

**ROSILENE CANZI ALMADA DE SOUZA**

**ESTUDO DA CINÉTICA CELULAR DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA CAUSADA PELA CRIOTERAPIA  
EXPERIMENTAL EM PELE NORMAL DE  
CAMUNDONGOS UTILIZANDO O MÉTODO  
DE BOLSAS DE AR NO SUBCUTÂNEO**

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado  
em Ciências Médicas da Universidade Federal  
de Santa Catarina para obtenção do grau de  
mestre em Ciências Médicas com área de  
concentração de Clínica Médica.**

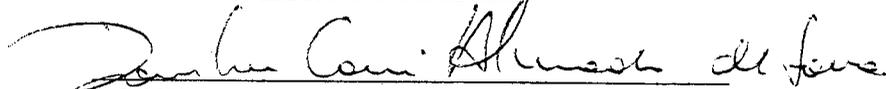
**COORDENADOR: Prof. Dr. Armando José d'Acampora  
ORIENTADOR: Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho**

**CONSULTA LOCAL**

**FLORIANÓPOLIS, SC  
2001**

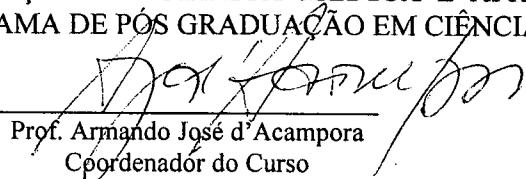


Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências da Saúde  
Mestrado em Ciências Médicas

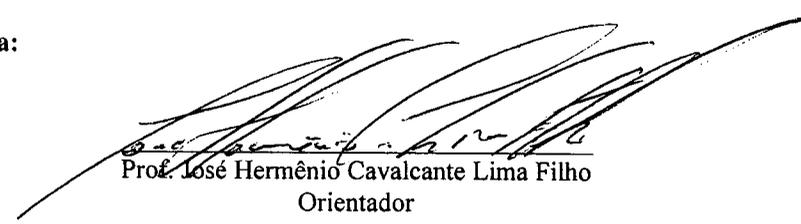
  
ROSILENE CANZI ALMADA DE SOUZA

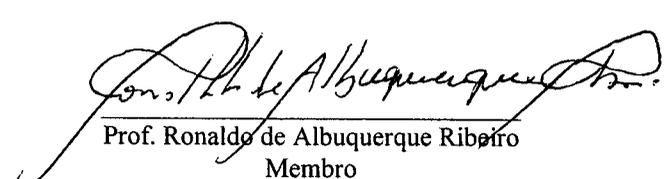
ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
**MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

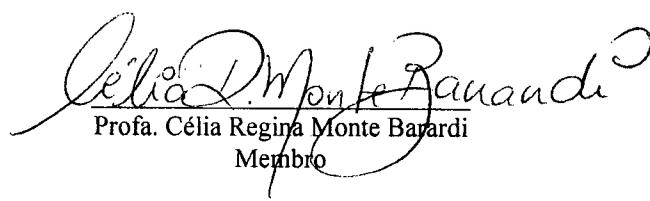
COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA E APROVADA EM SUA  
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

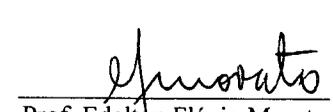
  
Prof. Armando José d'Acampora  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

  
Prof. José Hermênio Cavalcante Lima Filho  
Orientador

  
Prof. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro  
Membro

  
Profa. Célia Regina Monte Barardi  
Membro

  
Prof. Edelson Flávio Morato  
Membro

Florianópolis, 9 de março de 2001.



Hospital Universitário - Andar Térreo - Campus Universitário CEP 88040-970 Florianópolis - SC - Brasil  
Telefone: (048) 3319150 Fax: (048) 2349744 E-mail: [posmed@hu.ufsc.br](mailto:posmed@hu.ufsc.br)

***Mais vale gastar-se que enferrujar-se***

*Autor anônimo*

*Ao Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante  
Lima Filho por toda sua dedicação a esta  
dissertação como orientador, professor e  
amigo, ou simplesmente Hermênio pelo nosso  
verdadeiro amor.*

*As minhas filhas Mariana e Isabel*

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial aos meus pais, **José Almada de Souza** (*in memoria*) e **Arcilia Canzi Almada de Souza**.

A **Dra. Lismary Mesquita, Dra. Sívía Córdoba Ferreira, Dr José Caldeira Bastos, Dra. Anelise Roskamp Budel, Dra. Maristela Vieira, Dr. João Nilso Zunino, Sra. Tânia Regina Tavares Fernandes e Leandro Spenelli** pelo suporte no desenvolvimento desta tese.

Aos amigos **Joel e Inês**.

# ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS .....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>X</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>21</b>
<b>MÉTODO.....</b>	<b>22</b>
<b>RESULTADOS. ....</b>	<b>26</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CD (Cluster of Differentiation) - Conjunto de diferenciação

DP - Desvio padrão

iNOS (Inducible nitric oxide synthetase) - Óxido Nítrico Sintetase induzida

FITC - Fluoresceína

FK506 - Tracolimus

Freon 12 - Diclorofluorometano

Freon 22 - Clorodifluorometano

FSC (Forward Scatter Counter) - Detector de dispersão frontal

IL - Interleucina

KEGF (Keratinocyte Endothelial Growth Factor) - Fator de crescimento de queratinócito endotelial

LBP (LPS binding protein) - Proteína de ligação de LPS

LPS (Lipopolysacaride) - Lipopolisacarídeo

MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) - Proteína quimioatraente de monócito -1

MIP - Departamento Microbiologia e Parasitologia

N<sub>2</sub>O - Óxido nitroso

NF-kappa B (Nuclear Factor – kappa B) - Fator Nuclear – kappa B

NO (Nitric Oxide) - Óxido Nítrico

ONOO<sup>-</sup> (Oxide Nitrate) - Óxido Nitroso

PE - Ficoeritrina

SSC (Side Scatter Counter) - Detector de dispersão lateral

TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) - Fator de necrose tumoral-alfa

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

UV - Ultra-violeta

UVB - Ultra-violeta – B

XO ( Xantine oxidase) - Xantina oxidase

PBS (Phosphate Buffered Saline) - Salina tamponada por fosfato

## LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

<b>Tabela I:</b> Criógenos usados em criocirurgia .....	11
<b>Figura 1:</b> Análise por regressão múltipla dos valores de celularidade do exsudato da bolsa de ar subcutânea obtidos a partir da contagem pela câmara de Neubauer e citômetro de fluxo. ....	27
<b>Figura 2:</b> Resultado da citometria de fluxo de uma amostra de exsudato da cavidade da bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos a crioterapia.....	29
<b>Figura 3:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 0 hora após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	31
<b>Figura 4:</b> Curso da infiltração celular na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	33
<b>Figura 5:</b> Curso da infiltração de granulócitos na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	35
<b>Figura 6:</b> Curso da infiltração de linfócitos na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	37
<b>Figura 7:</b> Curso da infiltração de macrófagos na bolsa de ar subcutânea no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	39
<b>Figura 8:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 3 horas após crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	42
<b>Figura 9:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 6 horas após crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	43
<b>Figura 10:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 12 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	44

<b>Figura 11:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 24 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	45
<b>Figura 12:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 48 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	46
<b>Figura 13:</b> Resultado da celularidade relativa no ponto de 72 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.....	47
<b>Figura 14:</b> Cinética da proporção celular da concentração de granulócitos.....	48
<b>Figura 15:</b> Cinética da proporção celular da concentração de linfócitos.....	49
<b>Figura 16:</b> Cinética da proporção celular da concentração de macrófagos.....	50
<b>Figura 17:</b> Estrutura histopatológica normal da pele da orelha de camundongo (300 X).....	52
<b>Figura 18:</b> Evolução histopatológica da pele após a crioterapia (300 X).....	53
<b>Figura 19:</b> Evolução histopatológica da pele após a crioterapia (3000 X).....	54

## RESUMO

O desenvolvimento de um novo modelo de estudo da resposta inflamatória induzido pela crioterapia, foi descrito. Nitrogênio líquido em jato foi aplicado sobre uma bolsa de ar subcutânea na pele normal do dorso de camundongos da linhagem suíça, para estudar a cinética da migração celular da resposta inflamatória induzida pelo processo; o exsudato inflamatório do interior da bolsa de ar foi retirado 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas depois da crioterapia; as quantidades de células leucocitárias e subpopulações foram medidas usando-se citometria de fluxo. O mesmo procedimento foi feito na orelha, e análise histopatológica realizada nos mesmos pontos para comparação. A contagem de leucócitos no exsudato foi mais alta entre os pontos de 12 e 24 horas. O infiltrado foi predominantemente granulocítico nas primeiras 12 horas. Um infiltrado mononuclear, inicialmente correspondendo a aproximadamente 20% do total, evoluiu progressivamente, atingindo valores em torno de 50% na 48<sup>a</sup> e 72<sup>a</sup> hora após a crioterapia. Achados semelhantes foram observados no estudo anatomopatológico das amostras a partir das orelhas dos camundongos. Concluiu-se, portanto, que o infiltrado celular induzido pelo modelo da crioterapia, utilizado no presente trabalho, foi predominantemente granulocítico e induz uma inflamação aguda persistente por 72 horas.

## SUMMARY

The development of a novel study model of inflammation caused by cryotherapy was described. Liquid nitrogen jets were applied on subcutaneous air pouch done under the dorsal normal skin of Swiss mice strain to study the kinetic of inflammatory cellular migration. Inflammatory exudate from the air pouch was retrieved at 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours after cryotherapy. White blood cell and subpopulations counts were measured in the exudate using flow cytometry. The same technique was performed at the mice ear and histopathological study done at the same temporal points to compare with the dorsal data. White blood cell levels in the exudate were the highest for the treated group at 12 and 24 hours. Granulocytes predominate in the first 12 hours. The mononuclear cells were 20% of the total at the initial points. They progress to 50% in the last 2 points of analysis. Similar results were obtained from the ear histopathological study. We conclude that the cellular inflammatory response to the model used in the present work cryotherapy was largely formed by granulocytes and induce a persistent acute inflammation, which was observed until 72 hours after the procedure.

# INTRODUÇÃO

O tratamento cirúrgico das lesões benignas e malignas da pele indica que a dermatologia é não só uma especialidade clínica mas também cirúrgica. Alguns dermatologistas hoje dedicam muito tempo e estudo aos procedimentos cirúrgicos da especialidade, embora a maioria ainda se restrinja a procedimentos simples de cirurgia dermatológica <sup>1</sup>. Em países desenvolvidos o treinamento cirúrgico é obrigatório, bem como nos serviços de dermatologia credenciados pela Sociedade Brasileira de Dermatologia. Alguns estudos evidenciam que a carga de trabalho envolvendo procedimentos cirúrgicos de um dermatologista pode chegar a 50% .

O arsenal cirúrgico de um dermatologista inclui técnicas excisionais e não excisionais. Dentre essas últimas encontram-se a criocirurgia, a curetagem, a eletrocirurgia, e a cirurgia a laser <sup>2</sup>. Dessa forma, atualmente o dermatologista precisa de capacidade diagnóstica apurada e habilidade para julgar quais dos possíveis tratamentos cirúrgicos é adequado a um determinado tipo de lesão <sup>3</sup>.

A criocirurgia/crioterapia é uma técnica cirúrgica baseada no frio, baseada no congelamento dos tecidos <sup>4</sup>. O frio tem sido uma terapêutica suplementar importante na medicina. Os egípcios, 2500 A.C., usaram-no para tratar feridas e inflamação <sup>5</sup>. Hipócrates, o Pai da Medicina, usou o frio para aliviar a dor de feridas e algumas doenças. O barão Dominique Jean Lorrey usou frio para parar as hemorragias decorrentes de amputações, durante a retirada de Napoleão de Moscou <sup>6</sup>. Arnott, médico londrino, usando uma solução de salmoura, na qual as temperaturas eram reduzidas para -24°C, tratou neuralgia com esse método, bem como o usou como paliativo nas dores de pacientes terminais de câncer <sup>1</sup>.

A criocirurgia na área dermatológica se desenvolveu de maneira importante no final do século passado, quando White, usando um aplicador com ponta de algodão resfriado com ar liquefeito, tratou com sucesso verrugas vulgares, ceratoses e cânceres cutâneos. Dióxido de carbono foi inicialmente utilizado como o principal criógeno <sup>7</sup>. Mais tarde, em 1948, Alington introduziu o nitrogênio líquido aplicado com cotonete na prática médica. Mais tarde, Zacarian aperfeiçoou o sistema de jatos de nitrogênio líquido, desenvolvido por Whitehouse em 1907, utilizando uma haste de cobre. Torre, outro

dermatologista americano, desenvolveu um instrumento de cobre para criocirurgias neurais, iniciando a expansão da criocirurgia para outras áreas da medicina <sup>8</sup>. A aplicação da criocirurgia está presente na neurocirurgia, oncologia, ginecologia, urologia e oftalmologia <sup>9</sup>.

Simplificadamente, a criocirurgia poderia ser comparada a uma queimadura pelo frio, só que de maneira controlada. É uma técnica de remoção de calor dos tecidos pela aplicação do frio. Essa retirada de calor, dependendo da intensidade, pode produzir um pouco de dor, vermelhidão na pele e edema; descamação em pequena quantidade pode ocorrer nos dias seguintes à aplicação. Em maior grau de intensidade, pode produzir congelamento profundo e bolha <sup>10</sup>. Uma exposição prolongada pode levar a vasoconstrição definitiva, seguida de necrose e conseqüentemente amputação do órgão lesado, o que explica a perda, parcial ou completa de estruturas anatômicas de extremidades por alpinistas quando expostos ao frio excessivo <sup>11</sup>. Entretanto, na criocirurgia, o que se desenvolveu foi a capacidade de controlar a área atingida e o grau de necrose resultante, para o tratamento de doenças nas diversas áreas médicas <sup>12</sup>.

Com relação aos agentes utilizados nas criocirurgias, a maioria dos criocirurgiões utilizam nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>), substância amplamente disponível no mercado, com baixo custo, de fácil armazenamento, fácil de usar e de ação rápida <sup>13</sup>. Outros criógenos utilizados são o freon 12, o freon 22, o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) sólido, o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) líquido e o hélio líquido (**Tabela 1**) <sup>14</sup>. Como o criógeno de temperatura de ebulição mais baixa causa destruição mais profunda, os freons e o óxido nitroso só são utilizados para anestesia tópica e destruição superficial. O nitrogênio líquido é o único agente confiável para destruição profunda.

**Tabela I – Criógenos utilizados em criocirurgia (adaptado do livro Fitzpatrick Dermatological Secrets, 1996, p. 327)**

<i>CRIÓGENO</i>	<i>PONTO DE EBULIÇÃO (°C)</i>
Nitrogênio líquido	-195,8
Óxido nitroso (N <sub>2</sub> O), líquido.	-89,5
Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) sólido	-78,5
Clorodifluorometano (freon 22)	-40,8
Diclorofluorometano (freon 12)	-27,8

Outro aspecto marcante da criocirurgia é o custo do procedimento. Comparada a outras técnicas cirúrgicas, a quantidade de equipamento necessário para realizar uma criocirurgia é modesta <sup>15</sup>, na maioria das vezes apenas um reservatório para nitrogênio líquido e um pequeno aparelho para aplicação, o qual permite produzir jato direcionado do nitrogênio líquido quando este entra em ebulição e controlar a intensidade do jato. Também podem ser utilizados pequenos aplicadores de madeira com um cotonete na extremidade, o qual, quando embebido no nitrogênio, pode ser aplicado diretamente na lesão. Existem, ainda, vários outros acessórios que podem ser utilizados na criocirurgia: aplicadores de metais podem ser acoplados a garrafas de aplicação, cones de neoprene e termômetros intradérmicos <sup>16</sup>. A criocirurgia de lesões benignas dispensa anestesia. Entretanto, em lesões malignas, é quase sempre necessária a anestesia infiltrativa, podendo ser usada eventualmente anestesia tópica <sup>9</sup>.

Com relação às formas de aplicação dos criógenos, elas são muitas. *Swabs* de vários tamanhos podem ser imersos no nitrogênio e depois utilizados por contato para congelar a lesão alvo. Quanto maior o *swab* maior o efeito e mais rápida e profunda a região será congelada. Essa técnica não é própria para tratar doenças malignas <sup>17</sup>. Além do mais, é aconselhável usar um aparato exclusivo para cada paciente, para evitar possível contaminação com vírus <sup>18</sup>.

A técnica em jato serve-se de garrafas térmicas modificadas que permitem ao nitrogênio líquido se expandir através de um orifício de saída, pela alta pressão do líquido em ebulição, a  $-195,8^{\circ}\text{C}$ . O grau de congelamento é determinado pelo tamanho do orifício de saída do nitrogênio, pela pressão interna da garrafa, pela distância da lesão e pelo tempo de aplicação do congelamento <sup>19</sup>. Esse método, mais indicado para tratar lesões extensas, permite que o reservatório seja utilizada até seu esvaziamento, sem preocupante perigo de

contaminação<sup>20 21</sup>. Os cones de neoprene podem ser úteis para delimitar o sítio de aplicação<sup>22</sup>. São muito utilizados acessórios metálicos resfriados pela circulação interna de nitrogênio e aplicados sobre as lesões; também chamados de *probes*, são geralmente do tamanho das lesões, mas podem ser utilizados em lesões extensas, em múltiplas aplicações. Os *probes*, entretanto, são mais lentos na sua efetividade, permitindo o processo de contaminação cruzada. São melhor indicados para o tratamento de lesões superficiais<sup>23,24</sup>.

Lesões malignas e benignas podem ser tratadas pela criocirurgia<sup>25</sup>.

As lesões dermatológicas benignas mais comumente tratadas são as verrugas<sup>26</sup>, as ceratoses actínicas<sup>27</sup>, as ceratoses seborréicas<sup>28</sup>, e o molusco contagioso<sup>29</sup>. Outras lesões benignas tratadas são a acne<sup>30</sup>, o lentigo simples<sup>31</sup>, a queilite actínica<sup>32</sup>, o granuloma piogênico<sup>33</sup>, o dermatofibroma<sup>34</sup>, a cicatriz hipertrófica e o quelóide<sup>35</sup>.

Com relação à técnica de tratamento das lesões benignas, o conceito básico de toda criocirurgia é que a quantidade de congelamento além da lesão (expansão lateral) é igual à profundidade de congelamento<sup>36</sup>. Por exemplo, congelamento de 1-2 mm além da margem irá corresponder a uma profundidade de 1-2 mm. Essa profundidade é adequada para a maioria das lesões benignas. Entretanto para as verrugas, devido à hiperqueratose resultante da lesão, pode ser feito congelamento mais profundo ou rápidos congelamentos, múltiplas vezes. A ceratose seborréica pode ser congelada rapidamente e curetada suavemente em seguida. O mais importante é, para lesões benignas, não causar cicatriz, por isso, se prefere tratamento menos eficaz e repetido até a resolução do problema<sup>37</sup>.

A criocirurgia não se resume, como mencionado anteriormente, no tratamento de lesões benignas. O carcinoma basocelular<sup>38</sup>, o carcinoma espinocelular<sup>39</sup>, o ceratoacantoma<sup>40</sup>, a doença de Bowen<sup>41</sup>, o lentigo maligno<sup>42</sup>, o sarcoma de Kaposi<sup>43</sup>, e lesões metastáticas de diversas origens<sup>44</sup> são lesões malignas tratadas com a criocirurgia<sup>45</sup>.

Em se tratando de cânceres, o mais importante é ter certeza que eles serão completa e, portanto, adequadamente tratados. Antes de tudo é importante uma avaliação anatomopatológica para se ter certeza que a criocirurgia é apropriada para o tipo de câncer; outro ponto relevante é delimitar completamente a lesão, identificando a sua margem; finalmente, o tratamento correto de lesões malignas só pode ser realizado com equipamentos que induzam congelamento de -50 a -60°C além das margens laterais e profundas do tumor, congelamento esse melhor obtido com o nitrogênio líquido<sup>45</sup>.

Muitos criocirurgiões utilizam dois ciclos ou mais de congelamento para assegurar a destruição do tumor. A técnica mais eficiente compreende um congelamento rápido,

seguido de um lento descongelamento. Múltiplos congelamentos rápidos produzem mais dano que um congelamento longo <sup>46</sup>.

O tempo de aplicação é variável, mas existe alguma indicação geral. Para lesões malignas, aplicações menores de 45 segundos não são usadas, pelo risco de ineficácia. A maioria das técnicas prevêem aproximadamente 1 minuto de congelamento para tratamentos mais efetivos. Alguns criocirurgiões, inicialmente, curetam ou cortam superficialmente os tumores, principalmente quando profundos ou de limites imprecisos, para delinear a lesão ou expô-la para tratamento <sup>47,48</sup>.

O tratamento do câncer cutâneo por criocirurgia não é aceito por todos os dermatologistas. Geralmente, dermatologistas mais propensos a procedimentos cirúrgicos acreditam que há necessidade de demonstração da margem cirúrgica livre após o tratamento em lesões mais agressivas <sup>49</sup>. Entretanto criocirurgiões argumentam que tais medidas são desnecessárias, uma vez que a taxa de cura da criocirurgia é comparável à de outros métodos. Criocirurgiões experientes que tratam muitos cânceres descrevem taxas de cura de 95-98% para carcinomas basocelulares primários. Tais taxas são idênticas àquelas da cirurgia excisional e da radiação <sup>50-52</sup>.

Além das indicações clínicas, a criocirurgia tem outras vantagens: oferece anestesia parcial das lesões a serem tratadas e pode ser usada para múltiplas lesões em uma só aplicação; é o método de escolha para pacientes com distúrbios de coagulação e idosos que não podem se deslocar para centros cirúrgicos; e evita a contaminação do material com papiloma vírus humano e com o vírus da imunodeficiência humana. Por essas razões, esse eficiente, efetivo e econômico método é extensamente usado pelos dermatologistas para o tratamento de lesões cutâneas <sup>32, 53-56</sup>.

Há, porém, contra-indicações ao método: não devem ser submetidos a criocirurgia pacientes com patologias associadas ou acentuadas com o frio, entre elas a crioglobulinemia, a criofibrinogenemia, a urticária induzidas pelo frio e a doença de Raynaud; pacientes com padrão cutâneo melanodérmico devem ser tratados com cuidado, uma vez que tendem a formar cicatrizes hiperpigmentadas ou hipopigmentadas <sup>55,57</sup>.

Além das contra-indicações formais citadas acima, existem complicações derivadas do processo de criocirurgia, algumas imediatas, outras tardias. Geralmente não são severas, mas causam desconforto. Logo após a criocirurgia, formam-se edema, bolha e seqüencialmente crostas, e a lesão é deixada para cicatrizar por segunda intenção; esta cicatrização dura aproximadamente 1-6 semanas, dependendo da profundidade e do tempo do procedimento. Pode ocorrer efeito vaso-vagal em alguns pacientes, daí por que a técnica

deve ser realizada, sempre que possível, com o paciente deitado. Complicações tardias são incomuns e incluem infecções, cicatrizes hipertróficas, granuloma piogênico e danos nervosos, resultando em anestesia e parestesia, geralmente transitórias. Os folículos pilosos e os melanócitos são mais sensíveis que outras estruturas ou células da pele aos efeitos da criocirurgia. Conseqüentemente, a criocirurgia pode levar a alopecia e hipocromia como complicações tardias <sup>58-61</sup>.

