

LEONARDO FÁVIO ALVAREZ ARRIETA

EFEITOS DA HIDROCORTISONA, DA PREDNISOLONA E DA NEOMICINA
NO PROCESSO DE REPARAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CÃES.

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de “*Magister
Scientiae*”

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2001

A Deus.

Aos meus pais Armando e Natividad.

A meu filho Leonardo José

A minha esposa Claudia

Aos meus irmãos Rodolfo y Teresa

AGRADECIMENTO

À Universidad Nacional de Córdoba (UNICOR-Colômbia) e à Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade oferecida para a realização do Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Ao professor e orientador José Antônio Viana, pela orientação durante o curso e sugestões na elaboração da presente pesquisa.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória, pelo aconselhamento, pela amizade, pelo incentivo e pela sua valiosa colaboração para a realização deste trabalho.

Ao professor Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo, pelos conselhos, pelo incentivo, pelas sugestões durante o curso e pela grande amizade.

À professora Andréa Pacheco, pelas sugestões e colaboração nas cirurgias

Aos meus pais Armando Alvarez e Natividad Arrieta, pela dedicação incansável, pela confiança incondicional e pelo esforço permanente em me educar.

À minha esposa Claudia Patrícia Pinzón Morelo, pelo grande amor, pela confiança e apoio permanente, pela dedicação e acompanhamento nos momentos bons e naqueles difíceis.

A meu filho Leonardo José, pelo grande amor que me oferece, pelo seu sorriso que me traz felicidade, pelo incentivo, pela tranquilidade que me dá por estar a meu lado e por me permitir roubar-lhe parte do tempo em que devíamos estar juntos.

Aos meus irmãos Rodolfo e Teresa, pela confiança e constante incentivo.

A minha avó, pelo amor incondicional e confiança, pelo incentivo e apoio.

Ao professor Alberto Mestra Pineda, do Departamento de Medicina Veterinária da UNICOR, então Pró-reitor Acadêmico, pela confiança e colaboração para que fosse possível a realização deste curso de pós-graduação.

Ao professor Jorge Visbal S. "*In memoriam*", então Decano da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, pelo seu apoio para que fosse possível o meu treinamento ao nível de pós-graduação.

Aos professores Juan Carlos Ballut, José Cardona e Mastoby Martinez, do Departamento de Medicina Veterinária da UNICOR, pelo apoio, confiança e colaboração.

Aos colegas de trabalho e estudo, Teresa Oviedo Socarrás e Juan Carlos Carrascal Velásquez, pela amizade, companheirismo e pelo agradável convívio.

Ao professor Lazaro Reza Garcia, atual Decano da Faculdade de Medicina Veterinária da UNICOR, pela colaboração e compreensão.

Aos meus amigos colombianos Misael, Mayra, Maria Fernanda, Alba, Rodrigo e Sergio pela amizade e colaboração que de uma ou outra forma me ofereceram durante o curso.

Aos estudantes de pós-graduação Richard, Mario, Tatiana e Esther pela colaboração nas cirurgias e pela amizade.

Aos estudantes de graduação Alexandre, Tatiana, Cristiane, Luciana e Flavia pela valiosa colaboração nas cirurgias e coleta de amostras.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária (DVT) da UFV Adão Cardoso, Cláudio Veridiano, Lucinda, Luis Marcio, Maninha, Divina, Camilo, João e "Ponte Nova" pelos serviços prestados e pela amizade.

Às secretárias do DVT Cléia, Eloisa e Rose, pela colaboração e pela amizade.

A todos os animais que foram utilizados para a realização do presente experimento.

BIOGRAFIA

Leonardo Favio Alvarez Arrieta, filho de Armando Alvarez Arrieta e Natividad de Jesús Arrieta Mendez, nasceu o dia 8 de Novembro de 1971, em Cereté, Estado de Córdoba (Colômbia).

Em 22 de Abril de 1994, graduou-se em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade Nacional de Córdoba (UNICOR), em Montería, Córdoba (Colômbia).

De fevereiro de 1994 - 1998 trabalhou como assistente técnico na área de Veterinária e Zootecnia na empresa J & S Representaciones e Inversiones Ltda., no município de Planeta Rica, Estado de Córdoba – Colômbia.

Em 2 de fevereiro de 1998, foi admitido como professor auxiliar, em concurso público, pela Universidade Nacional de Córdoba (UNICOR), para atuar no Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia, em Montería, Córdoba.

Em agosto de 1999, iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, na área de Clínica e Cirurgia de pequenos animais.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Cicatrização.....	4
2.2. Fase inflamatória.....	5
2.3. Fase proliferativa.....	8
2.3.1. Proliferação de fibroblastos.....	9
2.3.2. Angiogênese.....	9
2.3.3. Epitelização.....	11
2.4. Fase de maturação.....	12
2.5. Variação clínica do processo de cicatrização.....	13
2.6. Mecanismos envolvidos no processo de cicatrização.....	13
2.6.1. Fatores de crescimento.....	13

	Página
2.6.1.1. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDFG).....	14
2.6.1.2. Fatores de crescimento transformadores (TGF).....	15
2.6.1.3. Fator de crescimento epidérmico (EGF).....	16
2.6.1.4. Interleucina 1 e fator de necrose tumoral (IL-1 e TNF).....	17
2.6.1.5. Fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs).....	17
2.6.2. Matriz extracelular.....	18
2.7. Fatores que alteram a cicatrização.....	20
2.7.1. Corticosteróides.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Modelo experimental.....	24
3.2. Procedimentos anestésico e cirúrgico.....	25
3.3. Coleta de material para estudo histológico.....	26
3.4. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. 1º dia pós-cirúrgico.....	28
4.2. 2º dia pós-cirúrgico.....	31
4.3. 4º dia pós-cirúrgico.....	33
4.4. 6º dia pós-cirúrgico.....	36
4.5. 8º dia pós-cirúrgico.....	38
5. DISCUSSÃO.....	40
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50
APÊNDICE.....	56

RESUMO

ARIETA, Leonardo Fávio Alvarez, M.S., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2001. **Efeitos da hidrocortisona, da prednisolona e da neomicina no processo de reparação de feridas cutâneas em cães.** Orientador: José Antônio Viana. Conselheiros: Marlene Isabel Vargas Vilória e Andréa Pacheco Batista Borges.

No presente estudo foram utilizados 25 cães adultos, machos e fêmeas, provenientes do canil do Departamento de Veterinária da UFV, com o objetivo de avaliar histologicamente os efeitos da hidrocortisona, da prednisolona e neomicina no processo de reparação de feridas cutâneas. Estes animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, em todos eles foram feitas cinco incisões de pele perpendiculares ao eixo maior do animal e numeradas de um a cinco de acordo com sua localização referencial no eixo crânio-caudal. Os grupos foram assim constituídos: grupo 1-controle; grupo 2-hidrocortisona tópica; grupo 3-hidrocortisona + neomicina tópica; grupo 4-prednisolona oral e grupo 5-neomicina tópica. Fragmentos de pele de cada incisão foram colhidos em todos os animais, na seguinte seqüência: no 1º dia pós-operatório, incisão nº 1; no 2º dia, incisão nº 2; no 4º dia, incisão nº 3; no 6º dia, incisão nº4 e no 8º dia, incisão nº5. Histologicamente, no 1º dia pós-cirúrgico, foi constatado que todos os animais mostravam reação inflamatória de intensidade variável, presença de exsudato celular, constituído principalmente por células polimorfonucleares

neutrófilos e coágulo de fibrina em quantidades escassas unindo as bordas da ferida. Na hipoderme a exsudação fibrinosa assim como a área de hemorragia eram maiores. A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa na intensidade do coágulo/edema entre os diferentes tratamentos. No 2º dia pós-cirúrgico, histologicamente foi observado início de epitelização, organização do coágulo, formação de capilares e presença de células mononucleares. A análise estatística mostrou diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias do tamanho do coágulo/edema dos diferentes grupos. No 4º dia pós-operatório, histologicamente observou-se que a linha de incisão estava preenchida com fibras colágenas, havia proliferação fibroblástica e diminuição do infiltrado inflamatório. Estatisticamente observou-se diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias do tamanho do coágulo/edema nos diferentes grupos. No 6º dia pós-cirúrgico constatou-se a presença de tecido conjuntivo bem diferenciado, com formação de vasos sanguíneos com paredes grossas, o epitélio mostrava as diferentes camadas. Quando se compararam as médias do tamanho do coágulo/edema observou-se, estatisticamente, diferença a 5% de significância entre os diferentes grupos. No 8º dia pós-operatório não houve diferença estatística significativa no tamanho do coágulo/edema entre os diferentes tratamentos, embora, apresentaram-se, histologicamente, diferenças qualitativas na resposta cicatricial entre os grupos 1, 2, 3, e 5 quando comparados com o grupo 4. Além disto, encontrou-se que o grupo 3 apresentou maior formação de tecido conjuntivo.

ABSTRACT

ARRIETA, Leonardo Fávio Alvarez, M.S., Universidade Federal de Viçosa, november of 2001. **Effects of the hydrocortisone, prednisolone and neomicine on skin wound repair process in dogs.** Adviser: José Antônio Viana. Committee Members: Marlene Isabel Vargas Vilória and Andrea Pacheco Batista.

In the present study 25 dogs adults, males and females were used, coming of the kennel of the Department of Veterinary of UFV, with the objectives of to evaluate histologically the effects of the hydrocortisone, prednisolone and neomicine in the process of cutaneous repair. These animals were allotted in five groups and in all them were made five perpendicular skin incisions to the larger axis of the animal and numbered of one to five in agreement with your location referential in the axis cranium-caudal. The treatments were administered in the following way: group 1-control; group 2-hydrocortisone topical; group 3-hydrocortisone + neomicine topical; group 4-prednisolone oral and group 5-neomicine topical. They were picked biopsies of skin of each wound, in all the animals, in the following sequence: to the 1st postoperative day, incision no. 1; to the 2nd day, incision no. 2; to the 4th day, incision no. 3; to the 6th day, incision n°4 and to the 8th day, incision n°5. Histologically, to the 1st powder-surgical day, was verified that all the animals showed inflammatory reaction of variable intensity, presence of cellular exsudato, constituted mainly by neutrophils and

clot in scarce amounts uniting the borders of the incision, however, in the hypodermis the fibrin deposit was larger. The statistical analysis showed that there was not significant difference in the intensity of the clot/edema among the different treatments. To the 2nd day, histologically was observed begin of epithelialization, organization of the coagulum, formation of capillary and presence of cells mononuclears. Statistical analyze showed significant difference ($P < 0,01$) in the size of the clot/edema among them measured of the different groups. In the 4th postoperative day, histologically was observed that the incision line was filled with by collagens fibers, there were fibroblastic proliferation and decrease of the inflammatory infiltrate. Statistically was observed difference significant ($P < 0,01$) of the size of the clot/edema in the different treatments. To the 6th day was observed the presence of fibrous tissue well differentiate and there was capillary with thick walls, the epithelium was showed the different layers. When the averages of the size of the clot/edema were compared it was observed, statistically, significant difference to 5% the different groups. In the 8th postoperative day there was not significant difference statistics in the size of the clot/edema between the different groups, although, they came qualitative differences in the healing response among the treatments 1, 2, 3, and 5 when compared with the treatment 4. Besides, it was observed that the group 3 presented larger formation of the conjunctive tissue.

1. INTRODUÇÃO

A reparação das feridas é um processo biológico por meio do qual é restaurada a continuidade do tecido e ocasionalmente a morfologia e função de órgãos que foram parcialmente destruídos (DAVIDSON, 1992). Geralmente dois processos diferentes estão envolvidos, a regeneração, onde o tecido lesado é restituído com células do mesmo tipo e sem sinais de lesão previa e a cicatrização, cujo novo tecido é de natureza embrionária e que com o tempo se transforma em tecido adulto chamado tecido cicatricial ou cicatriz (COTRAN, 1990).

A substituição das células que foram destruídas, por outras semelhantes só ocorre em certos tecidos e em circunstâncias muito especiais. Os vertebrados inferiores podem regenerar totalmente os membros ou a cauda, por exemplo. Os mamíferos e as aves só regeneram algumas vezes e unicamente uma pequena porção de alguns órgãos. Entretanto, dependendo do tipo e quantidade de tecido lesado, da assepsia ou contaminação bacteriana da ferida, do microambiente físico e químico presente no tecido que rodeia a zona afetada e do estado fisiológico geral do indivíduo, a reparação se dará pelo processo de regeneração ou restituição, ou ainda pela cicatrização ou substituição (CASAUBON, 1993).

As células do organismo se dividem em três grupos, dependendo de sua capacidade replicativa (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996): 1) Lábeis, são aquelas que, sob condições normais, continuam a se multiplicar por toda a vida, substituindo células que são perdidas continuamente por fenômenos

fisiológicos ou patológicos. Entre estas se incluem as células da epiderme, as células da mucosa dos aparelhos digestivo, urinário e respiratório, células endometriais e da medula óssea hematopoiética (CATTO *et al.*, 1992), 2) Estáveis, normalmente, param de multiplicar-se quando cessa o crescimento, possuem um período longo de vida, assim, conservam habilidade mitótica durante a vida adulta. Porém, alguma regeneração de tecido lesado pode ocorrer em resposta a diversos estímulos, portanto, são capazes de reconstruir o tecido original. Neste grupo se incluem as células parenquimatosas de, praticamente, todos os órgãos glandulares, tais como: fígado, pâncreas, tireóide, epitélio tubular renal, assim como, as células do córtex adrenal e células do tecido conjuntivo (fibroblastos, condrócitos, osteócitos) (ALISON, 1992), e 3) Células permanentes, que perdem a capacidade mitótica após o nascimento e o exemplo deste grupo são os neurônios e as células musculares cardíacas (COTRAN, 1990).

Muitos fatores endógenos ou exógenos, gerais ou locais, podem retardar o processo de reparação. Entre estes os mais comuns são infecção da ferida, persistência do agente agressor, desordens imunológicos, distúrbios metabólicos, deficiência de fatores de coagulação, de oxigenação, estado nutricional do hospedeiro, doenças como diabetes mellitus e uso de medicamentos, principalmente os antiinflamatórios (SCOTT *et al.*, 1995). Os corticosteróides, por exemplo, são utilizados com sucesso para uma variedade de doenças dermatológicas em cães, tanto local quanto parenteral. No entanto, estas drogas estão comumente associadas com efeitos adversos sistêmicos tais como, alteração no metabolismo, desequilíbrio hidro-eletrolítico, imunodepressão e supressão do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (RANDALL *et al.*, 1999).

Por outro lado, os glicocorticóides influenciam a qualidade das respostas inflamatória e imunológica retardando o processo de reparação (DRAZNER, 1987). Estas drogas interferem de duas formas no evento inflamatório: primeiro, suprimindo a produção ou alterando a função de mediadores específicos da inflamação e, segundo, diminuindo a função de células responsáveis por uma adequada resposta inflamatória (GOLDSTEIN *et al.*, 1992).

Segundo PEDERSEN (1999), a função dos leucócitos estaria diminuída por ação dos glicocorticóides. BRATTSAND & LINDEN (1996) consideraram que os glicocorticóides inibem a expressão e ação das chamadas citocinas de fase inicial, imunomoduladoras e interferon, enquanto CHEDID *et al.* (1996) sugeriram que há inibição dos fatores de crescimento na reparação.

