

RESPOSTA À APLICAÇÃO TÓPICA DE ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS, TRIGLICERÍDEOS E VITAMINAS 'A' E 'E' NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO EM *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769): EFEITO DA IDADE E IMUNOCOMPETÊNCIA

RAFAEL DA SILVA WIETH*
CARJONE ROSA GONÇALVES**
OBIRAJARA RODRIGUES***
PABLO ELÍAS MARTÍNEZ****

RESUMO

Foi avaliada a utilização tópica de uma solução farmacológica (SFC) contendo ácidos graxos essenciais (AGEs), triglicerídeos de cadeia média (TCMs) e vitaminas 'A' e 'E' na cicatrização de feridas em ratos, segundo a idade e a imunocompetência. Foram utilizados 72 ratos (36 jovens e 36 idosos), cuja metade foi tratada com dexametasona (DEX); os demais constituíram o grupo controle (CON). As lesões realizadas nos animais foram tratadas com SFC ou solução salina (SS). Os animais foram sacrificados e suas lesões avaliadas nos 3^o, 7^o e 14^o dias de pós-operatório (DPO). Nos animais jovens e idosos, as lesões tratadas com SS ($3,12 \pm 0,24$ e $1,32 \pm 0,28$ cm²) apresentaram área de cicatrização superior àquelas tratadas com SFC ($2,27 \pm 0,24$ e $-0,81 \pm 0,30$ cm²). A evolução do processo de cicatrização segundo o DPO mostrou progressiva melhora, enquanto o envelhecimento, imunodepressão e o uso tópico da SFC prejudicaram a cicatrização.

PALAVRAS-CHAVE: cicatrização; ácidos graxos essenciais; triglicerídeos de cadeia média; ratos.

ABSTRACT

Response to topic use of essential fatty acids, triglycerides and vitamins 'a' and 'e' on the healing process in *Rattus Norvegicus* (berkenhout , 1769): effect of age and immunocompetence

In this study, the topic use of a pharmacological solution (PS) containing essential fatty acids, medium-chain triglycerides and vitamins 'A' and 'E' on skin wound healing in rats, in different age and immunocompetence condition was evaluated. Seventy two rats were used (36 young and 36 aged); half of which were treated with dexamethasone; another half were control group. Wounds have been treated with PS or with a saline solution (SS). The animals were sacrificed and the healing wound was measured at 3th, 7th and 14th day after surgery (DAC). Young and aged rats

* Graduando do curso de Enfermagem e Obstetrícia – FURG; rafaelwieth@yahoo.com.br

** Graduanda do curso, Enfermagem e Obstetrícia – FURG; carjone@gmail.com

*** Professor do Dep. de Patologia – FURG; Mestre em Medicina Veterinária – UFPel; DPAT. bira@vetorial.net

**** Professor do Dep. de Ciências Fisiológicas – FURG; Doutor em Ciência Animal – UFMG; dcfpem@furg.br

in SS treatment (3.12 ± 0.24 e 1.32 ± 0.28 cm²) showed healing area bigger than PS treatment (2.27 ± 0.24 e -0.81 ± 0.30 cm²). DAC progress improved the healing process, whereas the aging, immunocompetence and the topic use of PS impaired this process.

KEY WORDS: healing; essential fatty acids; medium-chain triglycerides; rats.

1 – INTRODUÇÃO

O acúmulo de informações na última década e o conhecimento empírico permite, como assinalado por Denda⁽¹⁾, propor novas estratégias para melhorar a homeostasia da pele. Nesse sentido, sabe-se da importância da manutenção da integridade da membrana para proteger a célula dos mecanismos agressores da hipóxia e da facilidade que têm os ácidos graxos essenciais (AGEs) de se incorporar a essa membrana, podendo torná-la mais resistente⁽²⁾.

O ácido linoléico [18:2 (9, 12) ômega-6] é um AGE importante para a integridade da barreira de permeabilidade epidérmica, para o transporte de lipídios e para a manutenção da função e da integridade da membrana celular. Agindo como um imunológico local, provoca resposta inflamatória importante e atua como mediador pró-inflamatório, causando acúmulo de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos, resultando em mudanças histológicas teciduais durante a formação do tecido de granulação, o que aumentava a sua proliferação⁽³⁾. Possui grande capacidade de ser absorvido pelo estrato córneo, na sua aplicação tópica, podendo restaurar completamente a pele que apresenta distúrbios dermatológicos⁽²⁾.