Uma grande questão surge quando do estudo da criocirurgia: Como a criocirurgia trata as lesões?

O mecanismo de morte celular após a criocirurgia não é completamente entendido <sup>62</sup>. Vários fatores estão envolvidos, incluindo necrose resultante de dano mecânico causado pelos cristais de gelo intra e extracelulares produzidos pelo congelamento <sup>63</sup>. O gradiente de concentrações hidro-eletrolíticas entre os tecidos não congelados e os tecidos em descongelamento também participa desse processo <sup>62</sup>. Além do mais, a vasoconstrição resultante do frio causa anóxia tecidual e morte celular <sup>64,65</sup>. Finalmente, com a participação do processo inflamatório, que leva à cicatrização, a cura se inicia <sup>66</sup>.

Estudos de histopatologia da pele tratada com criocirurgia evidenciaram que o processo de cicatrização se inicia muito precocemente, dentro dos primeiros 30 minutos de congelamento: as células mostram um núcleo picnótico e um citoplasma vacuolado com edema e granulação grosseira. Em seguida, o dano vascular é seguido de edema e exsudato predominantemente leucocitário de polimorfonuclear. A resolução começa aproximadamente 3 dias depois <sup>67,68</sup>.

Portanto a inflamação resultante da crioterapia é o mesmo processo fisiológico pelo qual todos os tecidos vascularizados respondem ao dano <sup>69</sup>. Durante o processo inflamatório, mediadores solúveis e componentes celulares trabalham juntos, de modo sistemático, na tentativa de eliminar as células destruídas fisicamente. Assim, a inflamação parece claramente crucial para o efeito final da crioterapia <sup>68</sup>. Entretanto, quando pobremente controlado, o processo inflamatório pode resultar em destruição extensa de tecido saudável <sup>70</sup>. Por isso, prevalece na crioterapia, o conceito de inflamação como uma faca de dois gumes. Daí por que é necessário entender o processo inflamatório na crioterapia.

No estudo da inflamação *per se*, são creditadas as primeiras observações do processo inflamatório a Cornelius Celsus, que, no primeiro século da era cristã, descreveu os sinais clínicos cardeais da inflamação. Os sinais rubor (vermelhidão), dolor (dor), calor (calor) e tumor (edema) permanecem. Outro contribuinte para esse campo foi John Hunter

(1793), o primeiro a apreciar inflamação como defesa do hospedeiro, e não como doença. Julius Cohnheim realizou as primeiras descrições microscópicas do processo inflamatório. Para a compreensão global do processo inflamatório, Paul Ehrlich contribuiu com as observações do papel dos anticorpos, e Elie Metchnikoff com as observações da fagocitose, ambos foram laureados com o prêmio Nobel em 1908. Mais recentemente, outras descobertas cruciais nessa área incluem a de Wright, que descreveu como as proteínas do plasma (opsoninas) revestem e marcam as substâncias estranhas para destruição por fagocitose, e de Vale e Laidlaw, que demonstraram o papel vasotivo da histamina. Na história recente, muitos investigadores contribuíram para o conhecimento dos mediadores inflamatórios solúveis conhecidos como citocinas, que regem quase todas as características de eventos da resposta inflamatória <sup>71</sup>.

Inflamação foi dividida tradicionalmente em respostas agudas e crônicas. A aguda é rápida, de pequena duração (minutos, até poucos dias), e relativamente uniforme para qualquer dano agudo; caracteriza-se por acúmulo de fluido, proteínas plasmáticas e leucócitos, principalmente neutrófilos, no sítio inflamatório. Em contraste, a inflamação crônica é de duração mais longa e inclui afluência de linfócitos e macrófagos e crescimento de fibroblastos para regeneração tecidual <sup>72</sup>.

Portanto, o dano celular causado pela crioterapia inicia uma série de eventos moleculares que produzem mediadores pró-inflamatórios solúveis, os quais resultam nos sinais físicos de inflamação, entre eles o fluxo de sangue aumentado, a permeabilidade vascular, a migração de leucócitos do sangue periférico nos tecidos, o acúmulo desses leucócitos no sítio inflamatório e a ativação dos leucócitos para destruir e, se possível, eliminar as células mortas da lesão tecidual. Mediadores adicionais secretados por leucócitos ativados podem servir para prolongar a resposta inflamatória por meios diretos e indiretos <sup>73</sup>.

Quando o tecido lesado é eliminado, mediadores antiinflamatórios permitem a parada do processo <sup>74</sup>, o que evita dano desnecessário e excessivo para os tecidos normais do foco inflamatório. Em outros processos agudos que originam inflamação provocados por patógenos (p. ex., bactérias, vírus, parasitas), corpos estranhos exógenos (p. ex., amianto) ou endógenos (p. ex., cristais de urato, complexos imunes), ou por agentes físicos (por exemplo; queimaduras) ou substância química (p. ex., agentes cáusticos) se a inflamação resulta em eliminação e/ou destruição só incompleta do agente, o processo inflamatório persiste e amplia seu repertório de mediadores solúveis e componentes celulares, evoluindo para uma inflamação crônica <sup>75, 76</sup>.

Estudando a resposta inflamatória, é importante verificar o modo pelo qual o processo inflamatório é iniciado, pois dele depende em parte o conhecimento da natureza e das particularidades da reação inflamatória. Patógenos podem iniciar inflamação por vários mecanismos distintos e idiossincráticos. Eles podem ativar os sistemas de proteases plasmáticas por interação com produtos de degradação e de secreção de toxinas e iniciar a resposta inflamatória. Em outras circunstâncias, as células lesadas podem lançar produtos de degradação que iniciam uma ou mais cascatas de proteases plasmáticas. Tais eventos podem, por sua vez, iniciar e/ou aumentar a expressão de citocinas pró-inflamatórias que disparam o processo inflamatório <sup>77-82</sup>.

Independentemente do agente causal, as principais mudanças fisiológicas que caracterizam a inflamação aguda são quatro: a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento e ativação de neutrófilos e febre <sup>83,84</sup>.

Vasodilatação, freqüentemente precedida por um período breve de vasoconstrição, é uma das respostas físicas mais precoces ao dano tecidual agudo. As arteríolas são as primeiras a ser envolvidas, seguidas pelos leitos capilares, o que resulta em aumento líquido do fluxo de sangue; o fluxo de sangue aumentado produz em calor característico e vermelhidão (calor e rubor) presentes no foco inflamatório agudo <sup>85-87</sup>.

Em condições normais, as células endoteliais vasculares funcionam como uma membrana semipermeável e restringem as proteínas plasmáticas para o espaço intravascular. Em resposta a estímulos inflamatórios, células endoteliais das vênulas se contraem, e alargam as junções intercelulares para produzir espaços que permitem a passagem de proteínas plasmáticas para os tecidos (tumor). Danos mais severos podem ser associados com necrose das células endoteliais e vazamento descontrolado de proteínas para as células do sangue <sup>88-90</sup>.

Uma das respostas iniciais, crucial na maioria das inflamações agudas, é o recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos, da circulação sangüínea para o foco de atividade inflamatória. O primeiro passo observado nesse processo é a marginação, quando os neutrófilos parecem rolar ao longo da periferia dos vasos sanguíneos; aos quais aderem em seguida. A partir deste ponto, os neutrófilos migram para os tecidos, passando pelas células endoteliais e pela membrana basal. Após a migração por influência de agentes quimiotáticos solúveis, essas células são direcionadas para o local de inflamação, onde se acumulam para formar o exsudato inflamatório conhecido como "pus". Nesse local, os neutrófilos ingerem e digerem o agente inicial da inflamação, quer célula morta, quer bactéria, quer corpo estranho <sup>91</sup>.

A febre permanece como um dos aspectos mais pobremente conhecidos das respostas inflamatórias agudas. Agentes indutores de febre, conhecidos como pirógenos, são lançados de leucócitos em resposta a estímulos específicos, como endotoxina bacteriana. Os pirógenos agem no centro termorregulador do hipotálamo. Vários mediadores são implicados nesse processo, entre os quais a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e prostaglandinas. O calor local, induzido por vasodilatação, não é um dos sinais cardinais da inflamação <sup>92,93</sup>.

O processo inflamatório é iniciado, regulado e, em última instância, eliminado pelas ações coletivas dos mediadores da inflamação <sup>94</sup>. Alguns desses mediadores existem em forma inativa e são ativados por produtos de inflamação aguda; outros são sintetizados e/ou lançados de fontes celulares, também em resposta aos produtos de inflamação aguda, ou através de outros mediadores inflamatórios solúveis <sup>95</sup>. Podemos listar como mediadores inflamatórios as proteases plasmáticas (p. ex., as cininas e o complemento), os mediadores derivados do ácido aracônico (p. ex., as prostaglandinas e os leucotrienos), aminas e peptídeos (p. ex., a histamina), neuropeptídeos (p. ex., substância P), óxido nítrico, e citocinas pró-inflamatórias (p. ex., IL-1, IL-6) <sup>96-99</sup>. Vários sistemas experimentais têm estudado a importância dos mediadores inflamatórios nos processos inflamatórios. Tais estudos mostraram a redundância dos mediadores inflamatórios e a importância temporal do aparecimento e desaparecimento dessas no foco inflamatório <sup>100-102</sup>.

Alguns autores argumentam que a cascata de fatores inflamatórios solúveis tem o objetivo de recrutar células inflamatórias para o local de origem do processo inflamatório. O acúmulo de células inflamatórias, um dos eventos centrais no processo inflamatório, é iniciado pelos fatores inflamatórios quimiotáticos que se ligam às células e transduzem a resposta de motilidade para o interior da célula, que frequentemente é direcionada para o gradiente positivo do fator quimiotático <sup>89, 103-105</sup>. Dessa forma, a migração celular seria uma resposta à cascata de fatores pró-inflamatórios e conseqüentemente um reflexo desses fatores. Neutrófilos, eosinófilos e macrófagos são células cuja capacidade de motilidade apresenta características semelhantes <sup>106-108</sup>. Os linfócitos também são células móveis que, entretanto, não respondem à maioria dos fatores que agem nos polimorfonucleares e macrófagos <sup>109, 110</sup>. Vale a pena lembrar que os eventos associados à fagocitose são similares à quimiotaxia <sup>111-113</sup>.

Com relação especificamente ao papel de cada célula, os neutrófilos estão entre as células mais importantes na resposta inflamatória aguda. Eles respondem aos mediadores inflamatórios através da migração, fagocitose e destruição dos fatores indutores da

inflamação. Esse último aspecto acaba por resultar em resolução da inflamação, reparo tecidual e restauração da homeostase<sup>114-116</sup>. Outras células são recrutadas e participam do processo inflamatório, entre elas encontram-se os eosinófilos, os linfócitos e os monócitos/macrófagos; com relação a essas células, os eosinófilos são também recrutadas para os sítios inflamatórios em resposta a reações alérgicas do trato respiratório, do trato gastrointestinal e cutâneas ou a infecções helmínticas; os linfócitos desempenham seu papel na inflamação aumentando a resposta de neutrófilos; além do mais, produzem muitos fatores pró-inflamatórios; os macrófagos complementam a função dos neutrófilos na resposta aguda, entretanto têm ação principal na inflamação crônica<sup>116-122</sup>.

Um conceito que só foi apreciado recentemente é a resolução da resposta inflamatória, atualmente uma área de pesquisa ativa; ela é o modo pelo qual a resposta inflamatória aguda é reduzida; e se inicia após a retirada do fator indutor da inflamação. Entre os fatores envolvidos na resolução da resposta inflamatória aguda podem ser incluídos a apoptose, os mediadores antiinflamatórios, o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenocortical e a angiogênese. A principal importância desses fatores se deve ao fato de que eles podem ser mobilizados, em última instância, como agentes terapêuticos, limitando os aspectos prejudiciais de inflamação aguda<sup>74, 87, 123</sup>.

Em resumo, a crioterapia, como qualquer agressão à homeostase do organismo ou mais particularmente da pele, induz uma resposta inflamatória caracterizada pela produção de citocinas induzindo recrutamento de células inflamatórias para contenção da invasão tecidual por microorganismos e limpeza do tecido morto.

O conhecimento dos eventos celulares durante a criocirurgia pode otimizar a eficiência do tratamento e reduzir os efeitos colaterais do procedimento. O desenvolvimento de um modelo experimental para estudo do processo inflamatório na criocirurgia, portanto, é uma ferramenta importante na pesquisa dessa técnica. Ela objetiva, principalmente (1) providenciar dados sobre o mecanismo do seu funcionamento (2) e uma base racional para estudos experimentais e clínicos da criocirurgia e (3) confirmar os efeitos já demonstrados pela atuação prática de médicos e pesquisadores dessa técnica cirúrgica.

Esta dissertação tem como objeto de estudo a criocirurgia como modalidade cirúrgica diferente da excisional, no âmbito do seu aspecto reacional e inflamatório. Diferente, portanto, das questões puramente técnicas ou de habilidade cirúrgica tratada em outros estudos.

# OBJETIVOS

## **Objetivo Geral:**

Constitui o objetivo deste trabalho a avaliação da cinética celular na resposta inflamatória induzida pela crioterapia experimental na pele normal de camundongos da raça suíça, com base nas diferentes populações leucocitárias coletadas em bolsas de ar subcutâneas e analisadas por citometria de fluxo.

## **Objetivos Específicos:**

1. Comparar método tradicional de contagem celular por Câmara de Neubauer com a utilização da citometria de fluxo;
2. caracterizar a celularidade nas bolhas de ar induzidas em camundongos não criotratados para comparar com os submetidos à crioterapia;
3. Correlacionar os dados das alterações celulares conseqüentes de bolhas subcutâneas e crioterapia com dados histopatológicos.

# MÉTODO

Realizaram-se os experimentos no Laboratório de Imunologia do Departamento Microbiologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e no Setor de Citometria de Fluxo do Laboratório Médico Santa Luzia.

## **Animais experimentais**

Fêmeas de camundongos da raça suíça com 4 a 10 semanas de vida foram usadas em todos os experimentos. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC com quatro semanas de vida e acondicionados no Biotério do Laboratório de Imunologia do MIP, tendo acesso a ração e água (*ad libitum*) até sua utilização.

## **Preparação dos animais para o procedimento**

Todos os animais foram previamente submetidos a anestesia geral com dose intraperitoneal de 2,5 mg de cloridrato de cetamina. Após a indução anestésica, raspava-se o seu dorso no local onde se realizaria o procedimento e, com uma seringa estéril descartável e uma agulha 30G, ali se injetavam 2 ml de ar, para formação de uma bolha subcutânea onde se coletariam as células inflamatórias durante o experimento.

## **A crioterapia**

Simulou-se a crioterapia utilizando uma garrafa da marca CRY-AC<sup>®</sup> com ponteira do tipo C. Após o enchimento da garrafa com nitrogênio líquido, ele foi aplicado diretamente sobre as bolsas de ar subcutâneas. A aplicação ocorreu na forma de jato contínuo por 15 segundos. Empregou-se um tronco de cone oco de neoprene, com diâmetro de 1 cm em contato com a pele, com a finalidade de concentrar o jato de

nitrogênio no local especificado. Usou-se o topo do cone como distância fixa de aplicação do jato. Os animais do grupo controle não foram submetidos a crioterapia.

Para os estudos de histopatologia realizados nas orelhas dos animais, reproduziu-se o mesmo procedimento com redução do tempo para 10 segundos de aplicação. Ainda sob indução anestésica, um cone de 5 mm de diâmetro foi colocado no dorso da orelha, e a crioterapia realizou-se como mencionado anteriormente.

### **Estudo da cinética celular inflamatória nas bolsas subcutâneas**

Após a realização da crioterapia, procedeu-se à coleta das células inflamatórias presentes na bolha subcutânea, nos dois grupos experimentais, para análise da inflamação. O estudo constituiu-se de seis experimentos. Em cada experimento sacrificaram-se, por inoculação de dose letal de cetamina, dois animais por grupo — randomicamente selecionados —, nas 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas que se seguiram à formação da bolha no subcutâneo. Após o sacrifício, lavava-se a cavidade da bolha injetando 2 ml de uma solução contendo PBS, 50 U de heparina e 50  $\mu$ M de EDTA por mililitro. Seguindo o processo, movimentava-se cuidadosamente o animal para levar o líquido aos vários recessos da bolha. Realizava-se, então, nova punção com insuflação da cavidade peritoneal com 3 ml de ar, seguida da aspiração cuidadosa do conteúdo líquido. Transferia-se tal conteúdo para um tubo de ensaio, onde se anotava o volume de cada aspirado. Cada tubo recebia o aspirado dos dois animais correspondentes àquele ponto do estudo. Levavam-se os tubos à centrifugação por dez minutos a 1.500 rotações por minuto, correspondente a 300 x g. Desprezava-se o sobrenadante e procedia-se à solubilização das células em paraformaldeído a 2% (500  $\mu$ l). Armazenava-se a amostra em tubos para citometria, coberta por Parafilm®, e posteriormente levava-se à análise no citômetro de fluxo.

### **Determinação da concentração celular no exsudato inflamatório e correlação da concentração celular obtida pela contagem em câmara de Neubauer e por citometria de fluxo**

Previamente à realização da citometria, contou-se a celularidade de 20 amostras na câmara de Neubauer para correlação com os dados da citometria de fluxo. Em ambos os processos, a concentração celular do exsudato inflamatório foi determinada a partir do

volume do líquido obtido após a injeção de 2 ml: os valores obtidos após a ressuspensão em paraformaldeído a 2% foram divididos pelo volume do lavado da bolsa de ar. Assim, os dados da citometria ou da contagem de Neubauer foram corrigidos pelo volume obtido.

A contagem total da celularidade é tradicionalmente realizada por método manual com câmara de Neubauer. Neste estudo optou-se pela citometria de fluxo para consecução desse objetivo. Para tal, a concentração celular total do lavado de 20 amostras foi analisada simultaneamente pelos dois métodos. A concentração celular de cada amostra medida pela câmara de Neubauer foi correlacionada com a contagem de eventos totais obtidos da mesma amostra pelo citômetro de fluxo. Considerando-se o método de Neubauer como padrão, desenvolveu-se uma análise de regressão múltipla, das 20 amostras testadas, para correlacionar os dois métodos. Dessa análise determinou-se um índice de correlação dos valores, que corresponde à velocidade de leitura do citômetro de fluxo: Obteve-se um valor médio de 47,126  $\mu\text{L}/\text{min}$ . A correlação dos dados resultou em um  $R^2_{\text{ajustado}}=0,7746$   $\text{comp}=0,0308$ . Para efeito de descrição dos resultados, optou-se pelos valores obtidos a partir da citometria de fluxo.

### **Anticorpos para citometria de fluxo**

Anticorpos conjugados com fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina-R (PE) foram usados neste experimento. Anticorpos anti-CD45 (LCA, Ly-5) – FITC (PharMingen – Cat # 01114A); anti-CD3e (145-2C11) – FITC (PharMingen – Cat # 01085A) e anti-CD19 (1D3) – PE (PharMingen – Cat # 09655B) foram usados para análise das subpopulações celulares. O anticorpo anti-CD3e é um marcador de linfócitos T totais, o anti-CD19 um marcador de linfócitos B e o anti-CD45 um marcador de leucócitos.

### **Citometria de fluxo**

Para a análise das populações celulares, as amostras foram processadas através de análise utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur® (Becton e Dickinson Inc.) do Setor de Citometria do Laboratório Médico Santa Luzia. Ajustou-se o detector de dispersão dianteira (FS) em E00 e os de dispersão lateral (SS), FL1, FL2 e FL3 em 420, 150, 150 e 150V respectivamente. Definiu-se como limiar de FS e SS o valor 0. O padrão de dispersão de celularidade e granulosidade foi obtido e uma área total de coleta de dados estabelecida. A contagem de eventos em 15 segundos foi contabilizada em “high flow”.

Para análise das subpopulações celulares, marcou-se uma suspensão de células conforme seqüência abaixo, de acordo com o protocolo da PharMingen. Ressuspendeu-se um total de  $2 \times 10^6$  células em 200  $\mu$ l de solução salina tamponada. As células foram centrifugadas a 300 xg por 10 minutos e ressuspendidas em 50  $\mu$ l de solução salina, à qual foram adicionados 20  $\mu$ l de anticorpos específicos. Depois a solução foi deixada sobre gelo por 45 minutos. Usaram-se controles não-marcados, marcações com anticorpo e nas seguintes combinações: CD45 + CD19, CD3 + CD19. Em seguida as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em paraformaldeído a 2% (500  $\mu$ l) até a leitura. A análise foi feita em três pontos de estudo: 3, 24 e 72 horas.

Três áreas — correspondentes a linfócitos, granulócitos e macrófagos — foram estabelecidas com base nos resultados das marcações dos leucócitos, associados aos resultados de granulosidade e tamanho. As proporções celulares de cada subpopulação foram estabelecidas somando cada valor individualmente e o total dessa soma foi usado como divisor de cada valor numérico correspondente a cada tipo celular.

## **Histopatologia**

De cada ponto coletaram-se as orelhas de dois animais. Depois da fixação em formalina a 10%, os tecidos foram embebidos em parafina e cortados, obtendo-se várias secções, que foram coradas com hematoxilina e eosina. O estudo histopatológico centrado na intensidade da celularidade nas áreas de crioterapia foi realizado por microscopia óptica, com o auxílio da Dra. Lis Marie, da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

## **Análise estatística**

Os dados foram expressos no valor médio obtido de cada ponto experimental que alimentaram bancos de dados no Microsoft Excel 97<sup>®</sup>. A análise dos dados foi feita com auxílio do teste não-paramétrico de Wilcoxon - Matched Pair Test, do software Statistica<sup>®</sup> 6.0 (Stasoft Inc.), para amostras retiradas de populações independentes, considerando-se estatisticamente significativos valores de “p” menores ou iguais a 0,10 na análise dos dados pareados. Estudo de regressão múltipla foi realizado para análise de correlação.

# RESULTADOS

## 1- Determinação da celularidade do exsudato do lavado da bolsa de ar subcutânea

A contagem celular é tradicionalmente realizada por método manual com a câmara de Neubauer, porém resolveu-se investigar a possibilidade do uso da citometria de fluxo para esse objetivo. Para permitir o uso da citometria de fluxo no decorrer da tese, testou-se este método comparando-o com o da contagem na câmara de Neubauer da seguinte forma: a concentração celular total do lavado da bolsa de ar subcutânea de 49 amostras foi analisada simultaneamente pelos dois métodos. A concentração celular de cada amostra medida pela câmara de Neubauer foi correlacionada com a contagem de eventos totais obtidos da mesma amostra pelo citômetro de fluxo em 15 segundos. Considerando o método de Neubauer como padrão, desenvolveu-se uma análise de regressão múltipla das 38 amostras testadas, para correlacionar os dois métodos, determinando-se assim um índice de correlação dos valores que correspondem à velocidade de leitura do citômetro de fluxo.

