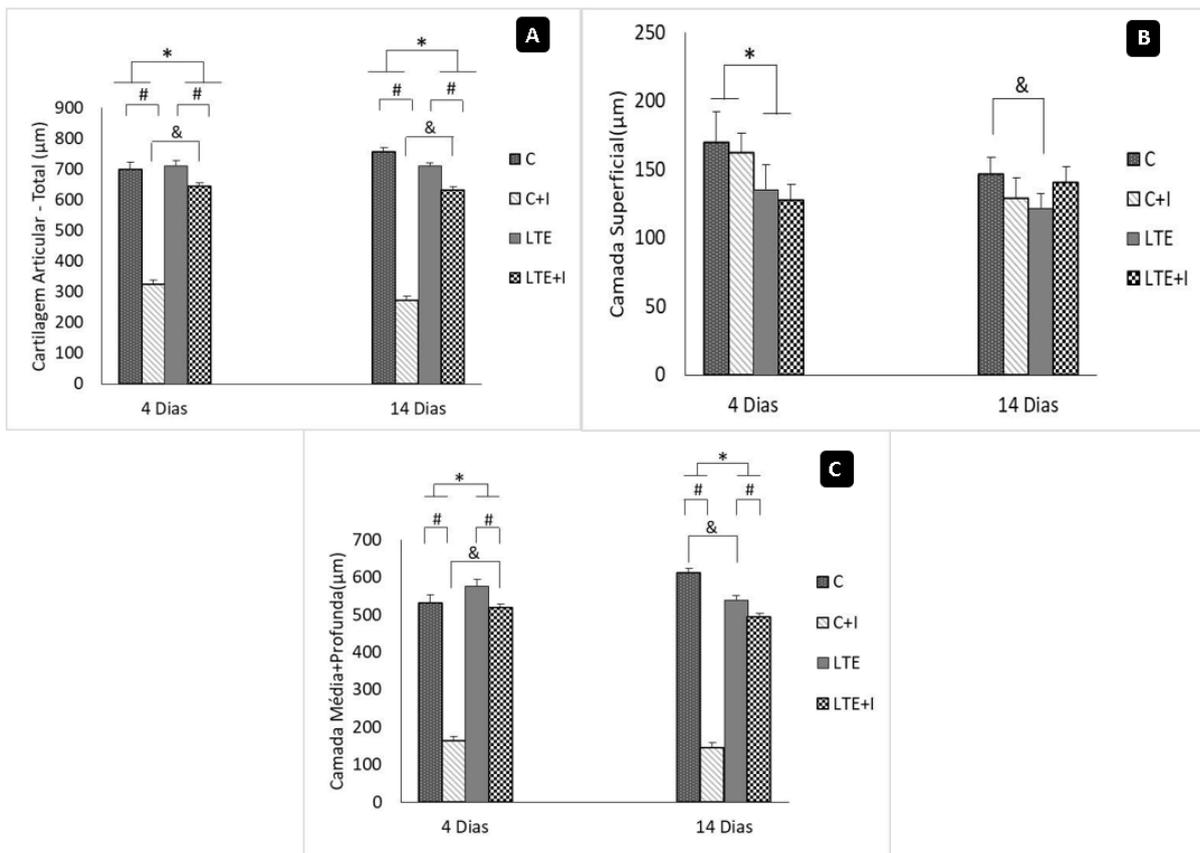


Figura 11- Cartilagem articular total (**A**), camada superficial da cartilagem articular (**B**) e camada Média+Profunda da cartilagem articular (**C**), dos grupos Controle (C), Controle + Insulina (C+I), Lesão Térmica por Escaldadura (LTE) e Lesão Térmica por Escaldadura + Insulina (LTE+I), em 4 e 14 dias. Em (**A**), Tanto aos 4 quanto aos 14 dias após a lesão os grupos LTE e LTE+I, independente do tratamento, apresentaram diferença na espessura da cartilagem articular do que C e C+I, $*=p<0,05$. Também aos 4 e 14 dias após a lesão os animais que receberam insulina, apresentaram menores espessuras de cartilagem articular quando comparado aos seus respectivos animais controles (C+I<C; LTE+I<LTE), com $\# = p<0,05$ e o grupo LTE+I teve maior espessura de cartilagem articular do que o grupo C+I ($\& = p<0,05$). Em (**B**), aos 4 dias após a lesão, os grupos LTE e LTE+I, independente do tratamento, apresentaram menor valor de espessura da cartilagem articular do que C e C+I, $*=p<0,05$. Já aos 14 dias após a lesão o grupo LTE apresentou menor camada superficial da cartilagem articular do que o grupo C, $\& = p<0,05$. Finalmente em (**C**), aos 4 dias após a lesão os grupos LTE e LTE+I apresentaram maior valor de espessura das camadas Média+Profunda da cartilagem articular do que C e C+I, e aos 14 dias, os grupos LTE e LTE+I apresentaram menor valor de espessura do que C e C+I, $*=p<0,05$. Tanto aos 4 quanto aos 14 dias, o tratamento com insulina

diminuiu a espessura da camada Média+Profunda da cartilagem articular tanto no grupo LTE (LTE+I<LTE) como no grupo Controle (C+I<C), $\# = p < 0,05$. Ainda aos 4 dias, o grupo LTE+I apresentou maiores valores comparado ao grupo C+I e, aos 14 dias, LTE foi menor que C, $\& = p < 0,05$.

4.3 Análise da densidade celular e área dos condrócitos da cartilagem articular

A análise da densidade de condrócitos da cartilagem articular refere-se ao número de condrócitos por mm^2 . Os resultados da densidade celular não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos analisados (C, C+I, LTE, LTE+I), em ambos os períodos experimentais (4 e 14 dias) (**Figura 12**).

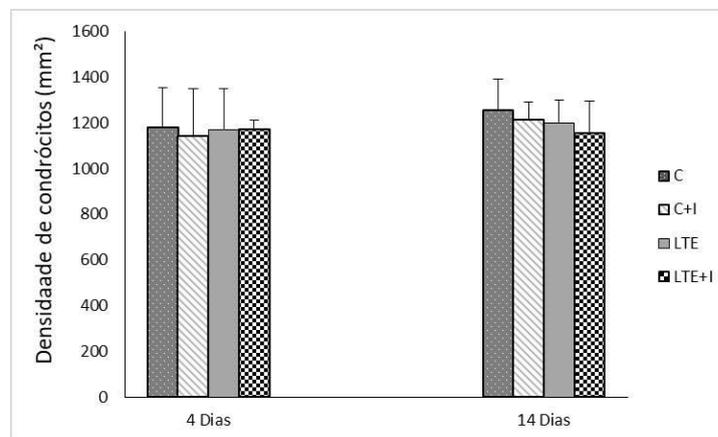


Figura 12: Análise da densidade de condrócitos da cartilagem articular, grupos Controle (C), Controle + Insulina (C+I), Lesão Térmica por Escaldadura (LTE), Lesão Térmica por Escaldadura + Insulina (LTE+I). Dados expressos em média + desvio padrão.

Já a análise da área dos condrócitos da cartilagem articular dos animais 4 dias, evidenciou que o grupo Lesão Térmica por Escaldadura submetido ao tratamento de insulina (LTE+I) possui condrócitos com menor área de perfil quando comparado com o grupo Controle submetido ao tratamento de insulina (C+I), ($p = 0,027$). Quanto aos resultados dos animais 14 dias, os grupos experimentais analisados não apresentaram diferença estatística significativa (C, C+I, LTE, LTE+I) (**Figura 13**).