Por isso, o conhecimento dos mecanismos da reparação das feridas e dos fatores que possam alterar o processo reparativo é de grande importância na prática médica, pois representa uma resposta básica e espontânea do organismo quando é lesado e muitas vezes significa o êxito ou fracasso de um procedimento cirúrgico.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de antiinflamatórios esteroidais, hidrocortisona e prednisolona, associados ou não a neomicina e aplicados de forma tópica ou sistêmica, sobre o processo de reparação de feridas cutâneas produzidas experimentalmente em cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cicatrização

O processo de cicatrização é um fenômeno fisiológico que compreende uma série complexa de reações bioquímicas, envolvendo vários tipos celulares, componentes da matriz extracelular, citocinas e outros mediadores solúveis (TUAN & NICTER, 1998). Inicia-se quando é quebrada a barreira celular (agressão) e continua com o processo inflamatório, seguido por reorganização e reparação da integridade do tecido (AUER, 1992). O tempo de evolução da cicatrização assim como a extensão desta variam dependendo do grau de lesão à membrana basal, da quantidade e velocidade com que é destruído o tecido bem como do estado de assepsia da lesão e da condição fisiológica geral do indivíduo (CASAUBON, 1993).

Segundo PROBST (1993), o processo de cicatrização é caracterizado pelas fases de: inflamação, reparação, fibroblástica, epitelização, contração e remodelação. Estas fases progridem de forma contínua e podem sobrepor-se consideravelmente (SCOTT *et al.*, 1995). Entretanto, GREENHALGH (1998) e CHANG *et al.* (2000), consideram que no processo de cicatrização há três fases que o caracterizam: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de maturação.

2.2. Fase Inflamatória

A inflamação é um passo crítico para o processo de cicatrização, sendo considerada como a primeira resposta de um tecido vivo após uma lesão. Ela é inespecífica e pode ser induzida por qualquer tipo de trauma, exceto aqueles que sejam imediatamente mortais. Esta fase, tipicamente, é de curta duração, dependendo de fatores locais e acontece antes que apareça a resposta imune adaptativa (STASHAK, 1991). Estão envolvidas respostas vasculares tais como: vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, igualmente respostas celulares, com predomínio de neutrófilos e macrófagos, destinadas a proteger o organismo contra excessiva perda de sangue e invasão de agentes estranhos (PROBST, 1993; JIMENEZ & RAMPY, 1999). Depois da agressão tissular e ruptura de vasos sanguíneos e linfáticos, existe liberação de proteínas plasmáticas e células sanguíneas dentro do espaço intersticial e aquele criado pela injúria. Logo em seguida ocorrem eventos que procuram reduzir a perda de sangue: ativação da cascata de coagulação, vasoconstrição e agregação plaquetária para formar um trombo mais permanente. Como conseqüência, o espaço criado pela injúria é rapidamente preenchido por um coágulo de fibrina, que constitui um selo, contendo quantidade variável de restos tissulares e material estranho (DAVIDSON, 1992).

A combinação da cadeia fibrilar produzida pelos enlaces cruzados de fibrina, junto com os múltiplos produtos liberados pelos grânulos plaquetários, inicia a formação de uma matriz provisória. Esta matriz facilitará o movimento das células envolvidas no processo inflamatório até o local da injúria, direcionadas por numerosas substâncias quimiotáticas resultantes da degradação de proteínas autólogas ou de agentes estranhos. A referida matriz é estabilizada pela formação de enlaces cruzados covalentes, catalizados pelo fator XIIa. Alguns dos constituintes desta matriz provisória incluem as proteínas de adesão, fibronectina, inicialmente derivada do plasma e trombospondina, derivada dos grânulos- α das plaquetas. Estas moléculas de adesão ligam-se com a fibrina criando o substrato para a movimentação celular (DAVIDSON, 1992).

As mudanças vasculares aparecem muito precocemente após a agressão e são desenvolvidas com velocidades muito variáveis, dependendo da gravidade da injúria. Inicialmente acontece uma vasoconstrição transitória das arteríolas, sendo este um fenômeno inconstante, que em lesões leves desaparece em três ou quatro segundos e nas mais graves pode durar alguns minutos. O passo seguinte é a vasodilatação, fundamental para aumentar o fluxo vascular, afetando primeiro as arteríolas e depois a abertura de novos leitos microvasculares. O incremento do volume sanguíneo pode aumentar a pressão hidrostática local o suficiente para produzir a transudação de líquido pobre em proteínas. Esta resposta é provocada pela histamina e pela maioria dos mediadores inflamatórios. Após estes eventos, existe estase na microcirculação, como consequência de um aumento da permeabilidade da microvascularização, restrita a pequenas vênulas (COTRAN, 1990).

O aumento rápido de mediadores químicos ou fatores pró-inflamatórios no local da injúria é devido à liberação de grânulos pré-formados. É sabido que ceratinócitos, glândulas sudoríparas e particularmente macrófagos contêm grandes quantidades de citocinas. Além disto, o exsudato com componentes sanguíneos pode contribuir para o aumento de mediadores pró-inflamatórios (GRELLNER *et al.*, 2000).

Com a diminuição da velocidade e estancamento do fluxo, os leucócitos, principalmente os neutrófilos, saem da coluna axial e entram em contato com o endotélio vascular, processo denominado marginação leucocitária. Inicialmente se aderem de forma transitória e logo em seguida mais fortemente, pouco depois migram através da parede vascular até o tecido intersticial (PROBST, 1993).

Inicialmente as células predominantes no local da injúria são os leucócitos polimorfonucleares (PMN), aparecendo dentro das primeiras seis horas após o ferimento e desaparecendo, aproximadamente, no terceiro dia. Estes são atraídos até o local da injúria por substâncias quimioatraentes, como a fração C5a do complemento, fator plaquetário 4 (PF4), leucotrienos, fator de crescimento transformador- β (TGF β), fator de crescimento transformador- α (TGF α), interleucina-1 (IL1) e produtos bacterianos. O movimento destas células até a matriz extracelular é ajudado por receptores

localizados sobre o endotélio vascular chamados selectinas e receptores de integrinas sobre os neutrófilos (CHANG *et al.*, 2000).

A principal função dos neutrófilos é a fagocitose de agentes invasores, assim como de material estranho no local da lesão. Eles também podem ser fonte de citocinas pró-inflamatórias tais como IL1 α , IL1 β e fator de necrose tumoral- α (TNF α) (PADGETT *et al.*, 1998). Embora os neutrófilos sejam as primeiras células inflamatórias a aparecer no local da ferida, eles não são essenciais para a reparação da mesma, pois se forem deficientes ou não existir infecção, suas funções podem ser supridas pelos macrófagos e o processo de cicatrização ocorreria normalmente (DAVIDSON, 1992; GREENHALGH, 1998; CHANG *et al.*, 2000).

As próximas células inflamatórias que chegam ao local da injúria, nas primeiras doze horas, são os monócitos, que se tornam o tipo celular predominante após 24 a 48 horas pós-ferimento, alcançando o número pico em aproximadamente três dias e começam a diminuir por volta do quinto dia pós-traumatismo (PADGETT *et al.*, 1998; CHANG *et al.*, 2000). À semelhança dos PMN, os monócitos são atraídos até a ferida por substâncias quimioatraentes como TGF β e PF4, sendo ativados, até se tornarem macrófagos, por fatores liberados pelas plaquetas e substâncias fagocíticas, como a fibronectina e colágeno (CHANG *et al.*, 2000). Os macrófagos também podem ser ativados por linfocinas, complexos imunes e produtos da clivagem do complemento, entre outros. Esta ativação resulta em muitas respostas especializadas, incluindo aumento da atividade lisossomal, incremento da secreção de proteases, fatores de crescimento, liberando componentes do complemento, produção de interferon, secreção de pirógeno endógeno e síntese de prostaglandinas (PROBST, 1993).

Os macrófagos são importantes para o recrutamento e ativação de fibroblastos e outras células inflamatórias. Produzem numerosos fatores solúveis que estimulam a proliferação dos fibroblastos, enzimas como colagenase e elastase, liberando fatores antimicrobianos como radicais de oxigênio e óxido nítrico. Além disso, os macrófagos desempenham um papel importante no sistema imune, permitindo ligação entre a imunidade natural e

a imunidade adaptativa (DAVIDSON, 1992; PROBST, 1993; CHANG *et al.*, 2000).

Os linfócitos também podem ser encontrados em reações inflamatórias crônicas. Sua importância é mais relevante em processos inflamatórios causados por bactérias que quando causados por trauma. A presença destas células em reações inflamatórias pode indicar resposta imunológica a agentes estranhos (PROBST, 1993). As células T são ativadas quando reconhecem antígenos apresentados pelos macrófagos, subsequentemente resulta na proliferação de células T antígeno-específicas (ABBAS, 1998). As citocinas, liberadas pelos linfócitos, podem ativar células imunes na vizinhança, incluindo outras células T, macrófagos e polimorfonucleares (CHANG *et al.*, 2000).

A presença dos neutrófilos não é um fator indispensável, além dos casos de defesa a agressão bacteriana e eliminação de material estranho (GREENHALGH, 1998). Estas células parecem não desempenhar um papel determinante no aparecimento dos macrófagos. No entanto, a presença dos macrófagos é fundamental para a fagocitose dos restos resultantes da necrose e hemorragia (KUROSAKA *et al.*, 2001), assim como a elaboração de fatores que promovem a proliferação dos fibroblastos e células endoteliais. Na medida em que os restos tissulares são fagocitados, existe a formação de tecido de granulação e, evidentemente, o tempo requerido para uma substituição total do tecido lesado é diretamente proporcional ao tamanho da ferida, à quantidade de material inerte que deve ser fagocitado e ao grau de contaminação (CASAUBON, 1993).

2.3. Fase Proliferativa

A fase proliferativa torna-se mais evidente três a cinco dias após a lesão tissular. É caracterizada por proliferação de fibroblastos, neoformação vascular e epitelização da ferida, dando origem a um tecido especializado, chamado tecido de granulação, devido a seu aspecto róseo, granular e frouxo (PROBST, 1993).

2.3.1. Proliferação de Fibroblastos

A formação do tecido de granulação é favorecida pela atividade dos fibroblastos e macrófagos, como também pela neovascularização (JIMENEZ & RAMPY, 1999). Os fibroblastos formam o elemento celular mais importante, pois são responsáveis pela elaboração de muitos componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno fibrilar (tipos I, III, V, VI, VII) e não fibrilar (tipos IV, VIII, XII), fibronectina, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Os fibroblastos são também células efectoras, produzem mediadores solúveis, incluindo fator de crescimento dos fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento de queratinócitos, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e IL-1. Desta forma coordenam a atividade de outras células como macrófagos, células do endotélio capilar e os mesmos fibroblastos (DAVIDSON, 1992). Existem evidências de que os fibroblastos, como células efectoras, podem ser influenciados por outros fatores externos que contribuem para manter o balanço entre a produção e lise do tecido (ECKES *et al.*, 2000).

Evidências indicam que os fibroblastos, nas feridas, derivam de células mesenquimais locais, particularmente as associadas com a adventícia dos vasos sanguíneos (PROBST, 1993). Eles aparecem, normalmente, por volta do 3º ou 4º dia após a lesão, embora existam relatos que indicam a presença destas células a partir de 24 a 36 horas pós-traumatismo, observando os primeiros sinais de atividade celular e continuando ativos por até 30 dias pós-ferimento (CASAUBON, 1993). Assim que estas células chegam ao local da ferida, entram num período de intensa atividade mitótica e pronunciada hipertrofia, aumentando a quantidade de retículo endoplasmático e complexo de Golgi (PROBST, 1993).

2.3.2. Angiogênese

A angiogênese é um processo biológico complexo, caracterizado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir daqueles pré-existentes, sendo essencial na reparação de feridas. Nestas condições é altamente regulada, pois, a persistência de angiogênese não regulada pode

conduzir a doenças como crescimento primário de tumores e metástase, por exemplo (FOLKMAN & BREM, 1992).

Todas as formas de angiogênese seguem um padrão comum de resposta pelas células endoteliais capilares. Os vasos capilares consistem de células endoteliais e pericitos. Estes dois tipos celulares carregam toda a informação genética para a formação de vasos, ramos colaterais e rede capilar por completo. Moléculas estimuladoras específicas podem iniciar o processo assim como as moléculas inibidoras específicas podem inibi-lo. Diferentes polipeptídeos angiogênicos têm sido identificados. Os mais importantes são os fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs), fator de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), fatores de crescimento transformadores (TGF- α e β), fator de necrose tumoral (TNF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiogenina (MORETTI *et al.*, 1999; BERGER *et al.*, 2000).

A neoformação vascular se inicia dois a três dias após a lesão, com cordões sólidos de células endoteliais crescendo como brotos para formar capilares nas bordas da ferida. Na extremidade destes brotos observam-se células endoteliais em migração e, atrás destas, células endoteliais em mitose (ALISON, 1992).

Os novos capilares são gerados por uma série de eventos morfológicos e bioquímicos que ocorrem na mesma seqüência, indiferentemente do estímulo angiogênico. Estes eventos estão representados por: (a) vasodilatação do vaso existente; (b) degradação da membrana basal; (c) migração de células endoteliais; (d) proliferação das células endoteliais; (e) formação de lúmen; (f) formação de nova membrana basal; (g) incorporação de pericitos; (h) maturação/evolução de canais preferenciais com segmentos arteriais ou venosos (MORETTI *et al.*, 1999; FOLKMAN & BREM, 1992).

O crescimento dos novos vasos sanguíneos também envolve a degradação da membrana basal capilar onde os brotos se originaram. Esta alteração é devida à geração de atividade proteolítica extracelular pelas próprias células endoteliais. As células endoteliais podem produzir duas metaloproteinases: a colagenase, que degrada o colágeno intersticial e a

estromelina, que tem uma grande especificidade por substrato, incluindo proteoglicanos, fibronectina, laminina e colágeno tipo IV (ALISON, 1992).

Segundo STEINBRECH *et al.* (1999), a angiogênese e o aumento do fluxo sanguíneo são eventos críticos para o sucesso da reparação de feridas cirúrgicas, relatam ainda que, a ruptura vascular devido à cirurgia deixa algumas áreas hipóxicas, onde a tensão de oxigênio aproxima-se de zero nos estágios iniciais do processo de reparação. Isto significa que a angiogênese é vital para o suprimento de oxigênio e de fatores de crescimento necessários para iniciar o processo de síntese na reparação tecidual (RENDELL *et al.*, 1997; BOND *et al.*, 2000). Por outro lado ADAIR *et al.* (1990), já consideravam que o suprimento vascular inadequado, assim como a redução da tensão de oxigênio no local da ferida, conduzia a angiogênese para satisfazer as demandas metabólicas do tecido.

2.3.3. Epitelização

A epitelização, proliferação e migração celular são os primeiros sinais de reparação e normalmente ocorrem antes da formação do novo tecido conjuntivo na ferida. A resposta das células imediatamente adjacentes à ferida é a mobilização (PROBST, 1993). Este movimento é do tipo amebóide e é facilitado pela alta concentração aquosa do tecido e pela lise das fibras de colágeno que se interpõem no trajeto. As células migram somente sobre tecidos viáveis e são auxiliadas por diferentes substratos, como ativadores da colagenase e plasminogênio, assim como pela presença de fibronectina, que promove a adesão de células ao colágeno (ALISON, 1992).

A epitelização pode ser muito rápida. A partir de 4 horas após o traumatismo, as células epiteliais começam a migrar por baixo do coágulo, a partir das bordas da ferida até o centro da mesma. A velocidade de migração varia conforme o grau de desidratação do coágulo, porém, a crosta impede a epitelização. A proliferação e migração destas células requerem grandes quantidades de oxigênio, principalmente da atmosfera, e menor quantidade daquele proveniente do tecido conjuntivo subjacente. Quando a crosta é substituída por uma membrana permeável ao oxigênio atmosférico e esta é

mantida úmida, as taxas de mitose e migração aumentam (CASAUBON, 1993).