Das 49 amostras, 5 foram considerados “out-liers” pelo programa. A partir das 44 restantes, a seguinte fórmula foi obtida:  $\text{Neubauer/ml} = 43200 + 71,101 \times \text{células do citômetro/15 segundos}$ . A correlação dos dados obtidos resultou em um  $R^2=0,7697$  com  $p<0,00001$  (**figura 1**). Considerando a boa correlação entre os dados, optou-se neste estudo por utilizar a celularidade obtida no citômetro por 15 segundos, uma vez que ela correspondia a valores na câmara de Neubauer em 76,97% das vezes com 95% de segurança.

## CORRELAÇÃO CITÔMETRO vs. NEUBAUER

$$\text{NEUBAUER/ml} = 43200 + 7,1108 * \text{CITÔMETRO/15 sec}$$

Correlation:  $r = 0,87738$

$R^2 = 0,76979805$

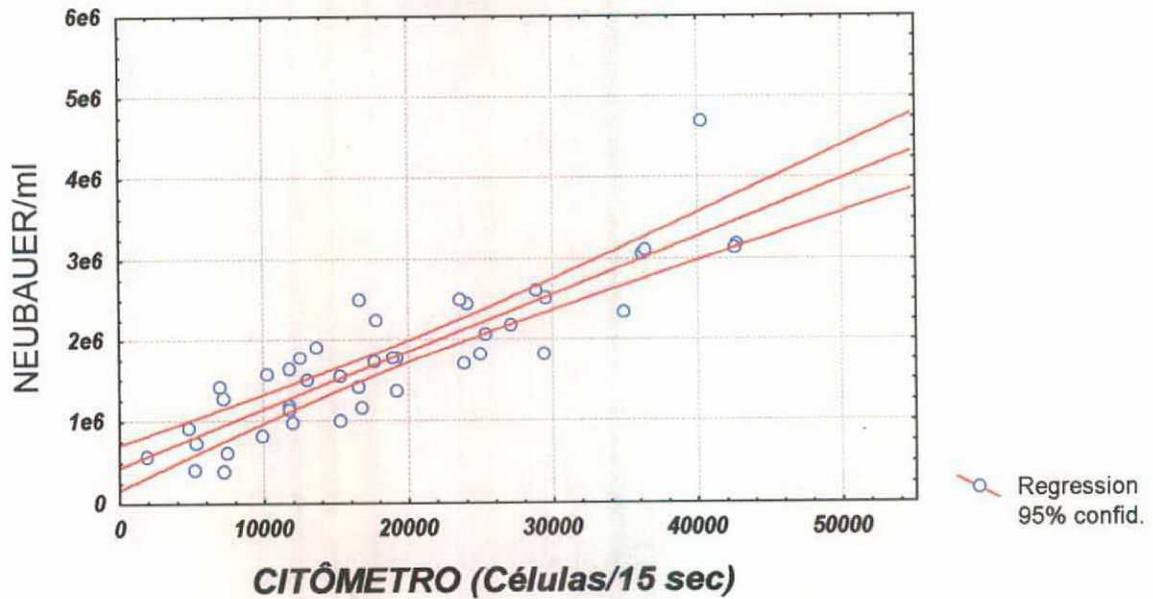


Figura 1: Análise por regressão múltipla dos valores de celularidade do exsudato da bolsa de ar subcutânea obtidos a partir da contagem pela câmara de Neubauer e citômetro de fluxo. Correlação  $R^2=0,769$  com  $p<0,000001$

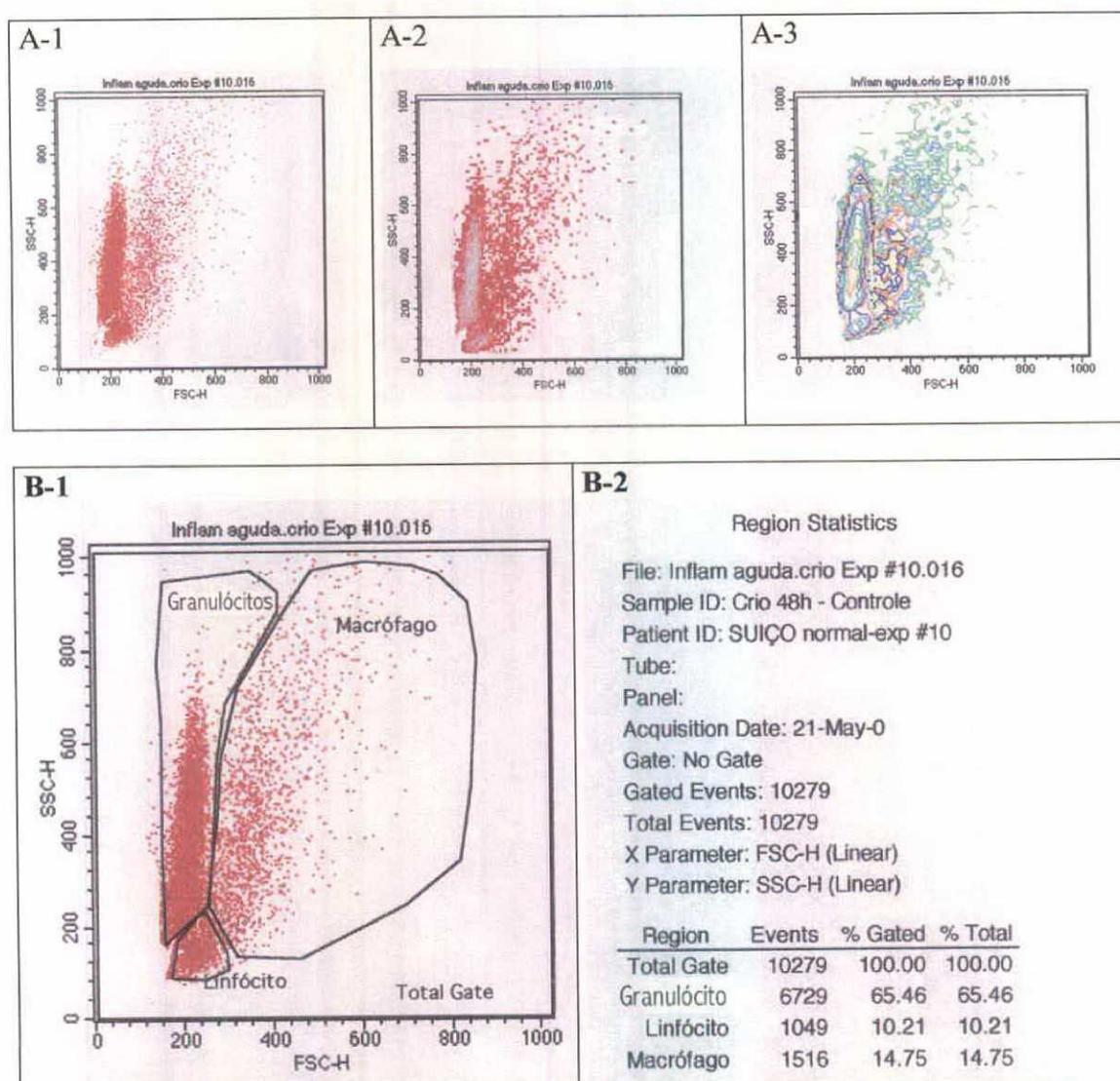
## 2- Caracterização das subpopulações celulares por tamanho e granulosidade confirmados pelos marcadores de superfície

Completamente ressuspensas, as células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo. A voltagem e a compensação para leitura foram feitas usando células não-coradas como controle.

Os resultados de FSC x SSC no citômetro de fluxo demonstraram a presença de três grupos de células (**figura 2 A-1, 2 e 3**). Esses acúmulos celulares estavam presentes tanto no grupo controle como no grupo experimental, e se mantinham presentes nos vários pontos de análise, com pouca variação nos padrões nas diferentes horas de estudo.

Foram estudados, então, os marcadores de superfície dessas células no grupo controle e no experimental, utilizando os marcadores acima listados, nos pontos de 0, 24 e 72 horas. Os quadrantes de marcação foram caracterizados com base nos controles negativos.

Os dados a partir de células marcadas com anti-CD45 identificam todas as células leucocitárias. Os três grupos de células marcavam positivamente para CD45, identificando todas como leucócitos. Entretanto o grupo com maior granulosidade e o outro com maior tamanho não foram marcados com anti-CD3 ou anti-CD19, marcadores de linfócitos T e B respectivamente. Um único grupo, o de menor granulosidade e tamanho, apresentou células marcadas com anti-CD3 e anti-CD19. A combinação dos dados acima obtidos indica que os três grupos de células podem, portanto, ser distribuídos em granulócitos, macrófagos e linfócitos (**figura 2B**). As regiões de análise assim estabelecidas foram utilizadas para os resultados mostrados a seguir.



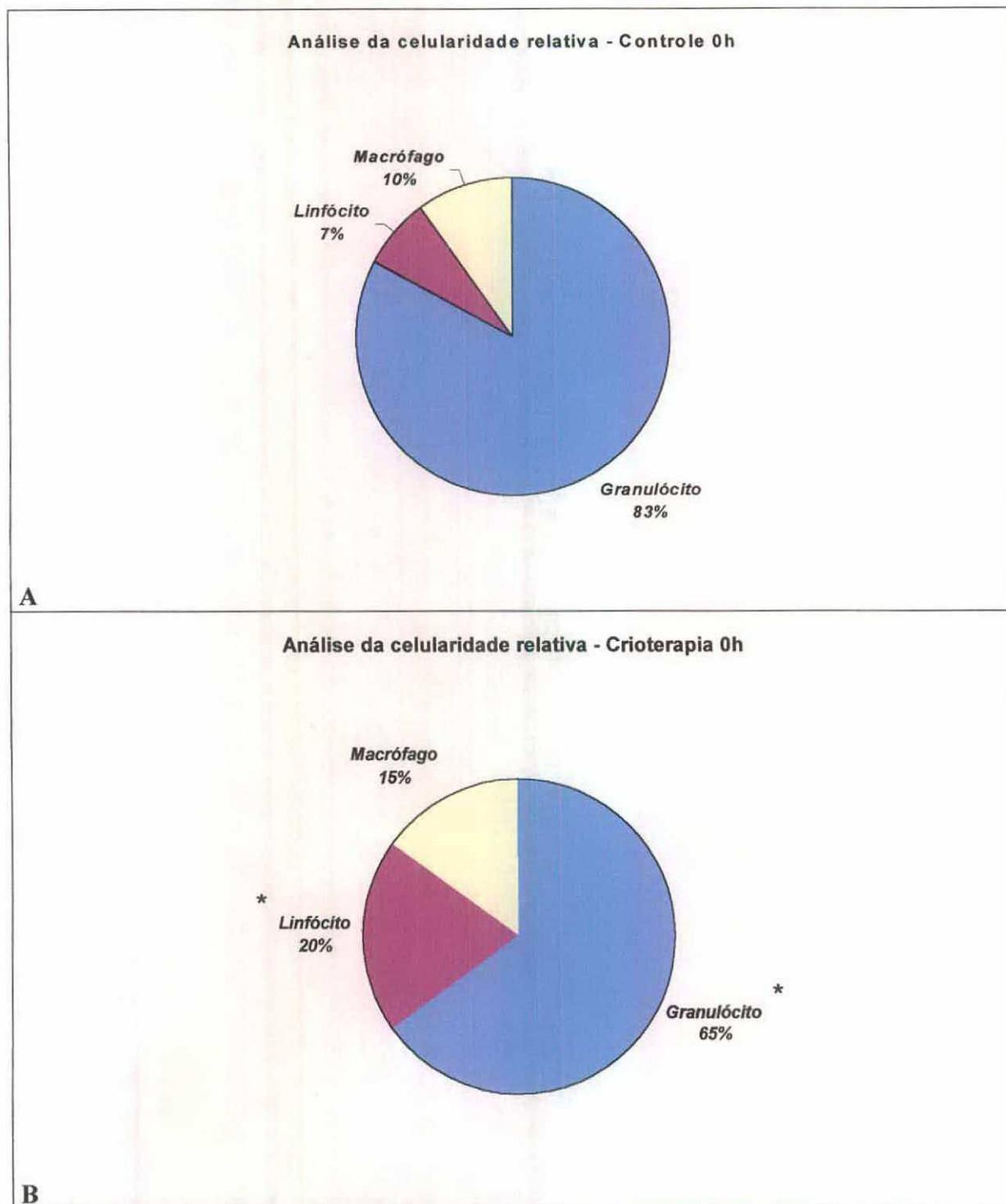
**Figura 2. Resultado da citometria de fluxo de uma amostra de exsudato da cavidade da bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos a crioterapia.** As células obtidas do exsudato foram analisadas por citometria de fluxo em 15 segundos contínuos. Os resultados observados são exemplo de como as determinações das subpopulações foram feitas. A figura 2 A-1 representa os dados individuais; a figura 2 A-2 representa os dados somados — a intensidade acumulativa é dada pelo tom cinza; a figura 2 A-3 representa os dados observados em termos de intensidade — cada curva de nível representa a intensidade ascendente do exterior para o interior. A figura 2 B-1 mostra as regiões de análise selecionadas, e a figura 2 B-2 seu resultado numérico.

### 3- Citologia da bolsa de ar logo após a sua formação

Camundongos da linhagem suíça foram anestesiados e uma bolha de ar subcutânea no dorso foi preparada com injeção de 2 ml de ar. Considerando a possibilidade de o procedimento, *per se*, induzir a vazão de células para o interior da cavidade, procedeu-se, por citometria de fluxo, ao estudo da celularidade no interior da bolsa, logo após a sua formação. Objetivou-se também adquirir dados das variações quantitativas no exsudato da bolha tratada com crioterapia ou não, tendo o conteúdo da bolha no ponto 0h sem crioterapia como padrão.

Para cumprir tal objetivo, optou-se inicialmente por caracterizar a população no ponto 0 hora dos camundongos não-criotratados, considerados grupo controle. Obteve-se uma média de 159 eventos totais em 15 segundos, com desvio padrão (DP) de 219 (n=6). Para tal valor, aplicando a fórmula anteriormente descrita, obtiveram-se  $4,42 \times 10^4$  células/ml. Adicionalmente, a partir dos dados agrupados na área de distribuição para granulócitos, linfócitos e macrófagos, obteve-se a proporção média das subpopulações celulares: 83% de granulócitos, 10% de linfócitos e 7% de macrófagos, para os seis animais (**figura 3-A**).

Observou-se, ainda, a concentração celular na bolha de ar logo após a crioterapia. Tentando avaliar o efeito imediato da aplicação de nitrogênio como indutor de destruição de vasos que pudessem levar ao extravasamento de sangue para o interior da bolsa de ar, encontrou-se o valor médio aproximado de  $4,44 \times 10^4$  células/ml. Assim, não se observou alteração significativa no número de células logo após a crioterapia; entretanto encontrou-se 65% de granulócitos, 20% de linfócitos e 15% de macrófagos. A população de mononucleares se altera, reduzindo, proporcionalmente, a de granulócitos. Tais resultados são estatisticamente significativos para a população de granulócitos e de linfócitos (**figura 3-B**).



**Figura 3. Resultado da celularidade relativa no ponto de 0 hora após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.** Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos, e o asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).

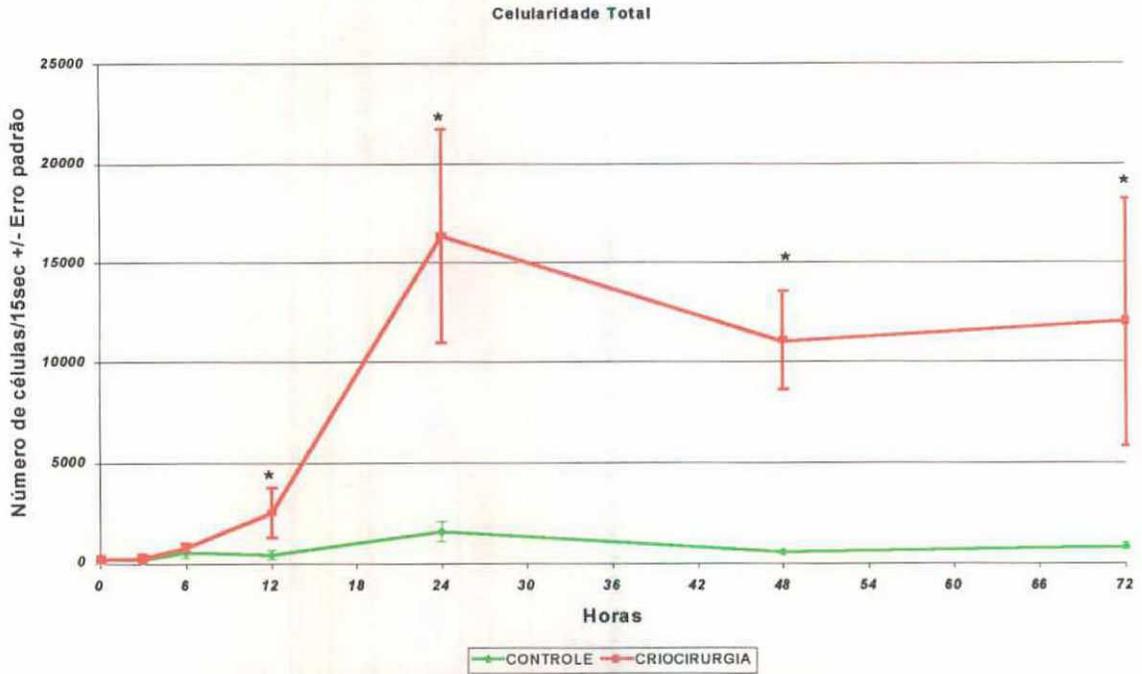
#### 4- Celularidade da bolha de ar subcutânea nos animais submetidos a crioterapia

Seguindo com o estudo, iniciou-se a análise cinética da modificação da celularidade da bolha de ar subcutânea dos camundongos submetidos a crioterapia, buscando compará-los aos controles com relação aos eventos totais, às subpopulações e às suas proporções nos diferentes pontos de observação. Na coleta dos dados utilizou-se citometria de fluxo para obter os valores absolutos da população leucocitária total e das subpopulações.

##### 4.1- Análise da celularidade total do exsudato inflamatório da bolha de ar subcutânea pós-crioterapia

A celularidade total da cavidade da bolha de ar subcutânea com 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a crioterapia se modificou durante o período nos dois grupos. Em todos os pontos estudados ocorreu aumento da celularidade do infiltrado inflamatório quando comparado ao primeiro ponto de análise (**figura 4**). Tal dado tornou-se significativo já na 3ª hora, quando para os dois grupos a concentração de células se mostrou significativamente diferente em relação ao ponto 0 (dados não demonstrados). Nas 6ª e na 12ª hora do estudo, embora tais diferenças já estivessem evidentes a partir do primeiro ponto de análise, observou-se maior incremento da celularidade no grupo que sofreu crioterapia, em relação ao grupo controle. Entretanto, tais dados não são estatisticamente significativos ( $p=0,24$  e  $0,07$ , respectivamente). A partir de então, na 24ª hora pós-crioterapia, a celularidade da cavidade tratada tornou-se significativamente maior; atingindo sua maior concentração; valores 10 vezes maiores que o controle ( $p=0,027$ ). Na 48ª hora após a crioterapia ocorre uma redução no número total de células em ambos os grupos ( $p=0,027$ ), embora a diferença absoluta suba para aproximadamente 20 vezes. A diferença significativa se mantém no último ponto de avaliação ( $p=0,046$ ), apesar de uma redução da diferença absoluta. Neste ponto, a concentração média de células nas bolsas tratadas com crioterapia é aproximadamente cinco vezes maior que nas bolsas controle (**figura 4**).

0.341.261-7



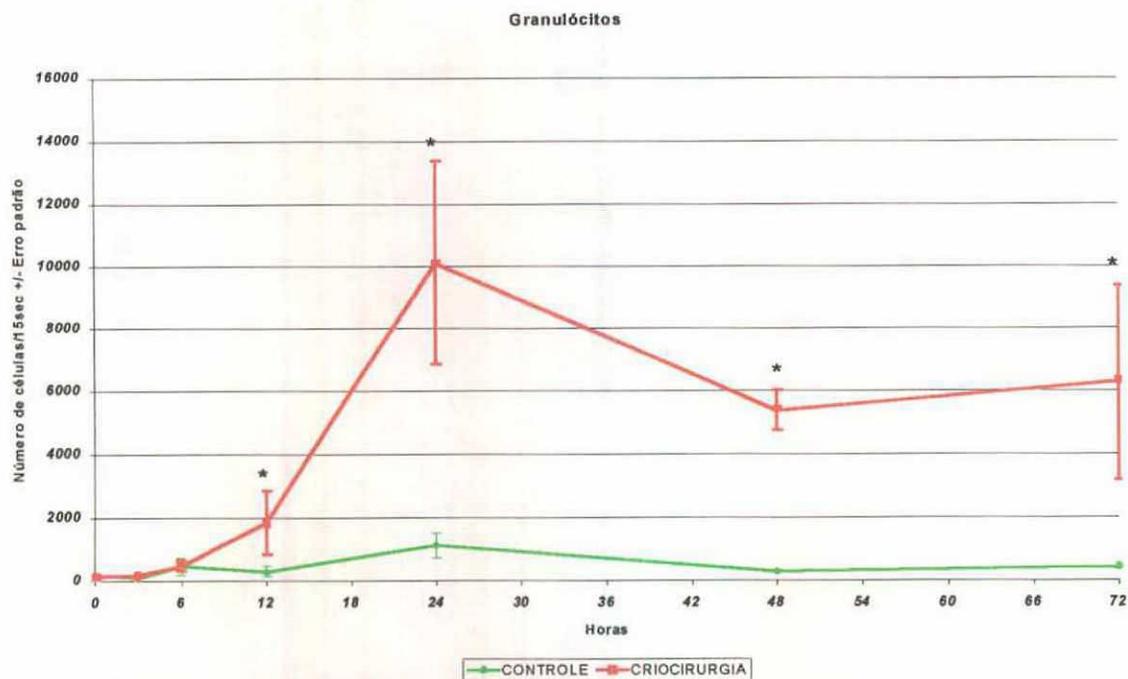
**Figura 4. Curso da infiltração celular na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.** O número de células foi determinado pela citometria de fluxo em 15 segundos contínuos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de seis experimentos; o asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle e o experimental ( $p < 0,005$ ).

#### **4.2- Análise da concentração celular absoluta das subpopulações celulares do exsudato inflamatório da bolha de ar subcutânea**

A análise da celularidade total no interior da bolsa de ar subcutânea informa a modificação da população leucocitária. Não informa, entretanto, se houve movimento de migração das subpopulações leucocitárias (granulócitos, linfócitos e macrófagos) para a cavidade da bolha de ar subcutânea, ou de evasão a partir dela. Nesse contexto, a análise das subpopulações leucocitárias impõe-se, permitindo inferir sobre a questão acima levantada. Assim, utilizando citometria de fluxo para definição do tamanho celular (FS) e da granulosidade (SS), subdividiram-se as populações em granulocítica, linfocítica e macrofágica.