Para fins cicatriciais, os triglicerídeos de cadeia média (TCMs), em especial os ácidos caprílico [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_6\text{-COOH}$] e cáprico [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_8\text{-COOH}$], servem como fonte de energia concentrada para a célula e, com isso, poupam proteínas para a síntese tecidual. Os TCMs possuem, ainda, importante atividade imunológica, pois propiciam intensa vasodilatação local, alteram as funções leucocitárias e aceleram o processo de granulação⁽⁴⁾. Além disso, os TCMs são facilmente absorvidos quando utilizados topicamente, formam uma película protetora na pele, previnem escoriações devido à alta capacidade de hidratação e proporcionam nutrição celular local⁽⁵⁾.

A vitamina A (retinol) é uma molécula pertencente à família dos retinóides, importantes para a visão, reprodução, crescimento e manutenção dos tecidos epiteliais⁽⁶⁾. Portanto, agindo sinergicamente com os AGEs, a vitamina A é essencial para a diferenciação normal dos tecidos epiteliais e secreção mucosa⁽⁶⁾, favorecendo a integridade da

pele e sua cicatrização⁽⁵⁾.

A função primária da vitamina E é atuar na prevenção da oxidação não-enzimática dos componentes celulares, como os ácidos graxos poliinsaturados (AGEs), ocasionada pelos peróxidos (radicais livres) e pelo oxigênio molecular⁽⁶⁾. Por conseguinte, também em sinergia com os AGEs, a vitamina E atua como antioxidante, protegendo a membrana celular do ataque dos radicais livres, substâncias que destroem as células e suas estruturas internas⁽⁵⁾.

O envelhecimento está associado à diminuição na capacidade de manter a homeostase⁽⁷⁾, ao declínio na imunidade celular e humoral⁽⁸⁾ e ao prejuízo no processo de cicatrização^(9, 10). Nas pessoas, o envelhecimento pode ser afetado por fatores genéticos, dieta, condições sociais e pela ocorrência de doenças relacionadas com a idade. Várias funções celulares diminuem progressivamente com o envelhecimento, como a fosforilação oxidativa das mitocôndrias e a capacidade celular de captação de nutrientes e de reparo. Embora várias teorias tenham sido propostas, hoje está claro que o envelhecimento celular envolve um programa molecular endógeno e contínua exposição a influências exógenas adversas durante a vida, ou seja, o envelhecimento celular é resultado de influência multifatorial⁽¹¹⁾.

Os glicocorticóides têm importantes efeitos relacionados ao metabolismo dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios^(12, 13). Em concentrações farmacológicas, os glicocorticóides causam efeitos antiinflamatórios e imunossupressores que prejudicam o processo de cicatrização, porquanto inibem o processamento do antígeno, a função dos linfócitos T, a síntese de mediadores celulares da resposta inflamatória, a migração celular e a ação leucocitária nos locais de inflamação⁽¹⁴⁾. Além disso, os glicocorticóides reduzem o número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos na circulação⁽¹³⁾.

Portanto, neste estudo pretendeu-se avaliar a eficácia da utilização tópica de uma solução farmacológica cicatrizante (SFC) contendo AGEs, TCMs e vitaminas A e E no processo de cicatrização de feridas em ratos (*Rattus norvegicus*), segundo os efeitos da idade e da imunocompetência.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Neste estudo foram utilizados 72 ratos (*Rattus norvegicus*)

machos da linhagem Wistar, sendo 36 jovens (de três a cinco meses de idade) e 36 idosos (de 18 a 20 meses de idade), provenientes do biotério central da FURG. Foram obedecidas as normas da Nomenclatura Anatômica Veterinária (1983) e os Princípios Éticos de Experimentação Animal do International Council for Laboratory Animal Science. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), onde permaneceram acondicionados em gaiolas, isoladamente, e mantidos sob condições controladas de temperatura (21°C), umidade (60%), fotoperíodo (12 horas claro/12 horas escuro) e ração *ad libitum*.

Formação dos grupos e tratamento sistêmico

Os ratos foram divididos igualmente em dois grupos: controle (CON) e dexametasona (DEX); neste último os animais foram imunodeprimidos, recebendo o glicocorticóide dexametasona na ingesta hídrica. A dexametasona foi administrada na água de bebida, cinco dias antes da execução dos ferimentos e durante todo o período de acompanhamento do processo de cicatrização. A concentração da dexametasona (Decadron 0,5 mg – Lab. Prodome, Campinas, SP, Brasil) foi ajustada em 2,5 mg/L de água, de acordo com Oz, Hughes e Varilek⁽¹⁵⁾.