Acompanhando a regeneração epitelial, existe a substituição de elementos da membrana basal. Estas macromoléculas incluem fibronectina, colágeno tipo IV, proteoglicano e laminina. Outros componentes importantes na regeneração da epiderme incluem receptores da superfície celular para componentes da matriz, integrinas, por exemplo, e componentes da junção intracelular, desmossomos e hemidesmossomos. O caráter de regeneração epidérmica depende da natureza da injúria. Em feridas superficiais, a porção profunda dos apêndices epidérmicos permanece intacta e sua regeneração coincide com a maturação de mais epiderme. Os folículos pilosos são a maior fonte de reserva para células epidérmicas durante a reparação de feridas. Cada folículo serve como fonte para nova epiderme e a restauração epitelial pode ocorrer extremamente rápido em superfícies de feridas incisais (DAVIDSON, 1992).

2.4. Fase de maturação

Esta fase começa depois que a proliferação celular inicial decresce em intensidade. Está associada à redução gradual do número de pequenos vasos sanguíneos e à diminuição do número e tamanho dos fibroblastos, com o equilíbrio de produção e lise de colágeno e do tecido de granulação. As fibras colágenas funcionalmente orientadas começam a predominar e as não funcionais são absorvidas (AUER, 1992).

A contração envolve o movimento do tecido pré-existente nas bordas da ferida e não do tecido novo já formado. As evidências indicam que a contração é um fenômeno mediado por células. Estudos com microscopia eletrônica mostraram que alguns dos fibroblastos em feridas contraídas apresentam aparência de células musculares lisas. Estes fibroblastos são chamados de miofibroblastos. Estas células possuem miofilamentos no citoplasma, que são potencialmente contrácteis, como também modificações na membrana que permitem interconectar e transmitir contração para outras células (PROBST, 1993).

Quando a cicatriz amadurece, as fibras de colágeno se tornam alinhadas paralelamente à superfície da pele. Este alinhamento se deve à força de tensão produzida pelas bordas da ferida (PROBST, 1993). Apesar de ocorrer um aumento progressivo da resistência da cicatriz, ela permanece de 15 a 20% mais fraca do que o tecido vizinho (AUER, 1992).

Segundo TATESHITA *et al.* (2001), a contração da ferida conduz à reorganização e restauração da função do tecido. Ainda, consideram que a contração é um fenômeno importante na reparação cutânea nas situações em que o defeito ocorre em toda a espessura da pele, auxiliando a junção das margens da ferida.

2.5. Variação clínica do processo de cicatrização

É referida como união primária ou cicatrização por primeira intenção, aquela que acontece em feridas incisivas, limpas, sem contaminação significativa e com mínima perda tecidual, onde as bordas da ferida estão próximas, podendo, com um mínimo de formação de tecido, unirem-se, fechando a ferida (ALISON, 1992; CASAUBON, 1993).

A união secundária ou cicatrização por segunda intenção é quando as bordas da ferida não estão justapostas, encontram-se dilaceradas, com maior quantidade de restos celulares, resposta inflamatória mais intensa e lenta remoção dos restos celulares. Neste caso, a cicatrização da ferida ocorre depois de um estágio de secreção aumentada e formação de tecido de granulação mais exuberante; é o que acontece nos ferimentos intencionalmente deixados abertos (COTRAN, 1990; CASAUBON, 1993; ALISON, 1992).

2.6. Mecanismos envolvidos no processo de cicatrização

2.6.1. Fatores de crescimento

O crescimento celular resulta da ação coordenada de numerosos agentes estimuladores e inibidores da divisão celular. Entre eles estão produtos das próprias células, das células vizinhas ou de células situadas à

distância, além do micro-ambiente extracelular (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996).

Os eventos que ocorrem seqüencialmente ordenados no processo de cicatrização são mediados, em parte, por uma série de moléculas polipeptídicas de baixo peso molecular, referidos como fatores de crescimento. Estas moléculas são produzidas por diferentes tipos celulares e possuem um papel crucial para controlar o crescimento e diferenciação normal das células, agindo em células específicas ou atuando sobre vários tipos celulares (CATTO *et al.*, 1992). Funcionalmente, algumas destas substâncias são fatores de competência, que não estimulam a síntese de DNA, embora capacitam as células que estão em fase G₀ ou G₁ da mitose para responder a um segundo fator de crescimento. Outros são fatores de crescimento de progressão que induzem a síntese de DNA e multiplicação em células competentes (WASSERMANN *et al.*, 1998).

Portanto, os fatores de crescimento desempenham um papel importante na cicatrização de feridas, já que atuam como mediadoras dos diferentes estágios do processo de cicatrização, incluindo a síntese, deposição e maturação do colágeno (BUCKMIRE *et al.*, 1998).

2.6.1.1. Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)

O PDGF é encontrado mais abundantemente nos grânulos α das plaquetas, como também é sintetizado pelos macrófagos, células endoteliais e musculares. (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996). O PDGF estimula a proliferação de fibroblastos e células musculares lisas e atua como um potente quimioatraente para neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células musculares lisas, promovendo a formação de tecido de granulação durante a reparação de feridas (UCHI *et al.*, 2000). Entretanto, parece que o PDGF não estimula diretamente a síntese de colágeno pelos fibroblastos e não aumenta a deposição de glicosaminocanos e fibronectina. Provavelmente o PDGF exerce indiretamente estes efeitos de duas formas: incrementando a celularidade da ferida e, induzindo os macrófagos e fibroblastos a produzirem quantidades maiores de TGF β , o que estimula a mitogênese dos fibroblastos e aumenta a síntese de colágeno (CHANG *et al.*, 2000).

O PDGF é um homo ou heterodímero de duas subunidades, uma cadeia A e uma B (PDGF-AA, PDGF-BB ou PDGF-AB). O PDGF liga-se a receptores A e B. O receptor A pode ligar-se a ambas subunidades A e B do PDGF, no entanto o receptor B é específico para a subunidade B do PDGF. Os ceratinócitos humanos produzem os três tipos de PDGF e nenhum dos receptores para os mesmos. Entretanto os fibroblastos e células da musculatura lisa vascular da derme expressam receptores para PDGF durante a cicatrização de feridas (UCHI *et al.*, 2000).

2.6.1.2. Fatores de crescimento transformadores (TGF)

Trata-se de dois fatores distintos, denominados TGF α e TGF β . O TGF α é produzido por diferentes células embrionárias ou da placenta, tem grande semelhança com o fator de crescimento epidérmico (EGF), liga-se ao mesmo receptor deste fator de crescimento. Além disto, estimula a proliferação de fibroblastos e células epiteliais (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996).

O TGF β é um importante sinal para iniciar e manter a fase aguda da inflamação no processo de cicatrização de feridas. Funciona como quimiotático para monócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e fibroblastos. Estimula a liberação de citocinas e tem um papel importante na regulação da matriz extracelular. Os receptores para TGF β são expressos na maioria dos tipos celulares, podendo funcionar como estimulador ou inibidor da proliferação celular, dependendo da origem epitelial ou mesenquimal da célula, assim como da presença de outros fatores de crescimento e seus receptores (KUHN *et al.*, 2001).

Segundo YANG *et al.* (1999), o TGF β constitui um grupo de fatores de crescimento que atuam como potentes reguladores do crescimento e diferenciação celular. Estes fatores são expressos ao longo da embriogênese e são detectados em altos níveis nas áreas que experimentam rápida morfogênese, sugerindo um papel importante no desenvolvimento e reparação tecidual. Os TGF β s regulam vários eventos do processo de cicatrização, incluindo quimiotaxia de células inflamatórias,

angiogênese, deposição de matriz extracelular e formação de tecido de granulação.

Existem três formas isoméricas de TGF β s, (TGF β_1 , TGF β_2 , TGF β_3), estruturalmente relacionadas, embora funcionalmente distintas. O TGF β_1 é a isoforma mais abundante em tecidos, encontrado em altas concentrações nos grânulos das plaquetas, e é produzido também por uma grande variedade de células como macrófagos, linfócitos e células endoteliais (ASHCROFT, 1999).

O TGF β_1 é um potente mitogênico para os fibroblastos e pode potencializar os efeitos de outros fatores como o PDGF. Estimula a quimiotaxia dos fibroblastos e a produção de colágeno, fibronectina e proteoglicanos, inibindo, simultaneamente, a degradação do colágeno e favorecendo a fibrogênese (CATTO *et al.*, 1992).

Segundo CHANG *et al.* (2000), o TGF β estimula a produção de colágeno por aumentar nos fibroblastos a expressão de RNAm para os colágenos tipo I e III. Diferentemente do PDGF, o TGF β aumenta o tecido de granulação por induzir seletivamente a maturação de pacotes de colágeno.

Os ceratinócitos humanos produzem TGF β_1 e expressam receptores tipo I, II e III para os TGF β s. O TGF β_1 controla a proliferação e diferenciação dos ceratinócitos mantendo a homeostase epidérmica (UCHI *et al.*, 2000).

2.6.1.3. Fator de crescimento epidérmico (EGF)

O EGF é mitogênico para células epiteliais e mesenquimais, atua como fator de progressão, estimulando a divisão celular por ligar-se a um receptor específico, uma glicoproteína de membrana. A ligação do receptor com o EGF ativa a porção intracitoplasmática do receptor, que tem atividade proteína-quinase e fosforila diversos substratos, incluindo o próprio receptor. Após esta reação, o receptor e o EGF são internalizados por endocitose e finalmente degradados para iniciar a síntese de RNA (BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996; COTRAN, 1990).

O EGF, assim como o TGF α desempenham um papel importante no processo de cicatrização de feridas devido às suas capacidades em

aumentar a migração de ceratinócitos. Apesar de EGF e TGF α serem peptídeos altamente homólogos e se ligarem ao mesmo receptor com a mesma afinidade, o TGF α é mais efetivo que o EGF em aumentar a motilidade “*in vitro*” dos ceratinócitos (UCHI *et al.*, 2000).

Segundo SUTER *et al.* (1997), o EGF estimula a hiperplasia e hipertrofia na epiderme. Os ceratinócitos caninos estão constantemente crescendo em presença de EGF. Especificamente, os efeitos do EGF parecem ser bifásicos, onde altas concentrações deprimem a proliferação e conduzem à diferenciação aberrante.

2.6.1.4. Interleucina 1 e fator de necrose tumoral (IL-1 e TNF)

São duas citocinas que atuam, sinergicamente, como importantes mediadores da inflamação. Compartilham propriedades biológicas, particularmente induzindo o mesmo espectro de efeitos na fase aguda da inflamação. Os efeitos da IL-1 e TNF sobre o endotélio são: (a) Indução e síntese de moléculas de adesão; (b) indução da síntese e secreção de PGI₂; (c) estimulação da síntese do fator ativador de plaquetas (PAF) e (d) aumento das propriedades pró-coagulante e anticoagulante das células endoteliais (COTRAN, 1990).

A IL-1 é uma citocina pluripotente e multifuncional que é fundamental para iniciar e desenvolver as respostas inflamatória e imune. Os ceratinócitos produzem IL-1 α , IL-1 β e seu receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra). Ambas, IL-1 α e IL-1 β , possuem propriedades biológicas similares, mas não são secretadas simultaneamente. A IL-1 induz a produção de outras citocinas como a IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator estimulador de colônia macrófago-granulócito (GM-CSF) (UCHI *et al.*, 2000).

2.6.1.5. Fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs)

Formam parte de uma grande família de fatores de crescimento. Inicialmente foram isolados a partir do cérebro e hipófise bovino. Entretanto, sabe-se que não estão restritos ao tecido nervoso, que são sintetizados por

diferentes tipos de células e que estimulam a proliferação de diferentes tipos celulares. Duas formas foram inicialmente identificadas, fator de crescimento dos fibroblastos ácido (aFGF) e fator de crescimento dos fibroblastos básico (bFGF) (CATTO *et al.*, 1992).

O fator de crescimento dos ceratinócitos (KGF) é um membro da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos e é produzido pelos fibroblastos dérmicos. Um receptor de alta afinidade para este fator é encontrado nos ceratinócitos, sugerindo que o KGF constitui um mecanismo de regulação mesenquimal do epitélio (SUTER *et al.*, 1997).

Os FGFs (aFGF, bFGF e KGF) possuem atividade mitogênica para os ceratinócitos. Estas células sintetizam o bFGF assim como o receptor para o mesmo, sendo considerado um fator autócrino importante no controle do crescimento e diferenciação deste tipo celular. As outras duas moléculas, aFGF e KGF, são produzidas pelas células do estroma. O bFGF acelera o processo de cicatrização da pele e o KGF media o crescimento dos folículos pilosos (UCHI *et al.*, 2000).

Estudos demonstraram que membros da família dos fatores de crescimento dos fibroblastos são expressos na pele normal e, ainda, podem ser estimulados em injúrias. Assim, os fatores de crescimento pertencentes a esta família podem ser utilizados como terapia promissora para o tratamento de feridas, queimaduras e outros distúrbios da pele não só em indivíduos saudáveis, como também em condições patológicas (JIMENEZ & RAMPY, 1999).

2.6.2. Matriz Extracelular

A matriz extracelular é um complexo de macromoléculas que, além de dar suporte estrutural para os tecidos, também modula várias funções celulares tais como: proliferação, diferenciação, movimento celular e adesão. Todos estes fenômenos são possíveis através da interação célula-matriz, que depende da expressão de receptores de membrana (CATTO *et al.*, 1992). Estes receptores são glicoproteínas, pertencentes à família das integrinas, cujos domínios intracelulares interagem com elementos do citoesqueleto, sinalizando a resposta celular (COTRAN, 1990).

O colágeno é a proteína mais abundante da matriz, oferecendo a estrutura extracelular para todos os organismos multicelulares. É constituído por uma família de moléculas geneticamente diferentes e é o principal componente do tecido fibroso, membranas basais, cartilagem e outros tecidos especializados como a córnea e as valvas cardíacas (COTRAN, 1990). A principal característica de uma molécula de colágeno típica é a estrutura longa e rígida de sua fita-tripla helicoidal na qual três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , são enroladas umas nas outras. As cadeias polipeptídicas individuais do colágeno, cadeias pró- α , são sintetizadas em ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) e injetados para a luz do retículo endoplasmático como grandes precursores (ALBERTS *et al.*, 1997).

A fibronectina é uma proteína extracelular de adesão, produzida pelos fibroblastos, monócitos e células endoteliais. Existe na forma dimérica solúvel (plasma) e oligomérica (superfície celular). Possui sítios de ligação com receptores celulares (integrinas) e forma complexos moleculares com o colágeno, fibrina, heparina, proteoglicanos e membranas celulares. Desta forma a fibronectina intervém na adesão célula-célula, na atividade quimiotática e organização do estroma tecidual (COTRAN, 1990; CATTO *et al.*, 1992; BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996).

O acúmulo de nova matriz no local da ferida pode ser aumentado por várias vias: (a) aumentando o número de células produtoras de matriz; (b) aumentando a produção de matriz por célula; (c) diminuindo a degradação da matriz. Substâncias mitogênicas produzidas pelas plaquetas e macrófagos (PDGF, TGF- α , bFGF) atuam principalmente através da primeira via (DAVIDSON, 1992).

A regulação da deposição de matriz extracelular é um evento fundamental em muitas condições fisiológicas e patológicas. Este processo é requerido para uma cicatrização normal, onde moléculas da matriz extracelular necessitam ser rapidamente sintetizadas durante a formação de tecido de granulação prematuro e também durante a substituição final por tecido conjuntivo maduro. Excessiva deposição de tecido conjuntivo, porém,

leva à formação patológica de fibrose, quelóide e cicatriz hipertrófica (ECKES, 2000).