##### **4.2.1- Granulócitos**

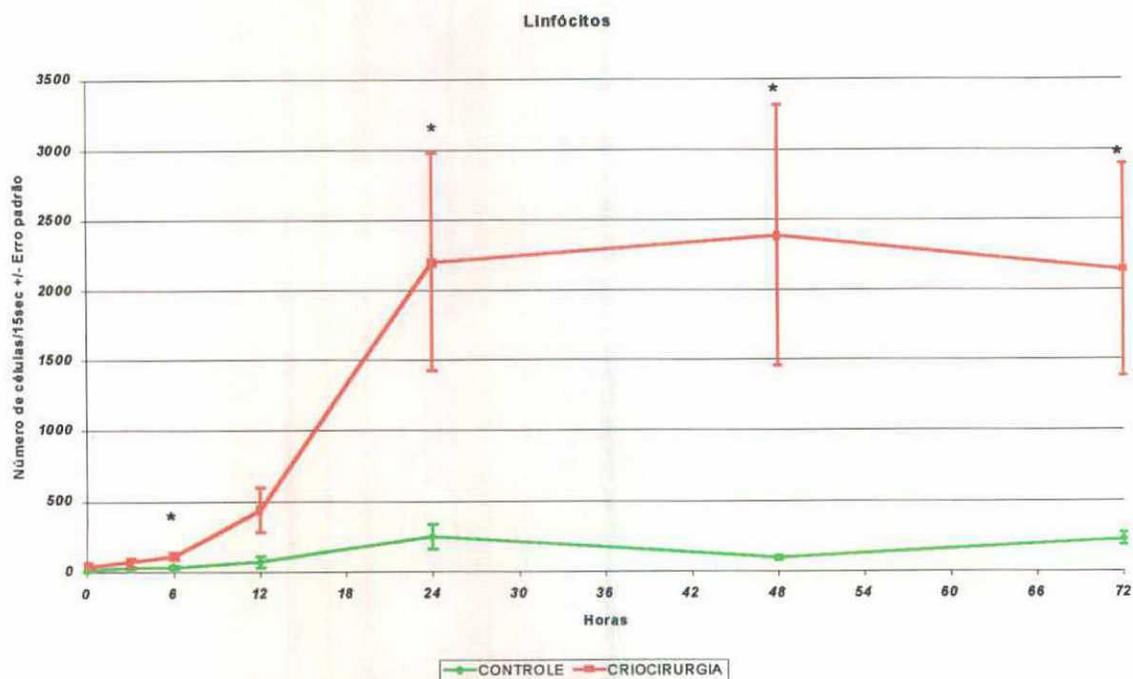
Ao analisar as subpopulações celulares de granulócitos, observam-se diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais nas três doses testadas em todos os pontos (**figura 5**). Nesta pesquisa observou-se um aumento no número dessas células em função do tempo, com tendência de crescimento contínuo nas primeiras 24 horas. Destaca-se maior incremento da população no grupo tratado com crioterapia em relação ao controle. Nesse ponto, os valores de granulócitos foram 10 vezes maiores que os verificados no grupo controle, e a maior concentração granulocítica foi atingida ( $p=0,027$ ). Subseqüentemente, observou-se uma queda dessa população na 48<sup>a</sup> hora e uma manutenção desta queda como num platô na 72<sup>a</sup> hora ( $p=0,027$  e  $0,046$  respectivamente). Os valores de granulócitos foram 20 e 15 vezes maiores no grupo pós-crioterapia quando comparado ao controle, respectivamente, diferença essa estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ).



**Figura 5.** Curso da infiltração de granulócitos na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia. O número de granulócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 15 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos granulócitos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de seis experimentos; o asterisco indica diferença significativa entre o grupo controle e o experimental ( $p < 0,005$ ).

#### 4.2.2- Linfócitos:

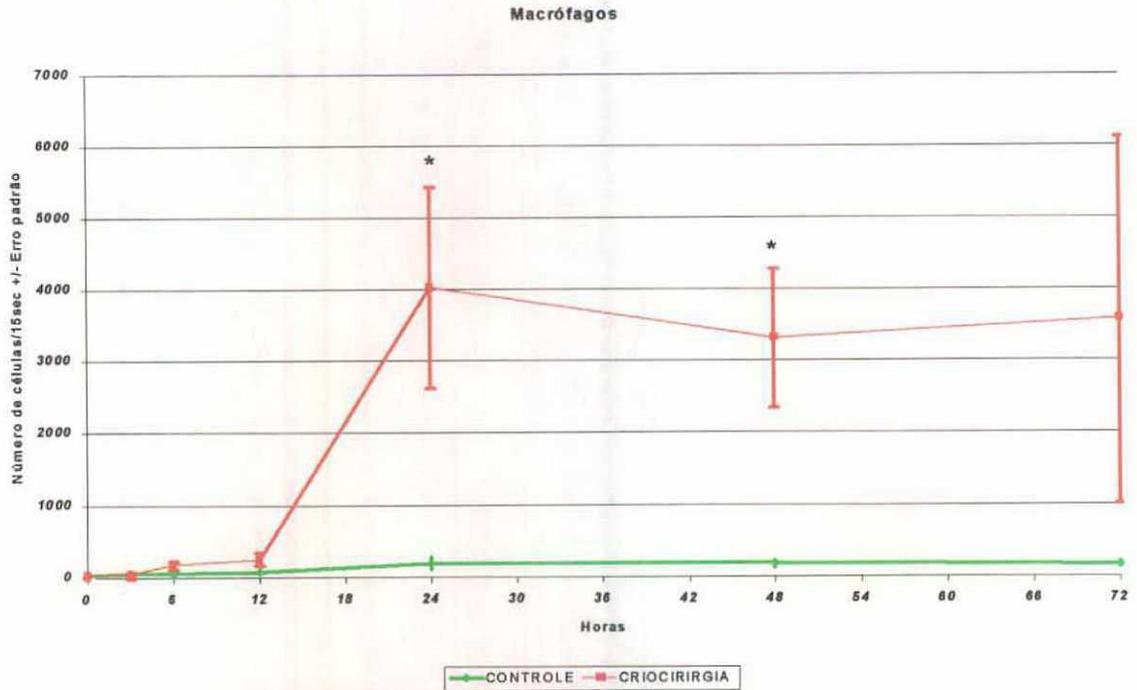
O comportamento da população linfocítica assemelha-se à dos granulócitos, com aumento no número desse tipo de célula na cavidade da bolha de ar subcutânea no grupo tratado em relação ao controle. Essa tendência de incremento da população linfocitária está presente nos dois grupos desde a 3<sup>a</sup> hora de observação. Entretanto já na 6<sup>a</sup> hora as diferenças significativas entre os grupos se estabelecem, exceto na 12<sup>a</sup> hora, onde não se detectaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Entretanto, as diferenças entre os grupos são menos acentuadas que a observada para as alterações no número de granulócitos. A concentração de linfócitos é dez vezes maior no grupo experimental que no controle (**figura 6**).



**Figura 6.** Curso da infiltração de linfócitos na bolsa de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia. O número de linfócitos foi determinado pela citometria de fluxo em 15 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos linfócitos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de seis experimentos. O asterisco indica uma diferença significativa quando o grupo controle e experimental foram comparados ( $p < 0,005$ ).

#### 4.2.3- Macrófagos

A evolução da população macrofágica segue um padrão semelhante aos anteriormente descritos (**figura 7**). Ocorre gradual aumento até a 24<sup>a</sup> hora, mantendo-se, daí em diante, a concentração celular média em ambos os grupos. Embora a diferença dos valores absoluta seja da ordem de 40 vezes nos últimos três pontos de análise, somente na 24<sup>a</sup> e na 48<sup>a</sup> hora se nota diferença estatisticamente significativa no grupo tratado com crioterapia ( $p < 0,05$ ). No último ponto não há diferença estatística devido à grande variação dos dados experimentais.



**Figura 7. Curso da infiltração de macrófagos na bolsa de ar subcutânea no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.** O número de macrófagos foi determinado pela citometria de fluxo em 15 segundos contínuos presentes em uma área específica correspondente aos macrófagos a partir do exsudato presente no interior da bolha. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da média de seis experimentos. O asterisco uma diferença significativa quando o grupo controle e o experimental foram comparados ( $p < 0,005$ ).

### **4.3- Análise da proporção relativa das subpopulações celulares do exsudato da bolsa de ar subcutânea após crioterapia**

O estudo das proporções das subpopulações celulares no exsudato da bolsa de ar subcutâneo objetiva estabelecer a variação do predomínio de cada subpopulação nos diversos pontos de análise, buscando dados que permitam conhecer seu papel relativo na inflamação induzida pela crioterapia.

Observa-se no estudo das concentrações celulares absolutas uma variação cinética que pode alterar as proporções entre as células. Para efeito do estudo, a média das proporções encontradas para as distintas populações de granulócitos (85%), linfócitos (7%) e macrófagos (10%) no grupo controle (**figura 3-A**) representa os valores proporcionais considerados normais de cada subpopulação, para os animais estudados. Procedeu-se, então, à comparação com os grupos experimentais nos diferentes pontos de observação.

Porém, em observação inicial da análise das proporções podem-se constatar alterações significativas induzidas pela crioterapia logo após a sua aplicação. Inicialmente verifica-se uma redução significativa da proporção de granulócitos em relação às demais células: 20 pontos percentuais em relação à mesma população do grupo controle ( $p=0,10$ ). A redução de granulócitos acompanhou-se de um aumento de linfócitos e de macrófagos na ordem de 13 e 5 pontos percentuais, respectivamente, em relação aos valores de controle. Entretanto, o aumento só foi estatisticamente significativo na população linfocitária ( $p=0,10$ ) (**figura 3-B**).

#### **4.3.1- Análise temporal das proporções das subpopulações celulares da bolsa de ar subcutânea pós-crioterapia, comparadas com as da bolsa controle**

##### ***Análise da 3<sup>a</sup> hora pós-crioterapia:***

Neste ponto observa-se um padrão de alteração do infiltrado na bolsa de ar submetida a crioterapia em relação à do grupo controle, nas três subpopulações leucocitárias. Há redução na proporção de granulócitos com equivalente aumento de linfócitos e macrófagos. A redução dos granulócitos é da ordem de 21 pontos percentuais em relação ao controle ( $p=0,07$ ) (**figura 8-A E B**). Nos outros grupos o incremento é de 15 e 6 pontos, respectivamente, para linfócitos ( $p=0,02$ ) e macrófagos ( $p=0,17$ ), entre os grupos (**figuras 8-A e B**).

Com relação aos pontos iniciais, em ambos os grupos houve redução da população granulocítica e aumento das proporções de linfócitos e de macrófagos, porém não significativos.

#### *Análise da 6<sup>a</sup> hora pós-crioterapia*

A análise das três subpopulações leucocitárias em 6 horas mostra as mesmas alterações em relação ao controle observadas na 3<sup>a</sup> hora (**figuras 9-A e B**). Consistente com o ponto anterior, há redução nas populações de granulócitos com equivalente aumento de linfócitos e macrófagos. Quanto à significância, esta se mostrou a mesma para os granulócitos e linfócitos. Assim, destaca-se neste ponto de análise a manutenção dos resultados observados na 3<sup>a</sup> hora.

#### *Análise da 12<sup>a</sup> hora pós-crioterapia*

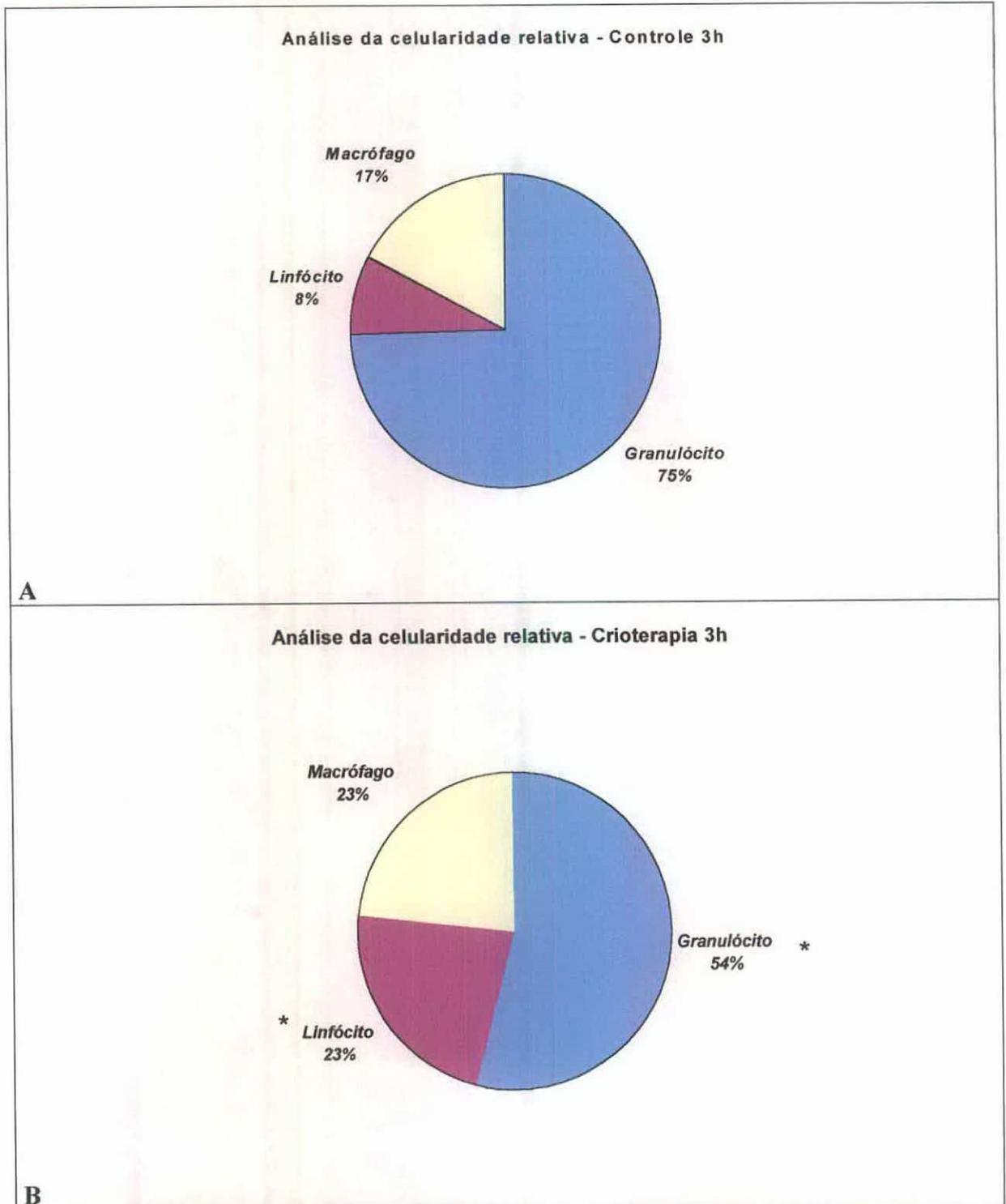
Para as 12 horas, as três subpopulações leucocitárias mantêm-se distintas das do grupo controle. Persiste a redução de granulócitos, bem como o concomitante aumento de linfócitos. Entretanto a população macrofágica encontra-se significativamente reduzida após a crioterapia ( $p=0,027$ ). Porém o que se nota é uma tendência ao equilíbrio proporcional entre os dois grupos (**figura 10-A e B**).

Quando comparado aos pontos iniciais, o grupo controle apresenta alteração significativa nas três populações leucocitárias. Observa-se redução na população de granulócitos e aumento nas outras duas quando comparadas ao ponto 0 hora ( $p=0,10$  para granulócitos e macrófagos e  $p=0,027$  para linfócitos). Entretanto não há diferença nos valores encontrados para crioterapia entre os pontos 0 e 12 horas após o tratamento.

#### *Análise da 24<sup>a</sup>, 48<sup>a</sup> e 72<sup>a</sup> hora pós-crioterapia*

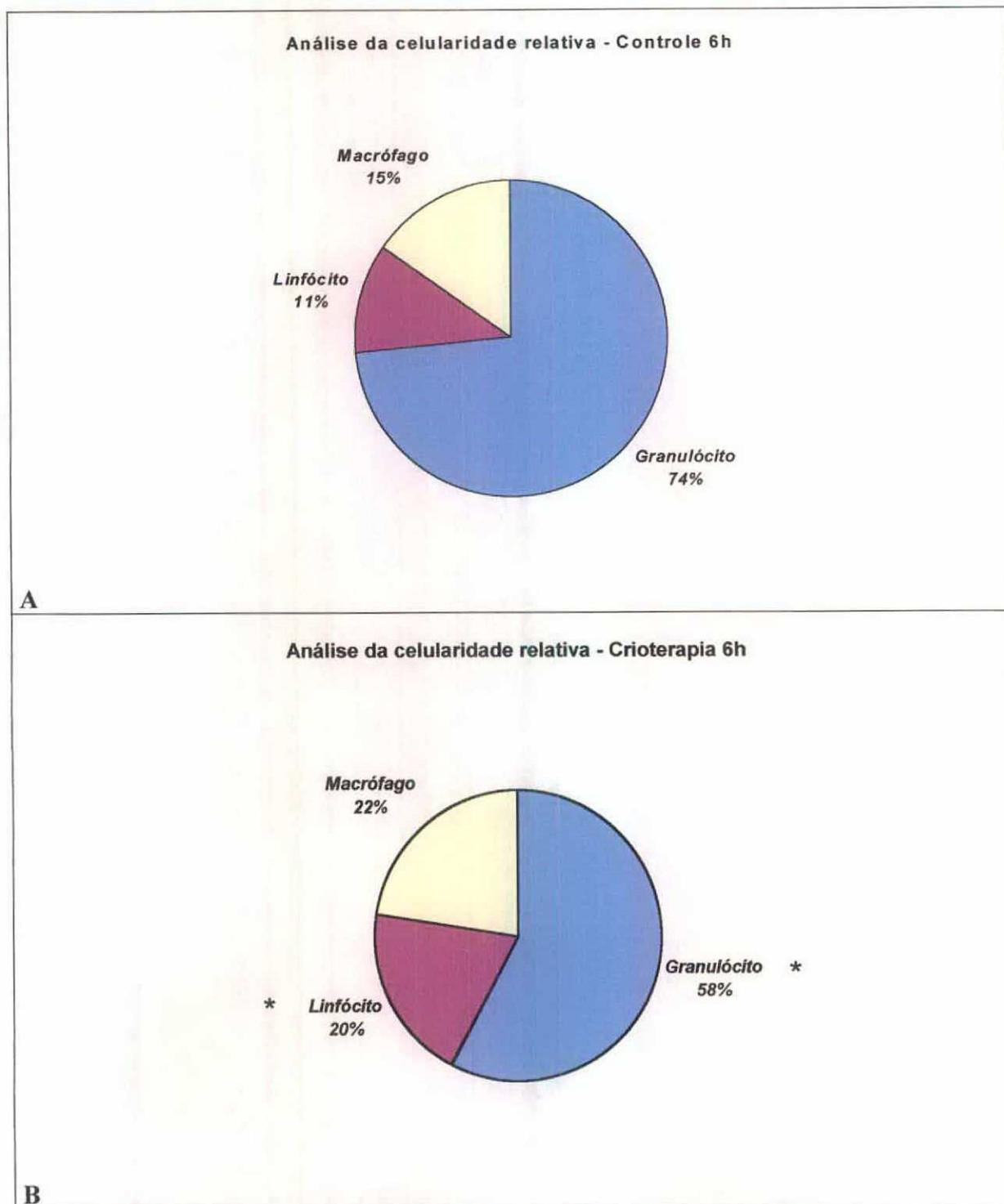
Nestes pontos de análise não há diferença proporcional significativa entre os dois grupos. Os granulócitos tendem a estabilizar-se em 50% das células do infiltrado e os linfócitos e macrófagos em 20 a 30% (**figuras 11-A e B, 12-A e B, 13-A e B**).

Com relação aos pontos iniciais, esses dados são significativamente diferentes: houve redução da população neutrofilica e aumento da população linfocítica e macrofágica em ambos os grupos. Esses dados das subpopulações leucocitárias tomadas em conjunto mostram tendência de regressão da população neutrofilica com o passar do tempo (**figura 14**) e aumento proporcional das outras duas (**figuras 15 e 16**) em ambos os grupos experimentais, independentemente da ação da crioterapia.