Em 24 ratos jovens ($300,86 \pm 7,12g$) foram efetuadas duas lesões no dorso de cada animal, segundo metodologia posteriormente exposta. As feridas de cada animal foram aleatoriamente designadas para receber um dos seguintes tratamentos tópicos: solução salina (SS) ou solução farmacológica cicatrizante (SFC). Os animais foram sacrificados e suas lesões estudadas, respectivamente, aos 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório (DPO).

Nos outros 12 ratos jovens ($374,16 \pm 8,23g$) e 36 ratos idosos ($575,57 \pm 10,07g$) foi efetuada apenas uma lesão por animal. Os animais receberam aleatoriamente os tratamentos SS e SFC. O acompanhamento da evolução das lesões foi efetuado nos 3^o, 7^o e 14^o DPOs.

Indução das lesões e tratamento tópico

Os animais foram anestesiados por meio de inalação de éter etílico (Labsynth, SP) e fixados sob prancha em posição de decúbito ventral. Após, realizou-se a tricotomia da região dorsal com tesoura cirúrgica e a anti-sepsia com PVPI alcoólico a 2%, segundo Prata,

Haddad e Goldemberg⁽¹⁶⁾. Em seguida, com instrumental cirúrgico, pinçou-se a pele tricotomizada, de modo a formar uma prega de 1cm de altura, na qual foi efetuada a lesão com uma tesoura cirúrgica, expondo as fáscias musculares; assim, estabeleceram-se ferimentos elípticos com aproximadamente 2cm de diâmetro menor. Por meio de paquímetro, registraram-se os diâmetros (maior e menor) das lesões iniciais, depois calculou-se a estimativa das áreas, utilizando a equação matemática $A = \pi.R.r$ (A representa a área, R o raio maior da lesão e r o raio menor).

O tratamento tópico consistiu na aplicação diária de 1ml de solução salina nas lesões dos animais do subgrupo SS e de 1ml da SFC nas lesões dos animais que formaram esse subgrupo. Esse procedimento foi realizado utilizando-se pipetas graduadas em 1ml.

A SFC foi fornecida pela farmácia de manipulação do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., da FURG. A fórmula é composta basicamente por ácido linoléico 30% (AGE), ácidos caprílico e cáprico 67g – 67% (TCMs), vitamina A (2500 UI – 1%) e vitamina E (100 UI – 1%).

Coleta de dados

Decorridos os DPOs preestabelecidos, os animais foram sacrificados com inalação de éter etílico para a coleta de fragmentos da lesão, fixados em formol a 10% e submetidos à inclusão em parafina para análise histológica⁽¹⁷⁾. As lesões finais foram mensuradas por meio de paquímetro e em seguida as áreas foram estimadas. A área cicatricial resultou da diferença entre a área final e a inicial (expressa em cm²).

Coletaram-se ainda amostras sanguíneas de cada rato para hemograma e testes bioquímicos (triglicerídeos, colesterol e glicose). Esse procedimento foi realizado por meio de laparotomia, seguida de dissecação da veia principal do sistema porta, de onde foram retirados 5ml de sangue de cada animal com agulhas e seringas descartáveis.

Análise histológica

O material ressecado no dia do sacrifício foi fixado por meio de imersão imediata em formol a 10%. Cortes transversais de 3mm de espessura foram efetuados nas áreas centrais das lesões. Esses cortes passaram pelo processamento histológico de rotina, com inclusão em parafina, confecção de lâmina com cortes de 5µm de espessura, e corados com hematoxilina e eosina. Para avaliação da presença de colágeno, foi aplicada a técnica de coloração de Masson⁽¹⁸⁾.

A análise histológica teve por objetivo avaliar os seguintes

parâmetros: presença de necrose e exsudato leucocitário em epiderme e derme; presença de tecido de granulação na área da lesão; presença de colágeno, e presença de regeneração epitelial. De acordo com Palma et al. ⁽¹⁹⁾, tais paradigmas anatomopatológicos foram quantificados por meio de escores discretos relativos a suas intensidades: 0 – ausente; 1 – discreto (parâmetro presente em menos de 20% da lesão); 2 – moderado (parâmetro presente entre 20 e 50% da lesão); 3 – acentuado (parâmetro presente em mais de 50% da lesão).

O estudo histológico foi realizado no Laboratório de Patologia do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., da FURG, localizado na Área Acadêmica Dr. Newton Azevedo.

Análise hematológica

O sangue coletado de cada rato para hemograma (3ml) foi imediatamente acondicionado em tubo a vácuo contendo o anticoagulante EDTA K₂ na concentração de 1,8mg/ml de sangue. Para os testes bioquímicos de triglicerídeos, colesterol e glicose, as amostras sanguíneas de cada rato (2ml) foram coletadas diretamente em tubo de centrífuga, refrigeradas (4° C) para facilitar a formação do coágulo, centrifugadas, o soro foi armazenado em endorques e as amostras foram encaminhadas para análise.