2.7. Fatores que alteram a cicatrização

O retardo no processo de cicatrização de feridas pode ser causado por diferentes fatores exógenos ou endógenos, gerais ou locais. As causas mais comuns incluem a obesidade e a idade avançada, fatores endócrinos (esteroidais e relacionados a estes), denervação, presença de corpos estranhos, infecção, tecido desvitalizado, espaço morto, deficiência de insulina (KIETZMANN, 1999; SCOTT *et al.*, 1995), hipoproteinemia, anemia, hipovolemia, anoxia tecidual, uremia, má nutrição, taxa metabólica aumentada, movimento da ferida, neoplasia, radiação e agentes citotóxicos, edema, temperaturas baixas e deficiências de vitaminas, principalmente A, K, E, C e do complexo B (PROBST, 1993; ELLINSON, 1996).

2.7.1. Corticosteróides

O córtex adrenal sintetiza e libera três classes de hormônios, os mineralocorticóides (zona glomerular), glicocorticóides (zona fascicular) e os andrógenos (zona reticular). Todos eles são quimicamente esteróides, sintetizados, endogenamente, a partir do colesterol sendo denominados corticóides ou corticosteróides. No sangue são transportados de forma livre ou ligados a uma proteína transportadora específica, transcortina, que é uma alfa-glicoproteína ácida cuja síntese é realizada no fígado. A fração livre é a biologicamente ativa, pode passar ao líquido intersticial, atravessar a membrana celular e no caso dos glicocorticóides, esta fração é responsável pelo “*feed-back*” negativo para secreção de ACTH (CARGANO, 1995).

O cortisol é rapidamente removido da circulação e metabolizado, com uma meia-vida aproximada de 90 minutos. Menos do 2% é eliminado pela urina sem alteração. A ligação dos glicocorticóides à transcortina e albumina pode modificar a potência, meia-vida e duração da atividade destes hormônios. As doenças hepáticas e renais também podem influenciar a eficácia dos glicocorticóides (GOLSTEIN *et al.*, 1992).

Os corticosteróides são utilizados de forma sistêmica ou tópica para uma variedade de doenças cutâneas em caninos (dermatite alérgica a pulgas, atopia, hipersensibilidade alimentar, dermatite piotraumática, doenças auto-imunes e dermatite acral por lambadura). O uso destas drogas tem sido considerado um grande sucesso, embora, a utilização de alguns glicocorticóides potentes, tais como acetato de prednisolona, dexametasona e triancinolona em preparações oftálmicas, óticas e tópicas, estão comumente associadas com efeitos adversos sistêmicos como alterações no metabolismo, desequilíbrio hidro-eletrolítico, imunodepressão e supressão do eixo hipotálamo - hipófise- adrenal (RANDALL *et al.*, 1999).

Segundo PEDERSEN (1999) os glicocorticóides possuem uma variedade de efeitos sobre os leucócitos. Causam uma pronunciada linfopenia, limitando o número destas células para participar em respostas imunológicas mediadas por células. Podem também reduzir a blastogênese de linfócitos induzida pelo antígeno específico. Estas drogas produzem monocitose, no entanto, a resposta destas células a alguns mediadores inflamatórios está diminuída. Este efeito é manifestado sistemicamente pela diminuição da remoção de material opsonizado e não opsonizado pelo sistema monocítico-fagocitário e, localmente, pela diminuição do fluxo de monócitos para o local da inflamação. Outros efeitos destas drogas são a inibição da produção de interferon, IL-1 e IL-2, alteração da função dos neutrófilos, aumentando os níveis circulantes destas células, por estimular a sua liberação da medula e, paradoxalmente, inibindo a migração dos mesmos até o sitio inflamatório. Os glicocorticóides prejudicam “*in vivo*” a quimiotaxia, adesão e secreção de enzimas lisossomais pelos neutrófilos.

Classicamente, os glicocorticóides exercem seus efeitos por ligar-se a um único receptor específico para glicocorticóides, localizado predominantemente no citoplasma das células alvo (ANDERSON & GOODKIN, 1998). Estes receptores estão presentes na maioria dos tipos celulares e sua densidade varia de 2000 a 30.000 sítios de ligação por célula (ADCOCK, 2000). Uma vez ligado, este complexo esteroide-receptor é transportado para dentro do núcleo, onde se liga a elementos que respondem a glicocorticóides (GREs) na cromatina (BATOR *et al.*, 1998). Esta ligação permite a associação de DNA polimerase para promover e

facilitar a transcrição de DNA para formar RNAm específico (GOLSTEIN *et al.*, 1992).

Segundo OLIVRY & SOUSA (2001), muitos efeitos dos glicocorticóides são devido à diminuição da transcrição de múltiplos genes que interferem na codificação de citocinas, receptores para as mesmas, proteínas quimiotáticas, enzimas pró-inflamatórias e moléculas de adesão. KARIM *et al.* (1997) consideravam que os glicocorticóides modulam genes via mecanismos de transcrição e pós-transcrição, incluindo genes que afetam a produção de pró-colágeno I, III e IV.

McPHEE *et al.* (1998) consideraram que os efeitos adversos dos corticosteróides também incluem: estabilidade das membranas dos lisossomos dos leucócitos, redução na produção de mucopolissacarídeos, diminuição na síntese de colágeno e diminuição na angiogênese, retardando desta forma o processo de cicatrização de feridas. Ainda BEINER *et al.* (1999) relataram que os corticosteróides podem causar prejuízo irreversível, dentre os quais a desorganização na estrutura do novo tecido formado durante o processo de reparação.

Dentro do contexto clínico, os glicocorticóides estão contra-indicados para terapias prolongadas devido a seu potencial imunodepressivo. Reduzidos níveis sorológicos de C3 têm sido relatados em humanos e cães induzidos por drogas como os glicocorticóides. Esta fração (C3) do complemento possui um papel importante na geração de efeitos biologicamente significativos do sistema de complemento. Uma vez ativado, pode conduzir a reações anafiláticas, atuar como opsonina, estimular a liberação de enzimas dos lisossomos dos macrófagos, estimular a produção de linfocinas pelas células B, liberar linfócitos da medula óssea e participar na resposta imune humoral. Entretanto, observou-se que o uso de prednisona em curto prazo (1,1 mg/kg/dia por 14 dias e 2,2 mg/kg/dia por 7 dias) e dexametasona (0,25 mg/kg/dia por 7 dias) não modificaram significativamente os níveis sorológicos de C3 em cães (LUCENA *et al.*, 1999).

Existem relatos de que KGF pode funcionar como modulador da proliferação e diferenciação celular durante o processo de cicatrização. A expressão deste fator é grandemente elevada após injúrias (24-72 horas) em

humanos e ratos. Em humanos a produção de KGF permanece elevada durante 11 dias após a injúria, sugerindo a sua participação na fase inflamatória como também na fase proliferativa da cicatrização. Adicionalmente, estudos “*in vitro*” demonstraram que citocinas com propriedades pró-inflamatórias (IL-1 α , PDGF-BB, TGF- α) estimularam fortemente a produção de KGF pelos fibroblastos. Os glicocorticóides, neste caso a dexametasona, inibiram os níveis basais de KGF, assim como a expressão das citocinas que induzem a produção de KGF. O mecanismo pelo qual diminui a produção de KGF inclui uma redução da taxa transcripcional e desestabilização do RNAm para o KGF (CHEDID *et al.*, 1996).

Segundo BRATTSAND & LINDEN (1996), os glicocorticóides inibem a expressão e ação de muitas citocinas. Em estudos com células sanguíneas mononucleares humanas ativadas em cultura, os glicocorticóides diminuíram fortemente a produção de citocinas de fase inicial IL-1 e TNF α e β e as citocinas imunomoduladoras IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12 e IFN- γ , como também IL-6, IL-8 e o fator estimulador de colônia monócito-granulócito (GM-CSF).

Os corticosteróides possuem efeitos antiinflamatórios, imunodepressivos (VENA & CASSANO, 1999; OLIVRY & SOUSA, 2001), antiproliferativos e vasoconstritores (GÜNES & FETIL, 2000). Os mecanismos para tais efeitos ainda não são completamente entendidos. Quando administrados sistemicamente, os corticosteróides causam uma redistribuição de linfócitos da circulação periférica para a medula óssea, resultando em linfocitopenia. Eles podem aumentar a atividade dos linfócitos T supressores, assim como, inibir a proliferação dos linfócitos T e apresentação de antígenos. Estas drogas também podem reduzir a permeabilidade vascular e diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Feridas de pele em camundongos, tratadas com dexametasona, mostraram uma redução significativa da expressão de RNAm para IL-1 α , IL-1 β e TNF α (CHANG *et al.*, 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo Experimental

Para a realização deste experimento foram utilizados vinte e cinco cães, machos e fêmeas, adultos, sem raça definida, clinicamente saudáveis, selecionados por exames físico e laboratorial, provenientes do canil do Departamento de Veterinária da UFV. Estes cães foram mantidos em baias individuais e isoladas, sendo higienizadas diariamente. Os animais foram alimentados com ração comercial balanceada para cães adultos e a água de bebida era fornecida à vontade.

Estes animais foram aleatoriamente separados em cinco grupos:

Grupo Nº 1: animais controle, sem tratamento

Grupo Nº 2: animais tratados com corticosteróide tópico: creme à base de hidrocortisona¹ 1 %, aplicada duas vezes por dia, pela manhã e à tarde.

Grupo Nº 3: animais tratados com corticosteróide e antibiótico tópico: creme a base de hidrocortisona 1 % e neomicina² 5%, aplicado duas vezes por dia, pela manhã e à tarde.

Grupo Nº 4: animais tratados com corticosteróide sistêmico: Prednisolona³ 1,1 mg/Kg de peso, como dose única diária, via oral, administrada pela manhã. No dia da cirurgia foi administrada momento antes da mesma.

1. Hidrocortisona creme 1 % - Medicamentus (farmácia de manipulação)

2. Hidrocortisona 1% + Neomicina 5% creme – Medicamentus (farmácia de manipulação)

3. Prednisolona – Medicamentus (farmácia de manipulação)

Grupo Nº 5: animais tratados com antibiótico tópico: neomicina⁴ creme 5%, duas vezes ao dia, pela manhã e à tarde.

Todas as feridas, independentemente do grupo, eram limpas com soro fisiológico⁵, duas vezes por dia, pela manhã e à tarde, e em seguida aplicados os medicamentos correspondentes. Os tratamentos foram feitos durante 8 dias, e neste período os animais não receberam nenhum outro tipo de medicamento.

3.2. Procedimentos Anestésico e Cirúrgico

Após jejum alimentar e hídrico de doze horas, os animais foram sedados com cloridrato de acepromazina⁶ na dose de 0,1 mg por Kg de peso. Posteriormente, foram anestesiados com tiopental sódico⁷ na dose de 12,5 mg por Kg de peso e em seguida intubados com sonda endotraqueal.

Inicialmente, a região dorsolateral esquerda de todos os animais, foi devidamente preparada para cirurgia, por meio de tricotomia, desengorduramento com éter⁸ e antissepsia com povidine tópico⁹

Com uma lâmina de bisturi foram feitas cinco incisões na pele, perpendiculares ao eixo maior do animal, medindo aproximadamente 5 centímetros de extensão, separadas 5 cm umas das outras. Estas incisões foram numeradas de um a cinco de acordo com sua localização referencial no eixo crânio-caudal do animal.

Após realização de hemostasia por compressão, as incisões foram suturadas com fio de náilon cirúrgico¹⁰ nº 2-0, por meio de pontos simples separados.

Imediatamente após o procedimento cirúrgico todos os animais receberam um colar elizabetano com a finalidade de impedir a interferência dos mesmos sobre a ferida. Os animais permaneceram com o colar durante todo o experimento.

-
4. Neomicina 5% creme – Medicamentus (farmácia de manipulação)
 5. Solução fisiológica^R 0,9% -Equiplex.
 6. Acepram^R 1% - Univet.
 7. Thionembutal sódico^R – Abbott do Brasil Ltda
 8. Éter Etilico^R - Isofar
 9. Macrodine^R Tópico – Innovatec
 10. Náilon cirúrgico - Brasmedica

Todos os animais foram submetidos à avaliação clínica durante todo o experimento, observando-se a presença de reação inflamatória local e evolução do processo de reparação das feridas.

3.3. Coleta de material para estudo histológico

Após anestesia local e com auxílio de uma lâmina de bisturi, foram colhidos dois fragmentos de pele, de cada ferida, em todos os animais, na seguinte seqüência: 24 horas pós-operatório, incisão número um; 48 horas, incisão número dois; quarto dia, incisão número três; sexto dia, incisão número quatro e no oitavo dia, incisão número cinco. Estes fragmentos de tecido foram fixados em solução de Bouin por 24 horas. Completada a fixação, os fragmentos de pele foram lavados em água corrente, procedendo-se, em seguida, à desidratação em álcool 70, 80, e 90% e dois banhos em álcool 100%, por uma hora, em cada solução alcoólica. Após a desidratação os fragmentos foram diafanizados em dois banhos de xilol, por uma hora cada ou até completa diafanização do tecido.

Posteriormente os fragmentos foram embebidos em Paraplast¹¹ e mantidos em estufa¹² a 58°C durante duas horas, para logo serem incluídos em blocos do mesmo. Os blocos foram seccionados em micrótomo¹³ de rotação manual com espessura de 5 micrômetros e montados em lâmina de vidro e posteriormente corados segundo a técnica de hematoxilina-eosina (GRIMALDI FILHO, 1981) e Tricrômico de Gomori (BANCROFT *et al.*, 1996).

A análise histológica foi realizada com auxílio de microscópio¹⁴ de luz, com objetivas de 4X, 10X, 20X e 40X e documentadas fotograficamente.

Para a avaliação histológica, o processo de reparação foi dividido em fase inflamatória: coágulo/edema e infiltrado celular (polimorfonucleares neutrófilos e macrófagos) e fase proliferativa: epitelização, angiogênese e proliferação fibroblástica.

11. Paraplast^R 1 Kg – SIGMA

12. Estufa Orion – FANEM LTDA. São Paulo

13. Micrótomo Spencer – American Optical Company

14. Microscópio Dialux 20 EB.- Leitz

Com auxílio de uma ocular micrométrica¹⁵ foi medida a espessura do coágulo/edema, sendo estabelecidos os seguintes graus: (1) ausente; (2) grau leve (1 - 300 micras); (3) grau moderado (301 – 600 micras) e (4) grau intenso (> 600 micras).

3.4. Análise estatística

Para determinar a influência dos diferentes tratamentos sobre a fase inflamatória do processo de reparação, as medidas da espessura do coágulo/edema foram submetidas ao teste de ANOVA:um critério. Para a comparação das médias foi utilizado o teste t-student.

15. ocular micrométrica. OLYMPUS OSM^R

4. RESULTADOS

4.1. 1º dia pós-cirúrgico

Clinicamente, em todos os animais dos diferentes grupos observou-se reação inflamatória ao redor das feridas. Embora, este processo tenha sido mais intenso em alguns animais do que em outros, inclusive entre animais do mesmo grupo, as observações clínicas das feridas foram semelhantes entre todos os grupos, estando caracterizadas por bordas avermelhadas e aumentadas de volume (Figura 1). Nos animais dos grupos 1, 2, 3 e 5, as feridas se apresentaram aparentemente secas e cobertas por uma crosta. Porém, nos animais do grupo 4 tratados com prednisolona por via sistêmica, as feridas estavam úmidas e com presença de exsudato seroso.