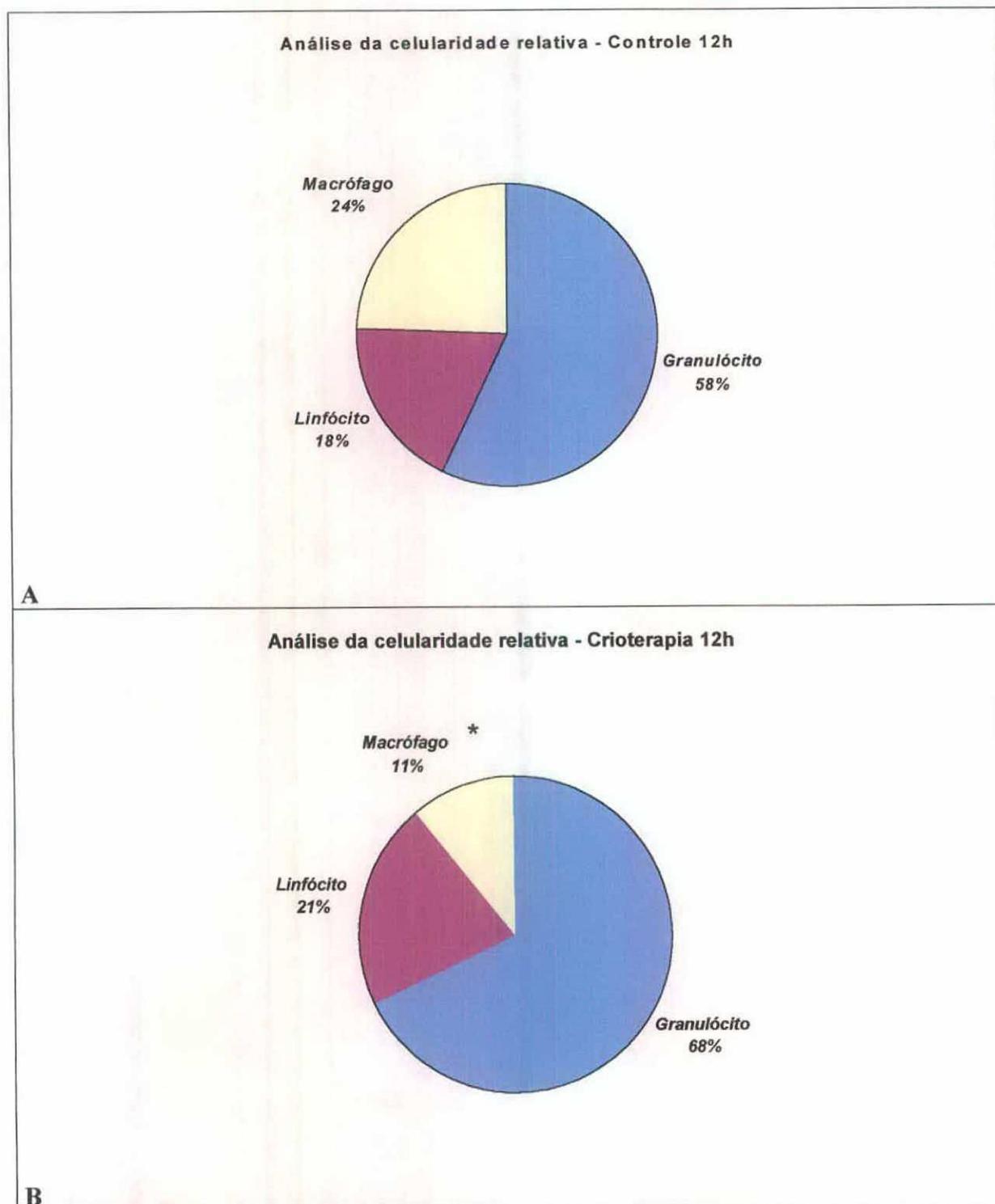


**Figura 8. Resultado da celularidade relativa no ponto de 3 horas após crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.**

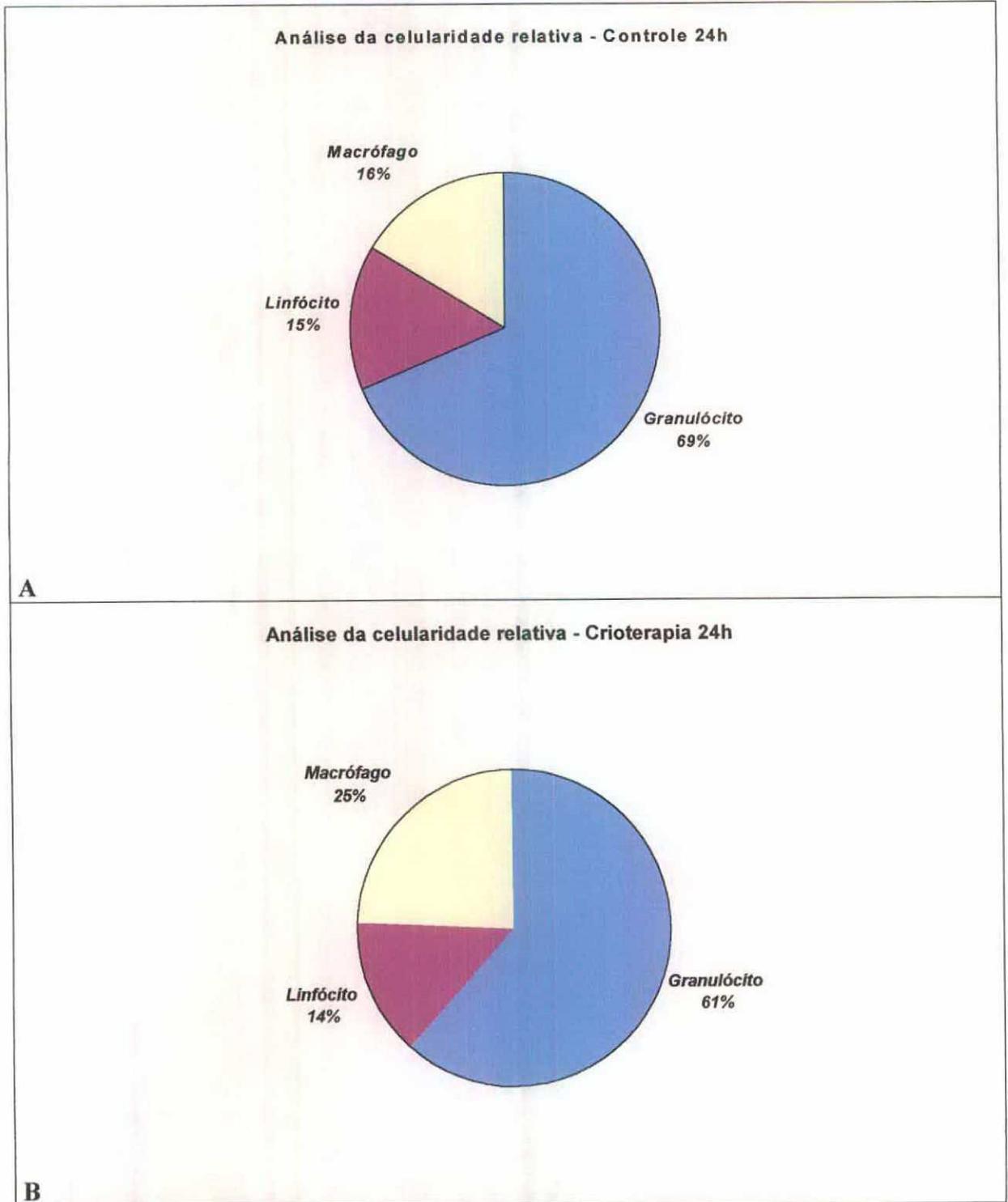
Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).



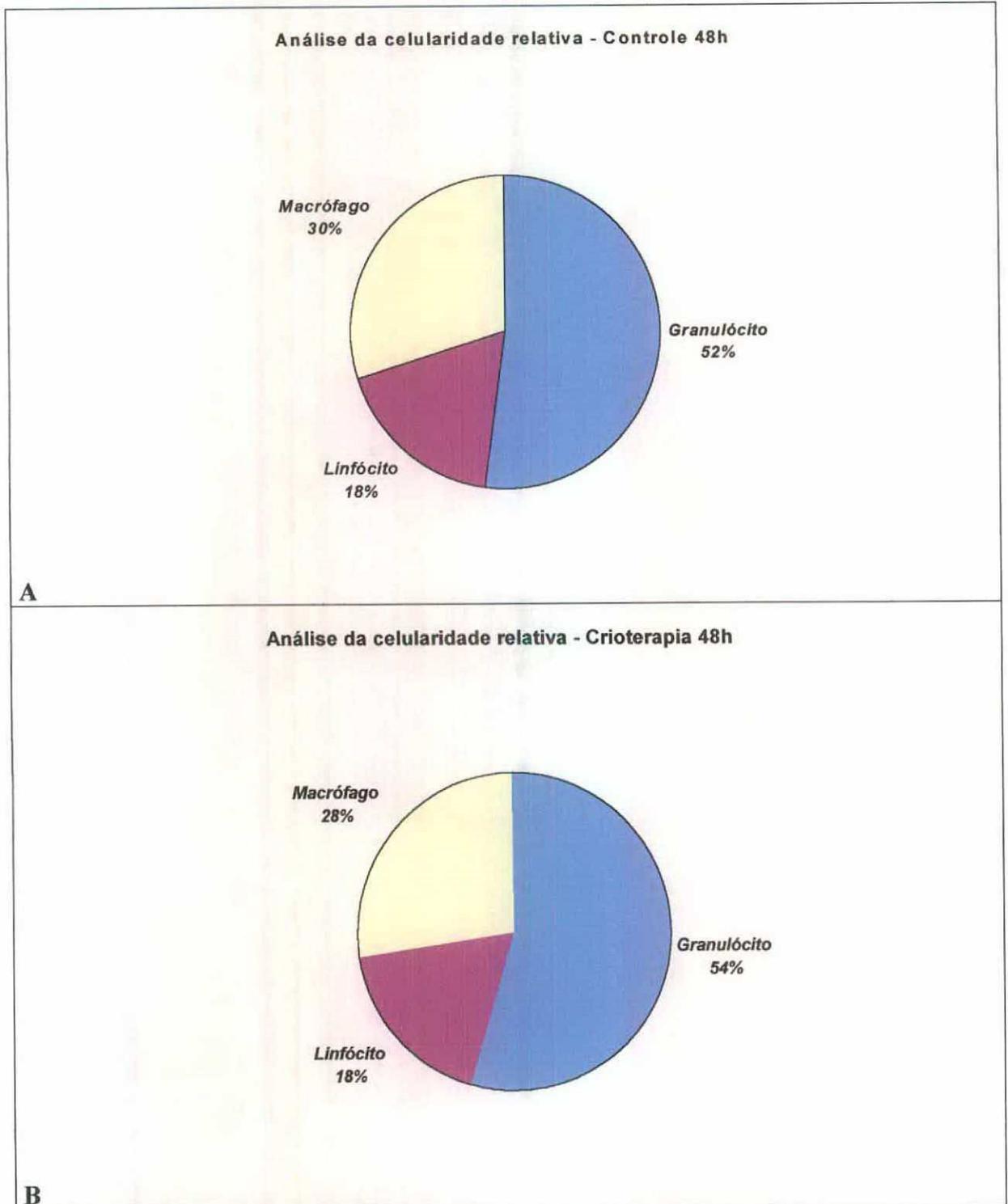
**Figura 9.** Resultado da celularidade relativa no ponto de 6 horas após crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia. Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).



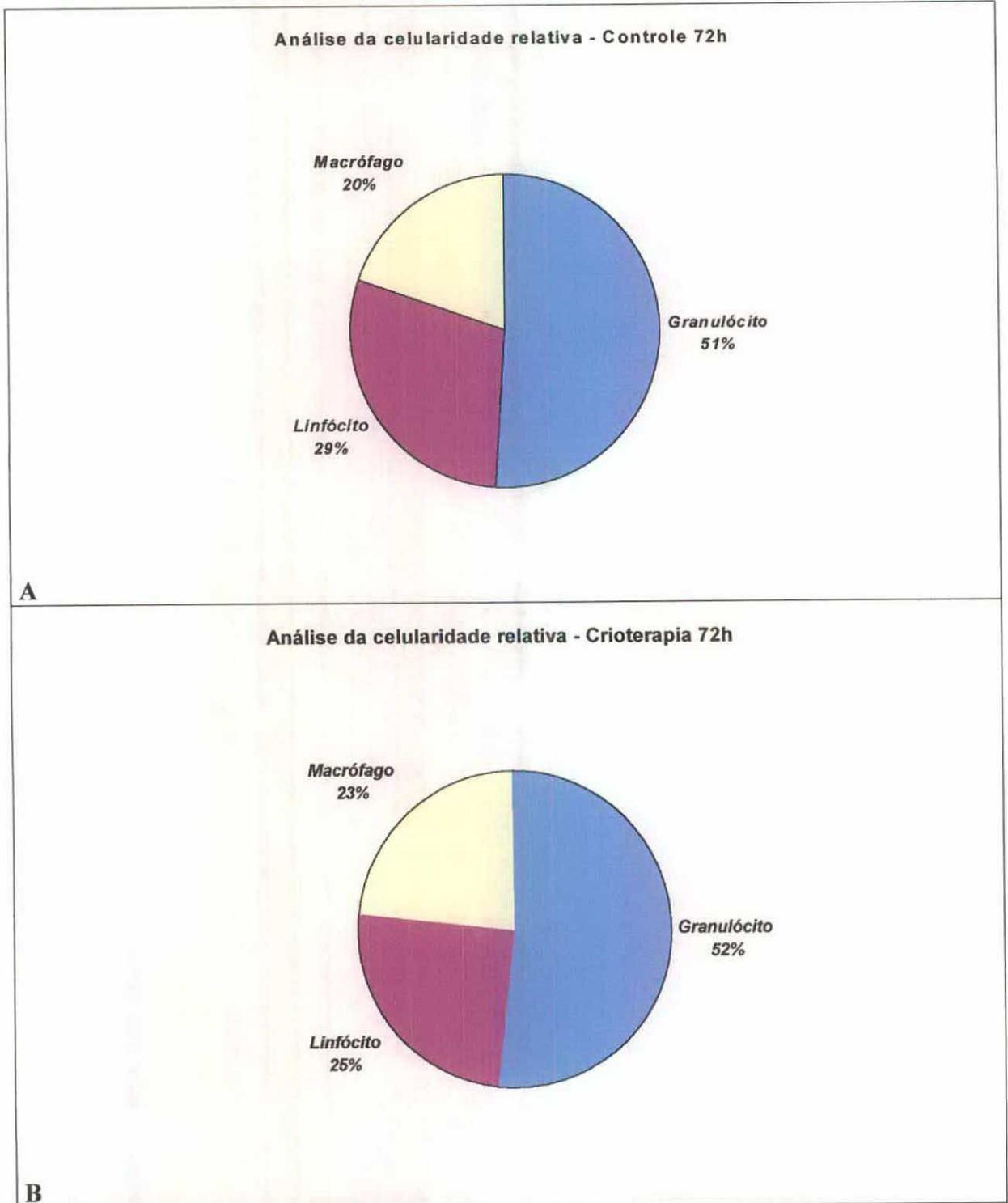
**Figura 10.** Resultado da celularidade relativa no ponto de 12 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia. Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).



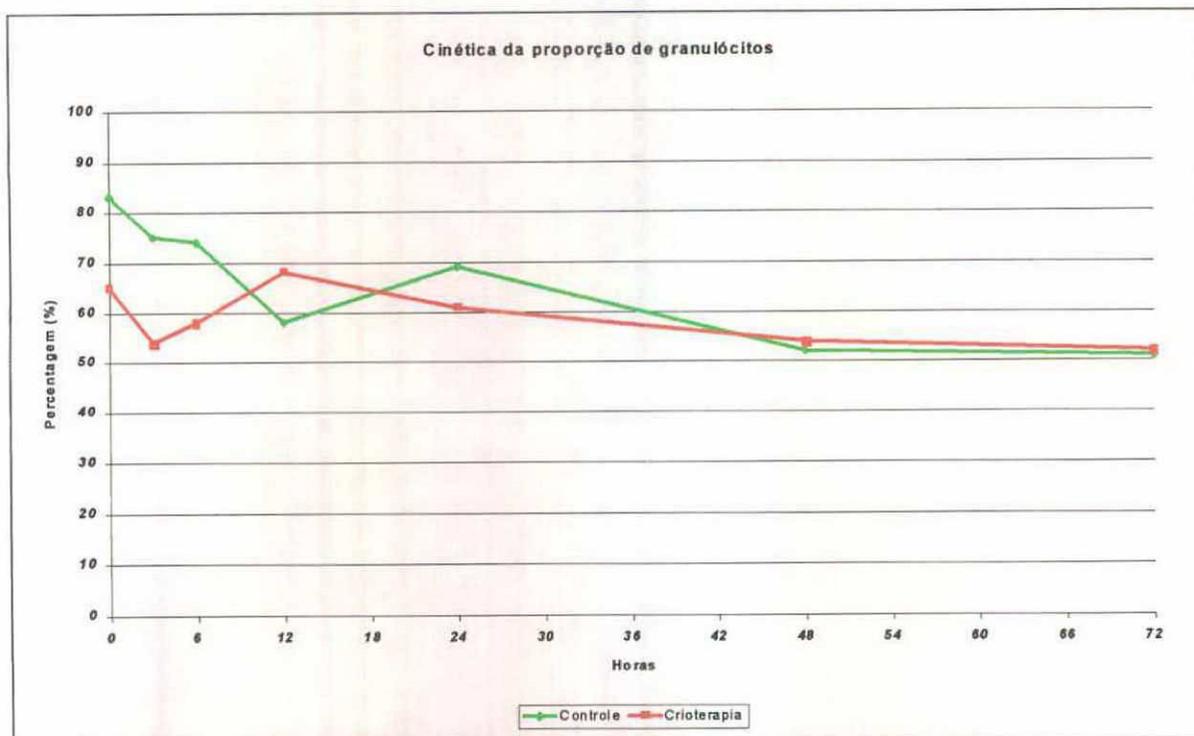
**Figura 11. Resultado da celularidade relativa no ponto de 24 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia.** Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).



**Figura 12.** Resultado da celularidade relativa no ponto de 48 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia. Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).

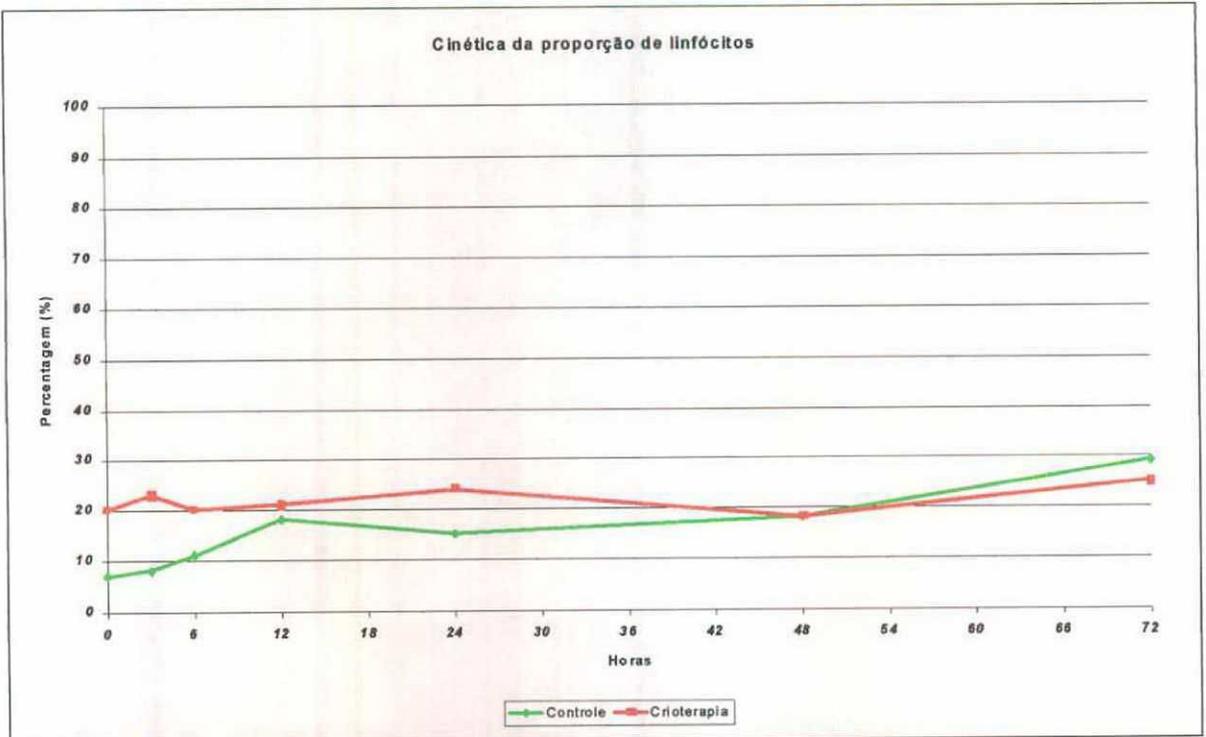


**Figura 13.** Resultado da celularidade relativa no ponto de 72 horas após a crioterapia realizada sobre uma bolha de ar subcutânea formada no dorso de camundongos da linhagem suíça submetidos ou não a crioterapia. Estes dados representam a celularidade relativa entre as três populações celulares estudadas (granulócitos, linfócitos e macrófagos). Este ponto representa a média de seis experimentos. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo experimental e o controle ( $p < 0,10$ ).



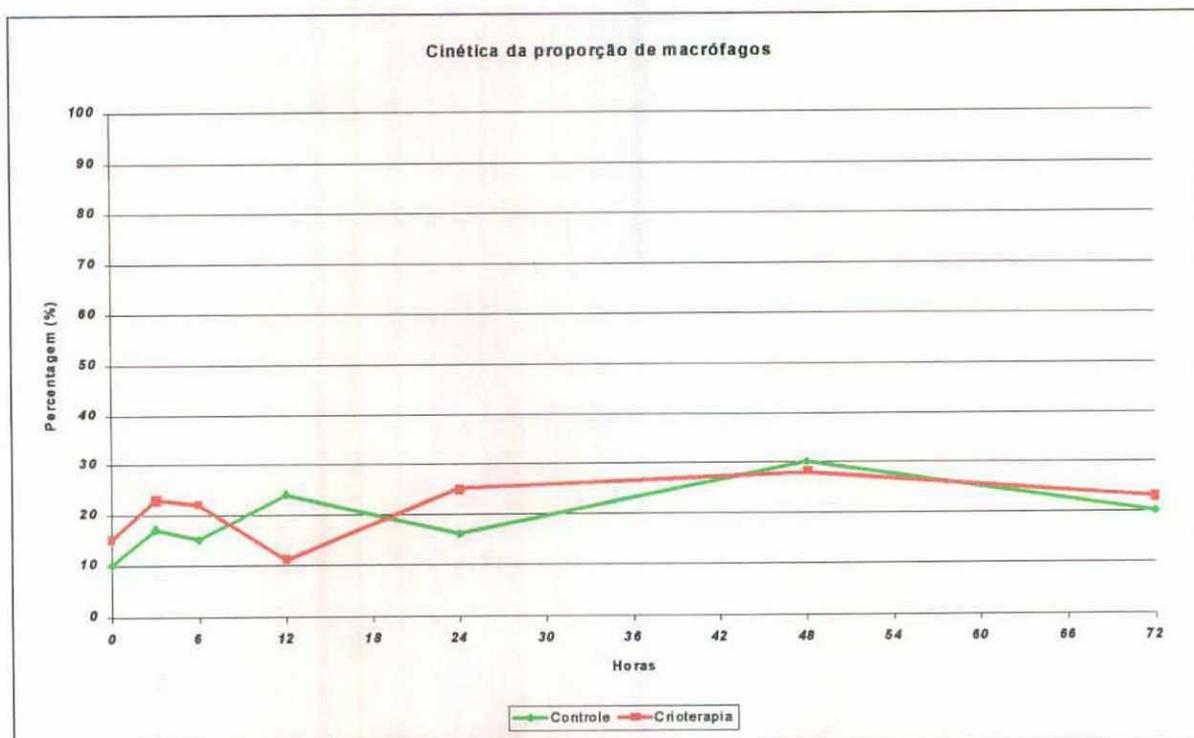
**Figura 14. Cinética da proporção celular da concentração de granulócitos.**

A proporção do número de granulócitos em relação à celularidade total do conteúdo da bolha de ar subcutânea foi determinada nos dois grupos experimentais. Cada ponto temporal representa a proporção média de seis experimentos. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao tempo.



**Figura 15. Cinética da proporção celular da concentração de linfócitos.**

A proporção do número de linfócitos em relação à celularidade total do conteúdo da bolha de ar subcutânea foi determinada nos dois grupos experimentais. Cada ponto representa a proporção média de seis experimentos. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao tempo.



**Figura 16. Cinética da proporção celular da concentração de macrófagos.**

A proporção do número de macrófagos em relação à celularidade total do conteúdo da bolha de ar subcutânea foi determinada nos dois grupos experimentais. Cada ponto temporal representa a proporção média de seis experimentos. Os resultados foram expressos em percentagem em relação ao tempo.