Os hemogramas e os testes bioquímicos foram realizados pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Dr. Miguel Riet Corrêa Jr., da FURG.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão. A área cicatricial foi obtida pela diferença absoluta entre os valores da área do ferimento inicial e final. Para comparar o efeito de uma ou duas lesões no processo cicatricial e nos outros parâmetros, foi realizada uma análise considerando exclusivamente os animais jovens. Posteriormente foi efetuada uma análise considerando os dois grupos etários. A avaliação do processo de cicatrização foi efetuada por meio de análise de variância (ANOVA) segundo o período pós-operatório, considerando o tratamento tópico, o efeito do sistema imune, o número de lesões e a idade dos animais, quando apropriado. Para a comparação das médias, foi utilizado o teste Tukey, sendo considerada diferença significativa quando $P < 0,05$. Para a análise histológica, utilizou-se o procedimento não-paramétrico de Kruskal-Wallis Anova e o teste *a posteriori* de Mann-Whitney U ($P < 0,05$).

3 – RESULTADOS

Processo cicatricial: efeito de uma e duas lesões

Inicialmente foi efetuada a avaliação do processo cicatricial em ratos jovens com duas lesões (dados não-apresentados) e constatou-se que a evolução da cicatrização atingiu um platô entre os 14 e 21 dias. Considerando esse resultado, os achados no 21º dia foram eliminados das posteriores análises e esse grupo foi excluído nos experimentos seguintes.

Considerando todos os DPOs, as áreas cicatriciais nos animais com uma ($2,19 \pm 0,86 \text{ cm}^2$) e duas ($3,82 \pm 0,6 \text{ cm}^2$) lesões foram estatisticamente semelhantes. Nos animais com duas lesões, a contagem de leucócitos ($8,72 \pm 0,75 \cdot 10^3 \text{ células } \mu\text{l}^{-1}$) foi superior ($P=0,02$) à do grupo com uma lesão ($6,25 \pm 0,45 \cdot 10^3 \text{ células } \mu\text{l}^{-1}$). O hematócrito foi afetado pelo número de lesões e pelo DPO, e ao analisar a interação desses parâmetros observou-se efeito significativo. Os resultados são apresentados no Gráfico 1. Nenhum outro parâmetro hematológico ou bioquímico foi afetado significativamente pelo número de lesões.

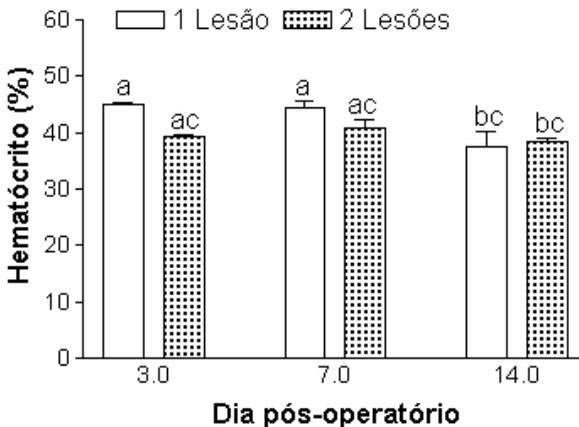


GRÁFICO 1 – Hematócritos (média \pm erro-padrão) registrados em ratos jovens segundo o número de lesões e o dia pós-operatório. Barras com letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$)

Com o intuito de evitar reiteração na apresentação dos resultados, as diferenças observadas nos animais jovens, não relacionadas ao número de lesões, serão apresentadas em comparação com os animais idosos.

Processo cicatricial: efeito da idade e do tratamento

As áreas iniciais das lesões dos animais jovens e idosos foram significativamente diferentes ($P < 0,05$), pois registrou-se $9,76 \pm 0,15 \text{cm}^2$ para jovens e $12,12 \pm 0,30 \text{cm}^2$ para idosos. Por essa razão, em todas as análises que envolveram a área cicatricial, acrescentou-se a área inicial como co-variável.