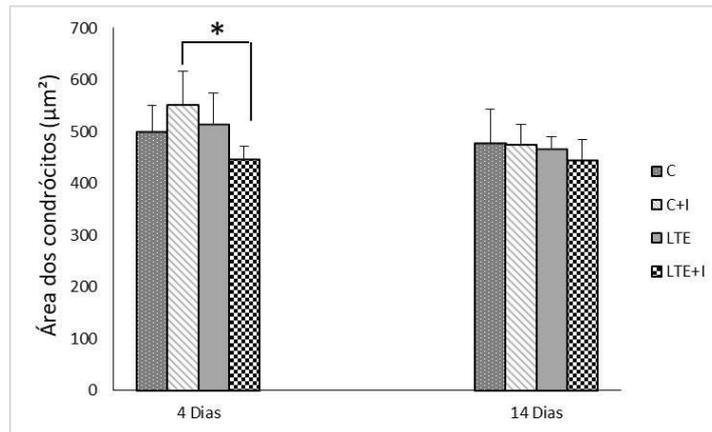


Figura 13: Análise da área dos condrócitos da cartilagem articular, grupos Controle (C), Controle + Insulina (C+I), Lesão Térmica por Escaldadura (LTE), Lesão Térmica por Escaldadura + Insulina (LTE+I). Dados expressos em média + desvio padrão. (*)indica diferença entre o grupo Controle + Insulina com o grupo Lesão Térmica por Escaldadura + Insulina ($p < 0,05$).

4.4 Análise das fibras colágenas tipo I e III da cartilagem articular e lâmina epifisial

A análise das fibras colágenas da cartilagem articular e da lâmina epifisial foi realizada por meio da coloração Picro-Sírius analisada sob luz polarizada, na qual se evidenciam as fibras colágenas tipo I em vermelho e as fibras colágenas tipo III em verde. Quanto aos resultados, pode-se observar que, em ambos os períodos experimentais (4 e 14 dias), todos os grupos analisados (C, C+I, LTE e LTE+I) apresentaram as redes de colágeno da cartilagem articular e da lâmina epifisial organizadas em malha pantográfica. Notou-se também, que os animais do grupo LTE apresentaram menor intensidade na coloração do colágeno e comprometimento na organização da malha. Porém, após administração de insulina por 14 dias, o grupo LTE+I apresentou as fibras colágenas com uma organização muito semelhante ao grupo Controle, evidenciando que o tratamento em longo prazo é capaz de reverter as alterações nas fibras de colágeno, provocadas pela lesão térmica (**Figura 14**).

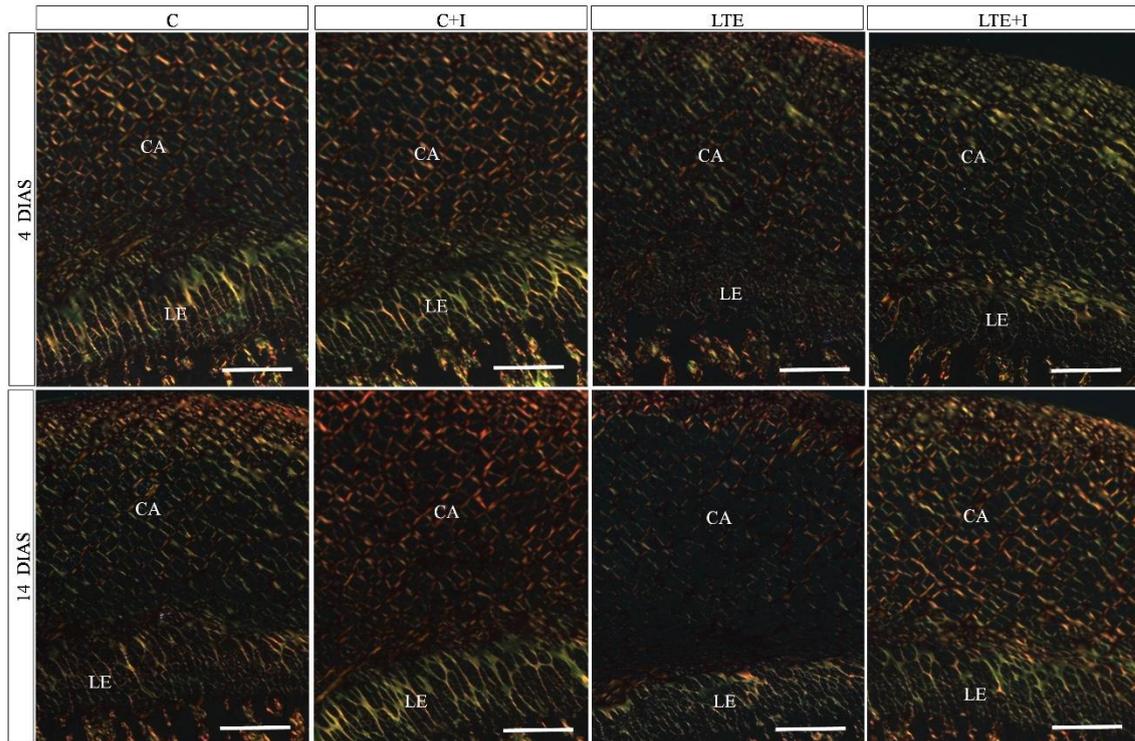


Figura 14: Cartilagem articular (CA) e lâmina epifisial (LE) do fêmur de ratos dos grupos C, C+I, LTE e LTE+I com 4 ou 14 dias após a lesão. As imagens revelam a organização da rede de colágeno tipo I (vermelho e laranja) e tipo III (verde) em forma de malha. Ressalta-se a diferença na organização dessa malha tanto da CA quanto da LE nos animais LTE após 4 e 14 dias. Após 14 dias de administração de insulina, o grupo LTE+I passa a ter a constituição da malha de colágeno muito próxima do seu respectivo controle. Picro sírius sob luz polarizada. Barra=100µm.

Em relação a análise da camada superficial da cartilagem articular, observou-se que os animais 4 e 14 dias possuem diferenças quanto ao tipo de colágeno. Os animais dos grupos LTE 4 dias (LTE e LTE+I) apresentaram maior predominância de colágeno tipo III (verde) quando comparado aos grupos Controle (C e C+I). Além disso, foi possível observar que a administração de insulina por 4 dias, nos animais que foram submetidos a Lesão Térmica por Escaldadura, aumentou a quantidade de colágeno tipo III.

Os animais de 14 dias não apresentaram diferença quanto a lesão térmica, mas sim quanto a administração de insulina. Os animais Controle que receberam insulina (C+I) apresentaram maior predomínio de colágeno tipo I (vermelho) quando comparado com o grupo controle, enquanto que o grupo LTE+I apresentou maior quantidade de fibras colágenas tipo III (verde) (**Figura 15**).