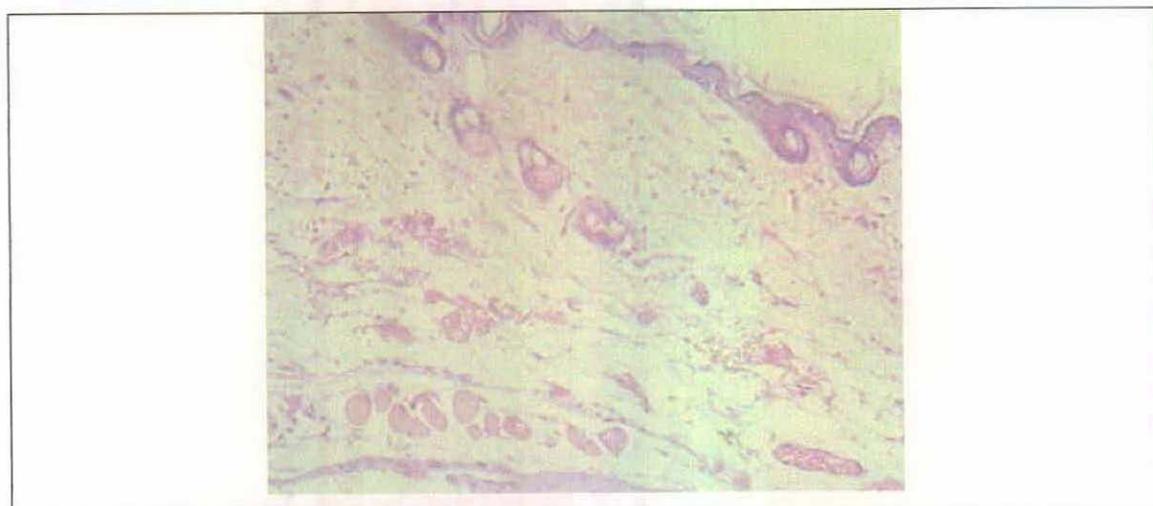
## 5- Análise histopatológica da resposta inflamatória no sítio de crioterapia

Finalmente, iniciou-se o estudo da resposta inflamatória no sítio da crioterapia, cujos dados poderiam não só elucidar se a resposta celular do interior da bolha de ar subcutânea dependia da técnica em si, mas também confirmar os resultados anteriores.

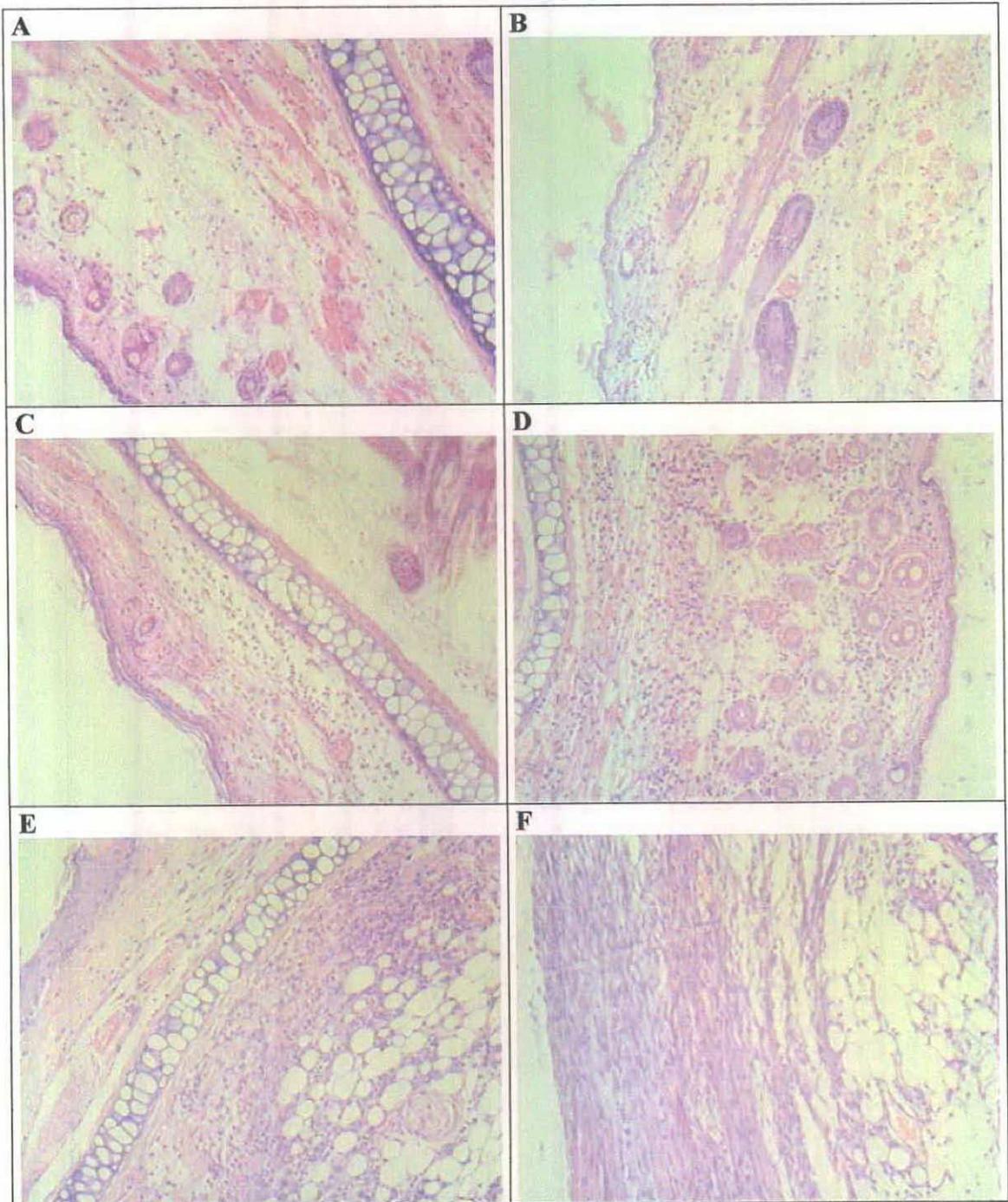
Outro sítio anatômico, a orelha de camundongos da linhagem suíça, mais prático para análise histopatológica, foi submetido a crioterapia como descrito em Método. Investigaram-se as diferenças na intensidade da resposta inflamatória e a preponderância das células no sítio após a crioterapia, nos mesmos pontos temporais analisados pela citometria de fluxo. O padrão normal foi utilizado como ponto inicial de análise (**figura 17**).

Um progressivo aumento na intensidade da resposta inflamatória ocorreu com o passar do tempo: variou de discreto a moderado nos primeiros dois pontos de estudo, 3 e 6 horas após a crioterapia, (**figuras 18 A e B**); e de moderado a acentuado nos pontos seguintes, 12 e 24 horas, indicando sinais claros de inflamação aguda (**figuras 18 C e D**); finalmente, nos últimos dois pontos de análise, 48 e 72 horas pós-crioterapia observou-se um intenso infiltrado inflamatório. Necrose pode ser observada no sítio do infiltrado inflamatório (**figuras 18 E e F**). Em todos os pontos estudados a célula preponderante foi o neutrófilo; entretanto, com o passar do tempo, foi-se destacando a presença de linfócitos e macrófagos (**figuras 19 A, B, C, D, E e F**).

Em resumo, os resultados demonstraram um progressivo aumento da intensidade inflamatória aguda, sem alterações qualitativas importantes nesse infiltrado com o passar do tempo. Conseqüentemente, tomados em conjunto, todos os dados do estudo histopatológico confirmam o resultado obtido pela citometria de fluxo.

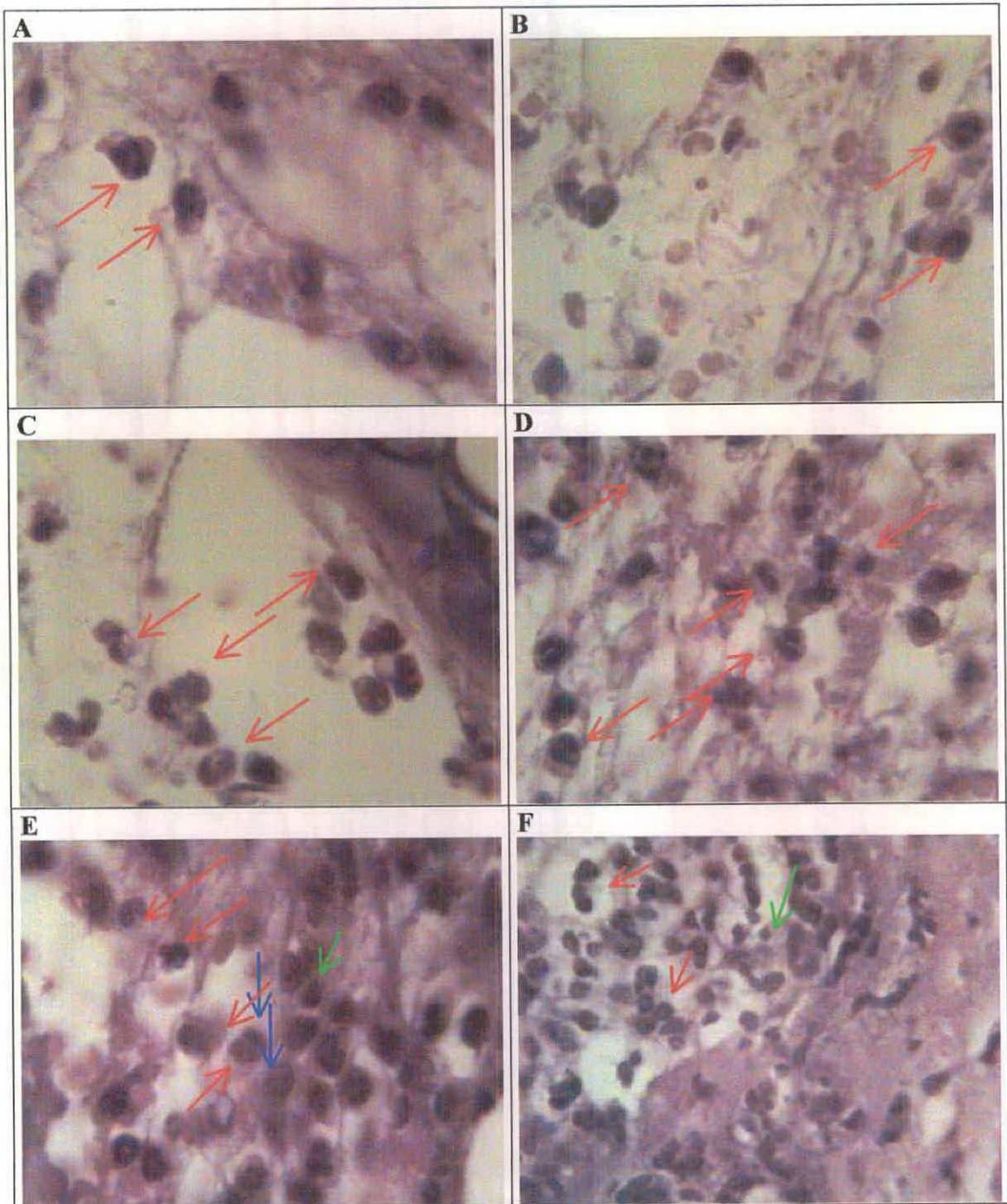


**Figura 17. Estrutura histopatológica normal da pele da orelha de camundongo (300 X).**



**Figura 18. Evolução histopatológica da pele após a crioterapia (300 X).**

Três e 6 horas após a crioterapia (A e B): inflamação aguda de intensidade discreta a moderada, com predomínio de neutrófilos; 12 e 24 horas depois da crioterapia: há aumento da celularidade, de moderado a intenso (C e D); 48 horas e depois: o infiltrado inflamatório é intenso, com sinais de necrose (E e F).



**Figura 19. Evolução histopatológica da pele após a crioterapia (3000 X).**

Três e 6 horas após a crioterapia (A e B): inflamação aguda de intensidade discreta a moderada, com predomínio exclusivo de neutrófilos;. 12 e 24 horas depois da crioterapia: há um aumento da celularidade, de moderado a intenso (C e D), e o surgimento de alguns linfócitos e macrófagos; 48 horas e depois: o infiltrado inflamatório é intenso (E e F) e apresenta todos os grupos celulares estudados. As setas vermelhas evidenciam neutrófilos, as verdes os linfócitos e as azuis os macrófagos.

## DISCUSSÃO

O mecanismo de ação da crioterapia ainda continua pouco entendido. Estudos mostram que vários fatores estão envolvidos, incluindo dano mecânico causado por cristais de gelo formados intra e extracelularmente; resultando em necrose <sup>63</sup>. Outro fator importante seria o gradiente de concentrações hidroeletrólíticas entre os tecidos não-congelados e os tecidos em descongelamento <sup>124</sup>. Finalmente, a vasoconstrição resultante do frio, causando anóxia tecidual e morte celular, estaria também envolvida no processo <sup>64</sup>.

<sup>65</sup>

A necessidade do processo inflamatório — que se inicia após a crioterapia e leva à cicatrização e à cura — não foi bem estudada em tal situação. Além do mais, poucos modelos experimentais foram utilizados e analisados com o objetivo de avaliar a inflamação induzida pela crioterapia <sup>125</sup>. O presente estudo, portanto, foi desenhado para examinar vários parâmetros relacionados ao processo inflamatório induzido pela injúria do frio na criocirurgia, mimetizando a ação deste sobre a pele normal de um animal de experimentação. Além do mais, uma vez que não há modelo experimental na área, utilizou-se como ponto de partida o modelo descrito por Edwards et al. em 1981 para produção das bolsas de ar e análise do exsudato inflamatório do interior da bolsa, para com ele criar um modelo de estudo do modo de ação da injúria térmica induzida pela crioterapia sobre pele saudável <sup>126</sup>. Na dermatologia, o conteúdo do exsudato inflamatório de bolhas causadas por doenças auto-imunes já foram estudadas em seres humanos <sup>127</sup>. Em outros estudos, o modelo desenvolvido por Edwards tem sido usado extensamente para análise da resposta inflamatória experimental <sup>128</sup>, mas apenas Naidu o utilizou para estudar inflamação na pele <sup>129</sup>.

Não obstante os aspectos supracitados, usou-se a citometria de fluxo como ferramenta importante na pesquisa do modelo. Através dela, analisou-se a celularidade total e das subpopulações. Finalmente, os resultados obtidos com as novas técnicas foram comparados e validados pelas técnicas tradicionais da contagem em câmara de Neubauer e estudo histopatológico <sup>130-132</sup>.

Utilizou-se um modelo experimental animal, camundongos da linhagem suíça, buscando paralelos da presença ou ausência da ação do nitrogênio líquido sobre a pele

normal simulando situação de crioterapia. Utilizou-se o nitrogênio líquido em jato por ser esse o procedimento mais comum na criocirurgia dermatológica<sup>133</sup>. Deve-se mencionar que outros procedimentos, como o uso de CO<sub>2</sub> em haste ou mesmo de nitrogênio líquido aplicado com *swab*, estão também presentes na prática dermatológica<sup>25, 134-136</sup>.

Neste estudo optou-se por raspar os pêlos dos camundongos com o objetivo de eliminar seu efeito no bloqueio da transmissão térmica<sup>137</sup>. Alguns autores, em estudo dos efeitos colaterais da crioterapia sobre o pêlo, realizaram-na sem esse procedimento<sup>63</sup>. Nos pacientes a aplicação da crioterapia geralmente é feita em áreas do corpo sem pêlos terminais, como forma de evitar um dos seus efeitos colaterais mais comuns, que é a alopecia<sup>138</sup>, daí por que a crioterapia pode ser utilizada justamente com esse intuito, ou seja, induzir alopecia para tratamento<sup>139</sup>. Dessa forma, a depilação do camundongo na área de estudo é adequada, se não necessária, para os objetivos do trabalho.

Fatores como tempo, área de aplicação, distância do jato e quantidade de nitrogênio aplicado são variáveis que podem interferir na ação da crioterapia<sup>21, 47, 140</sup>, mas puderam aqui ser controladas com a aplicação de nitrogênio durante 15 segundos em jato contínuo, usando-se a ponteira tipo C, a uma distância de aproximadamente 1 cm em uma área de 1 cm de diâmetro, o que permitiu, ainda, uma simulação de procedimento para tratamento de lesões benignas na dermatologia<sup>141-143</sup>.

Considerou-se também no estudo a possibilidade do processo de formação da bolha induzir uma alteração na sua celularidade interna. Tal fato, explicável pela extrema sensibilidade da pele às agressões<sup>20, 144</sup>, tornava-se, então, um viés para o modelo investigado. Petzelbauer considera essa sensibilidade a heterogeneidade do tipo e da intensidade de expressão de antígenos celulares endoteliais da microvasculatura cutânea<sup>145</sup>. Assim, os grupos controles foram aqueles sobre os quais se simularam os procedimentos prévios de formação da bolha e que não foram submetidos a criointervenção.

Por razões logísticas e técnicas, decidiu-se utilizar camundongos fêmeas de linhagem não-isogênica do tipo suíço (Tecpar), com idade entre 4 e 10 semanas. Inicialmente, a escolha de uma linhagem não-isogênica mostraria uma variabilidade ideal para os objetivos desta pesquisa. A população humana, objeto futuro deste estudo no que respeita à crioterapia, não é isogênica. O modelo de camundongo, embora não tão freqüente no estudo dos processos inflamatórios (o mais comum é o rato), apresentaria a vantagem do uso de anticorpos monoclonais disponíveis para determinação da subpopulação celular nas suas derivações deste estudo. Com relação ao fato da pele desses animais poder diferir muito da humana, Geiser e Walker demonstraram que a

fisiopatologia e histopatologia de lesões térmicas (queimaduras) em animais são muito semelhantes às dos humanos <sup>132</sup>. Do que se pode inferir que os resultados do modelo possam ser derivados para o estudo em seres humanos. Finalmente, a idade é uma variável que deve, e foi, controlada neste estudo. Berardesca e Distanti mostraram que na inflamação cutânea a idade é um dos fatores que modifica a evolução da resposta <sup>146</sup>. Gilcherst et al. afirmaram que a resposta inflamatória da pele a lesão por radiação ultravioleta se reduz com a idade em seres humanos <sup>147</sup>. Assim, associando o detalhe da semelhança das respostas inflamatórias entre a pele humana e a de animais, justifica-se o uso de camundongos jovens e da mesma idade.

Após a decisão do aparato técnico, do modo de realização da crioterapia e da escolha do animal, pesquisou-se a celularidade no interior da bolsa de ar subcutânea. Restava definir quais pontos temporais deveriam ser analisados, uma vez que o objetivo do trabalho se centrava nos aspectos da inflamação aguda. Em geral, os estudos sobre a evolução da inflamação revelam um pico de exsudato nas primeiras 24 horas, seguido por resposta separada de mononucleares, formação de um denso exsudato e granuloma nos 2 a 7 dias seguintes <sup>148</sup>. Considerando que classicamente os eventos da inflamação aguda ocorrem em 72 horas <sup>149</sup>, era possível que as modificações relacionadas com a crioterapia estivessem presentes nesse espaço de tempo.

Entretanto autores demonstraram um processo dinâmico e seqüencial de citocinas que levam ao exsudato inflamatório e sua dinâmica após uma injúria <sup>150</sup>. Observaram, também, que as alterações são tão precoces quanto 1 hora após o desafio <sup>151</sup>. Silber et al. demonstraram que esse processo seqüencial ocorre na parede endotelial <sup>152</sup>. Além do mais, essa cinética determina uma dinâmica até no processo de aderência da população celular dependente do tempo. A importância das moléculas de adesão pode ser apreciada em situações em que a migração de neutrófilos é bloqueada por anticorpos contra moléculas de adesão endoteliais, como se verificou em experimento feito na pele após queimadura <sup>153</sup>. Assim, se definiu que um estudo dinâmico deveria avaliar a concentração celular no interior da bolha subcutânea 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas após a injúria. Pontos semelhantes já foram usados em estudos da dinâmica da inflamação <sup>149,152</sup>.

Este estudo baseou-se na análise cinética da celularidade do exsudato inflamatório após crioterapia. Embora muitos pesquisadores se concentrem na análise do perfil de citocinas para estudar inflamação <sup>117, 154, 155</sup>, o estudo da celularidade tem sua importância, uma vez que ela é um indicador de processo inflamatório, o que foi demonstrado por Stewart et al. com relação à neutrofilia peritonial como potencial indicador de inflamação

desse órgão <sup>156</sup>. Outro argumento a corroborar a alteração da celularidade como indicador de inflamação vem do trabalho de Bone et al., que definem, entre outros conceitos, a contagem leucocitária sangüínea como critério de sepse <sup>157</sup>. Em ambos os casos, as citocinas, principalmente as quimiocinas, devido à sua produção pelas células envolvidas no processo de injúria, são responsáveis pelas alterações quantitativas e qualitativas no exsudato inflamatório <sup>106</sup>. Ou seja, a importância do estudo da celularidade se faz óbvio quando se considera que as células produzem e consomem as citocinas inflamatórias resultantes do processo, e se modificam com elas.

Não só a celularidade, mas outros produtos da reação inflamatória podem ser utilizados para determinar a intensidade da inflamação. Os níveis de C3a, produto da degradação de C3, foi usado para determinar a intensidade da inflamação em injúria cutânea por queimadura em modelo experimental <sup>158</sup>. Entretanto a maioria dos estudos das lesões cutâneas causadas por fatores físicos têm determinado os níveis de citocinas. Klein et al. mostraram que na queimadura o aumento de IL-1 beta está associado a infiltração neutrofílica e ao incremento de *LPS binding protein* (LBP) <sup>159</sup>, e que as infecções bacterianas nas queimaduras poderiam estar associadas à concentração aumentada de LPB. Ainda nessa linha, Ohzato demonstrou um aumento dos níveis de IL-6 sistêmico e local após queimadura <sup>160</sup>. Sobre essa citocina e a pele, Paquet e Pierard mostraram que ela tem papel crucial na patogênese de inflamação cutânea e no desenvolvimento de tumores e doenças <sup>161</sup>.

Ainda sobre as citocinas inflamatórias nas lesões induzidas por injúria térmica, Abeyama et al. mostraram que a queimadura solar, através de UV, induz ativação de NF-kappa B e conseqüente transcrição de genes alvos, como IL-1, IL-6, TNF-alfa e KEGF, e que estes não estão associados a lesão tecidual direta <sup>162</sup>. Finalmente, Faunce et al. demonstraram que IL-8, outra citocina inflamatória, aumenta sua concentração nos tecidos queimados por água quente, além de atrair neutrófilos para esse sítio inflamatório. Neste estudo, o pico de IL-8 ocorreu 4 a 8 horas depois da injúria, mas o pico da concentração neutrofílica se verificou na 24<sup>a</sup> hora após o trauma <sup>163</sup>.