Considerando que os animais jovens não apresentaram diferenças na área cicatricial segundo o número de lesões, estes foram considerados como um único grupo, a fim de se efetuar as diferentes comparações com os ratos idosos. Dessa forma, constatou-se que a área cicatricial foi significativamente maior nos animais jovens que nos idosos e que o tratamento com SS apresentou uma capacidade de cicatrização significativamente superior à registrada quando aplicada a SFC. Posteriormente, como mostrado no Gráfico 2, o tratamento tópico e a idade apresentaram interação significativa ($P < 0,05$). As áreas cicatriciais demonstraram diferenças entre as idades e os tratamentos. As lesões tratadas com SS ($3,12 \pm 0,24 \text{cm}^2$) apresentaram área de cicatrização maior que a das tratadas com SFC ($2,27 \pm 0,24 \text{cm}^2$) nos animais jovens, e estas, por sua vez, foram maiores que as dos idosos independentemente do tratamento. Além disso, nos idosos foram observadas as mesmas diferenças com relação ao tratamento tópico que nos animais jovens, registrando-se as áreas cicatriciais $1,32 \pm 0,28$ e $-0,81 \pm 0,30 \text{cm}^2$ para as lesões tratadas com SS e SFC, respectivamente.

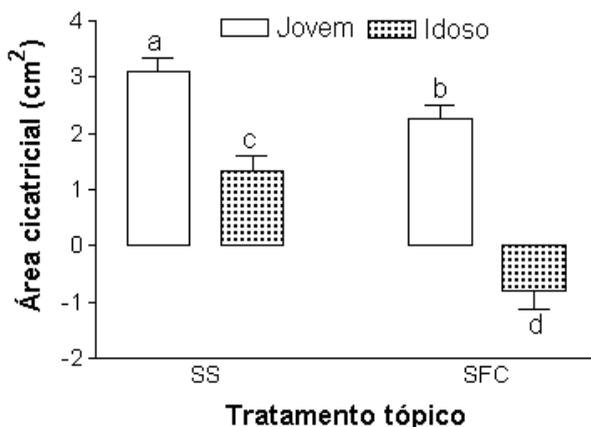


GRÁFICO 2 – Efeito da idade (jovens e idosos) e do tratamento tópico (SS e SFC) na área cicatricial (média \pm erro padrão) de ratos. Barras com letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Processo cicatricial: efeito do DPO, a imunocompetência e o

tratamento tópico

O tratamento com DEX, o DPO e o tratamento tópico afetaram significativamente a capacidade de cicatrização. Ainda com relação à área cicatricial, houve interação significativa ($P < 0,05$) entre o tratamento tópico, o DPO e o efeito do sistema imune (Gráfico 3). Em geral, verificou-se que a cicatrização evoluiu progressivamente segundo o DPO, porém a imunossupressão e o tratamento com SFC retardaram o processo de cicatrização.

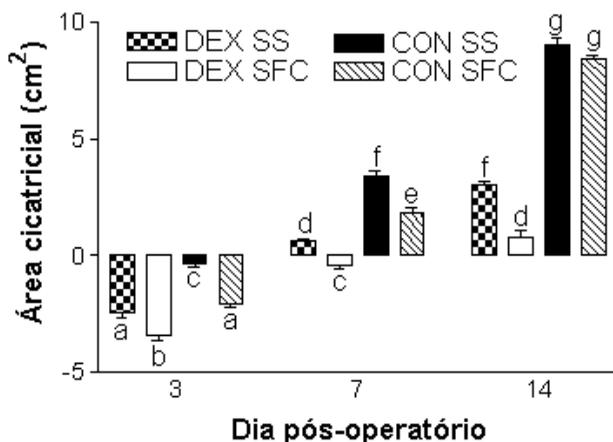


GRÁFICO 3 – Efeito da imunocompetência (DEX e CON), dia pós-operatório (3º, 7º e 14º) e do tratamento tópico (SS e SFC) na área cicatricial (média ± erro padrão) de ratos. Barras com letras distintas indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

De forma ilustrativa podemos especificar que as áreas cicatriciais no 3º DPO foram $-0,35 \pm 0,16$ e $-2,47 \pm 0,21 \text{cm}^2$ ($P < 0,05$) para os grupos CON e DEX tratados com SS, respectivamente; já no 14º DPO, para o mesmo tratamento tópico, estas áreas foram de $9,07 \pm 0,27$ e $3,03 \pm 0,17 \text{cm}^2$ ($P < 0,05$) para os grupos CON e DEX, respectivamente. No tratamento com SFC, no 3º DPO, as áreas cicatriciais foram $-2,02 \pm 0,21$ e $-3,39 \pm 0,22 \text{cm}^2$ ($P < 0,05$) para os grupos CON e DEX, respectivamente; no 14º DPO, as áreas cicatriciais das lesões tratadas com SFC foram $8,45 \pm 0,14$ e $0,75 \pm 0,30 \text{cm}^2$ ($P < 0,05$) para os grupos CON e DEX, respectivamente. Com base nesses dados, notou-se que as diferenças mais significativas foram registradas no 14º DPO quando a resposta cicatricial do grupo CON foi expressivamente melhor que a do grupo DEX, demonstrando um efeito negativo da imunodepressão na cicatrização. Além disso, verificou-se que a dexametasona teve sua ação

potencializada, quando associada ao tratamento tópico com a SFC.