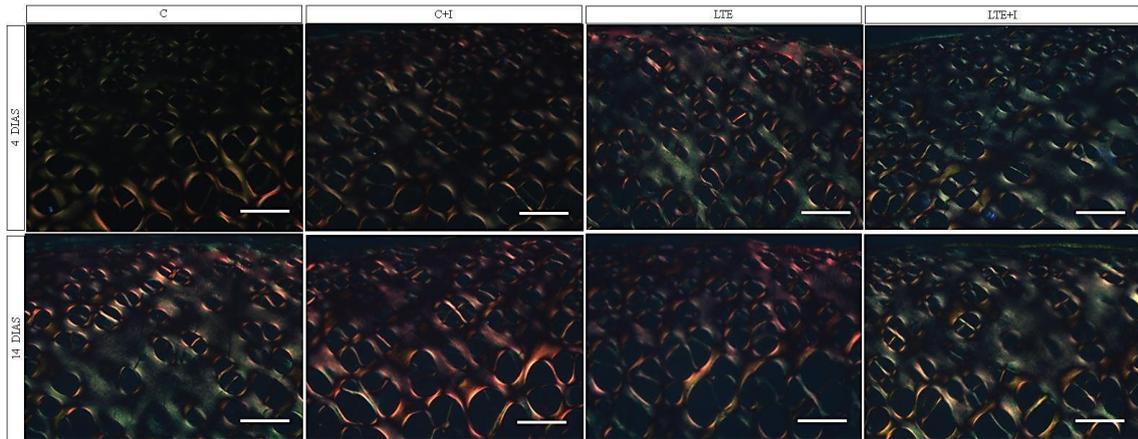


Figura 15: Camada superficial da cartilagem articular do fêmur de ratos dos grupos C, C+I, LTE e LTE+I com 4 ou 14 dias após a lesão. As imagens revelam a organização da rede de colágeno tipo I (vermelho e laranja) e tipo III (verde) em forma de malha pantográfica. Picro sírius sob luz polarizada. Barra=100µm.

Quanto aos resultados da lâmina epifisial, pode-se observar que os grupos Controle (C e C+I), em ambos os períodos experimentais (4 e 14 dias), apresentaram as fibras colágenas organizadas em forma de malha pantográfica. Diferentemente do que pode ser observado nos animais submetidos a Lesão Térmica por Escaldadura (LTE) tanto em 4 como 14 dias, no qual apresentaram as fibras colágenas com padrão desorganizado. Entretanto, os animais que foram submetidos a lesão térmica e passaram pelo tratamento com insulina durante 4 ou 14 dias, tiveram o padrão de organização das fibras colágenas em malha pantográfica recuperado, se assemelhando ao observado nos grupos controle (**Figura 16**).

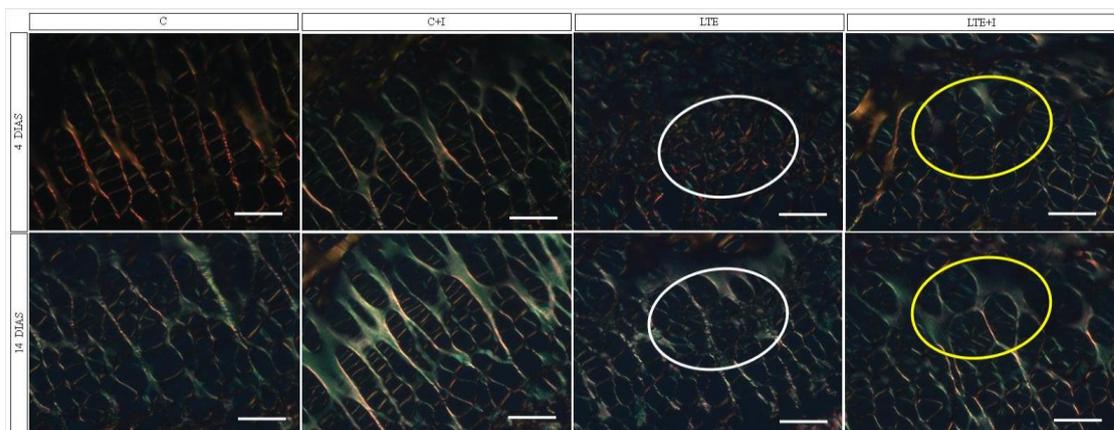


Figura 16: Lâmina epifisial do fêmur de ratos dos grupos C, C+I, LTE e LTE+I com 4 ou 14 dias após a lesão. As imagens revelam a organização da rede de colágeno tipo I (vermelho e laranja) e tipo III (verde) em forma de malha pantográfica. Os grupos C e C+I após 4 ou 14 dias apresentam o padrão de rede organizado. Destacado com a figura oval branca em LTE após 4 e 14 dias a perda do padrão organizado dessa rede de fibras colágenas. Já nos grupos LTE+I após 4 ou 14 dias, observa-se uma

melhora no padrão de rede (figura oval amarela), porém ainda não totalmente semelhante aos respectivos controles. Picro sírius sob luz polarizada. Barra=100µm.

4.5 Análise imunoistoquímica dos fatores de regulação osteogênica RUNX-2 e RANK-L

A avaliação imunoistoquímica dos fatores de regulação osteogênica RUNX-2 e RANK-L revelaram a presença dessas proteínas no núcleo de condrócitos da cartilagem articular e lâmina epifisial, bem como em alguns ostócitos presentes na diáfise e ainda em células do periósteo. A seguir as **Figuras 17 e 18** mostram o padrão dessa marcação para a lâmina epifisial. Ressalta-se que não foram observados padrões de diferença nas marcações nos grupos investigados.

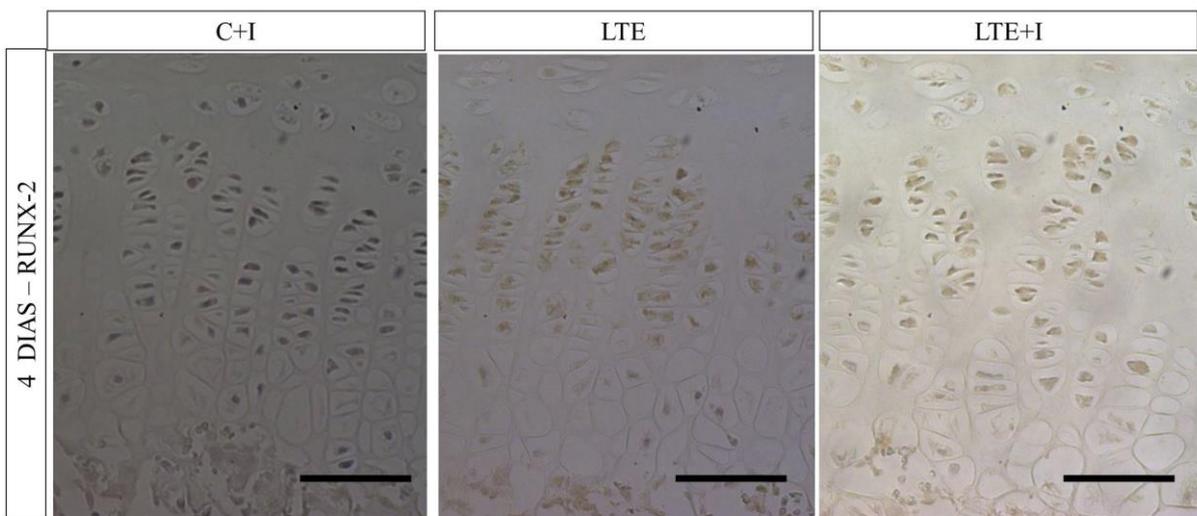


Figura 17: Lâmina epifisial do fêmur de ratos dos grupos C+I, LTE e LTE+I com 4 dias após a lesão. As imagens revelaram marcação nuclear dos condrócitos da lâmina epifisial dos animais investigados. Barra=100µm.