A análise histológica das amostras das feridas dos animais dos diferentes grupos, também mostrava reação inflamatória de intensidade variável. Observou-se a presença de coágulo unindo as bordas das feridas constituído, principalmente, de fibrina e em quantidades escassas (Figura 3A). Entretanto, na hipoderme, imediatamente abaixo da linha de incisão, o depósito de fibrina era maior, chegando a ser intenso em alguns animais.

Igualmente, o exsudato celular era mais evidente na hipoderme, sendo constituído, predominantemente, por células inflamatórias do tipo polimorfonucleares neutrófilos (PMNN). Este infiltrado inflamatório também era observado nas papilas dérmicas próximas às bordas das feridas e ao redor daqueles anexos cutâneos que foram lesados durante o ato cirúrgico.



Figura 1. Feridas de um animal do grupo 3. Bordas avermelhadas e aumentadas de volume

Na avaliação histológica da espessura do coágulo/edema formado durante a reação inflamatória observou-se que apenas um animal do grupo 1 apresentou edema intenso. Entretanto, nos grupos 2 e 4 observaram-se em três animais, de cada grupo, edema inflamatório intenso, sendo que nos outros dois havia edema moderado. Em dois animais do grupo 3 observou-se edema intenso, enquanto nos outros três o edema era moderado. Já, nos animais do grupo 5 apenas dois animais mostraram edema leve e os outros mostraram edema moderado.

Entretanto, ao se analisar a Figura 2 pode-se constatar que as médias geométricas dos valores do coágulo/edema dos animais dos grupos 1 e 5 são semelhantes, o mesmo sendo observado entre as médias dos grupos 2, 3 e 4.

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa na intensidade do coágulo/edema da fase inflamatória nos animais dos diferentes tratamentos.

Tabela 1. Significância das medias comparadas da espessura do coágulo/edema dos animais dos diferentes tratamentos

Médias	Segundo dia	Quarto dia	Sexto dia
1 e 2	NS	0,0081*	NS
1 e 3	NS	0,0030*	NS
1 e 4	0,0457**	0,0008*	0,0105**
1 e 5	0,0062*	NS	NS
2 e 3	NS	NS	NS
2 e 4	0,0411**	NS	NS
2 e 5	0,0055*	0,0797***	NS
3 e 4	0,0064*	NS	0,0081*
3 e 5	0,0008*	0,0329**	NS
4 e 5	NS	0,0095*	0,0499**

* Significativo 1%
 ** Significativo 5%
 *** Significativo 10%
 NS Não significativo

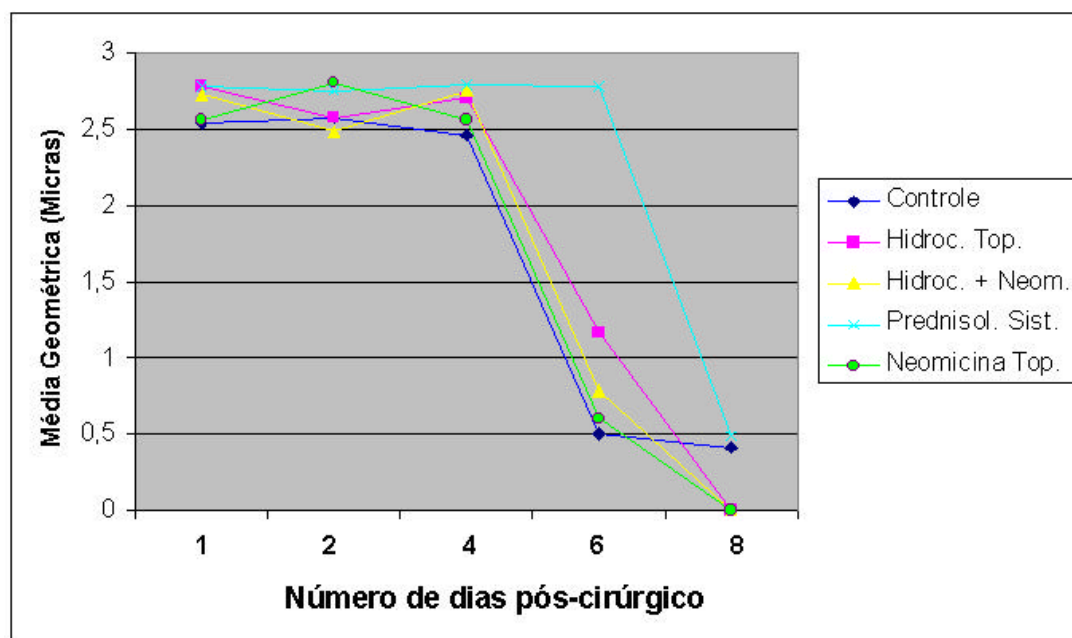


Figura 2. Tendência do coágulo/edema com relação aos diferentes tratamentos nas diferentes coletas.

4.2. 2º dia pós-cirúrgico

Clinicamente as feridas ainda permaneciam com sinais de reação inflamatória, principalmente nas bordas, mas estavam limpas e secas. As bordas das feridas encontravam-se avermelhadas e edemaciadas, o que era evidenciado pelo aumento de volume e afastamento das mesmas. Estes sinais eram mais evidentes nos animais do grupo 2, diferentemente do que foi observado nos animais do grupo 4 onde o processo inflamatório era menos evidente. As feridas dos animais do grupo 3 tinham um aspecto mais seco quando comparadas com as dos outros grupos.

Histologicamente, nos animais do grupo 1 observou-se em três deles, a organização do coágulo de fibrina localizado na hipoderme logo abaixo da linha de incisão, bem como naquele que unia as bordas da ferida. Esta organização era caracterizada pela formação de uma rede de fibrina onde já podia ser observada a formação de capilares (angiogênese), bem como a presença de células fusiformes indiferenciadas (Figura 3B). O infiltrado celular (Figura 3B) continuava sendo predominantemente do tipo PMNN, embora, já se observassem células do tipo mononuclear (macrófagos). Além disto, observou-se o início da epitelização, em dois animais deste grupo, notando-se que as células da camada basal da epiderme, mais próximas das bordas da ferida, apresentavam-se de forma alongada, parecendo estar migrando para o interior da ferida. As bordas das feridas estavam unidas por um delgado feixe de fibrina. Observou-se, ainda, a eliminação daqueles anexos lesados durante o ato cirúrgico.

Características similares foram encontradas nas amostras dos animais dos diferentes grupos. No entanto, nos animais do grupo 2, apenas três deles apresentaram organização do coágulo e início da epitelização (Figura 3C). No grupo 3, todos os animais apresentaram organização do coágulo e início da epitelização e a angiogênese também era observada nas papilas dérmicas próximas às bordas da ferida. Em todos os animais dos grupos 4 e 5 observou-se início da epitelização. Entretanto, no grupo 4 apenas três animais mostraram organização do coágulo e no grupo 5, isto foi constatado apenas em dois animais.

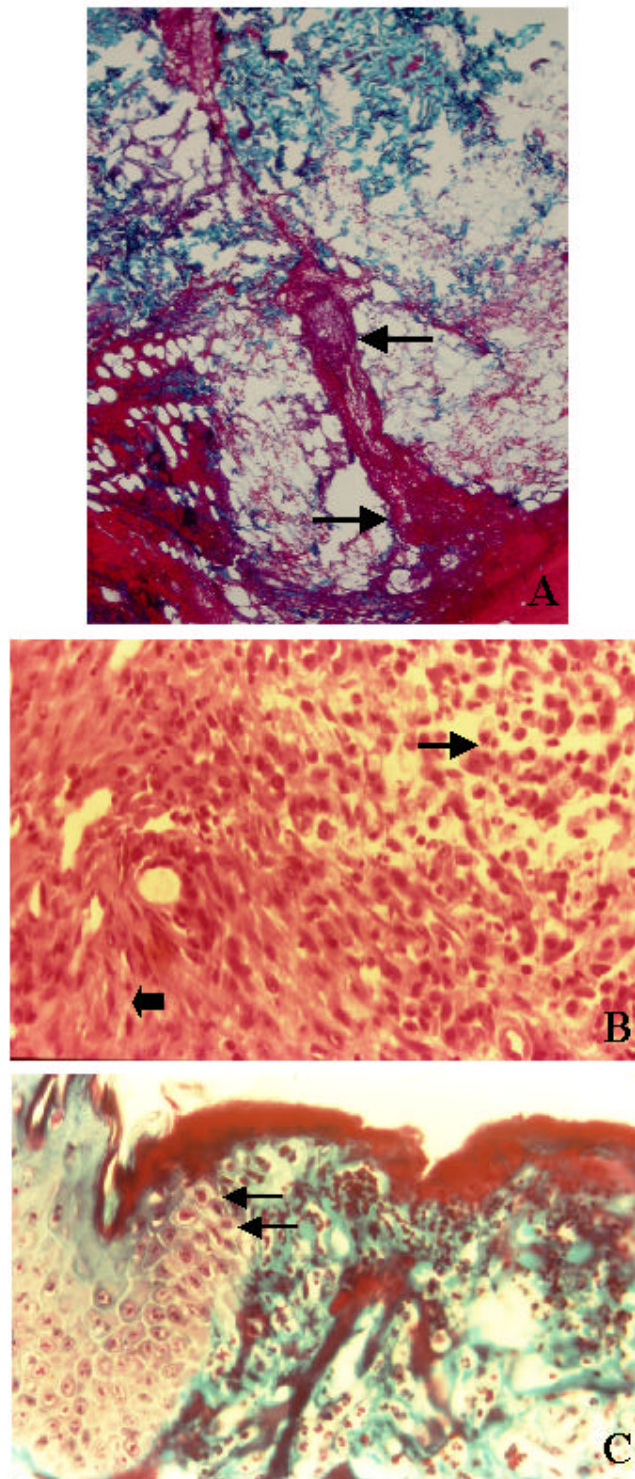


Figura 3. **A.** Animal do grupo 1. Primeiro dia pós-cirúrgico. Coágulo de fibrina unindo as bordas da ferida (setas). Tricrômico de Gomori, 100X. **B.** Animal do grupo 1. Segundo dia pós-cirúrgico. Fibroblastos (◼) e infiltrado inflamatório (seta). HE, 400X. **C.** Animal do grupo 2. Segundo dia pós-cirúrgico. Migração de ceratinócitos (setas). Tricrômico de Gomori, 400X.

Quanto à avaliação histológica da espessura do coágulo/edema observou-se edema leve em dois animais do grupo 1 e edema moderado nos outros três. Já, no grupo 2 foram três animais com edema moderado, um com edema intenso e um com edema leve. Por outro lado, foi observado que no grupo 3 haviam três animais com edema leve e apenas dois com edema moderado. No grupo 4 observou-se que quatro animais apresentaram edema moderado e só um mostrou edema intenso. No grupo 5 quatro animais mostraram edema intenso e apenas um com edema moderado.

Ao analisar a Figura 2 pode-se observar que na segunda coleta pós-cirúrgico houve uma ligeira queda nas médias geométricas dos valores do coágulo/edema dos grupos 2 e 3; ao contrario do que foi observado no grupo 5 que mostrou um ligeiro aumento.

Estatisticamente observou-se diferença significativa ($P < 0,01$) no tamanho do coágulo/edema entre as médias dos grupos 1, 2 e 3 quando comparados com o grupo 5. Igualmente houve diferença significativa ($P < 0,01$) quando se compararam as médias dos animais dos grupos 3 e 4. Já, a comparação das médias dos animais dos grupos 1 e 2 com as médias dos animais do grupo 4 mostraram diferença a 5% de significância.

4.3. 4º dia pós-cirúrgico

Clinicamente, nos animais dos grupos 1 e 3 observaram-se feridas bem fechadas, com poucas evidências de reação inflamatória. Nos animais do grupo 2 observaram-se feridas com bordas avermelhadas, ainda com sinais de inflamação mas com afastamento mínimo das bordas. No grupo 4, as feridas apresentavam-se úmidas e avermelhadas. As feridas dos cães do grupo 5 apresentavam-se avermelhadas e aumentadas de volume. Entretanto, em todos os animais dos diferentes grupos observou-se a fragilidade das feridas, manifestada pela separação das bordas no momento da biópsia.

Histologicamente, nas amostras das feridas dos animais do grupo 1 notou-se que a linha de incisão não era mais evidente, observando-se no seu lugar fibras colágenas (Tricrômico de Gomori) dispostas

perpendicularmente à superfície epitelial, parecendo que as mesmas continuavam-se com fibras colágenas provenientes da hipoderme (Figura 4A). A epitelização era completa em três animais, onde a epiderme mostrava, ora um epitélio delgado, cujas camadas não estavam completamente diferenciadas, ora uma fina camada de células ceratinizadas. Esta última era observada, principalmente, naquelas amostras onde ainda era possível observar uma crosta espessa sobre a ferida. Em todas as amostras observou-se que na hipoderme o coágulo tinha sido substituído por uma matriz frouxa contendo células fusiformes com núcleo volumoso e abundante citoplasma. O infiltrado inflamatório (Figura 4A) continuava sendo predominantemente do tipo PMNN. Além disto, constatou-se a formação de numerosos capilares com paredes finas e diminuição do edema e do infiltrado inflamatório em todos os animais. Proliferação fibroblástica também foi observada entre as fibras musculares e ao redor de anexos cutâneos.

Os fragmentos das feridas dos animais dos grupos tratados apresentaram características semelhantes às observadas nos animais do grupo controle. Entretanto, no grupo 2, a epitelização das feridas era completa somente em dois animais, enquanto que no grupo 3 a epitelização era completa em quatro animais. No grupo 4 observou-se que a epitelização era completa só em dois animais. Além disto, havia proliferação fibroblástica com formação de tecido conjuntivo desorganizado. Nos três animais que não mostraram epitelização completa se observaram inúmeras células inflamatórias do tipo PMNN. Nas amostras dos animais do grupo 5 observou-se que, em dois animais, não houve epitelização completa porque ainda haviam anexos cutâneos sendo eliminados e neste caso observavam-se abundantes células inflamatórias do tipo PMNN na hipoderme.