Análise hematológica e bioquímica

O tratamento tópico e o DPO não influenciaram ($P>0,05$) na contagem de leucócitos dos animais. O efeito do sistema imune alterou a concentração dessas células ($P<0,05$), sendo registradas $8,05 \pm 0,50 \cdot 10^3$ e $6,31 \pm 0,36 \cdot 10^3$ células μl^{-1} para os grupos CON e DEX, respectivamente; a idade também influenciou a contagem de leucócitos, que foi de $7,85 \pm 0,55 \cdot 10^3$ e $6,56 \pm 0,32 \cdot 10^3$ células μl^{-1} para jovens e idosos, respectivamente.

A idade e a imunocompetência afetaram ($P<0,05$) o hematócrito dos ratos. Registraram-se maiores valores em idosos ($43,93 \pm 0,83\%$) do que em jovens ($40,40 \pm 0,62\%$) e foram superiores no grupo DEX ($43,86 \pm 0,93\%$) do que no CON ($40,46 \pm 0,51\%$).

As concentrações de triglicerídeos e colesterol foram maiores nos idosos ($221,22 \pm 39,81$ mg dl^{-1} e $169,57 \pm 14,10$ mg dl^{-1} , respectivamente) do que nos jovens ($117,95 \pm 6,80$ mg dl^{-1} e $85,60 \pm 4,59$ mg dl^{-1}). Nos tratados com DEX, as concentrações de triglicerídeos ($205,95 \pm 34,47$ mg dl^{-1}), colesterol ($158,19 \pm 11,70$ mg dl^{-1}) e glicose ($459,80 \pm 16,97$ mg dl^{-1}) foram maiores do que no grupo CON ($118,11 \pm 7,56$ mg dl^{-1} ; $84,71 \pm 7,25$ mg dl^{-1} e $292,88 \pm 19,84$ mg dl^{-1} , respectivamente). Os triglicerídeos, o colesterol e a glicose não foram significativamente afetados pelas outras variáveis analisadas.

Análises de correlação foram realizadas entre a área cicatricial e os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os resultados mais relevantes ($P<0,05$) foram verificados na associação dessa variável com as concentrações de colesterol e glicose, que assinalaram $-0,32$ e $-0,39\%$, respectivamente.

Estudo histológico

O estudo compreendeu 44 ratos, sendo 20 jovens e 24 idosos, dos quais 8 jovens possuíam duas lesões, totalizando 52 lesões analisadas. A idade e o tratamento tópico não interferiram ($P>0,05$) na análise histológica dos animais em questão.

Os diferentes DPOs afetaram ($P<0,05$) a presença de necrose e exsudato leucocitário, sendo de $2,62 \pm 0,15$, $1,62 \pm 0,23$ e $1,00 \pm 0,23$ para 3^o, 7^o e 14^o dias, respectivamente. O tratamento com DEX aumentou a necrose e exsudato leucocitário ($2,21 \pm 0,17$), comparado ao grupo CON ($1,33 \pm 0,22$). O tecido de granulação foi afetado

unicamente pelo DPO, sendo inferior no 3º dia ($0,81 \pm 0,13$) e semelhante no 7º dia ($2,00 \pm 0,20$) e no 14º ($2,06 \pm 0,22$). A presença de colágeno e a regeneração epitelial foram diferentes segundo o DPO, sendo no 3º dia $0,12 \pm 0,12$ e $0,00$; no 7º dia, $1,37 \pm 0,27$ e $0,50 \pm 0,20$, e no 14º dia, $2,06 \pm 0,26$ e $0,93 \pm 0,22$, respectivamente. A presença de colágeno e a regeneração epitelial foi menor no DEX ($0,73 \pm 0,21$ e $0,13 \pm 0,09$, respectivamente) do que no grupo CON ($1,58 \pm 0,33$ e $0,79 \pm 0,18$, respectivamente).

4 – DISCUSSÃO

A contagem de leucócitos superior nos ratos com duas lesões indica uma resposta imunológica mais acentuada nesses animais. Isso pode ser explicado pela maior interrupção na continuidade da pele (animais com duas lesões), que acionou os mecanismos de defesa do organismo, liberando citocinas, as quais recrutaram células (polimorfonucleares) para o local lesado e estimularam a leucopoiese.