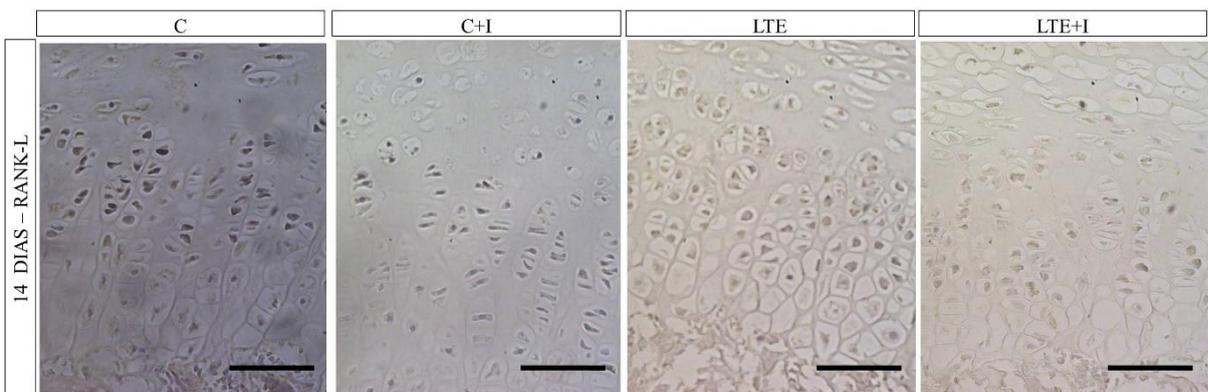


Figura 18: Lâmina epifisial do fêmur de ratos dos grupos C, C+I, LTE e LTE+I com 14 dias após a lesão. As imagens revelaram marcação nuclear dos condrócitos da lâmina epifisial dos animais

investigados. Barra=100µm.

5.0. DISCUSSÃO

A lesão térmica extensa, acima de 40% da superfície corporal traz diversas consequências ao organismo e na tentativa de reestabelecer a homeostase corporal, a lesão térmica gera atraso no crescimento (BLINE *et al*, 2013). Dessa maneira, fazem-se necessários estudos que tenham como objetivo investigar estratégias que minimizem agravos trazidos pela ampla lesão térmica. O presente estudo investigou a influência do tratamento com insulina de curta e longa duração no tecido cartilágneo da epífise proximal do fêmur de ratos submetidos à lesão térmica extensa. Os principais achados mostraram que na lâmina epifisial após a lesão térmica, a presença de insulina resultou na reorganização das fibras colágenas tanto em curto quanto longo prazo; na cartilagem articular, a insulina em curto e longo prazo culminou na diminuição da espessura da cartilagem; a camada superficial da cartilagem articular na presença da lesão térmica, independente do tratamento com insulina, apresentou predominância do colágeno tipo III em curto prazo comparado ao grupo controle; em longo prazo a insulina no grupo controle resultou em predominância de colágeno do tipo I e a lesão térmica na presença da insulina resultou na predominância de colágeno do tipo III.

Cabe aqui destacar que o fêmur é um osso longo, o maior do corpo humano e é responsável por suportar maior porcentagem de peso do corpo durante atividades de vida diária, além de ser também o osso mais forte sobre compressão (NARELIYA e KUMAR, 2011). Está situado no membro inferior e garante a distribuição adequada da carga - dissipada pelos ossos do quadril - para as estruturas mais distais. O fêmur garante fácil visualização das estruturas analisadas e é frequentemente utilizado para análise da idade óssea (SUBRAMANAIN e VISWANATHAN, 2020; HIERSCH e MELAMED, 2018). No presente estudo ele é um osso situado distante da lesão térmica, o que permitiu analisar o efeito sistêmico da lesão térmica.

A insulina é um hormônio anabólico que em organismos em estados catabólicos mostrou diminuir a proteólise e aumentar a síntese proteica, atua no aumento de proteínas musculares em lesionados térmicos, aumenta a reepitelização dos locais doadores de enxerto e aumento da produção de colágeno (DEMLING, 2005), na lesão térmica a insulina mostrou diminuir citocinas pré-inflamatórias (IL-

1beta, IL-6, MIF e TNF) e aumentar citocinas anti-inflamatórias (IL-2, IL-4 e IL-10) (JESCHKE et al, 2002). Portanto faz-se necessário identificar as repercussões da insulina no organismo de lesionados térmico.

Quanto aos resultados da lâmina epifisial, o presente estudo identificou diminuição da lâmina epifisial total somente em longo prazo (14 dias) dos animais LTE, independente do tratamento. A diminuição não foi identificada em todas as camadas, ocorreu nas zonas proliferativa, hipertrófica e calcificada em longo prazo (14 dias) dos animais submetidos a lesão térmica quando comparado aos grupos controles, independente do tratamento. A lâmina epifisial é dividida em zonas, essas são fundamentais para o crescimento adequado do osso. A zona proliferativa é responsável pela proliferação dos condrócitos, os condrócitos dessa zona são dispostos de maneira longitudinal o que fornece o direcionamento do crescimento ósseo; na zona hipertrófica os condrócitos não se dividem e tem diminuída síntese de DNA, grandes reservas de lipídeo e glicogênio estão presentes também; por fim, a zona calcificada é responsável pela mineralização da matriz (ABAD *et al*, 2002; BURDAN *et al*, 2009). Sendo assim, as alterações encontradas podem gerar graves consequências na formação óssea, como diminuição da proliferação dos condrócitos e posteriormente diminuição da produção de matriz óssea que, por consequência, afetará o crescimento ósseo. Esses achados vão ao encontro de estudos que indicam diminuição no crescimento de crianças após lesão térmica como o de Bline *et al* (2013) em análise de caso clínico de paciente do sexo masculino de 8 anos, 5 anos após a lesão térmica, identificou diminuição do seu IMC e altura e também foi encontrado diminuição da massa óssea na coluna lombar. Tomé *et al* (2019) analisou lâmina epifisial de 28 ratos Wistars e identificou diminuição nos animais submetidos a lesão térmica quando comparado aos animais saudáveis, achados do estudo também evidenciaram maior osteoclastogênese nos animais lesionados.

Para a cartilagem articular, o presente estudo encontrou diminuição da cartilagem articular total na lesão térmica quando comparado com animais controles. A cartilagem articular tem função de absorção de impacto e diminuição do cisalhamento entre dois ossos (TEMENOFF, MIKOS, 2000), sendo essa fundamental para que ocorram as movimentações corporais. A camada superficial confere resistência a tração, essa é fundamental para resistir ao cisalhamento entre duas superfícies articulares; a camada média faz a ligação da camada superficial e é a primeira linha de defesa contra forças compressivas; a camada profunda possui

feixes de colágenos mais verticalizados que permitem aderência da cartilagem articular ao osso (WOO *et al*, 1976). Nossos achados corroboram com o estudo de Vinatier (2016), a lesão térmica extensa desenvolve processo catabólico intenso em todo o organismo podendo suscitar em diminuição da cartilagem articular. No entanto, essa diminuição não foi equivalente a todas as camadas da cartilagem. A camada superficial, em curto prazo, apresentou diferença apenas com relação à lesão térmica. E ainda em longo prazo, houve diferença somente entre Controle e LTE.

A diminuição acentuada verificada nas camadas média e profunda pode gerar diminuição da distribuição adequada de forças compressivas e sobrecarregar o osso, que na lesão térmica já está em processo desregulado de reabsorção óssea (KLEIN, *et al*, 1995), além de declínio da vitamina D que resultará na diminuição da densidade mineral óssea (BLINE, *et al*, 2013). Além disso, a cartilagem articular é avascular e possui baixa taxa de proliferação dos condrócitos, processos catabólicos no presente tecido tornam-se irreversíveis, levando ao desenvolvimento de doenças, como por exemplo, a osteoartrite (VINATIER, 2016).

Outro dado importante que o presente estudo apontou foi a ação mais drástica da insulina no grupo C+I quando comparado ao grupo LTE+I, indicando que a insulina agiu de maneira diferenciada e que a lesão térmica alterou seu efeito. Ribeiro *et al*, (2016) em modelo experimental de condrócitos humanos cultivados em culturas traz que níveis altos de insulina 6 horas depois de sua aplicação, levaram a diminuição de autofagia, mecanismo que auxilia a homeostase da cartilagem articular, esse mecanismo auxilia a remoção de organelas disfuncionais e moléculas. Os mesmos autores encontraram a MMP-13 (metaloproteinase-13), proteína catabólica que auxilia na degeneração da cartilagem articular, sob tratamento com insulina, além de proteínas como IL- 1b, indicando que a insulina medeia efeitos inflamatórios semelhantes aos da osteoartrite.