A avaliação histológica do edema mostrou que três animais do grupo 1 apresentaram edema moderado. No entanto, nos animais do grupo 2 ainda havia três animais com edema intenso. No grupo 3 somente dois animais apresentaram edema intenso, diferentemente do que foi observado no grupo 4 em que o edema intenso foi constatado em quatro animais. Nas amostras dos animais do grupo 5 haviam três com edema moderado. Estes achados podem ser analisados na Figura 2 onde se mostra que na terceira coleta pós-cirurgia houve um ligeiro aumento do edema nos animais dos grupos 2 e

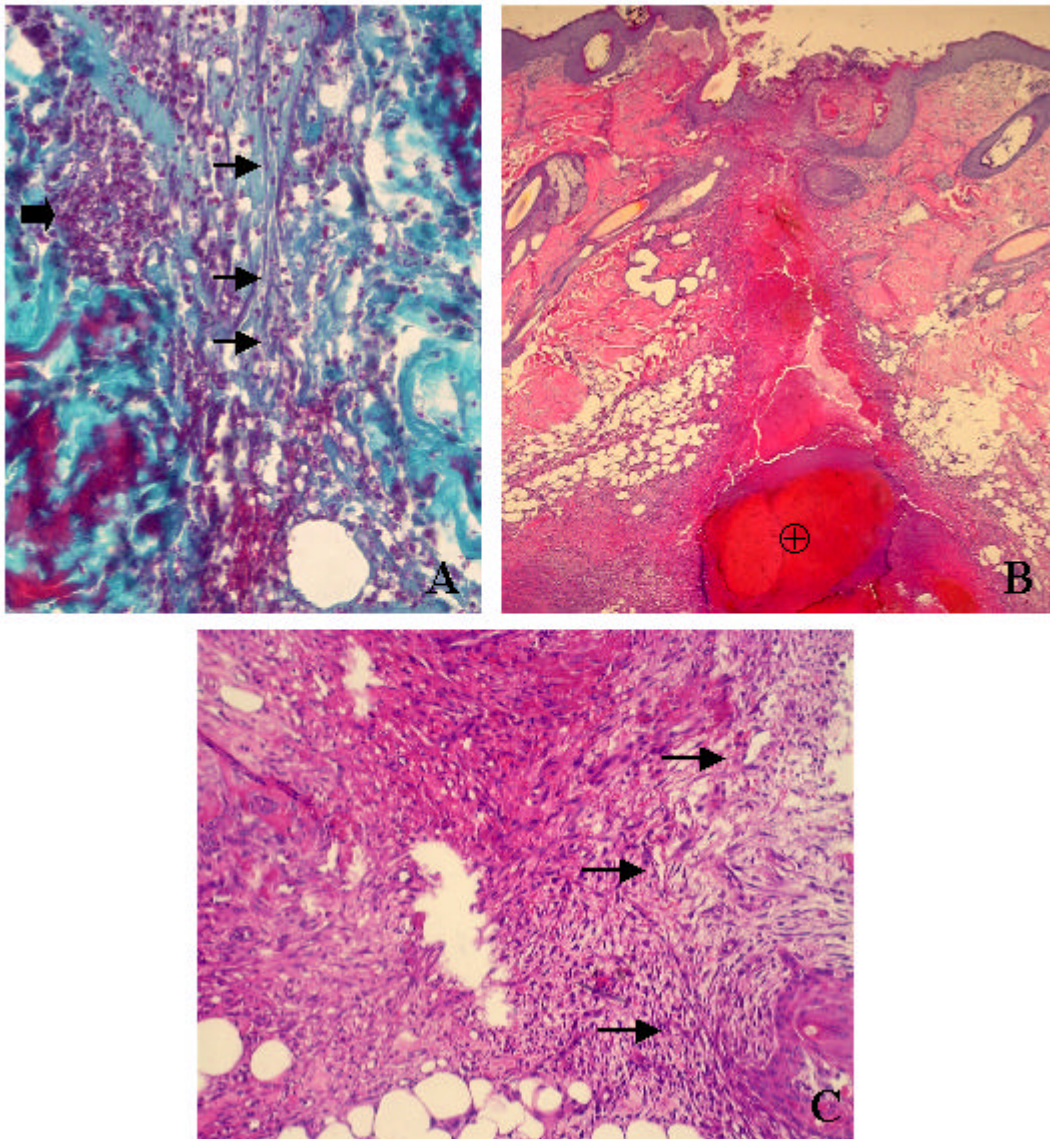


Figura 4. **A.** Animal do grupo 1. Quarto dia pós-cirúrgico. Fibras colágenas (setas) e infiltrado inflamatório (\blacktriangleright). Tricrômico de Gomori, 400X. **B.** Animal do grupo 4. Sexto dia pós-cirúrgico. Presença de coágulo (\oplus). HE, 40X. **C.** Animal do grupo 5. Sexto dia pós-cirúrgico. Tecido conjuntivo (setas). HE, 200X.

3, enquanto que houve uma ligeira queda no grupo 5. No grupo 4 as médias geométricas se mantiveram constantes.

Estatisticamente observou-se diferença significativa ($P < 0,01$) nas médias do tamanho do coágulo/edema dos grupos 2, 3 e 4 quando comparadas com o grupo 1. As médias do grupo 4 quando comparadas com as do grupo 5 mostraram diferença a 1% de significância. Já nas médias dos animais do grupo 3 comparadas com as do grupo 5 observou-se diferença a 5% de significância. Entretanto, comparando as médias dos animais dos grupos 2 e 5 houve diferença a 10% de significância.

4.4. 6º dia pós-cirúrgico

As feridas dos animais dos grupos 1, 3 e 5 pareciam clinicamente reparadas, sem sinais de inflamação, completamente fechadas, limpas e com aderência perceptível no momento da coleta das biópsias. Nos animais do grupo 2 as feridas apresentavam-se sem sinais clínicos de inflamação, secas, embora ainda mostrassem as bordas separadas. No grupo 4 as feridas mantinham sinais clínicos de inflamação, com aspecto úmido, avermelhadas e com bordas afastadas, demonstrando evolução lenta.

No exame histológico, nas amostras de todos os animais do grupo 1 observou-se que o epitélio sobre a linha de incisão mostrava as diferentes camadas que constituem a epiderme, embora mais espesso que o epitélio adjacente (Figura 5A). A matriz frouxa havia sido substituída por tecido conjuntivo fibroso bem diferenciado, onde também se observavam numerosos vasos sanguíneos com paredes espessas. Raramente observavam-se focos de células inflamatórias do tipo PMNN. Porém, um foco com inúmeras células inflamatórias PMNN e macrófagos foi observado em um animal deste grupo, embora apresentasse tecido conjuntivo fibroso bem diferenciado. Em alguns animais observou-se também proliferação fibroblástica nas papilas dérmicas próximas à incisão.

De modo geral, as características histológicas que foram observadas nos animais dos grupos tratados se assemelhavam às que foram descritas para o grupo controle. Entretanto, em dois animais dos grupos 2 e 3 não se observou epitelização completa.

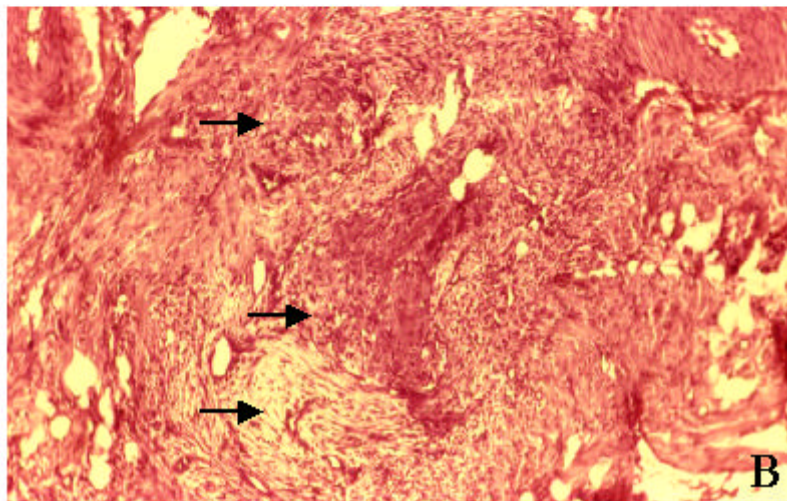
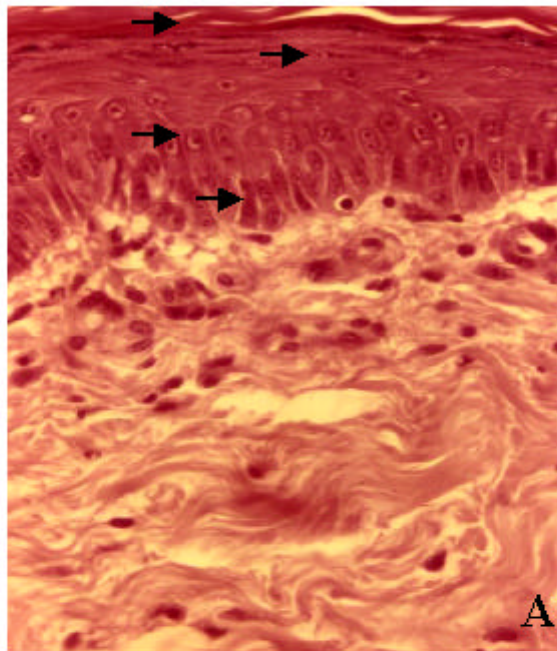


Figura 5. **A.** Animal do grupo 3. Sexto dia pós-cirúrgico. Epitélio bem diferenciado (setas). HE, 400X. **B.** Animal do grupo 2. Sexto dia pós-cirúrgico. Desorganização do tecido conjuntivo (setas). HE, 100X.

Já, nos animais do grupo 4 a epitelização só era completa em um animal, observando-se também que o infiltrado celular ainda era abundante e continuava sendo, predominantemente, do tipo PMNN. Além disto, observou-se ainda a desorganização do tecido conjuntivo, como também no grupo 2 (Figura 5B). Todos os animais do grupo 5 mostraram epitelização completa e formação de tecido conjuntivo fibroso (Figura 4C).

A avaliação histológica do edema mostrou que somente um animal do grupo controle apresentou edema moderado, diferentemente do observado nas amostras dos animais do grupo 2, onde dois deles apresentaram edema intenso..Nos animais do grupo 4 três deles apresentaram edema moderado e dois com coágulo/edema intenso (Figura 4B). Já, no grupo 5 somente em um animal observou-se edema intenso.

Na Figura 2 pode-se observar que houve uma marcada queda do edema nos animais dos grupos 1, 2, 3 e 5, enquanto que o grupo 4 continuava igual ao quarto dia pós-cirurgia.

Quando compararam-se as médias do tamanho do coágulo/edema entre os grupos 1 e 3, e entre os grupos 4 e 5 observou-se estatisticamente diferença a 5% de significância. Já, comparando as médias dos animais dos grupos 3 e 4 houve diferença estatística a 1% de significância.

4.5. 8º dia pós-cirúrgico

Clinicamente, as feridas dos animais dos grupos 1, 3 e 5 apresentavam-se completamente fechadas, com evidente aderência das bordas, secas e sem nenhum sinal de reação inflamatória, portanto, clinicamente reparadas. Nos animais dos grupos 2 e 4 as feridas continuavam mostrando evolução clínica mais lenta, com fragilidade evidente na união das bordas, principalmente nos animais do grupo 4.

Na análise histológica das amostras dos animais dos grupos 1, 3 e 5 constatou-se que o tecido conjuntivo fibroso mostrava características semelhantes ao que foi observado no sexto dia pós-cirúrgico, embora, com maior depósito de fibras colágenas. Igualmente, a epiderme mostrava camadas epiteliais bem diferenciadas, inclusive com formação de ceratina. Entretanto, em quatro animais dos grupos 2 e 4 o tecido de granulação não

tinha sido completamente substituído por tecido conjuntivo fibroso. No grupo 2, observou-se em um animal que, embora houvesse epitelização completa, a derme mostrava abundante tecido de granulação.

Estatisticamente não houve diferença significativa nas médias do tamanho do coágulo/edema entre os diferentes tratamentos, embora, apresentaram-se, histologicamente, diferenças qualitativas na resposta cicatricial entre os grupos 1, 2, 3, e 5 quando comparados com o grupo 4.

5. DISCUSSÃO

Muitos autores consideram que a inflamação é a fase inicial do processo de reparação, constituindo-se num evento fundamental neste processo, que se inicia quando é quebrada a barreira celular (STASHAK 1991; AUER, 1992; PROBST, 1993; GREENHALGH, 1998; CHANG *et al.*, 2000 e SMITH *et al.*, 2000). Esta resposta inflamatória envolve eventos vasculares tais como: vasodilatação e aumento da permeabilidade (PROBST, 1993; JIMENEZ & RAMPY, 1999), o que explica a vermelhidão e o aumento de volume observados nas bordas das feridas dos animais do presente estudo, caracterizando desta forma alguns dos eventos iniciais do processo inflamatório: hiperemia e edema.

O edema que foi observado nas feridas 24 horas pós-cirurgia pode ser explicado pelas mudanças vasculares que ocorrem muito precocemente após a agressão, que se desenvolvem com velocidades variáveis dependendo da intensidade da injúria. A vasodilatação com conseqüente aumento do fluxo eleva a pressão hidrostática local o suficiente para produzir a transudação de líquido, originando desta forma o edema (COTRAN, 1990).

De acordo com GRELLNER *et al.* (2000), o aumento rápido de mediadores químicos ou fatores pró-inflamatórios no local da injúria é devido à liberação de grânulos pré-formados. É sabido que ceratinócitos, glândulas sudoríparas e particularmente macrófagos contêm grandes quantidades de citocinas. Além disto, o exsudato com componentes sanguíneos pode contribuir para o aumento dos mediadores pró-inflamatórios. Por outro lado,

os componentes da cascata da coagulação, em particular o fator de Hageman, ativam o sistema imune inato e estimulam a geração de peptídeos vasoativos (CHANG *et al.*, 2000). Então, o aumento de permeabilidade vascular provocada pelos mediadores inflamatórios, liberados no local, também contribuiu para o aparecimento do edema.

O coágulo de fibrina que unia as bordas das feridas, bem como aquele que foi observado na hipoderme, imediatamente abaixo da linha de incisão, é explicado porque durante o ato cirúrgico há ruptura de vasos sanguíneos, originando saída de proteínas plasmáticas e liberação de células sanguíneas. Por outro lado, a exposição do colágeno subendotelial estimula a agregação plaquetária e ativa a cascata da coagulação, o que leva à formação de um coágulo que serve como selo hemostático e como matriz provisória para a movimentação celular (SUTER *et al.*, 1997).

Pode-se inferir que o infiltrado celular observado na hipoderme e nas papilas dérmicas próximas às bordas das feridas que estava constituído, predominantemente, por PMNN foi devido à liberação local de mediadores quimiotáticos, inicialmente liberados pelas plaquetas, tais como: TGF α , TGF β e PF4, que atuaram como quimioatratentes para os PMNN (CHANG *et al.*, 2000). Entretanto, estas células inflamatórias, primeiro neutrófilos e depois macrófagos, foram as principais fontes não só de substâncias quimiotáticas como também de fatores de crescimento e citocinas no local da ferida, mantendo assim o afluxo das células inflamatórias que foram observadas durante todo o período analisado, o que está de acordo com o relatado por GROSE & MARTIN (1999).

O grande afluxo de células PMNN que foi constatado em todos os animais do presente estudo, 24 horas após a cirurgia, está de acordo com PROBST (1993), quando afirma que os neutrófilos saem da coluna axial após a diminuição da velocidade do fluxo, iniciando o processo de migração através da parede vascular até o tecido lesado. Desta forma, estas células são as primeiras a chegar ao local da ferida, constituindo o tipo celular predominante nas primeiras 6 horas pós-ferimento (CHANG *et al.*, 2000).

Em contraposição ao que CHANG *et al.* (2000) afirmaram, que os monócitos são as células predominantes 12 horas pós-injúria, com o pico máximo aos três dias, o mesmo não foi observado no presente estudo, já

que em nenhum dos períodos de coleta constatou-se predomínio destas células.

Já, PADGETT *et al.* (1998) consideraram que os macrófagos chegam ao local da injúria nas primeiras 24 a 48 horas pós-ferimento, concordando assim com o que foi observado no presente experimento, ainda, constatou-se que a presença destas células coincidia com a organização do coágulo. Isto se justifica porque, paralelamente à fagocitose de restos celulares, os macrófagos são importantes para o recrutamento e ativação de fibroblastos (DAVIDSON, 1992; CASAUBON, 1993; PROBST, 1993; CHANG *et al.*, 2000; KUROSACA *et al.*, 2001). Estes autores sugeriram ainda, que os estágios tardios do processo de cicatrização são dependentes do evento inflamatório inicial e que a deficiência no recrutamento ou função destas células pode ter impacto significativo sobre este processo em geral.