O fato de os ratos possuírem perda da continuidade epitelial os expõe a perdas hídricas através das lesões. Presume-se, então, que os animais com lesões recentes percam mais água e, conseqüentemente, aumentem as concentrações das células sanguíneas. Isso auxilia a explicar a pequena elevação do hematócrito no 3º e 7º DPO.

Como esperado, o processo de cicatrização foi prejudicado nos animais idosos, considerando o declínio na imunidade celular e humoral, segundo Ginaldi et al.⁽⁸⁾, e o prejuízo no processo de cicatrização, de acordo com Ghadially et al.⁽⁹⁾ e Jenkins⁽¹⁰⁾. Entretanto, o uso tópico da SFC, que, por sua constituição rica em AGEs, TCMs e vitamina A e E, segundo as indicações de Declair⁽³⁾, Declair, Carmona e Cruz⁽²⁾ e Goldmeier⁽⁵⁾, deveria acelerar o processo cicatricial, retardou-o expressivamente. O resultado do presente estudo, ao contrariar a bibliografia consultada, merece criteriosa análise para sua interpretação. Nesse sentido, devemos analisar quali-quantitativamente os constituintes dessa solução. Assim, podemos observar que os AGEs e as vitaminas utilizadas em geral carecem de contra-indicações. Porém, os TCMs merecem considerações a respeito de sua possível toxicidade⁽²⁰⁾. Além disso, por serem facilmente absorvidos quando utilizados topicamente⁽⁵⁾ e constituírem o principal componente da fórmula, os TCMs requerem particular atenção. Não obstante, a informação sobre o efeito dos TCMs é contraditória. Foi verificado que esses triglicérides aumentaram a proliferação de microorganismos em ratos⁽²¹⁾ e em humanos⁽²²⁾, podendo também elevar a incidência de neoplasias⁽²⁰⁾. Todavia, muitas informações mostram ação benéfica ou pouco clara e efeitos

diferenciados segundo a espécie⁽²⁰⁾.

O efeito do tratamento tópico com SFC parece não prejudicar quaisquer das variáveis histológicas analisadas neste estudo, portanto seu efeito depressor da cicatrização pode ser devido à atuação direta em estruturas não-quantificadas ou indireta pela alteração da liberação de citocinas ou outros mediadores do processo cicatricial. Desse modo, a ação da SFC dependeria de sua infiltração no ferimento, e essa capacidade deveria ser maior nos primeiros DPOs. Confirmando essa assertiva, foi verificado que o efeito inibitório da SFC no grupo CON foi significativo no 3° e 7° DPO e não mostrou diferenças no 14° DPO. Entretanto, no grupo DEX, a SFC retardou a cicatrização em todos os períodos. Isso poderia ser associado ao fato de a dexametasona ter afetado significativamente os parâmetros histológicos, podendo, assim, facilitar a atuação da SFC. Além disso, a imunossupressão prejudicou o processo cicatricial em todos os DPOs.

A diminuição na contagem de leucócitos e o aumento na concentração de triglicerídeos e colesterol no grupo DEX e nos idosos podem justificar a diminuição na cicatrização desses animais. Da mesma forma, o aumento na concentração de glicose nos animais tratados com glicocorticóide poderia estar relacionado com a redução da cicatrização.

Histologicamente, a evolução do processo cicatricial apresentou características normais, mostrando diminuição da presença de necrose e exsudato leucocitário à medida que progrediam os DPOs. Contrariamente, a presença de colágeno e de regeneração epitelial aumentou conforme se sucediam os DPOs, sendo observado para o tecido de granulação um comportamento semelhante.

A presença reduzida de colágeno nas lesões dos animais do grupo DEX está diretamente ligada à ação dos glicocorticóides, pois esses hormônios, além de limitarem a resposta inflamatória⁽¹³⁾, inibem a síntese das fibras do conjuntivo, dificultando a cicatrização das feridas⁽²³⁾. O colágeno é uma proteína estável, sendo sua renovação muito lenta⁽²³⁾, o que justifica o fato de sua presença ser maior conforme a seqüência dos dias, ou seja, no 14° DPO. Como sugerido por Wanda e Dorsett-Martin⁽²⁴⁾, neste trabalho se verifica a conveniência do uso de ratos como modelo de estudo no processo de cicatrização de feridas cutâneas.

5 – CONCLUSÃO

O envelhecimento e a imunodepressão retardam a cicatrização. O tratamento tópico com a SFC prejudica o processo cicatricial em ratos;

portanto, não é recomendado seu emprego até a realização de estudos complementares na espécie humana, para validar ou não sua utilização.