Em contrapartida Cai *et al*, (2002), em estudo com modelo experimental em porcos, ratos diabéticos e pacientes com osteoartrite, afirma que em concentrações baixas (<10nM) a insulina, inibiu a produção de óxido nítrico e bloqueou os efeitos prejudiciais da IL-1 na cartilagem articular. Insulina em valores a 0,1 nM foram capazes de superar o efeito inibitório da IL-1 na produção de proteoglicanos, valores a 100 nM aumentou a cultura de IL-1 em 70%. Em concentrações de 10 nM a insulina foi capaz de diminuir a degradação da matriz em 30 % e suprimiu o

catabolismo gerado por IL-1. Os estudos citados sugerem que a modulação da quantidade de insulina conduz a resposta tecidual da cartilagem, afetando diretamente a resposta que o tecido terá.

O presente estudo identificou menor intensidade na coloração do colágeno na cartilagem articular e na lâmina epifisial nos animais submetidos a lesão térmica – independente do tratamento - tanto em curto quanto em longo prazo (4 e 14 dias), no entanto após 14 dias de administração de insulina o grupo LTE+I apresentou as fibras colágenas com uma organização muito semelhante ao grupo controle. Achados esses que corroboram com estudo de Gomes *et al* (2019), que analisou o fêmur de 60 ratos Wistars de 40 dias de vida e observou que animais diabéticos apresentaram diminuição na quantidade de fibras colágenas e que após administração de insulina (2-4 U / dia) por período de 8 semanas, as fibras colágenas do tipo I e III apresentaram aumento de 53%. Goldstein *et al*, (1988) em estudo analisando fibroblastos embrionários de pulmão humano cultivados em cultura identificaram maior produção de colágeno tipo I e III mediante a adição de 20 ng/ ml de insulina.

Nossos achados evidenciaram que referente a camada superficial da cartilagem articular os animais do grupo LTE e LTE+I 4 dias apresentaram predominância de colágenos do tipo III quando comparados ao grupo C, ademais a administração de insulina por 4 dias aumentou ainda mais a quantidade de colágeno tipo III dos animais LTE. Os animais LTE de 14 dias submetidos ao tratamento de insulina também apresentaram predominância de colágeno do tipo III, já os animais do grupo C submetidos ao tratamento com insulina apresentaram predominância de fibras colágenas do tipo I, o resultado demonstra que a lesão térmica alterou a ação da insulina. Dois terços da cartilagem é composta de fibras colágenas, o colágeno tipo III está presente na cartilagem articular humana sadia em menor grau. Caso haja menor expressão de colágeno tipo I esse é substituído em maior quantidade pelo tipo III (EYRE, 2002). O colágeno do tipo I está associado a regeneração, é mais forte e mais resistente, já o colágeno tipo III está relacionado a cicatrização e inflamação (CUNHA, PARAVIC, MACHADO, 2015). O colágeno do tipo III está associado a tecidos que possuem maior grau de flexibilidade como pele e músculo liso e fase de granulação onde é gradualmente substituído por colágeno do tipo I, restaurando a resistência original do tecido (LEHTO, SIMS e BAILEY, 1985), dessa

maneira alterações na cartilagem articular podem comprometer a absorção de carga e inadequação da dissipação de estresse ao osso.

Cabe ressaltar que a resistência da cartilagem articular para grandes tensões e estresse está ligada diretamente à rede de colágeno (CHEN *et al*, 2002). Nossos achados corroboram com o estudo de KREAM *et al*, 1985, que em análise dos efeitos da insulina na síntese de colágeno nos ossos frontais e parietais - de ratos fetais de 21 dias de idade - mantidos em cultura de órgãos em concentrações de glicose e fosfato identificaram em todas as concentrações a insulina (1 nM a 10 nM) estimulou maior produção de colágeno quando comparado aos animais do grupo controle (sem tratamento com insulina). Em concentrações de 100 nM a produção de colágeno aumentou 60% no osso central. Em 3nM a insulina aumentou em 250% a produção de colágeno do tipo I. A insulina é homóloga a partes a molécula de IGF-1, muito importante na formação da matriz extracelular em condrócitos, portanto ativa o receptor de IGF-1. Nesse contexto pode ser que a ação da insulina esteja atrelada indireta ou diretamente a ativação do receptor (MULLER *et al*, 2013).

Nossos resultados revelaram que os animais do grupo LTE e LTE+I apresentaram desorganização da rede de colágeno da lâmina epifisial tanto em curto quanto longo prazo (4 e 14 dias), entretanto os animais submetidos ao tratamento com insulina tanto em curto quanto longo prazo (4 e 14 dias) apresentaram padrão de organização das fibras colágenas em malha pantográfica recuperado, se assemelhando ao observado nos grupos controle. Durante o carregamento a rede de fibras colágenas é responsável por não permitir a expansão lateral da lâmina epifisial, garantindo resistência. Além disso, o posicionamento dos condrócitos é influenciado pela organização das fibras de colágeno: na zona de repouso os condrócitos estão dispersos, já nas zonas proliferativa e hipertrófica seguem um arranjo colunar. Portanto alterações na rede de colágeno podem levar a anormalidades no padrão de crescimento e na capacidade de resistência (AMINI *et al*, 2013).

Além da organização das fibras colágenas, existem fatores de regulação osteogênica importantes para o crescimento ósseo. Vale destacar que a maturação óssea ocorre de duas maneiras: ossificação intramembranosa e endocondral. A intramembranosa é restrita aos ossos da abóboda craniana, à alguns ossos faciais, parte da mandíbula e clavícula, o restante é formado por meio da ossificação endocondral que ocorre através de um molde de cartilagem, parte dessa cartilagem

se mantém e permite que o indivíduo alcance maior estatura após o nascimento (YOSHIDA et al, 2004) Para que o crescimento pós-natal ocorra de maneira adequada fatores de regulação osteogênica são importantes. O RANK-2 é da família RANK e tem papel fundamental na diferenciação de osteoblastos e condrócitos, o RANK-2 está envolvido também na invasão vascular na lâmina epifisial (KOMORI, 2011). O RANK-2 na lâmina epifisial direciona a organização da zona proliferativa, esse fator é expresso em células mesênquimais condrogênicas e influenciam a pré-hipertrofia e hipertrofia de condrócitos, portanto está atrelado a maturação dos condrócitos. Sob influência de RANK-2, o condrócito tem aumento de tamanho de 5 a 10 vezes em decorrência do aumento de organelas como mitocôndrias e retículo endoplasmático. Os condrócitos presentes em ossos grandes como o fêmur aumentam mais rapidamente que outros ossos em virtude do crescimento acelerado desses seguimentos (BURDAN et al, 2009). A falta de RANK-2 em camundongos gera ausência de osteoblastos e exibem anormalidade em condrócitos, isso leva a incapacidade da mineralização associada a baixos níveis de osteopontina e metaloproteinase da matriz 13 (HALLET, ONO W, ONO N, 2019).