A organização do coágulo, com início de formação de um tecido mesenquimal vascularizado, que foi observada nas amostras, 48 horas pós-cirurgia, está de acordo com o que foi reportado por outros autores (DAVIDSON, 1992; PROBST, 1993; GROSE & MARTIN, 1999; JIMENEZ & RAMPY, 1999) quando relataram que os fibroblastos da derme próxima à ferida começam a ser ativados e recrutados para o local da lesão, onde eles proliferam e começam a produzir matriz extracelular. Este novo tecido conjuntivo começa a ser invadido por uma série de capilares originados de vasos sanguíneos existentes, denominando-se então tecido de granulação.

Além disso, pelo fato de serem feridas incisivas com perda tecidual mínima, e que se mantiveram limpas, houve também formação mínima de tecido de granulação unindo as bordas das feridas, concordando com as observações relatadas por ALISON (1992) e CASAUBON (1993).

As características histológicas que foram observadas nas feridas, 48 horas pós-cirurgia, estão de acordo com os relatos de DAVIDSON (1992), quando comentou que, a partir do momento em que a inflamação aguda começa a ficar sob controle o coágulo de fibrina é gradualmente substituído pelo tecido de granulação. Relatou ainda que, histologicamente, nas bordas deste tecido de granulação em desenvolvimento pode-se observar a presença de células fibroblásticas fusiformes, bem como formação de capilares. Embora, CASAUBON (1993) tenha constatado que os fibroblastos

aparecem por volta do terceiro ou quarto dia pós-lesão, comenta que a presença destas células pode ser observada a partir de 24 a 36 horas pós-traumatismo.

Já, a neovascularização observada está de acordo com o que foi reportado por ALISON (1992) que considera que ela se inicia dois a três dias após a lesão.

Além disto, numerosos estudos têm demonstrado o papel crítico da angiogênese e do aumento do fluxo sanguíneo para o sucesso da reparação de feridas cirúrgicas. Segundo STEINBRECH *et al.* (1999), a ruptura vascular devido à cirurgia deixa algumas áreas hipóxicas, onde a tensão de oxigênio aproxima-se de zero nos estágios iniciais do processo de reparação. Isto significa que a angiogênese é vital para o suprimento de oxigênio (RENDELL *et al.*, 1997) e de fatores de crescimento necessários para iniciar os processos de síntese na reparação tecidual (BOND *et al.*, 2000). Por outro lado, ADAIR *et al.* (1990) encontraram que o suprimento vascular inadequado, assim como a redução da tensão de oxigênio, no local da ferida, levam a angiogênese compensatória, para satisfazer as demandas metabólicas do tecido.

A ausência de organização do coágulo com início de formação de tecido de granulação que foi constatada em alguns animais, dos diferentes grupos, 48 horas pós-cirurgia, poderia ser decorrente de hipóxia mais severa como consequência da compressão vascular pelo maior coágulo/edema formado. A hipóxia parece ter efeitos variados sobre os fibroblastos, impedindo a multiplicação dos mesmos, limitando a produção de colágeno (STADELMANN *et al.*, 1998) e principalmente regulando fatores de crescimento, dentre os quais o TGF β . Assim, a angiogênese derivada da hipóxia e a proliferação fibroblástica são fundamentais para a formação e remodelação da matriz extracelular no processo de reparação (STEINBRECH *et al.*, 1999).

Segundo DAVIDSON (1992), os fibroblastos, como células efectoras, produzem mediadores solúveis que ativam outras células, tais como: células endoteliais e ceratinócitos, dentre outras. Por outro lado, KENCH *et al.* (1999) consideraram que os leucócitos liberam mediadores que estimulam a proliferação de células endoteliais, musculares lisas e fibroblastos. Então,

pode-se deduzir que a formação deste tecido de granulação foi devida à presença de mediadores solúveis que foram secretados no tecido lesado. Deve-se considerar ainda, que os fatores de crescimento derivados da degranulação plaquetária foram sinais importantes para iniciar e coordenar os movimentos teciduais da epitelização e possivelmente iniciar a resposta de angiogênese (GROSE & MARTIN, 1999).

SCHAFFER *et al.* (1996) consideraram que a inibição da síntese de óxido nítrico no local da ferida pode estar diretamente relacionada à diminuição na formação de tecido de granulação. Acrescentaram, ainda, que o óxido nítrico parece ser um importante regulador do acúmulo de colágeno e pode afetar, diretamente ou através da liberação de outros mediadores, a síntese e lise de colágeno. Assim, é possível que naqueles animais dos grupos 2 e 4, onde não foi observado, 48 horas pós-lesão, início de organização do coágulo, tenha havido uma falha na produção de óxido nítrico, já que segundo ULLAND *et al.* (1997), os glicocorticóides inibem a enzima óxido nítrico sintetase. Entretanto, os mesmos autores sugerem que os efeitos dos glicocorticóides possam ser mediados através da inibição de TGF β 1.

PROBST (1993) e CASAUBON (1993) relataram que a proliferação e migração das células epiteliais são sinais prematuros de reparação. Segundo estes autores, esta resposta pode ser muito rápida e nas primeiras horas pós-traumatismo as células começam a migrar de forma centrípeta a partir das margens da ferida. Igualmente, ALISON (1992) relatou que a proliferação e a migração epitelial podem cobrir a ferida entre 12 e 24 horas pós-traumatismo. Diferentemente do que foi relatado por estes autores, tais sinais de reparação precoce não foram evidenciadas nas feridas, já que a migração de ceratinócitos da camada basal da epiderme somente foi constatada a partir das 48 horas pós-cirurgia. Entretanto, estas observações estão de acordo com os relatos de GROSE & MARTIN (1999), quando comentaram que, nas bordas de uma ferida cutânea, a monocamada basal de ceratinócitos inicia sua migração através de uma matriz provisória localizada na interface entre a derme e o coágulo de fibrina.

CASAUBON (1993) comentou que a velocidade de migração dos ceratinócitos varia conforme o grau de desidratação do coágulo e que a

crosta impede a epitelização. Assim, provavelmente, isto explique porque no grupo 2, somente três animais apresentaram início de epitelização, nos quais clinicamente era mais evidente o processo inflamatório e histologicamente se constatou a presença de restos celulares entre as bordas das feridas.

De acordo com DAVIDSON (1992), os folículos pilosos intactos são a maior fonte de reserva para células epidérmicas durante a reparação de feridas. Desta forma, a restauração epitelial pode ocorrer extremamente rápido em superfícies de feridas incisais que não tenham atingido muitos anexos cutâneos. Esta observação poderia explicar, em parte, o processo de epitelização mais lento observado nos animais onde muitos folículos foram lesados.

As características histológicas encontradas no quarto dia pós-cirurgia nos animais tratados com prednisolona sistêmica, onde havia proliferação fibroblástica com tecido desorganizado, podem ser explicadas pelos achados de BEINER *et al.* (1999), quando constataram que os corticosteróides podem causar prejuízo irreversível, dentre os quais a desorganização na estrutura do tecido. Além disto, é provável que tenha havido alguma interação entre a prednisolona e o TGF β 1, já que uma diminuição nos níveis deste fator de crescimento pode levar a diferenças qualitativas na cicatrização de feridas (KARIM *et al.*, 1997; MOULIN *et al.*, 1998; ASHCROFT, 1999).

McPHEE *et al.* (1998) observaram que a administração de corticosteróides após o terceiro dia pós-cirúrgico parecia não afetar o processo de cicatrização. Entretanto, como no presente estudo a prednisolona foi administrada por via oral, momentos antes da cirurgia, é possível que os efeitos da mesma tenham influenciado o processo de reparação nesses animais.

De acordo com COTRAN (1990), no quinto dia após o ferimento o espaço da incisão está preenchido com tecido de granulação, com um máximo de neovascularização e abundante depósito de colágeno e que a epiderme recupera a espessura normal e mostra arquitetura madura. No presente trabalho, tais achados foram observados no sexto dia pós-cirurgia, quando se constatou a presença de tecido conjuntivo fibroso bem diferenciado, com vasos sanguíneos de paredes espessas e epiderme com

camadas diferenciadas, embora mais espessa que o epitélio adjacente. Os achados histológicos verificados no oitavo dia pós-cirurgia concordam com as observações desses autores, quando afirmam que a partir da segunda semana se produz um contínuo acúmulo de colágeno e proliferação fibroblástica. Além disto, o infiltrado inflamatório, o edema e o aumento da permeabilidade vascular diminuem significativamente.

Estudos experimentais sugerem que os corticosteróides retardam a cicatrização de feridas com redução da força tensil (McPHEE *et al.*, 1998). Além disto, estas drogas inibem a inflamação por interferir sobre os macrófagos presentes na ferida e também no processo de angiogênese (STADELMANN *et al.*, 1998) e síntese de colágeno inibindo a fibrogênese (CHEDID *et al.*, 1996; TUAN & NICTER 1998). Assim, considerando que a cicatrização de feridas é um processo altamente regulado que envolve inflamação, proliferação e migração celular, angiogênese e produção de matriz extracelular (YANG *et al.*, 1999), pode-se inferir que as características qualitativas do tecido cicatricial e o retardo no processo de reparação que foram observados nos animais tratados com prednisolona estariam, provavelmente, relacionados com os efeitos induzidos por este medicamento. Segundo KARIM *et al.* (1997), os corticosteróides modulam genes via mecanismos de transcrição e pós-transcrição, incluindo genes que afetam a produção de pró-colágeno I, III e IV.

Ainda, segundo OLIVRY e SOUSA (2001), muitos efeitos dos glicocorticóides são devidos à diminuição da transcrição de múltiplos genes que interferem na codificação de citocinas, receptores para citocinas, proteínas quimiotáticas, enzimas pró-inflamatórias e moléculas de adesão.

Entretanto, como os glicocorticóides suprimem a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 (PADGETT *et al.*, 1998), que juntamente com PDGF-BB e TGF α , aumentam a expressão do KGF que é o principal mitógeno derivado dos fibroblastos (CHEDID *et al.*, 1996), também pode-se considerar que, nos animais tratados com prednisolona sistêmica, provavelmente, houve diminuição na produção destas citocinas pró-inflamatórias, contribuindo desta forma, no retardamento do processo de cicatrização.

Diferentemente do que foi descrito por McEWEN (2000), quando observou que o aumento na liberação de glicocorticóides, por estresse ou administração da droga, direciona a movimentação de vários tipos celulares (linfócitos e monócitos), da circulação para os tecidos, no presente estudo não se observou predomínio de células mononucleares no infiltrado inflamatório, possivelmente porque, neste caso, não houve estresse agudo nem hiperdosagem de corticosteróides, embora, possa ter havido diminuição na quimiotaxia destas células (ANDERSSON & GOODKIN, 1998)

McPHEE. *et al.* (1998), consideraram que os efeitos adversos dos corticosteróides também incluem: estabilidade das membranas dos lisossomos dos leucócitos, redução na produção de mucopolissacarídeos, diminuição na síntese do colágeno e diminuição na angiogênese. Isto poderia explicar a diferença qualitativa e quantitativa do tecido cicatricial observado nos animais do grupo 4 em relação aos animais dos outros grupos. Possivelmente houve menor depósito de algumas proteínas da matriz extracelular, que necessitam ser rapidamente sintetizadas durante o início de formação do tecido de granulação e também durante a substituição final por tecido conjuntivo maduro (CATTO *et al.*, 1992; BRASILEIRO FILHO *et al.*, 1996; ECKES *et al.*, 2000).

Uma vez que no oitavo dia pós-cirúrgico o coágulo/edema havia sido substituído por tecido conjuntivo fibroso em praticamente todos os animais, estatisticamente não se encontrou diferença significativa que demonstrasse a influência dos diferentes tratamentos na reparação das feridas. Entretanto, foram observadas, histologicamente, diferenças qualitativas e quantitativas quando se comparou o grupo 4 com os outros grupos experimentais. Isto, leva a pensar que, provavelmente, devido à potência quatro vezes maior da prednisolona em relação à hidrocortisona (SUMANO & OCAMPO, 1997) e a seu efeito sistêmico, este medicamento possa ter influenciado, negativamente, no processo de reparação das feridas. Por outro lado, nos animais dos grupos 1 e 5, a resposta cicatricial foi semelhante, possivelmente porque nenhum dos referidos grupos foi tratado com agentes antiinflamatórios que afetaram a mesma.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Foram utilizados 25 cães adultos, machos e fêmeas, clinicamente saudáveis, sem raça definida, provenientes do canil do Departamento de Veterinária da UFV, com o objetivo de avaliar histologicamente o efeito da hidrocortisona, da prednisolona e neomicina no processo de reparação de feridas cutâneas. Estes animais foram aleatoriamente divididos em cinco grupos, em todos eles foram feitas cinco incisões de pele perpendiculares ao eixo maior do animal e numeradas de um a cinco de acordo com sua localização referencial no eixo craniocaudal. Os grupos foram assim constituídos: grupo 1-controle; grupo 2-hidrocortisona tópica; grupo 3-hidrocortisona + neomicina tópica; grupo 4-prednisolona oral e grupo 5-neomicina tópica. Biópsias de pele de cada incisão foram coletadas em todos os animais, na seguinte seqüência: no 1º dia pós-operatório, incisão nº 1; no 2º dia, incisão nº 2; no 4º dia, incisão nº 3; no 6º dia, incisão nº4 e no 8º dia, incisão nº5.

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

1. Os animais tratados somente com corticosteróides, hidrocortisona tópica e prednisolona sistêmica, apresentaram diferenças qualitativas e quantitativas na resposta cicatricial, quando comparados com o resto dos animais, principalmente o grupo tratado com prednisolona, onde observou-se menor evolução na formação de tecido conjuntivo fibroso e desorganização do mesmo

2. Os animais tratados com neomicina não apresentaram histologicamente diferenças marcantes no processo de reparação quando comparados com os animais do grupo controle.
3. Os animais tratados com a combinação de hidrocortisona + neomicina, histologicamente, apresentaram evolução rápida e com maior formação de tecido conjuntivo.
4. Estatisticamente encontrou-se, ao final do experimento, que os diferentes tratamentos utilizados não influenciaram na substituição do coágulo/edema por tecido conjuntivo fibroso.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. Revinter Ltda. Rio de Janeiro 1998, 469p.
- ADAIR, T. H., GAY, W. J., MONTANI, J. P. Growth regulation of de vascular system: Evidence for a metabolic hypothesis. **Am. J. Physiol.** v.259, p.393-398, 1990.
- ANDERSON, P. & GOODKIN, D. E. Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: A critical review. **Journal of Neurological Science.** v.160, p.16-25, 1998.
- ADCOCK, I. M. Molecular Mechanisms of Glucocorticosteroid Actions. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.** v.10, p115-126, 2000.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. **Biologia Molecular da Célula**. Artes Médicas, Porto Alegre 1997, 1294p.
- ALISON, M.R. Repair and Regenerative Responses. In: MCGEE, J.O., ISAACSON, P., WRIGHT, N.A. (Eds). **Oxford Textbook of Pathology.** v.1, 1.ed, Oxford University Press: Oxford. 1992, p.365-368
- ASHCROFT, G. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . **Microbes and Infection.** V. 1, p.1275-1282, 1999.
- AUER, J. A. **Equine surgery**, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1992. 1214p.
- BANCROFT, I.D., STEVENS, A., TURNER, D.R. **Theory and Practice of Histological Techniques.** 4.ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766p.