Esses dados indicam que a resposta inflamatória que se segue a uma lesão térmica começa na própria pele. Células de Langerhans, macrófagos, ceratinócitos, fibroblastos e células endoteliais contribuem para iniciar esse evento e participam de sua resolução pela liberação ativa e passiva de mediadores pró- e antiinflamatórios. Ikai et al. ainda incluem os mastócitos nesse processo, por seu papel na inflamação após UV <sup>164</sup>. Assim, acredita-se que no início de um processo de injúria fatores pró e antiinflamatórios são disparados

simultaneamente <sup>157</sup>. Esse balanço ocorre principalmente pelo padrão de citocinas produzidas após estímulo. Por exemplo, TNF induz a inflamação cutânea <sup>165, 166</sup>, e IL-10 a reduz <sup>155, 167</sup>. Ono et al. mostraram que existe uma cinética de citocinas e conseqüentemente uma cinética celular associada ao reparo da pele <sup>168</sup>. *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), produzida por macrófagos, fibroblastos e células endoteliais em resposta a um estímulo inflamatório cutâneo induzido por queimadura, é uma importante citocina desse processo de reparo <sup>169</sup>.

Finalmente, resta especular o papel de NO no processo inflamatório cutâneo induzido por lesões térmicas. Benjamin et al. demonstraram, recentemente, que o NO produzido pelas células peritoniais residentes na infecção pode inibir a migração neutrofílica para essa cavidade <sup>170</sup>. Nessa linha de observação, Youn et al. mostraram que na pele a inflamação por UV é dependente de oxigênio <sup>171</sup>, dependência essa explicada pelo fato de que UVB estimula eNOS (*endothelial nitric oxide synthetase*) e XO (*xantine oxidase*). Tais enzimas produzem NO e ONOO<sup>-</sup> que são responsáveis pela vasodilatação e pelo eritema presente no processo inflamatório da pele induzido pela UVB <sup>172</sup>.

Considerando os aspectos mencionados, o estudo foi iniciado utilizando-se a técnica de citometria de fluxo para avaliação das populações celulares isoladas na bolha subcutânea nos grupos experimental e controle. Tal técnica encontra-se em desenvolvimento no laboratório onde os experimentos foram realizados. Inicialmente observou-se o padrão de granulosidade e tamanho dessas células. Três aglomerados celulares foram obtidos. A definição de populações macrofágicas, linfocíticas e granulocíticas através da citometria de fluxo só ocorreu após a análise dos padrões dos marcadores de superfície dessas células. Todos as três populações expressavam CD45 em sua superfície, identificando-as como leucocitárias. Entretanto, somente um grupo expressava, de maneira não-superposta, células com marcadores CD3 e CD19 na sua quase totalidade. Estas células correspondiam, então, a região dos linfócitos. Na ausência de outros marcadores, os outros dois grupos celulares foram determinados com base nos valores de tamanho e granulosidade. Assim sendo, as células com maior tamanho foram consideradas como sendo macrófagos e a de maior granulosidade como sendo granulócitos, segundo dados dessas células obtidos por microscopia eletrônica <sup>126, 173, 174</sup>.

Considerou-se também a possibilidade de modificar-se esse padrão celular com o passar do tempo após o início do processo inflamatório e conseqüente ativação celular, a qual poderia aumentar ou diminuir o tamanho e a granulosidade das células. Para elucidar esse aspecto, foram realizados em diferentes pontos temporais da evolução da lesão

estudos de marcação de superfície, cujos resultados mostraram pouca alteração do perfil com o passar do tempo. Dessa forma, os resultados foram confirmatórios da reprodutibilidade das áreas de análise escolhidas.

Para a avaliação da celularidade, decidiu-se correlacionar os dados da celularidade total obtidos por citometria com os obtidos por contagem manual na câmara de Neubauer e no citômetro de fluxo. Analisando os dados de 49 amostras, concluiu-se que existe uma correlação direta entre as duas metodologias. Portanto a citometria de fluxo mostrou-se apta para substituir as técnicas tradicionais de avaliação de população total e subpopulações, com a vantagem da rapidez, precisão e imparcialidade.

Uma vez que a dinâmica celular pode alterar-se não só quantitativa como qualitativamente <sup>175</sup>, resolveu-se incluir no padrão de análise um estudo da proporção relativa de cada subpopulação, estudo que tem sido de extrema utilidade na avaliação clínica de pacientes. Por exemplo, de uma maneira geral, os leucogramas expressam os valores absolutos e relativos das diferentes populações leucocitárias sangüíneas, possibilitando importantes decisões clínicas no dia-a-dia hospitalar, pois os valores normais, quando em relatividade, podem assumir outra perspectiva. Assim, os dois tipos de análise foram utilizados e ambos são importantes na busca do conhecimento sobre a resposta inflamatória induzida por crioterapia na pele.

Após a resolução dos padrões de análise por citometria de fluxo, foram iniciadas as coletas de dados, iniciando-se com a determinação da celularidade total e das subpopulações no camundongo normal submetido ou não a crioterapia logo após a feitura da bolha subcutânea. Esses dados foram considerados padrões controles para o experimento. A celularidade total encontrada foi semelhante em ambos os grupos. Essas células iniciais provavelmente derivam do processo de formação da bolha. Os resultados da celularidade relativa, entretanto, foram diferentes. Verificou-se significativa redução na população de granulócitos e aumento proporcional de linfócitos no grupo submetido a crioterapia. Tais resultados encontram amparo na literatura, uma vez que se tem observado lesão direta dos vasos pelo frio <sup>176</sup>. Além do mais, observou-se que as injúrias térmicas causam alterações diretas e rápidas por destruição e/ou contração e relaxamento das células endoteliais, na permeabilidade vascular. A substância P, uma das moléculas envolvidas no processo inflamatório e produzidas por terminações nervosas livres lesadas, é a possível responsável por esse fenômeno <sup>177</sup>. Deve-se lembrar que essa substância, prontamente liberada após a injúria térmica, induz dor e prurido, sintomas esses presentes após a criocirurgia <sup>4, 141, 178</sup>. Como resultado dessa ação, a resposta adrenérgica que se segue ao frio

estaria reduzida <sup>179</sup>. Por outro lado, Chappel et al. mostraram que na periferia das lesões térmicas ocorre isquemia intensa <sup>180</sup>. Assim, provavelmente, a alteração precoce no padrão celular se deve às modificações na permeabilidade vascular induzida pela crioterapia.

Procedeu-se ao estudo através da análise dos dados absolutos e proporcionais das populações e subpopulações leucocitárias existentes na cavidade subcutânea dos dois grupos experimentais com o passar do tempo. Assim, neste modelo, o insulto parece induzir um aumento leucocitário na cavidade subcutânea, como esperado, correspondendo a um incremento da população granulocítica em termos absolutos, intenso na 24<sup>a</sup> hora após a indução da lesão. Chen et al. mostraram o papel do neutrófilo no disparo da resposta inflamatória local e sistêmica <sup>181</sup>. Assim, o crescimento precoce da população granulocítica na 24<sup>a</sup> hora seria capaz de determinar um processo inflamatório mais intenso que no grupo controle, disparado pela lesão celular induzida pela crioterapia <sup>182</sup>.

Proporcionalmente, existe uma queda crescente na população granulocítica em ambos os grupos. Uma explicação para a redução progressiva de granulócitos após a 24<sup>a</sup> hora seria a destruição dessa população por macrófagos que iniciaram sua migração para o interior da bolsa de ar. Savill et al. demonstraram que esse fenômeno ocorreria após a ativação e envelhecimento neutrofilico <sup>183</sup>. Outra explicação seria a apoptose induzida nessas células pelos fenômenos inflamatórios <sup>184</sup>. Finalmente, resta especular o papel de NO nessa redução populacional. Benjamim et al. demonstraram, recentemente, que o NO produzido pelas células peritoniais residentes em uma infecção letal inibe a migração neutrofilica para essa cavidade <sup>170</sup>. Assim, em conjunto, todos os dados informados parecem explicar que na crioterapia haveria migração precoce de neutrófilos como mecanismo de defesa. Entretanto, a ativação excessiva levaria a um disparo da ativação granulocítica e migração mononuclear, que terminaria por inibir a migração de novas células para a bolsa de ar e conseqüentemente reduzir o número absoluto dessas células na cavidade.

Interessante, porém, é a não-redução proporcional dessas células no curso da infecção, pois o nível de granulócitos atinge um valor de redução por volta de 50-60%, mantido durante o resto do experimento. Tal fato pode ser explicado por alguns aspectos, como, por exemplo, pelo favorecimento de infecções no mecanismo de formação da bolha após a crioterapia <sup>185</sup>, o que, entretanto, não explica a semelhança dos resultados em ambos os grupos. Outra conjectura para explicar a não-redução de granulócitos seria o gradiente de morte celular epidérmica, estimulantes da presença de neutrófilos, por isquemia na borda da lesão <sup>180</sup>. Entretanto, novamente, esse dado não explica a semelhança dos

resultados entre o grupo experimental e o controle. Assim, em conjunto, todos os dados informados parecem explicar que na crioterapia, embora houvesse uma intensa migração precoce de neutrófilos como mecanismo de defesa, outros fatores manteriam essa população nos níveis observados.

Outro aspecto interessante neste estudo foi o aumento absoluto e proporcional de mononucleares na cavidade, após a injúria térmica. Macrófagos e linfócitos residentes na pele também são considerados a primeira linha de defesa e recuperação após injúria<sup>186</sup>. O aumento dessas populações foi demonstrado após um estímulo inflamatório descrito no desenvolvimento da inflamação aguda e sua evolução para crônica<sup>187</sup>. Associa-se a isso o fato de que essa migração objetiva dar início a resposta imune específica contra o agente agressor, possibilitando a recuperação tecidual<sup>188</sup>.

Tomados em seu todo, os níveis proporcionais de células do grupo experimental, quando comparados aos do grupo controle em todos os pontos temporais, podem ser explicados pelo fato de que a formação da bolha é uma injúria tecidual. A crioterapia amplifica o fenômeno, criando outro elemento estimulador da inflamação. Todos esses estudos indicam que na pele, como em outro tecido vascularizado, as alterações quantitativas e qualitativas da celularidade são respostas inflamatórias aos fatores quimiotáticos que as precederam. Além do mais, os níveis de modificações de celularidade têm correlação direta com a intensidade do processo inflamatório.

A última fase do estudo objetivou observar se as alterações celulares no conteúdo da bolha subcutânea a partir da crioterapia correspondiam aos achados em um estudo histopatológico. De certa forma, pretendia-se avaliar se o modelo da bolha e a citometria de fluxo mediriam as modificações histológicas induzidas pela crioterapia. Pequenas modificações foram instituídas, como a opção pela orelha, a redução da área de crioterapia para 0,5 cm de diâmetro e a diminuição do tempo para 10 segundos. Tais modificações objetivavam manter a integridade tecidual e a correspondente lesão ao tecido em uma área como a da orelha.

Resolveu-se analisar apenas o tipo celular predominante e a intensidade desse infiltrado. Tomados esses dados em conjunto, assemelhavam-se aos obtidos no modelo experimental, com marcante predomínio de neutrófilos desde o início do processo inflamatório e o surgimento de outras populações celulares mononucleares após a 24<sup>a</sup> hora. Dessa forma, a histopatologia confirmou o potencial do modelo e a importância da citometria de fluxo no estudo da inflamação experimental da crioterapia.

Com todos os dados acima somados, pode-se considerar que a crioterapia induz lesão tecidual e vascular seguida de alterações vasculares que, por sua vez, induzem a adesão, a diapedese e a ativação neutrofilica, dando início ao processo inflamatório observado. Os dados da análise da celularidade levam a supor que o aumento granulocítico seria associado a proteção. Entretanto especula-se sobre a necessidade da migração celular nesse tipo de situação. Por exemplo, Nwariaku et al. demonstraram que a inibição da migração neutrofilica por anti-CD18 seria capaz de reduzir a destruição tecidual causada por queimadura <sup>153</sup>. Cetinkale et al. mostraram a cinética da invasão neutrofilica na pele após a queimadura e induziram uma redução nessa migração e os efeitos inflamatórios pelo uso de FK506 (tracolimus) <sup>189</sup>; eles sugerem que tal redução da inflamação ocorreu devido a uma diminuição da peroxidação lipídica. Tal participação deletéria dos metabólitos do ácido aracdônico nesse tipo de inflamação foi confirmada nos estudos de Dong et al., que mostraram que o ibuprofeno, antiinflamatório não hormonal e redutor dos metabólitos do ácido aracdônico, aumenta a sobrevivência de animais submetidos a queimadura em mais de 30% de área corporal <sup>190</sup>. Ainda nessa linha, Eldad et al. evidenciaram o papel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na indução da inflamação tópica causada pelo gás mostarda <sup>191</sup>. Finalmente, Sholley e Cotran demonstraram que a infiltração de células inflamatórias, principalmente mononucleares, não é um estímulo necessário para iniciar a proliferação endotelial e a cicatrização na inflamação aguda não-imune, como nas queimaduras <sup>192</sup>.

Tomados, assim, em conjunto, os dados informados parecem explicar que na crioterapia haveria migração precoce de neutrófilos como mecanismo de defesa. Entretanto o balanço de ativação levaria a um disparo da ativação granulocítica excessiva, que terminaria por inibir ou dificultar o processo de recuperação em tal situação. Portanto, pode-se sugerir que a morte celular por si só resultaria nos efeitos terapêuticos da crioterapia e que mecanismos reguladores que evitam o descontrole da resposta inflamatória deveriam ser usados. Tais efeitos benéficos já foram evidenciados em outros estudos sem considerar-lhes a eficiência terapêutica <sup>193-195</sup>.

Portanto, o método aqui proposto — de análise da modificação da população leucocitária através da citometria de fluxo após crioterapia — revelou uma migração neutrofilica para o sítio inflamatório, a qual pode estar associada ao início do processo de cicatrização ou à indução de um processo inflamatório desnecessário para o efeito terapêutico da crioterapia. adicionalmente, a migração mais tardia das células mononucleares estaria associada ao início da resposta imune específica. essa estratégia pode ampliar o entendimento do modo de ação da crioterapia e ser útil para avaliar as

modificações dos mediadores inflamatórios. além de ser pioneiro na demonstração destes aspectos, o presente modelo pode ser usado em outros estudos.

## REFERÊNCIAS

1. Gage AA. History of cryosurgery. *Semin Surg Oncol* 1998;14(2):99-109.
2. Jara Padilla I. Cirugía dermatológica. *Dermatología* 1994;10(4):244-6.
3. American Academy of Dermatology Committee on Guidelines of Care. Guidelines of care for cryosurgery. *J Am Acad Dermatol* 1994;31(4):648-53.
4. Torre D. The art of cryosurgery. *Cutis* 1994;54(5):354.
5. Bracco D. The historic development of cryosurgery. *Clin Dermatol* 1990;8(1):1-4.
6. Kuflik EG, Gage AA, Lubritz RR, Graham GF. Millenium paper: history of dermatologic cryosurgery. *Dermatol Surg* 2000;26(8):715-22.
7. Coleman WP, 3rd, Hanke CW, Orentreich N, Kurtin SB, Brody H, Bennett R. A history of dermatologic surgery in the United States. *Dermatol Surg* 2000;26(1):5-11.
8. Torre D. New York, cradle of cryosurgery. *N Y State J Med* 1967;67(3):465-7.
9. Elton RF. The appropriate use of liquid nitrogen. *Prim Care* 1983;10(3):459-78.
10. Neel HBd. Cryosurgery for the treatment of cancer. *Laryngoscope* 1980;90(8 Pt 2):1-48.
11. Hirvonen J. Some aspects on death in the cold and concomitant frostbites. *Int J Circumpolar Health* 2000;59(2):131-6.
12. Kumar AA. Liquid nitrogen cryotherapy in the treatment of benign skin lesions. *J Fam Pract* 1975;2(3):221-4.
13. Duperrat B, Bouquet JF. The use of liquid nitrogen in dermatological cryotherapy. *Australas J Dermatol* 1971;12(1):5-9.
14. Anonymous. Skin refrigerants. *J Dermatol Surg Oncol* 1985;11(1):8-9.
15. O' Cathain A, Brazier JE, Milner PC, Fall M. Cost effectiveness of minor surgery in general practice: a prospective comparison with hospital practice. *Br J Gen Pract* 1992;42(354):13-7.
16. Price E, Biro L. Use of thermocouples in cryosurgery. *J Dermatol Surg Oncol* 1983;9(3):215-8.

17. Simon CA. A simple and accurate cryosurgical tool for the treatment of benign skin lesions: the "hard tail" dip-stick. *J Dermatol Surg Oncol* 1986;12(7):680-2.
18. Jones SK, Darville JM. Transmission of virus particles by cryotherapy and multi-use caustic pencils: a problem to dermatologists? *Br J Dermatol* 1989;121(4):481-6.
19. Torre D. Understanding the relationship between lateral spread of freeze and depth of freeze. *J Dermatol Surg Oncol* 1979;5(1):51-3.
20. Anvari B, Milner TE, Tanenbaum BS, Nelson JS. A comparative study of human skin thermal response to sapphire contact and cryogen spray cooling. *IEEE Trans Biomed Eng* 1998;45(7):934-41.
21. Chiarello SE. Cryopeeling (extensive cryosurgery) for treatment of actinic keratoses: an update and comparison. *Dermatol Surg* 2000;26(8):728-32.
22. Torre D. Cryosurgical treatment of epitheliomas using the cone-spray technique. *J Dermatol Surg Oncol* 1977;3(4):432-6.
23. Blume-Peytavi U, Zouboulis CC, Jacobi H, Scholz A, Bisson S, Orfanos CE. Successful outcome of cryosurgery in patients with granuloma annulare. *Br J Dermatol* 1994;130(4):494-7.
24. Pappenfort RB. Semicircular thermocouple needle depth gauge for cryoprocures. *Cutis* 1981;27(6):605-8.
25. Zacarian SA. Cryosurgery in dermatology. *Int Surg* 1967;47(6):528-34.
26. Bourke JF, Berth-Jones J, Hutchinson PE. Cryotherapy of common viral warts at intervals of 1, 2 and 3 weeks. *Br J Dermatol* 1995;132(3):433-6.
27. Wetmore SJ. Cryosurgery for common skin lesions. Treatment in family physicians' offices. *Can Fam Physician* 1999;45:964-74.
28. Zouboulis CC. Cryosurgery in dermatology. *Eur J Dermatol* 1998;8(7):466-74.
29. Credo BV, Dymont PG. Molluscum Contagiosum. *Adolesc Med* 1996;7(1):57-62.
30. Mescon H, Kohn SR. Acne. Pathogenesis and treatment. *Minn Med* 1974; 57(10):788-92.
31. Beacham BE. Common skin tumors in the elderly. *Am Fam Physician* 1992; 46(1):163-8.

32. Kuflik EG. Cryosurgery updated. *J Am Acad Dermatol* 1994;31(6):925-44; quiz 944-6.
33. Shah M, Kingston TP, Cotterill JA. Eruptive pyogenic granulomas: a successfully treated patient and review of the literature. *Br J Dermatol* 1995;133(5):795-6.
34. Spiller WF, Spiller RF. Cryosurgery in dermatologic office practice: special reference to dermatofibroma and mucous cyst of the lip. *South Med J* 1975;68(2):157-60.
35. English RS, Shenefelt PD. Keloids and hypertrophic scars. *Dermatol Surg* 1999;25(8):631-8.
36. Pease GR, Rubinsky B, Wong ST, Roos MS, Gilbert JC, Arav A. An integrated probe for magnetic resonance imaging monitored skin cryosurgery. *J Biomech Eng* 1995;117(1):59-63.
37. Torre D. Cosmetic aspects of cryosurgery. *Cutis* 1976;17(3):422.
38. Zacarian SA, Adham MI. Cryotherapy of cutaneous malignancy. *Cryobiology* 1966;2(4):212-8.
39. Blackwood J, Moore FT, Pace WG. Cryotherapy for malignant tumors. *Cryobiology* 1967;4(1):33-8.
40. Kuflik EG. Cryosurgery for cutaneous malignancy. An update. *Dermatol Surg* 1997;23(11):1081-7.
41. Kim HJ, Min HG, Lee ES. Bowen's diseases and basal cell carcinomas in a patient. *J Dermatol* 1999;26(10):695-7.
42. Becker F. Lentigo maligna: cut out or freeze? *J Dermatol Surg Oncol* 1980;6(9):691, 700.
43. Tur E, Brenner S. Treatment of Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol* 1996;132(3):327-31.
44. Roenigk RK, Roenigk HH, Jr. Current surgical management of skin cancer in dermatology. *J Dermatol Surg Oncol* 1990;16(2):136-51.
45. Sheard C. Malignancy treated with liquid nitrogen. *Cutis* 1976;18(2):243.
46. Mallon E, Dawber R. Cryosurgery in the treatment of basal cell carcinoma. Assessment of one and two freeze-thaw cycle schedules. *Dermatol Surg* 1996;22(10):854-8.

47. Zacarian SA. How accurate is temperature monitoring in cryosurgery and is there an alternative? *J Dermatol Surg Oncol* 1980;6(8):627-32.
48. Gage AA, Guest K, Montes M, Caruana JA, Whalen DA, Jr. Effect of varying freezing and thawing rates in experimental cryosurgery. *Cryobiology* 1985;22(2):175-82.
49. Coleman WPd. More of lentigo maligna: cut out or freeze? *J Dermatol Surg Oncol* 1980;6(12):978.
50. Kuflik EG, Gage AA. The five-year cure rate achieved by cryosurgery for skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 1991;24(6 Pt 1):1002-4.
51. Jaramillo-Ayerbe F. Cryosurgery in difficult to treat basal cell carcinoma. *Int J Dermatol* 2000;39(3):223-9.
52. Kuflik EG, Gage AA. Recurrent basal cell carcinoma treated with cryosurgery. *J Am Acad Dermatol* 1997;37(1):82-4.
53. Atkinson SC. Action and indications for solid carbon dioxide therapy in dermatology. *J Med Soc N J* 1966;63(5):168-70.
54. Dachow-Siwiec E. Cryosurgery in the treatment of skin cancers: indications and management. *Clin Dermatol* 1990;8(1):80-5.
55. Jester DM. Office procedures. Cryotherapy of dermal abnormalities. *Prim Care* 1997;24(2):269-80.
56. Iglesias Júnior J. Crioterapia: indicações e técnica. *Femina* 1987;15(7):572.
57. Holden H. Cryotherapy in the treatment of cancer with special reference to its indications and limitations. *Acta Otorhinolaryngol Belg* 1975;29(5):835-8.
58. Peck GL. Hypertrophic scar after cryotherapy and topical tretinoin. *Arch Dermatol* 1973;108(6):819-22.
59. Wingfield DL, Fraunfelder FT. Possible complications secondary to cryotherapy. *Ophthalmic Surg* 1979;10(8):47-55.
60. Elton RF. Complications of cutaneous cryosurgery. *J Am Acad Dermatol* 1983;8(4):513-9.
61. Heidenheim M, Jemec GB. Side effects of cryotherapy. *J Am Acad Dermatol* 1991;24(4):653.