Além disso, o presente estudo permitiu a elaboração de um modelo experimental que viabilizará o desenvolvimento de pesquisas que avaliem o processo cicatricial de feridas cutâneas em ratos.

REFERÊNCIAS

- [1] DENDA M. New strategies to improve skin barrier homeostasis, *Adv. Drug Deliv. Review*, 54(suppl. 1):5123-5130, 2002.
- [2] DECLAIR V; CARMONA MP; CRUZ JA. Ácidos graxos essenciais: protetores celulares dos mecanismos agressivos da lesão hipóxica. *Dermatologia Atual*, 4:11-16,1998.
- [3] DECLAIR V. Efeito do triglicéris de cadeia média na aceleração do processo de feridas, *Nutrição Enteral e Esportiva*, 5:4-8, 1994.
- [4] GIRONDI JBR; WATERKEMPER R. O uso de ácidos graxos essenciais no tratamento de flebites e extravasamento de quimioterápicos. *Cepon*, 2001.
- [5] GOLDMEIER S. Comparação dos triglicerídeos de cadeia média com ácidos graxos essenciais, com o polivinilpirrolidona-iodo no tratamento das úlceras de decúbito em pacientes cardiopatas. *Nutrição Enteral*, 6:5-9,1996.
- [6] CHAMPE PC; HARVEY RA. *Bioquímica Ilustrada*. 2. ed. Porto Alegre, 1997. p. 179-320.
- [7] WANG OS; LO MJ; KAU MM. Glucocorticoid and aging. *J. Formos. Med. Assoc.*, 96(10):792-801, 1997.
- [8] GINALDI L; DE MARTINIS M; D'OSTILIO A; *et al.* The immune system in the elderly: specific cellular immunity. *Immunol. Res.*, 20(2):109-115, 1999.
- [9] GHADIALLY R; BROWN SM; SEQUEIRA-MARTIN SM; *et al.* The aged epidermal permeability barrier: structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model, *J. Clinical Invest*, 95(5):2281-2290, 1995.
- [10] JENKIS G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms Ageing Develop.*, 123:801-810, 2002.
- [11] ROBBINS SL; COTRAN RS; KUMAR V; *et al.* *Patologia Estrutural e Fundamental*. Rio de Janeiro, 1996. p. 68-74; 28-29.
- [12] HALL JE; GUYTON AC. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- [13] KATZUNG BG; BENET LZ; BENOWITZ NL; *et al.* *Farmacologia Básica e Clínica*. Rio de Janeiro, 1998. p. 450-460.
- [14] CECIL; GOLDMAN L; AUSIELLO D. *Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Elsevier; 1-2:21-26, 2005.
- [15] OZ HS; HUGHES WT; VARILEK GW. A rat model for combined *Trypanosoma cruzi* and *Pneumocystis carinii* infection. *Microbial Pathogenesis*, 29:363-365, 2000.

- [16] PRATA MB; HADDAD CM; GOLDENBERG S; *et al.* Uso tópico de açúcar em feridas cutâneas: estudo experimental em rato. *Acta Cir. Bras.*, 3(2):43-48, 1988.
- [17] EURIDES D; MAZZANTI A; BELLETI ME; *et al.* Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* Martius). *Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro. Uruguiana*, 2-3(1):37-42, 1996.
- [18] BEÇAK W; PAULETE J. *Técnicas de Citologia e Histologia*. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. p. 305-307.
- [19] PALMA PCR; MARQUES PC; VIDAL BC; *et al.* Histopathological alterations resulting from subcutaneous implant of collagen and autologous aponeurotic fascia: a comparative study in dogs. *Brazilian Journal of Urology*, 27(2):171-177, March-April, 2001.
- [20] TRAU KA; DRIEDGER A; INGLE DL; NAKHASF D. Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 79-98, 1999.
- [21] GARNACHO-MONTERO J; ORTIZ-LEYBA C; GARNACHO-MONTERO MC; *et al.* Effects of three intravenous lipid emulsion on the survival and mononuclear phagocyte function of septic rats. *Basic Nutritional Investigation*, 18:751-754, 2002.
- [22] WANTEN GJ; NETEA MG; NABER TH; *et al.* Parenteral administration of medium-but not long-chain lipid emulsions may increase the risk for infections by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 70:6471-6474, 2002.
- [23] JUNQUEIRA LC; CARNEIRO J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
- [24] WANDA A.; DORSETT-MARTIN, DVM. *Rat model of skin wound healing: a review*. Mississippi, 2004.