O RANK-L é liberado por osteoblastos e células estromais da medula, enquanto o receptor RANK é expresso em pré-osteoclastos a relação de RANK-L com RANK estimula a diferenciação osteoclastica. O OPG é liberado por osteoblastos, e é concorrente de RANK-L para ligação com o receptor RANK, sua função é inibir a diferenciação de osteoclastos e, portanto, inibir a reabsorção óssea (VEJA, MALLOUF e SAKHAE, 2007). Na lesão térmica citocinas como IL-1 e IL-6 estão aumentadas e essas estimulam os osteoblastos a produzirem RANK-L que por conseguinte resultará no aumento da reabsorção óssea, após duas semanas da lesão a produção de glicocorticoides aumenta em 8 vezes, fator que aumenta a reabsorção óssea, densidade mineral óssea também fica comprometida, mediante ao aumento da osteoclastogênese, e essa permanece aumentada em crianças até 5 anos após a lesão (HOSCHEIT *et al*, 2006). Os glicocorticoides inibem a diferenciação dos osteoblastos, além também haver escassez de osteoblastos na superfície óssea, marcadores bioquímicos que são responsáveis pela diferenciação dos osteoblastos encontram-se diminuídos em crianças grande lesionadas térmicas (KLEIN, 2004). Entretanto, o presente estudo não encontrou diferença na imunoexpressão desses fatores de regulação osteogênica. Porém, cabe salientar que houve dificuldades na realização da técnica para avaliação imunoistoquímica

para os fatores de regulação osteogênica (RANX-2 e RANK-L), principalmente pela dificuldade de manutenção do tecido nas etapas das lavagens, e também necessidade de maior tempo laboratorial para foto documentar os achados microscópicos, o que não foi possível devido a quarentena pela pandemia do novo coronavírus.

6.0. CONCLUSÃO

A lâmina epifisial do fêmur dos animais que sofreram a lesão térmica, em longo prazo (14 dias após a lesão) apresentou menor tamanho que o controle, independente do tratamento com insulina, mostrando que a lesão foi capaz de causar aceleração da redução do tamanho da lâmina. Na análise das medidas das zonas que formam a lâmina epifisial desses animais, verificou-se que essa diminuição total não se dá na zona de repouso, mas sim nas zonas proliferativa e calcificada+hipertrófica. Com relação aos efeitos da insulina, os mesmos só foram verificados aos 4 dias (curto prazo) após a lesão apenas nas zonas hipertrófica+calcificada, de maneira a diminuir essa camada nos grupos que receberam a insulina. Como essa interferência não persistiu na medida total da lâmina epifisial nem em curto ou longo prazo, concluiu-se que a insulina não modulou a lâmina epifisial como um todo ao final do tratamento. A cartilagem articular sofreu diminuição tanto em longo quanto em curto prazo como efeito da lesão térmica. Salienta-se que a insulina diminuiu drasticamente a sua espessura da cartilagem articular nos grupos controle que receberam insulina (C+I), e essa diminuição, apesar de ter sido observada também nos grupos LTE+I, ocorreu em grau mais moderado, também em longo e curto prazo (4 e 14 dias), mostrando que o efeito modulador da insulina foi diferente na presença da lesão térmica. Na análise das camadas superficial e Média+Profunda da cartilagem articular, verificou-se que a interferência tanto da lesão quanto do tratamento com insulina ocorreu principalmente nas camadas Média+Profunda. Dessa maneira, concluiu-se que a insulina foi capaz de interferir nas consequências das lesões térmicas na cartilagem articular.

A densidade dos condrócitos não sofreu alteração em decorrência da lesão térmica nem sobre ação da insulina, em ambos os grupos. Já na análise da área dos condrócitos os animais submetidos a lesão térmica e tratamento de insulina (LTE+I)

em curto prazo (4 dias) apresentaram menor área de perfil quando comparado ao grupo controle submetidos ao tratamento de insulina (C+I) evidenciando que a resposta à insulina foi diferente sob a presença da lesão térmica.

A malha pantográfica constituída pelas fibras colágenas apresentou desorganização nos animais do grupo lesão térmica (LTE) tanto em curto quanto longo prazo (4 e 14 dias), foi possível observar que em longo prazo (14 dias) a insulina foi capaz de reverter as alterações nas fibras colágenas, provocadas pela lesão térmica. Na cartilagem articular os animais dos grupos lesão térmica em curto e longo prazo (4 e 14 dias) apresentaram predominância de fibras colágenas do tipo III, já os animais do grupo controle submetidos ao tratamento de insulina (C+I) a longo prazo (14 dias) apresentaram predomínio de fibras colágenas do tipo I, evidenciando que a insulina teve ação diferente na presença a lesão térmica. Na lâmina epifisial os animais do grupo lesão térmica por escaldadura (LTE) tanto em curto quanto em longo prazo (4 e 14 dias) apresentaram padrão de fibras colágenas desorganizado, já os animais do grupo lesão térmica por escaldadura que passaram pelo tratamento de insulina tiveram padrão de fibras colágenas organizadas. Portanto a insulina possibilitou a organização das fibras colágenas tanto da cartilagem articular quanto lâmina epifisial. Análise dos fatores de regulação osteogênica não apresentou padrões de diferenças nas marcações nos grupos investigados.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, V.; MEYERS, J.L.; WEISE, M.; GAFINI, R. I.; BARNES, K. M.; NILSON, O.; BACHER, J. D.; BARON J. The Role of the Resting Zone in Growth Plate Chondrogenesis. **Endocrinology**, [s.l.], v. 143, n. 5, p.1851-1857, 2002.
- ATIYEH, B. S.; GUNN, S. W. A.; DIBO, S. A. Metabolic Implications of Severe Burn Injuries and Their Management: A Systematic Review of the Literature. **World Journal Of Surgery**, [s.l.], v. 32, n. 8, p.1857-1869, 2008.
- ATIYEH, B.; & JANOM, H. H. Physical rehabilitation of pediatric burns. **Annals of burn and fire disasters**, [s.l.] v. 27 n. 1, p. 37–43, 2014.
- AYGIT, A. C.; BENLIER, E.; TOP, H.; YALCIN, O.; HUSEYINOVA, G.; KANTER, M.; CAKIR, B.; YURDAKUL, E. The Effects of Thermal Injury on Immature Rat Ear Cartilage. **Journal Of Burn Care & Research**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.803-808, 2010.
- BANTA, S.; YOKOYAMA, T.; BERTHIAUME, F., YARMUSH, M. L. Quantitative effects of thermal injury and insulin on the metabolism of the skeletal muscle using the perfused rat hindquarter preparation. **Biotechnology And Bioengineering**, [s.l.], v. 88, n. 5, p.613-629, 2004.
- BARRETT, L., W.; FEAR, V., S.; WAITHMAN, J., C.; WOOD, F., M.; FEAR, M., W. Understanding acute burn injury as a chronic disease. **Burns Trauma**, [s.l.], v. 7, n.23, p. 2-9, 2019.
- BERLANGA-ACOSTA, J.; IGLESIAS-MARICHALB, I.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZA, N.; MENDOZA-MARIA, Y.; GARCIA OJALVOA, A. FERNÁNDEZ-MAYOLAA, M.; PLAYFORD, R., J. Review: Insulin resistance and mitochondrial dysfunction following severe burn injury. **Peptides**, [s.l.], v.126, 2020.
- BORTOLIN, J. A.; QUINTANA, H. T.; TOMÉ T. C.; RIBEEIRO, F. A. P.; RIBEIRO, D. A.; OLIVEIRA, Flavia de. Burn injury induces histopathological changes and cell proliferation in liver of rats. **World Journal Of Hepatology**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.322-330, 2016.
- BOWE, E. J.; FRANKILIIN, Z. J.; HAUGE-EVANS, A. C.; KING A. J.; PERSAUD, S. J.; JONES, P. M. METABOLIC PHENOTYPING GUIDELINES: Assessing glucose homeostasis in rodent models. **Journal Of Endocrinology**, [s.l.], v. 222, n. 3, p.13-25, 2014.
- BURDAN, F.; SZUMI, J.; KOROBOWICZ, A; FAROQUEE, R; PATEL, S; PATEL, A; DAVE, A; SZUMI, M; SOLECKI, M; KLEPACZ, R; DUDKA, J. Morphology and physiology of the epiphyseal growth plate. **Folia Histochem Cytobiol**, Lublin, v. 47 n. 1, p. 5-16, 2009.
- BLINE, C.; DYLEWSKI, M.L.; DRISCOLL, D.N.; FUZAYLOV, G. Case of extreme growth deceleration after burns. **Burns**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.15-17, 2014.
- BISHOP, J.F. Burn wound assessment and surgical management. **Crit Care Nurs Clin North Am**, [s.l.] v. 16, n. 1, p. 145-177, 2004.
- CACHO, J.; SEVILLANO, J.; DE CASTRO J.; HERRERA E.; RAMOS M.P. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. **American Journal Of Physiology-endocrinology And Metabolism**, [s.l.], v. 295, n. 5, p. 1269-1276, 2008.
- CAI, L; OKUMU, F.W; CLELAND; M, BERESINI; D, HOGUE; LIN, Z; FILVAROFF. A slow release formulation of insulin as a treatment for osteoarthritis. **Osteoarthritis Cartilage**, United States of America, [s.l.] v. 10, n. 9, p. 696-706, 2002.
- CALOEIRO, C. B. **Comparison of the analgesic effect between morphine, tramadol and buprenorphine in cats undergoing ovariohysterectomy**. 15 f. Dissertação (Mestrado em Clínica e Cirurgia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. **Arch Biochem Biophys**, [s.l.] v. 561, p. 3-12, 2014.
- CLAASSEN, H.; SCHICHT, M.; BRANDT, J.; REUTILIZAÇÃO, K.; SCHADLICH, R.; GOLDRING, M. B.; GUDDAT, S. S.; THATE, A.; PAULSEN, F. C-28/I2 and T/C-28a2 chondrocytes as well as human primary articular chondrocytes express sex hormone and insulin receptors—Useful cells in study of cartilage metabolism. **Annals Of Anatomy - Anatomischer Anzeiger**, [s.l.], v. 193, n. 1, p.23-29, 2010.
- CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clinical journal of the American Society of**