- BATOR, J. M., COHEN, R. L., CHAMBERS, D. A. Hydrocortisone Regulates the Dynamics of Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Expression in Culture Murine Keratinocytes. **Experimental Cell Research**. v.242, p.110-119, 1998.
- BEINER, J. M., JOKL, P., CHOLEWICKI, J., PANJABI, M. M. The effect of Anabolic Steroids and Corticosteroids on Healing of Muscle Contusion Injury. **The American Journal of Sports Medicine**. v.27, n.1, p.2-9, 1999.
- BERGER, A., FELMAN, A., GNANT, M., KRUGER, E., KIM, B., HEWITT, S., FIGG, W., RICHARD, H., LIBUTTI, S. The Angiogenesis Inhibitor, Endostatin, Does Not Affect Murine Cutaneous Wound Healing. **Journal of Surgical Research**. v.91, p.26-31, 2000.
- BOND, S. J., KLEIN, S. A., ANDERSON, G. L., WITTLIFF, J. L. Interaction of Angiogenesis Inhibitor TNP-470 with Basic Fibroblast Growth Factor Receptors. **Journal of Surgical Research**. v.92, p.18-22, 2000.
- BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F.E.D.; PITTELA, J.E.H.; BAMBIRRA, E.A; BARBOSA, A,J.A (eds) *Bogliolo Patologia Geral*. 1ª ed., Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 1996, 312 p.
- BRATTSAND, R. & LINDEN, M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v.10 Suppl. n.2, p.81-90, 1996.
- BUCKMIRE, M., PARQUET, G., GREENWAY, S., ROLANDELLI, R. Temporal Expression of TGF- β 1, EGF, and PDGF-BB in a Model of Colonic Wound Healing. **Journal of Surgical Research**. v.80, p.52-57, 1998.
- CARGANO, A. Corteza Adrenal. In: GARCIA, A., CASTEJÓN, F., DELA CRUZ, L., GONZALEZ, J., MURILLO, M., SALIDO, G. (Eds). **Fisiología Veterinaria**. McGRAW-HILL- Interamericana. 1995, 1074p.
- CASAUBON, H. T. Reparación. In: TRIGO, F.J., MATEOS, A. (Eds). **Patología General Veterinária**. 2.ed. McGRAW-HILL-Interamericana, 1993, 242 p.
- CATTO, M.E. Healing (repair) and Hypertrophy. In: CATTO, J.R. (Ed) **Muir's Textbook of Pathology**. 20.ed, Edward Arnold: London, 1992, p5.1-5.26.
- CHANG, L.; CORDEIRO, M. F.; AKBAR, A. N.; KHAW, P. T. The Role of Immune System in Conjunctival Wound Healing After Glaucoma Surgery. **Survey of Ophthalmology**. v.45, n.1, July-August. 2000.

- CHEDID, M., HOYLE, J.R., CSAKY, K.G., RUBIN, J.S. Glucocorticoids inhibit keratinocyte growth factor production in primary dermal fibroblasts. **Endocrinology**. v.137, n.6, p2232-2237, 1996.
- COTRAN, R. S. Inflamación y Reparación. In: COTRAN, R. S., KUMAR, V., ROBBINS, L. S. (Eds). **Robbins Patología Estructural y Funcional**. 4.ed., McGRAW-HILL-Interamericana. v.I, 1990, 739p.
- DAVIDSON, J.M. Wound Repair. In: GALLIN, J.I., GOLSTEIN, I.M., SNYDERMAN, R. (Eds). **Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates**. 2.ed. Raven Press Ltda. New York, 1992, 1182p.
- DRAZNER, F.H. **Small Animal Endocrinology**. New York: Churchill Livingstone, 1987, 508p.
- ECKES, B., ZIGRINO, P., KESSLER, D., HOLTKÖTTER, O. Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. **Matrix Biology**. v.19, p.325-332, 2000.
- ELLISON, W. G.; Cicatrização Visceral e Distúrbios Decorrentes da Reparação. In: BOJRAB, J.M. (Ed). **Mecanismos da Moléstia na Cirurgia dos Pequenos Animais**. 2.ed. Manole LTDA, 1996, 1446p.
- FOLKMAN, J. & BREM, H. Angiogenesis and Inflammation. In: GALLIN, J.I., GOLSTEIN, I.M., SNYDERMAN, R. (Eds). **Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates**. 2.ed. Raven Press Ltda. New York. 1992, 1182p.
- GOLDSTEIN, A. R., BOWEN, L. D., FAUCI, S. A. Adrenal Corticosteroids. In: GALLIN, J.I., GOLSTEIN, I.M., SNYDERMAN, R. (Eds). **Inflammation Basic Principles and Clinical Correlates**. 2.ed. Raven Press Ltda. New York. 1992, 1182p.
- GREENHALGH, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.30, p.1019-1030, 1998.
- GRELLNER, W., GEORG, T., WILSKE, J. Quantitative analysis of proinflammatory (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. **Forensic Science International**. v.113, p.251-264, 2000.
- GRIMALDI FILHO, G. **Manual de Técnica Histológica**. Ed. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1981.
- GROSE, R. & MARTIN, P. Parallels between wound repair and morphogenesis in the embryo. **Cell & Developmental Biology**. v.10, p.395-404, 1999.

- GÜNES, A.T. & FETIL, E. Hormones: Androgens, Antiandrogens, Anabolic Steroids, Estrogens – Unapproved Uses or Indications. **Clinics in Dermatology**. v.18, p.55-61, 2000.
- JIMENEZ, P. & RAMPY, M. Keratinocyte Growth Factor-2 Accelerates Wound Healing in Incisional Wounds. **Journal of Surgical Research**. v.81, p.238-242, 1999.
- KARIM, M. A., FRIZZELL, S., INMAN, L., SHINN, M., MILLER, D. D. *In vivo* Role of Glucocorticoids in Barotrauma Vascular Repair and Fibrosis. **Journal Mol. Cell Cardiol**. v.29, p.1111-1122, 1997.
- KIETZMANN, M. Improvement and retardation of wound healing: effects of pharmacological agents in laboratory animal studies. **Veterinary Dermatology**. v.10, p.83-88, 1999.
- KENCH, J. A., RUSSELL, D. M., FADOK, V. A., YOUNG, S. K., WORTHEN, G. S., CARSON, J. J., HENSON, J. E., HENSON, P. M., NEMAZEE, D. Aberrant Wound Healing and TGF- β Production in the Autoimmune-Prone MRL/+ Mouse. **Clinical Immunology**. v.92, n.3, p.300-310, 1999.
- KUHN, M. A., SMITH, P. D., WACHTEL, T. L., WRIGHT, T. E., ROGAZEWSKI, A., NGUYEN, K., ROBSON, M. C., FRANZ, M. G. Abdominal Wall Repair Is Delayed During Hepatic Regeneration. **Journal of Surgical Research**. v.95, p.54-60, 2001.
- KUROSAKA, K., WATANABE, N., KOBAYASHI, Y. Production of Proinflammatory Cytokines by Resident Tissue Macrophages after Phagocytosis of Apoptotic Cells. **Cellular Immunology**. v.211, p.1-7, 2001.
- LUCENA, R., GINEL, P., HERNANDEZ, E., NOVALES, M. Effects of short courses of different doses of prednisone and dexamethasone on serum third component of complement (C3) levels in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.68, p.187-192, 1999.
- McEWEN, B. S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**. v.886, p.172-189, 2000.
- McPHEE, I. B., WILLIAMS, R. P., SWANSON, C. E. Factors Influencing Wound Healing After Surgery for Metastatic Disease of the Spine. **Spine**. v.23, n.6, p.726-732, 1998.
- MORETTI, S., SPALLANZANI, A., PINZI, C. Skin Angiogenesis: Biologic Bases for Pathological Processes. **Clinics in Dermatology**. v.17, p.629-631, 1999.

- MOULIN, V., CASTILLOUX, G., AUGER, F. A., GARREL, D., O'CONNOR-McCOURT, M. D., GERMAIN, L. Modulated Response to Cytokines of Human Wound Healing Myobibroblasts Compared to Dermal Fibroblasts. **Experimental Cell Research**. v.238, p.283-293, 1998.
- OLIVRY, T. & SOUSA, C. A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): glucocorticoid pharmacotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.81, p.317-322, 2001.
- PADGETT, D. A., MARUCHA, P. T., SHERIDAN, J. F., Restrain Stress Slows Cutaneous Wound Healing in Mice. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.12, p.64-73, 1998.
- PEDERSEN, N.C. A review of immunologic diseases of the dog. **Veterinary immunology and immunopathology** v.69, p.251-342, 1999.
- PROBST, C. W. Wound healing and Specific Tissue Regeneration. In: SLATTER, D. (Ed). **Textbook of small animal surgery**. v.I, 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1993, 1141 p.
- RANDALL, C., DAWN, L., LISA, R., JAY, H. Effects of a 1% hydrocortisone conditioner on haematological and biochemical parameters, adrenal function testing and cutaneous reactivity to histamine in normal and pruritic dogs. **Veterinary Dermatology**. v.10, p.109-116, 1999.
- RENDELL, M. C., MILLIKEN, B. K., FINNEGAN, M. F., FINNEY, D. A., HEALY, J. C. The Skin Blood Flow Response in Wound Healing. **Microvascular Research**. v.53, p.222-234, 1997.
- SCOTT, D. W., MILLER, W.H., GRIFFIN, C. E. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5.ed, Interlivros, 1995, 1130p.
- SCHÄFFER, M. R., TANTRY, U., GROSS, S. S., WASSERKRUG, H. L., BARBUL, A. Nitric Oxide Regulates Wound Healing. **Journal of Surgical Research**. v.63 p.237-240, 1996.
- SMITH, P., KUHN, M., FRANZ, M., WACHTEL, T., WRIGTH, T., ROBSON, M. Initiating the inflammatory Phase of Insicional Healing prior to Tissue Injury. **Journal of Surgical Research**. v.92, p.11-17, 2000.
- STADELMANN, W. K., DIGENIS, A. G., TOBIN, G. R., Impediments to Wound Healing. **The American Journal of Surgery**. v.176, sup.2A, p.39s-47s, 1998.
- STASHAK, T. **Equine wound management**. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1991, 278p.
- STEINBRECH, D. S., LONGAKER, M. T., MEHRARA, B. J., SAADEH, P. B., CHIN, G. S., GERRETS, R. P., CHAU, D. C., ROWE, N. M., GITTES, G. K. Fibroblast Response to Hypoxia: The Relationship between

- Angiogenesis and Matrix Regulation. **Journal of Surgical Research**. v.84, p.127-133, 1999.
- SUMANO, H. L. & OCAMPO, L. C. **Farmacología Veterinaria**. 2 ed. McGRALL-HILL Interamericana. Mexico 1997, 860p.
- SUTER, M. M., CRAMERI, F. M., OLIVRY, T., MUELLER, E., TSCHARNER, C. V., JENSEN, P. J. Keratinocyte biology and pathology. **Veterinary Dermatology**. v.8, p.67-100, 1997.
- TATESHITA, T., ONO, I., KANEKO, F. Effects of collagen matrix containing transforming growth factor (TGF)- β 1 on wound contraction. **Journal of Dermatological Science**. v.27, p.104-113, 2001.
- TUAN, L. T. & NICHTER, S. L. The Molecular Basis of Keloid and Hypertrophic Scar Formation. **Molecular Medicine Today**, January. p.19-24, 1998.
- UCHI, H., TERAOKA, H., KOGA, T., FURUE, M. Cytokines and chemokines in the epidermis. **Journal of Dermatological Science**. v.24, Sup1, p.s29-s38, 2000.
- ULLAND, A. E., SHEARER, J. D., COULTER, C., CALDWELL, M. D. Altered Wound Arginine Metabolism by Corticosterone and Retinoic Acid. **Journal of Surgical Research**. v.70, p.84-88, 1997.
- VENA, G. A. & CASSANO, N. Immunosuppressive Therapy in Cutaneous Vasculitis. **Clinics in Dermatology**. v.17, p.633-640, 1999.
- WASSERMANN, R. J., POLO, M., SMITH, P., WANG, X., KO, F., ROBSON, M.C. Differential Production of Apoptosis-Modulating Proteins in Patients with Hypertrophic Burn Scar. **Journal of Surgical Research**. v.75, p.74-80, 1998.
- YANG, L., QIU, C., LUDLOW, A., FERGUNSON, M., BRUNNER, G. Active Transforming Growth Factor- β in Wound Repair. **American Journal of Pathology**. v.154, n.1, p.105-111, January 1999.

APÊNDICE

Intensidade do coágulo/edema de todos os animais nos diferentes dias de coleta

	GRUPO Nº 1					GRUPO Nº 2					GRUPO Nº 3					GRUPO Nº 4					GRUPO Nº 5				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
1º dia	4	2	2	2	2	3	3	4	4	4	4	3	4	3	3	4	3	3	4	4	2	2	3	3	3
2º dia	2	3	3	3	2	2	3	3	3	4	3	2	2	3	2	3	3	3	3	4	3	4	4	4	4
4º dia	2	2	3	3	3	3	4	3	4	4	3	3	4	3	4	4	3	4	4	4	2	3	3	3	2
6º dia	3	1	1	1	1	4	1	1	4	1	3	2	2	2	2	4	3	3	3	4	1	1	1	4	1
8º dia	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1 Ausente

2 Leve (1 – 300 micras)

3 Moderado (301 – 600 micras)

4 Intenso (>600)

Teste ANOVA: Um critério (1º dia pós-cirúrgico)

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	287.97e+03	71991.418
Coleta	20	125.79 e+04	62894.829
F=	1.1446	-----	-----
(p)=	0.3646	-----	-----

Tamanho do coágulo/edema (micras)

1 Controle	2 Hidro. tópica	3 Hidro + Neo	4 Prednisolona	5 Neomicina
244.8	452.8	1105.6	964.8	228.8
289.6	457.6	372.8	568	254.4
241.6	790.4	736	350.4	473.6
275.6	774.4	363.2	601.6	419.2
1006.4	646.4	384	675.2	560

Teste ANOVA: Um critério (2º dia pós-cirúrgico)

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	413.70	103.43e+03
Coleta	20	371.77	18588.262
F=	5.5641	-----	-----
(p)=	0.0038	-----	-----

Tamanho do coágulo/edema (micras)

1 Controle	2 Hidro. tópica	3 Hidro + Neo	4 Prednisolona	5 Neomicina
283.2	211.2	491.2	579.2	352
497.6	470.4	246.4	497.6	681.6
550.4	328	276.8	513.6	817.6
393.6	328	337.6	596.8	724.8
267.2	632	248	723.2	732.8

Teste ANOVA: Um critério (4º dia pós-cirúrgico)

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	391.19	97798.004
Coleta	20	353.59	17679.395
F=	5.5318	-----	-----
(p)=	0.0039	-----	-----

Tamanho do coágulo/edema (micras)

1 Controle	2 Hidro. tópica	3 Hidro + Neo	4 Prednisolona	5 Neomicina
222.4	342.4	515.2	633.6	220.8
228.2	612.8	580.8	443.2	526.4
328	339.2	636.8	673.6	520
352	788.8	462.2	617.6	412.8
356.8	638.4	713.6	782.8	265.6

Teste ANOVA: Um critério (6º dia pós-cirúrgico)

FONTES DE VARIACÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	4	116.36	290.89e+03
Coleta	20	201.02	100.51e+03
F=	2.8942	-----	-----
(p)=	0.0480	-----	-----

Tamanho do coágulo/edema (micras)

1 Controle	2 Hidro. tópica	3 Hidro + Neo	4 Prednisolona	5 Neomicina
307.2	1001.6	0	864	0
0	0	0	585.6	0
0	0	0	600	0
0	713.6	115.9	376	1043.2
0	0	74.5	708.8	0

Tamanho do coágulo/edema (micras). 8º dia pós-cirúrgico

1 Controle	2 Hidro. tópica	3 Hidro + Neo	4 Prednisolona	5 Neomicina
0	0	0	262.4	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
108.9	0	0	0	0
0	0	0	0	0