62. Ciecierski L. Clinical application and mechanism of action of cryotherapy. *Pol Tyg Lek* 1969;24(51):1979-81.
63. Burge SM, Dawber RP. Hair follicle destruction and regeneration in guinea pig skin after cutaneous freeze injury. *Cryobiology* 1990;27(2):153-63.
64. Rothenborg HW. 125-I-serum albumin assay of edema in rat skin with and without vasoconstriction after cryosurgery type freezing. *Cryobiology* 1972;9(1):1-8.
65. Bircher AJ, Buchner SA. Blood flow response to cryosurgery on basal cell carcinomas. *Acta Derm Venereol* 1991;71(6):531-3.
66. Chavis RM, Vygantas CM, Vygantas A. Experimental inhibition of prostaglandin-like inflammatory response after cryotherapy. *Am J Ophthalmol* 1976;82(2):310-2.
67. Zacarian SA. Histopathology of skin cancer following cryosurgery. Preliminary report. *Int Surg* 1970;54(4):255-63.
68. Lourenço EA, Almeida CIRd, Antico Filho A, Mizutani RK. Estudo histopatológico dos efeitos da crioterapia com dióxido de carbono em cornetos de cobaias. *Rev. bras. otorrinolaringol* 1986;57(2):65-70.
69. Falconieri G, Lugnani F, Zanconati F, Signoretto D, Di Bonito L. Histopathology of the frozen prostate. The microscopic bases of prostatic carcinoma cryoablation. *Pathol Res Pract* 1996;192(6):579-87.
70. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996;125(8):680-7.
71. Gallin J, Goldstein I, Snyderman R, editors. *Inflammation*. 2nd ed. ed. New York: Raven Press; 1992.
72. Paul WE, editor. *Fundamental Immunology*. 3rd ed. New York: Raven Press; 1993.
73. Robbins S, Cotran R. Inflammation and repair. In: Robbins S, Cotran R, editors. *Pathologic basis of disease*. Philadelphia: WB Saunders; 1979. p. 59-63.
74. Anderson G. Resolution of chronic inflammation by therapeutic induction of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 1996;17:438-442.
75. Schmidt KL, Ott VR, Rocher G, Schaller H. Heat, cold and inflammation. *Z Rheumatol* 1979;38(11-12):391-404.

76. Yoshino S, Cromartie WJ, Schwab JH. Inflammation induced by bacterial cell wall fragments in the rat air pouch. Comparison of rat strains and measurement of arachidonic acid metabolites. *Am J Pathol* 1985;121(2):327-36.
77. Rylander R. The role of endotoxin for reactions after exposure to cotton dust. *Am J Ind Med* 1987;12(6):687-97.
78. Marshall JS, Bienenstock J. The role of mast cells in inflammatory reactions of the airways, skin and intestine. *Curr Opin Immunol* 1994;6(6):853-9.
79. Dinarello CA. The biological properties of interleukin-1. *Eur Cytokine Netw* 1994;5(6):517-31.
80. Kapp A. The role of cytokines in the psoriatic inflammation. *J Dermatol Sci* 1993;5(3):133-42.
81. Bingaman AW, Ha J, Waitze SY, Durham MM, Cho HR, Tucker-Burden C, et al. Vigorous allograft rejection in the absence of danger. *J Immunol* 2000;164(6):3065-71.
82. Lawley TJ, Kubota Y. Cell adhesion molecules and cutaneous inflammation. *Semin Dermatol* 1991;10(3):256-9.
83. White MV. The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86(4 Pt 2):599-605.
84. Rampart M, De Smet W, Fiers W, Herman AG. Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin in vivo. *J Exp Med* 1989;169(6):2227-32.
85. Liston SL. Nonbacterial inflammation as a means of enhancing skin flap survival. *Laryngoscope* 1984;94(8):1075-85.
86. Kupper TS, Chua AO, Flood P, McGuire J, Gubler U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest* 1987;80(2):430-6.
87. Thepen T, van Vuuren AJ, Kiekens RC, Damen CA, Vooijs WC, van De Winkel JG. Resolution of cutaneous inflammation after local elimination of macrophages. *Nat Biotechnol* 2000;18(1):48-51.

88. Henriques MG, Silva PM, Martins MA, Flores CA, Cunha FQ, Assreuy-Filho J, et al. Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz J Med Biol Res* 1987;20(2):243-9.
89. Omata M, Watanabe M, Hirasawa N, Tsurufuji S, Mue S, Ohuchi K. A role of peripheral leukocytes in vascular permeability and edema formation in air pouch type allergic inflammation in rats. *J Pharmacobiodyn* 1991;14(5):267-75.
90. Buckley TL, Brain SD, Collins PD, Williams TJ. Inflammatory edema induced by interactions between IL-1 and the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J Immunol* 1991;146(10):3424-30.
91. Schubert C, Christophers E, Swensson O, Isei T. Transendothelial cell diapedesis of neutrophils in inflamed human skin. *Arch Dermatol Res* 1989;281(7):475-81.
92. Hanson DF. Fever and the immune response. The effects of physiological temperatures on primary murine splenic T-cell responses in vitro. *J Immunol* 1993;151(1):436-48.
93. Miller AJ, Hopkins SJ, Luheshi GN. Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 1997;120(7):1274-9.
94. Raekallio J, Nieminen L. On the enzymatic response to injury and its mediators. *Med Biol* 1979;57(4):211-9.
95. Jackson JR, Bolognese B, Mangar CA, Hubbard WC, Marshall LA, Winkler JD. The role of platelet activating factor and other lipid mediators in inflammatory angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1998;1392(1):145-52.
96. Jakob T, Udey MC. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion in Langerhans cell-like dendritic cells by inflammatory mediators that mobilize Langerhans cells in vivo. *J Immunol* 1998;160(8):4067-73.
97. Janoff A, Schaefer S, Scherer J, Bean MA. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. II. Mechanism of action of lysosomal cationic protein upon vascular permeability in the rat. *J Exp Med* 1965;122(5):841-51.
98. Smith HR, Larsen GL, Cherniack RM, Wenzel SE, Voelkel NF, Westcott JY, et al. Inflammatory cells and eicosanoid mediators in subjects with late asthmatic responses and increases in airway responsiveness. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89(6):1076-84.

99. Grando SA, Glukhenky BT, Drannik GN, Epshtein EV, Kostromin AP, Korostash TA. Mediators of inflammation in blister fluids from patients with pemphigus vulgaris and bullous pemphigoid. *Arch Dermatol* 1989;125(7):925-30.
100. Scholzen TE, Brzoska T, Kalden DH, O'Reilly F, Armstrong CA, Luger TA, et al. Effect of ultraviolet light on the release of neuropeptides and neuroendocrine hormones in the skin: mediators of photodermatitis and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1999;4(1):55-60.
101. Naik SM, Cannon G, Burbach GJ, Singh SR, Swerlick RA, Wilcox JN, et al. Human keratinocytes constitutively express interleukin-18 and secrete biologically active interleukin-18 after treatment with pro-inflammatory mediators and dinitrochlorobenzene. *J Invest Dermatol* 1999;113(5):766-72.
102. Ishida H, Fujii E, Irie K, Yoshioka T, Muraki T, Ogawa R. Role of inflammatory mediators in lipid A analogue (ONO-4007)-induced vascular permeability change in mouse skin. *Br J Pharmacol* 2000;130(6):1235-40.
103. Kurihara A, Ohuchi K, Tsurufuji S. Correlation of leukocyte accumulation with chemotactic activity in the exudate of an allergic air-pouch inflammation. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1983;71(4):368-70.
104. Iida M, Watanabe K, Tsurufuji M, Takaishi K, Iizuka Y, Tsurufuji S. Level of neutrophil chemotactic factor CINC/gro, a member of the interleukin-8 family, associated with lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Infect Immun* 1992;60(4):1268-72.
105. Hirasawa N, Watanabe M, Mue S, Watanabe K, Tsurufuji S, Ohuchi K. Induction of neutrophil infiltration by rat chemotactic cytokine (CINC) and its inhibition by dexamethasone in rats. *Inflammation* 1992;16(2):187-96.
106. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338(7):436-45.
107. Zachariae CO. Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)* 1993;181:1-37.

108. Rampart M, Van Damme J, Zonnekeyn L, Herman AG. Granulocyte chemotactic protein/interleukin-8 induces plasma leakage and neutrophil accumulation in rabbit skin. *Am J Pathol* 1989;135(1):21-5.
109. Mibu Y, Shimokaway Y, Hayashi H. Lymphocyte chemotaxis in inflammation. X. Heterogeneity of chemotactic responsiveness in human T subsets towards lymphocyte chemotactic factors from delayed hypersensitivity reaction site. *Immunology* 1985;55(3):473-9.
110. Harita S, Shimokawa Y, Mibu Y, Ishida M, Hayashi H. Lymphocyte chemotaxis in inflammation. IX. Further characterization of lymphocyte chemotactic lymphokines produced by purified protein derivative-stimulation in vitro and in vivo. *Immunology* 1984;51(2):295-303.
111. Ortiz-Bravo E, Schumacher HR, Jr. Components generated locally as well as serum alter the phlogistic effect of monosodium urate crystals in vivo. *J Rheumatol* 1993;20(7):1162-6.
112. Sin YM, Wong MK. Effect of sodium aurothiomalate on carrageenan induced inflammation of the air pouch in mice. *Ann Rheum Dis* 1992;51(1):112-6.
113. Souza CA, Cunha FQ, Ferreira SH. Inflammatory edema and migration of leucocytes but not phagocytosis are reduced in young rats. *Braz J Med Biol Res* 1994;27(3):663-70.
114. Movat HZ, Cybulsky MI, Colditz IG, Chan MK, Dinarello CA. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. *Fed Proc* 1987;46(1):97-104.
115. Follin P. Skin chamber technique for study of in vivo exudated human neutrophils. *J Immunol Methods* 1999;232(1-2):55-65.
116. Terui T, Ozawa M, Tagami H. Role of neutrophils in induction of acute inflammation in T-cell-mediated immune dermatosis, psoriasis: a neutrophil-associated inflammation-boosting loop. *Exp Dermatol* 2000;9(1):1-10.
117. Cohen S. Cell mediated immunity and the inflammatory system. *Hum Pathol* 1976;7(3):249-64.

118. Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000;192(5):705-18.
119. Dumonde DC, Pulley MS, Paradinas FJ, Southcott BM, O'Connell D, Robinson MR, et al. Histological features of skin reactions to human lymphoid cell line lymphokine in patients with advanced cancer. *J Pathol* 1982;138(4):289-308.
120. Kuhns DB, DeCarlo E, Hawk DM, Gallin JI. Dynamics of the cellular and humoral components of the inflammatory response elicited in skin blisters in humans. *J Clin Invest* 1992;89(6):1734-40.
121. Santamaria Babi LF, Perez Soler MT, Hauser C, Blaser K. Skin-homing T cells in human cutaneous allergic inflammation. *Immunol Res* 1995;14(4):317-24.
122. Egan PJ, Kimpton W, Seow HF, Bowles VM, Brandon MR, Nash AD. Inflammation-induced changes in the phenotype and cytokine profile of cells migrating through skin and afferent lymph. *Immunology* 1996;89(4):539-46.
123. Orteu CH, Poulter LW, Rustin MH, Sabin CA, Salmon M, Akbar AN. The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. *J Immunol* 1998;161(4):1619-29.
124. Ciecierski L. Results of cryotherapy with liquid nitrogen in various skin diseases. *Pol Tyg Lek* 1969;24(43):1649-51.
125. Monteiro-Pedro V, Vizioli MR, Almeida OPd, Jorge AOC. Effect of local cryotherapy and elevation on Dextran-induced edema in the hind paw of rats. *Braz. j. morphol. sci* 1997;14(2):265-9.
126. Edwards JC, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol* 1981;134(2):147-56.
127. Imaizumi T, Nomura K, Hashimoto I, Sawada Y. Interleukin-1 levels in blister fluids of some skin diseases with blister formation. *Clin Physiol Biochem* 1990;8(4):179-83.

128. Willoughby DA, Sedgwick AD, Giroud JP, Al-Duaij AY, de Brito F. The use of the air pouch to study experimental synovitis and cartilage breakdown. *Biomed Pharmacother* 1986;40(2):45-9.
129. Naidu SH, Beredjiklian P, Adler L, Bora FW, Jr., Baker DG. In vivo inflammatory response to silicone elastomer particulate debris. *J Hand Surg Am* 1996;21(3):496-500.
130. Ahluwalia A, De Felipe C, O'Brien J, Hunt SP, Perretti M. Impaired IL-1beta-induced neutrophil accumulation in tachykinin NK1 receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 1998;124(6):1013-5.
131. Brito GA, Falcao JL, Saraiva SN, Lima AA, Flores CA, Ribeiro RA. Histopathological analysis of rat mesentery as a method for evaluating neutrophil migration: differential effects of dexamethasone and pertussis toxin. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(10):1319-27.
132. Geiser DR, Walker RD. Management of thermal injuries in large animals. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1984;6(1):91-105.
133. Adriance M. Methods of applying liquid nitrogen for skin surgery. *Am Fam Physician* 1994;49(3):579.
134. Augustynowicz SD, Szmurlo WF, Madej GJ. Cryosurgical nitrogen apparatus and recent results of its application in the radical treatment of certain neoplasms. *Cryobiology* 1977;14(1):52-9.
135. Karakashian GV, Sweren RJ. Frigipoint: a new cryosurgical instrument. *J Dermatol Surg Oncol* 1989;15(5):514-7.
136. Krahwinkel DJ, Jr. Cryosurgical treatment of skin diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1980;10(4):787-801.
137. Dougherty L. Scalp cooling to prevent hair loss in chemotherapy. *Prof Nurse* 1996;11(8):507-9.
138. Bartley GB, Bullock JD, Olsen TG, Lutz PD. An experimental study to compare methods of eyelash ablation. *Ophthalmology* 1987;94(10):1286-9.
139. Sullivan JH, Beard C, Bullock JD. Cryosurgery for treatment of trichiasis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1977;74:189-202.

140. Graham GF. Advances in cryosurgery during the past decade. *Cutis* 1993;52(6):365-72.
141. Myers B, Donovan W. Cryosurgery of the skin: an experimental and clinical study. *Ann Plast Surg* 1978;1(3):271-9.
142. Zalla MJ. Basic cutaneous surgery. *Cutis* 1994;53(4):172-86.
143. Thai KE, Sinclair RD. Cryosurgery of benign skin lesions. *Australas J Dermatol* 1999;40(4):175-84; quiz 185-6.
144. Tchervenkov JI, Latter DA, Psychogios J, Christou NV. Altered leukocyte delivery to specific and nonspecific inflammatory skin lesions following burn injury. *J Trauma* 1988;28(5):582-8.
145. Petzelbauer P, Bender JR, Wilson J, Pober JS. Heterogeneity of dermal microvascular endothelial cell antigen expression and cytokine responsiveness in situ and in cell culture. *J Immunol* 1993;151(9):5062-72.
146. Berardesca E, Distanto F. The modulation of skin irritation. *Contact Dermatitis* 1994;31(5):281-7.
147. Gilchrest BA, Stoff JS, Soter NA. Chronologic aging alters the response to ultraviolet-induced inflammation in human skin. *J Invest Dermatol* 1982;79(1):11-5.
148. Hambleton P, Miller P. Studies on immunological air pouch inflammation in the rat. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1988;87(1):70-5.
149. Whyte A, Licence ST, Robinson MK, van der Lienden K. Lymphocyte subsets and adhesion molecules in cutaneous inflammation induced by inflammatory agonists: correlation between E-selectin and gamma delta TcR+ lymphocytes. *Lab Invest* 1996;75(3):439-49.
150. Hesse DG, Tracey KJ, Fong Y, Manogue KR, Palladino MA, Jr., Cerami A, et al. Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surg Gynecol Obstet* 1988;166(2):147-53.
151. Ayala A, Kisala JM, Felt JA, Perrin MM, Chaudry IH. Does endotoxin tolerance prevent the release of inflammatory monokines (interleukin 1, interleukin 6, or tumor necrosis factor) during sepsis? *Arch Surg* 1992;127(2):191-6; discussion 196-7.

152. Silber A, Newman W, Reimann KA, Hendricks E, Walsh D, Ringler DJ. Kinetic expression of endothelial adhesion molecules and relationship to leukocyte recruitment in two cutaneous models of inflammation. *Lab Invest* 1994;70(2):163-75.
153. Nwariaku F, Sikes PJ, Lightfoot E, Jr., Mileski WJ. Inhibition of selectin- and integrin-mediated inflammatory response after burn injury. *J Surg Res* 1996;63(1):355-8.
154. Dunn CJ, Hardee MM, Staite ND. Acute and chronic inflammatory responses to local administration of recombinant IL-1 alpha, IL-beta, TNF alpha, IL-2 and Ifn gamma in mice. *Agents Actions* 1989;27(3-4):290-3.
155. Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Davidson NJ, et al. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* 1995;182(1):99-108.
156. Stewart RJ, Holloway LJ, Isbister WH. Peritoneal neutrophilia: a potential indicator of the surgical acute abdomen. *Aust N Z J Surg* 1984;54(6):565-8.
157. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24(7):1125-8.
158. Maeno Y, Mori Y, Iwasa M, Inoue H. Estimation of local vital reactions in severely burned tissues of guinea pig skin using C3a or C3a desArg as a marker. *Forensic Sci Int* 1993;61(1):43-52.
159. Klein RD, Su GL, Aminlari A, Zhang H, Steinstraesser L, Alarcon WH, et al. Skin lipopolysaccharide-binding protein and IL-1beta production after thermal injury In Process Citation. *J Burn Care Rehabil* 2000;21(4):345-52.
160. Ohzato H, Monden M, Yoshizaki K, Ogata A, Nishimoto N, Gotoh M, et al. Systemic production of interleukin-6 following acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197(3):1556-62.
161. Paquet P, Pierard GE. Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;109(4):308-17.
162. Abeyama K, Eng W, Jester JV, Vink AA, Edelbaum D, Cockerell CJ, et al. A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest* 2000;105(12):1751-9.

163. Faunce DE, Llanas JN, Patel PJ, Gregory MS, Duffner LA, Kovacs EJ. Neutrophil chemokine production in the skin following scald injury. *Burns* 1999;25(5):403-10.
164. Ikai K, Danno K, Horio T, Narumiya S. Effect of ultraviolet irradiation on mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice. *J Invest Dermatol* 1985;85(1):82-4.
165. Movat HZ, Burrowes CE, Cybulsky MI, Dinarello CA. Acute inflammation and a Shwartzman-like reaction induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor. Synergistic action of the cytokines in the induction of inflammation and microvascular injury published erratum appears in *Am J Pathol* 1988 Mar;130(3):642. *Am J Pathol* 1987;129(3):463-76.
166. Kondo S, Sauder DN. Tumor necrosis factor (TNF) receptor type 1 (p55) is a main mediator for TNF-alpha-induced skin inflammation. *Eur J Immunol* 1997;27(7):1713-8.
167. Thai NL, Fu F, Qian S, Sun H, Gao L, Wang SC, et al. Cytokine mRNA profiles in mouse orthotopic liver transplantation. Graft rejection is associated with augmented TH1 function. *Transplantation* 1995;59(2):274-81.
168. Ono I, Gunji H, Zhang JZ, Maruyama K, Kaneko F. A study of cytokines in burn blister fluid related to wound healing. *Burns* 1995;21(5):352-5.
169. Gibran NS, Ferguson M, Heimbach DM, Isik FF. Monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in the human burn wound. *J Surg Res* 1997;70(1):1-6.
170. Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis* 2000;182(1):214-23.
171. Youn JI, Gange RW, Maytum D, Parrish JA. Effect of hypoxia on sunburn cell formation and inflammation induced by ultraviolet radiation. *Photodermatol* 1988;5(6):252-6.
172. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Exp Physiol* 1996;81(6):1021-33.
173. Jones DB. The morphology of acid mucosubstances in leukocytic sticking to endothelium in acute inflammation. *Lab Invest* 1970;23(6):606-11.

174. Mills JN. Lymph node cytology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1989;19(4):697-717.
175. Celdran A, Inarrea P, Fernandez J, Larrocha C, Madero R. Neutrophil dynamics in abdominal cavity of peritonitic rats treated with antiseptics. *Int Surg* 1993;78(4):354-6.
176. Schoning P, Hamlet MP. Experimental frost-bite in Hanford Miniature Swine. II. Vascular changes. *Br J Exp Pathol* 1989;70(1):51-7.
177. Dunnick CA, Gibran NS, Heimbach DM. Substance P has a role in neurogenic mediation of human burn wound healing. *J Burn Care Rehabil* 1996;17(5):390-6.
178. Hocutt JE, Jr. Cryotherapy. *Am Fam Physician* 1981;23(3):141-4.
179. Aas P. Responses of noradrenergic nerves in rabbit ear-artery before and after experimental frost-bite. *Acta Physiol Scand* 1994;150(4):381-8.
180. Chappell VL, LaGrone L, Mileski WJ. Inhibition of leukocyte-mediated tissue destruction by synthetic fibronectin peptide (Trp-9-Tyr). *J Burn Care Rehabil* 1999;20(6):505-10.
181. Chen X, Christou NV. Relative contribution of endothelial cell and polymorphonuclear neutrophil activation in their interactions in systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 1996;131(11):1148-53; discussion 1153-4.
182. Schoning P, Hamlet MP. Experimental frost-bite in Hanford Miniature Swine. I. Epithelial changes. *Br J Exp Pathol* 1989;70(1):41-9.
183. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989;83(3):865-75.
184. Brown DL, Kao WW, Greenhalgh DG. Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery* 1997;121(4):372-80.
185. Christou NV, Zakaluzny I, Marshall JC, Nohr CW. The effect of the immunomodulator RU 41,740 (biostim) on the specific and nonspecific immunosuppression induced by thermal injury or protein deprivation. *Arch Surg* 1988;123(2):207-11.

186. Houck JC, Hellman KB, Chang CM. The biochemistry of lymphocyte-derived mediators of immunological inflammation. *Agents Actions* 1978;8(1-2):73-9.
187. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(1):37-49.
188. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343(2):108-17.
189. Cetinkale O, Konukoglu D, Senel O, Kemerli GD, Yazar S. Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. *Burns* 1999;25(2):105-12.
190. Dong YL, Fleming RY, Yan TZ, Herndon DN, Waymack JP. Effect of ibuprofen on the inflammatory response to surgical wounds. *J Trauma* 1993;35(3):340-3.
191. Eldad A, Ben Meir P, Breiterman S, Chaouat M, Shafran A, Ben-Bassat H. Superoxide dismutase (SOD) for mustard gas burns. *Burns* 1998;24(2):114-9.
192. Sholley MM, Cotran RS. Endothelial proliferation in inflammation. II. Autoradiographic studies in x-irradiated leukopenic rats after thermal injury to the skin. *Am J Pathol* 1978;91(2):229-42.
193. Hindson TC, Spiro J, Scott LV. Clobetasol propionate ointment reduces inflammation after cryotherapy. *Br J Dermatol* 1985;112(5):599-602.
194. Spiro J, Hindson C. Steroid therapy of postcryotherapy inflammation. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(2 Pt 1):306.
195. Humphreys F, Spiro J. The effects of topical indomethacin and clobetasol propionate on post-cryotherapy inflammation. *Br J Dermatol* 1995;132(5):762-5.