Nephrology, [s.l.] v.3, p. 131-9, 2008.

CHURCH, D.; ELSAYED, S.; REID, O.; WISTON, B.; LINDSAY R. Burn Wound Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.403-434, 2006.

CORREA, D.; LIETMAN, A. S. Articular cartilage repair: Current needs, methods and research. **Seminars in cells & Developmental Biology**, [s.l.], v. 62, n. 2017, p. 67-77, 2016.

DATTA, H K; NG, WF; WALKER, JA; TUCK, SP; VARANASI, SS. The cell biology of bone metabolism. **Journal Of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.

DOWEY P.A.; Siegel M.I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. **Phys Ther**, [s.l.] v. 86, n. 1, p. 77-91, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde [Internet]. Secretaria Executiva. Datasus [acesso em maio 2013]. Informações de Saúde. Informações epidemiológicas e morbidades. Disponível em <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>.

DE OLIVEIRA B. C.; DE OLIVEIRA, F.; MARTINI, D.T.; PRISCO, C.R.; DA SILVA, R. M.M.; LIBERT, E.A.; DE CAMPOS B. S. The relative effects of severe burn injury and pre- and post-natal protein deprivation on mandibular condyle morphology. **Histology And Histopathology**, [s.l.], n. 25, p.45-54, 2009.

EERDEN, B. C. J. van der; KARPERIEN, M.; WIT, J. M. Systemic and Local Regulation of the Growth Plate. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 24, n. 6, p.782-801, 2003.

EMANUELE, M. A.; EMANUELE, N. V.; GAMELLI, R. L.; KOVACS, E. J.; LAPAGLIA, Nancy. Effects of Insulin on Hepatic Inflammation Induced by Ethanol and Burn Injury in a Murine Model of Critical Illness. **Journal Of Burn Care & Research**, [s.l.], v. 28, n. 3, p. 490-499, 2007.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2015, p.1-17, 2015.

FOX, A. J. S.; BEDI, A.; RODEO, S. A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. **Sports Health: A Multidisciplinary Approach**, [s.l.], v. 1, n. 6, p.461-468, 2009.

GAUGLITZ, G. G.; HERDON, D. N.; KULP, G. A.; MEYER, W. J.; JESCHKE, M. G. Abnormal insulin sensitivity persists up to three years in pediatric patients post-burn. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, [s.l.] v. 94, n. 5, p. 1656–1664, 2009.

HETTIARATCHY, S.; DZIEWULSKI, P. ABC of burns. **Clinical Review**, v. 328, n. 7452, p.1366-1368, 2004.

HOLM, C; HORBRAND,F M; HENCKEL; Mayr, G; MUHLBAUER, Donnersmarck, W. Acute hyperglycaemia following thermal injury: friend or foe?. **Resuscitation**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.71-77, 2004.

IBEBUNJO, C.; MARTYN, J. A. J. Thermal injury induces greater resistance to d-tubocurarine in local rather than in distant muscles in the rat. **International Anesthesia Research Society: GENERAL ARTICLES**, Massachusetts, v. 12439, n. 91, p.1243-49, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemicat Journal**, Sao Paulo, v. 11, p.447-455, 1978.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KADDOURA, I; ABU-SITTAH, G; IBRAHIM, A; KARAMANOUKIAN, R; PAPAZIAN, N. Burn injury: review of pathophysiology and therapeutic modalities in major burns. **Ann Burns Fire Disasters**, Beirut, [s.l.] v. 2, n. 30, p.95-102, 2017.

KLEIN, G.L.; HERNDON, D.N.; LANGMAN, C.B.; RUTAN, T.C.; YOUNG, W.E.; PEMBLETON, G.; NUSYNOWITZ, M; BARNETT, J. L.; BROEMELING, L. D.; SAILER, D. E. Long-term reduction in bone mass after severe burn injury in children. **The Journal Of Pediatrics**, Galveston, v. 2, n. 126, p.252-56, 1995.

KLEIN, G. L Disruption of bone and skeletal muscle in severe burns. **Bone Research**, [s.l.], v. 3, n.

15002, fev. 2015.

KLEIN, G. L. Does vitamin D deficiency contribute to post-burn bone loss? **F1000research**, [s.l.], v. 1, n. 57, p. 1-5, 2012.

KRISHNAMOORTHY, V.; RAMAIAH, R.; BHANANKER, S. Pediatric burn injuries. **International Journal Of Critical Illness And Injury Science**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.128-34, 2012.

LAMPL, M.; SCHOEN, M. How long bones grow children: mechanistic paths to variation in human height growth. **American Journal of Human Biolog.** Atlanta, v. 29, n. 2, p. 16-26, 2017.

MADIHALLY, S. V.; PANTELOGIANIS, A.; TONER, M. Antiproteolytic Action of Orally Delivered Insulin Using pH-Responsive Hydrogels in a Rat Burn Model. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 135, n. 1, p.187-194, 2006.

MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Ed UERJ, 1995.

MECOTT, G. A.; AL- MOUSAWI, A. M.; GLAUGLITZ G. G.; HERNDON D. N.; JASCHKE M. The Role of Hyperglycemia in Burned Patients: Evidence-Based Studies. **Shock**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.5-13, 2010.

MULCAHY L.E, TAYLOR D., LEE T.C., DUFFY G.P. RANKL and OPG activity is regulated by injury size in networks of osteocyte-like cells. **Bone**, [s.l.] v. 48, n.2, p.182-8, 2011.

NEWMAN, J; STROME, DR; GOODWIN, CW; MASON, AD Jr; PRUITT BA Jr. Altered muscle metabolism in rats after thermal injury. **Metabolism: Clinical And Experimental**, [s.l.] v. 31, n. 12, p.1229-1233, 1982.

OLIVEIRA, F. et al. Helium-neon laser therapy interferes with epiphyseal plate growth in the femur and tibia of rabbits. **Photonics & Lasers In Medicine**, [s.l.], v. 2, n. 4, 2013.

ORNITZ, D. M.; LEGEAI-MALLET, L. Achondroplasia: Development, pathogenesis, and therapy. **Developmental Dynamics**, [s.l.], v. 246, n. 4, p.291-309, 2017.

PEREIRA R.C, JORGETTI V, CANALIS E. Triiodothyronine induces collagenase-3 and gelatinase B expression in murine osteoblasts. **Am J Physiol**, [s.l.] v. 277, p.496-504, 1999.

PEARLE, A.D.; WARREN, R.F.; RODEO, S.A. Basic Science of articular cartilage and osteoarthritis. **Clin sports med**, [s.l.] v. 24, n.1, p.1 -12, 2005.

PIDCOKE, H. F. et al. Insulin effects on glucose tolerance, hypermetabolic response, and circadian-metabolic protein expression in a rat burn and disuse model. **American Journal Of Physiology-regulatory, Integrative And Comparative Physiology**, [s.l.], v. 307, n. 1, p.1-10, 2014.

POOLE, A. Robin; KOJIMA, Toshi; YASUDA, Tadashi, MWALE Fackson, KOBAYASHI Masahiko, LAVERTY Sheila. CARTILAGE BIOLOGY: Composition and Structure of Articular Cartilage. **Clinical Orthopaedics And Related Research**, [s.l.], p.26-33, 2001

PRELACK, J.; DWYER, J.; DALLAL, G. E.; RAND, W. N.; YU, W. M.; KEHAYIAS, J. J.; ANTOON, A.; SHERIDAN, R. L. Growth deceleration and restoration after serious burn injury. *Journal of Burn Care & Research*, [s.l.] v. 28, n. 2, p. 262-268, 2007.

QUINTANA, H. T. et al. Systemic Host Response Following Skin Burn Injury in Rats: Cytotoxicity and Genotoxicity Evaluation. **International Journal Of Experimental And Clinical Phatophysiology And Drug Research**. Santos, 2014.

QUINTANA, H. T.; BORTOLIN, J. A.; DA SILVA, N. T.; RIBEIRO, F. A. P.; LIBERTY, E. A.; RIBEIRO, D. A.; DE OLIVEIRA, F. Temporal study following burn injury in young rats is associated with skeletal muscle atrophy, inflammation and altered myogenic regulatory factors. **Inflammation Research**, [s.l.], v. 64, n. 1, p.53-62, 2014.

RIBEIRO, M; P, LÓPEZ DE FIGUEROA; BLANCO, F.J; MENDES, A.F; CARAMÉS, B. Insulin decreases autophagy and leads to cartilage degradation. **Osteoarthritis Cartilage**, Spain, v. 24, n. 4, p. 731-736, 2016.

SOLOMON, V.; MADIHALLY, S.; YARMUSH, M.; TONER, M. Insulin Suppresses the Increased Activities of Lysosomal Cathepsins and Ubiquitin Conjugation System in Burn-Injured Rats. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.120-126, 2000.

SILVA, N. T. da et al. Burn Injury Induces Skeletal Muscle Degeneration, Inflammatory Host

Response, and Oxidative Stress in Wistar Rats. **Journal Of Burn Care & Research**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.428-33, 2015.

SOLOMON, Vered; MADIHALLY, Sundararajan; MITCHELL, Richard N; YARMUSH, Martin; TONER, Mehmet. Antiproteolytic action of insulin in burn-injured rats. **The Journal Of Surgical Research**, Boston, v. 2, n. 105, p.234-42, 2002.

SOTOCINA, Susana G et al. The Rat Grimace Scale: A Partially Automated Method for Quantifying Pain in the Laboratory Rat via Facial Expressions. **Molecular Pain**, [s.l.], v. 7, p.1744-8069, 2011.

SUN M.; Zhou X; Chen L; Huang S; Leung V; Wu N; Pan H; Zhen W; Lu W, Peng S. The Regulatory Roles of MicroRNAs in Bone Remodeling and Perspectives as Biomarkers in Osteoporosis. **Biomed Res Int**, [s.l.] v. 2016, p. 1-11, 2016.

TAKIGAWA, M. CCN2: a master regulator of the genesis of bone and cartilage. **Journal Of Cell Communication And Signaling**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.191-201, 2013.

TOMÉ, T., C.; QUINTANA, H., T.; BORTOLIN, J., A.; TAFFAREL, A., A.; LIBERTI, E., A.; DE OLIVEIRA, F. Extensive burn injury causes bone collagen network alteration and growth delay related to RANK-L immunoexpression change. **Connective Tissue Research**, [s.l.], v.61, n.5, 2019.

TEMENOFF, J.S.; MIKOS, A.G. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. **Biomaterials**, Houston, v. 5, n. 21, p.431-40, 2000.

TOMÉ, T.C ; QUINTANA, H.T; BORTOLIN, J.A ; TAFFAREL, A.A ; LIBERTI, E.A; DE OLIVEIRA, F. Extensa queimadura causa alteração na rede de colágeno ósseo e retardo de crescimento relacionado à alteração da imunoexpressão RANK-L. **Conective Tissue Research**, [s.l.], v.12, n. 1, p. 42-48, 2019

VINATIER, C; J, GUICHEUX. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to oarthritis treatments. **Ann Phys Rehabil Med**, France, v. 59, n. 3, p. 139-144, 2016.

WALKER, HI.; AD JUNIOR, M. A standard animal burn. **The Journal Of Trauma**, v. 6, n. 8, p.1049-51, 1968.

World Health Organization (WHO). Burns. 2018 disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/en/>>. Acesso em: 16 de abril de 2018.

XU, H.; YU, Y.; MA, H.; CARTER, E. A.; FAGAN, S.; TOMPKINS R. G.; FISCHMAN, A. J. Glucose metabolism during the early "flow phase" after burn injury. **Journal Of Surgical Research**, [s.l.], v. 179, n. 1, p.83-90, 2013.

8.0. ANEXO 1



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da insulina no tecido ósseo e cartilaginóseo do fêmur de ratos jovens submetidos à lesão térmica", protocolada sob o CEUA nº 4343120319 (ID 008387), sob a responsabilidade de **Flávia de Oliveira** e equipe; **Anny Rocha Pereira**; **Flávia de Oliveira** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 09/04/2019.

We certify that the proposal "Insulin effects in the bone and cartilaginous tissue of the femur in young rats after thermal injury", utilizing 0 Heterogenics rats (), protocol number CEUA 4343120319 (ID 008387), under the responsibility of **Flávia de Oliveira** and team; **Anny Rocha Pereira**; **Flávia de Oliveira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 04/09/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [04/2019](#) a [05/2020](#) Área: [Biociências](#)

Origem: [Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [21 a 21 dias](#) N: [0](#)

Linhagem: [Wistar](#) Peso: [40 a 70 g](#)

Local do experimento: Os animais provenientes do CEDEME foram transportados para o Biotério de Experimentação do Departamento de Biociências, onde foram mantidos até a eutanásia. Após a mesma, os espécimes coletados foram armazenados no Laboratório de Estudos Morfofuncionais (LABEM).

São Paulo, 10 de abril de 2019

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo