



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

AUGUSTO CÉZAR LACERDA BRASILEIRO

EFEITOS DA NIFEDIPINA TÓPICA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

RECIFE

2017

AUGUSTO CÉZAR LACERDA BRASILEIRO

EFEITOS DA NIFEDIPINA TÓPICA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

RECIFE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Brasileiro, Augusto César Lacerda
Efeitos da nifedipina tópica na cicatrização de feridas cutâneas/Recife:
O Autor, 2017.

142 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Inovação Terapêutica, Recife, 2017.**

Inclui referências

- 1. Cicatrização de feridas 2. Nifedipina 3. Suínos I. Oliveira,
Dinaldo Cavalcanti de (orient.) II. Título**

615.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 548

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

AUGUSTO CÉZAR LACERDA BRASILEIRO

EFEITOS DA NIFEDIPINA TÓPICA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 14/08/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira - UFPE

Orientador

Prof. Dr. Laécio Leitão Batista - UFPE

Examinador

Prof. Dr. José Ângelo Rizzo - UFPE

Examinador

Prof. Dr. Edgar Guimarães Victor - UFPE

Examinador

Prof^a. Dr^a. Gisélia Alves Pontes da Silva - UFPE

Examinadora

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas Clarice e Ana Cecília, por me mostrarem o amor em toda sua plenitude.

À minha esposa Mariana, por saber ser paciente e ter tanto carinho por mim.

Ao meu pai Dr Brasileiro, por ter me mostrado que encontramos felicidade ao ajudar outras pessoas. Meu pai, sua ternura me ajudou a vencer gigantes verdadeiros e imaginários.

À minha mãe querida Geny Coeli, por ser simplesmente amor.

Aos meus irmãos Ana Raquel e Júnior, por serem pessoas tão bonitas. Admiro muito vocês.

Ao meu cunhado (irmão) Henrique Lacerda de Vasconcelos, por sempre defender a verdade.

Aos meus sobrinhos Ana Maria, José Henrique e Arthur, por me encherem de esperança todas as vezes que os encontro.

Ao meu orientador Dr Dinaldo Cavalcanti de Oliveira, pela ajuda irrestrita, incentivo e amizade. Eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À professora Suelly Galdino (*in memorian*), por ter acreditado na nossa ideia.

Aos professores da Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), pela seriedade e competência.

À Faculdade de Medicina Nova Esperança (FAMENE), João Pessoa-PB, instituição de referência em ensino e pesquisa na área da saúde, por ter me dado condições para a realização desta pesquisa. Agradeço, em especial, à senhora Carolina Santiago, pelo apoio em todos os momentos.

À professora Gladys Fonseca, coordenadora do curso de medicina da FAMENE, pelo estímulo na capacitação continuada dos professores.

À minha querida amiga Dra. Ana Flávia Nóbrega de Paiva (patologista), pelas avaliações histológicas fundamentais deste estudo e por sempre me atender com tanta gentileza.

À farmacêutica (mestre) Pollianne Barbosa da Silva, pela competência e cuidado na formulação dos cremes utilizados na pesquisa.

Ao amigo Dr. Álvaro Jáder de Andrade Dantas (médico veterinário), pela ajuda na coleta dos dados e cuidados com os animais.

À professora Maria do Socorro Gadelha Nóbrega, pela responsabilidade com que coordena a comissão de ética da FAMENE.

Aos professores Jeine Emanuele Santos da Silva e Edbhergue Ventura Lola Costa, pela ajuda na análise fotográfica.

Ao Hospital Naval Marcílio Dias, por ter me acolhido e por estar em aperfeiçoamento contínuo, sendo um hospital de referência em ensino e pesquisa do nosso país.

Aos Drs. Antônio Barra Torres, Eduardo Chaib, Egídio Jóia, Fernando Giordano, Marisa Baltar, Paula Fabrini, Alexandre Coutinho, Eimar Deli de Araújo, Jackson Caiafa, Eduardo Werneck, Alberto Beer e Luís Carlos Moreira, pelos ensinamentos em cirurgia vascular.

À Professora Doutora Gilka Soares Sampaio Souto, pelo incentivo na pesquisa sobre cicatrização de feridas.

Aos meus queridos primos Aldo Lacerda Brasileiro e José Lacerda Brasileiro, por me mostrarem a importância da cirurgia vascular para a sociedade. Vocês foram minha referência desde quando eu era ainda muito criança.

Ao Professor Doutor Laécio Leitão Batista, do Serviço de Angiorradiologia e Cirurgia Endovascular do Hospital das Clínicas da UFPE, pelos conhecimentos fundamentais transmitidos para minha formação profissional.

Ao amigo e Professor Doutor Carlos Roberto Carvalho Leite, pelos conselhos nesta tese e em outros desafios da minha profissão.

Ao Professor Doutor Jorge René Garcia Arévalo, pela simpatia, apoio e por sempre estar pronto para me ajudar.

Aos colegas da Nova Diagnóstico Alessandra Vanessa Albuquerque, Melissa Medeiros Leite Ferrantti, Sílvio Giovanni Rique Pereira Gomes, Eduardo Sérgio Borges da Fonseca, Eduardo Azevedo Pontes de Carvalho, Norberto de Castro Nogueira Neto e Marcelo Augusto Ferrer Nogueira, pelo incentivo à pesquisa e por buscarem fazer o melhor todos os dias.

Aos meus colegas de especialidade Carlos Maranhão, Antônio Vasconcelos, Jorge Albuquerque e Lauro Brandão, pela amizade e entusiasmo com a cirurgia vascular.

Ao secretário do PPGIT Paulo Germano Brito, pelas orientações e simpatia durante esses quatro anos de estudo.

Às bibliotecárias Lilianne Soares da Silva Moraes e Janaína Nascimento de Araújo, pela revisão da escrita de acordo com as normas técnicas.

À secretária da Coordenação de Medicina da FAMENE Johane Rodrigues, pela atenção e carinho na digitação dos dados.

Aos residentes Angélica Fernandes de Lacerda, Julianna Maria Silva de Amorim, Gabriella Sancho Leite, Josann Frederico Ribeiro, Jéssica Montenegro Pontes e Ernesto de Souza Diniz Neto, e aos acadêmicos de Medicina, Camilla de Almeida Franca Falcão, João Kairo Soares de Lima Rocha, Laís Lima Dantas, Marina Dantas Henrique e Rafaela Silva Luna Temóteo, pela ajuda fundamental na coleta dos dados.

Aos amigos e funcionários da FAMENE Ana Maria Cavalcante da Silva, Márcia Maria Araújo de Barros, Rafaela Carla Carneiros de Araújo e Francinaldo dos Santos, pela ajuda no cuidado com os animais.

Aos animais inocentes que participaram desta pesquisa. Espero que o sofrimento e medo que passaram possam ajudar a diminuir a angústia de outros seres.

É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem são felizes nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece nem vitória nem derrota.

Theodore Roosevelt

Até aqui, caminhei acreditando que encontraria a verdade através do conhecimento. Entretanto, percebo agora que a verdade, a verdade por completa, só é possível de ser vista quando se tem coragem o suficiente para se render ao amor.

Augusto Brasileiro

RESUMO

Os ferimentos na pele têm alta prevalência em todas as faixas etárias, representando, em algumas situações, um desafio para os profissionais de saúde, com elevado custo social, econômico e emocional. A nifedipina (NFD) inibe os canais de cálcio ao nível endotelial, promovendo uma vasodilatação que pode beneficiar a cicatrização de feridas cutâneas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da NFD tópica na cicatrização de feridas, observando as respostas histológica e macroscópica. Utilizamos quatro porcos, sendo realizados oito ferimentos na região dorsal de cada animal. Para os três primeiros animais, aplicamos as concentrações do creme a 1%, 10% e 20% para os animais 1, 2 e 3 respectivamente, sendo que, em quatro ferimentos, aplicamos a NFD e, nos outros quatro ferimentos, apenas soro fisiológico. No porco 4, foi utilizado apenas soro fisiológico. Analisamos a presença de polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, linfócitos, proliferação vascular, fibroblastos, colágeno e queratinócitos em seis momentos diferentes (dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28), além do registro fotográfico para acompanhamento macroscópico. Os ferimentos tratados com NFD em comparação com os controles de cada animal individualmente nos porcos 1, 2 e 3, mostraram que há uma resposta acentuada progressiva e estatisticamente significativa em relação aos PMNs, de acordo com a concentração [1% (OR 3,5/ $p=0,044$), 10% (OR 11,8/ $p<0,001$) e 20% (OR 22,1/ $p<0,001$)]. Essa resposta progressiva não foi percebida em relação aos outros parâmetros, entretanto, no animal 3, houve resposta estatisticamente significativa também em relação aos linfócitos (OR 11,1/ $p=0,049$), proliferação vascular (OR 4,84/ $p=0,019$), formação do colágeno (OR 0,02/ $p=0,005$) e queratinócitos (OR 0,05/ $p=0,023$). Na comparação dos doze ferimentos tratados com NFD (independentemente da concentração) em relação aos doze ferimentos tratados com placebo nos três primeiros animais, houve resultado estatisticamente significativo a favor dos ferimentos tratados com medicamento no aumento dos PMNs (OR 8,48/ $p<0,001$), no aumento da proliferação vascular (OR 2,24/ $p=0,019$) e na diminuição nos níveis de colágeno (OR 0,06/ $p=0,006$). Para avaliar se havia absorção sistêmica do medicamento, comparamos os controles dos porcos 1, 2 e 3 com os controles do porco 4. Encontramos que, nos ferimentos controles dos três primeiros animais, mesmo sem exposição direta à NFD, houve aumento estatisticamente significativo de PMNs em todas as concentrações, além de maior resposta com relação aos linfócitos no porco 1 ($p=0,029$) e mais proliferação vascular no porco 2 ($p=0,016$). Não houve diferença entre os ferimentos tratados com os controles, em relação ao tempo final de cicatrização. A NFD tópica apresenta aumento da resposta em relação aos PMNs em todas as concentrações, sendo observado ainda, na concentração de 20%, aumento dos linfócitos e da proliferação vascular, e diminuição da síntese de colágeno e dos queratinócitos. A NFD tópica, quando avaliada independente da concentração, teve efeito nas três fases do processo de cicatrização, com aumento dos PMNs, proliferação vascular e diminuição do colágeno. Há absorção da nifedipina tópica pelos ferimentos tratados, provocando aumento principalmente de PMNs em locais não tratados diretamente com o medicamento.

Palavras-chave: Nifedipina Tópica. Cicatrização. Porco.

ABSTRACT

Skin injuries have a high prevalence in all age groups, representing, in some situations, a challenge for health professionals, with high social, economic and emotional costs. Nifedipine (NFD) inhibits endothelial calcium channels, promoting vasodilation that may benefit healing of cutaneous wounds. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of topical nifedipine on wound healing, observing histological and macroscopic responses. We used four pigs, and eight injuries were performed in the dorsal region of each animal. For the first three animals, we applied 1%, 10% and 20% cream concentrations for animals 1, 2 and 3 respectively, being that in four wounds we applied NFD and in the other four wounds only saline 0.9%. In pig 4, only 0.9% saline solution was used. We analyzed the presence of polymorphonuclear cells (PMNs), macrophages, lymphocytes, vascular proliferation, fibroblasts, collagen and keratinocytes at six different moments (days 1, 3, 7, 14, 21 and 28), besides the photographic record for macroscopic monitoring. Wounds treated with NFD compared to the controls of each individual animal in pigs 1, 2 and 3 showed that there is a pronounced progressive and statistically significant response to PMNs, according to the concentration [1% (OR 3.5 / $p=0.044$), 10% (OR 11.8/ $p<0.001$) and 20% (OR 22.1/ $p<0.001$)]. This progressive response was not perceived in relation to the other parameters; however, in the animal 3, there was a statistically significant response in relation to lymphocytes (OR 11.1/ $p=0.049$), vascular proliferation (OR 4.84/ $p=0.019$), formation of collagen (OR 0.02/ $p=0.005$) and keratinocytes (OR 0.05/ $p=0.023$). In comparison of the twelve NFD-treated wounds (regardless of concentration) in relation to twelve placebo-treated wounds in the first three animals, there was a statistically significant result in favor of drug-treated wounds in increasing PMNs (OR 8.48/ $p<0.001$), increased vascular proliferation (OR 2.24/ $p=0.019$) and decreased collagen levels (OR 0.06/ $p=0.006$). To assess whether there was systemic absorption of the drug, we compared controls of pigs 1, 2 and 3 with controls of pig 4. We found that, in the control wounds of the first three animals, even without direct exposure to NFD, there was a statistically significant increase in PMNs at all concentrations. In addition to a greater response to lymphocytes in pig 1 ($P=0.029$) and more vascular proliferation in pig 2 ($P=0.016$) were observed in all pigs. There was no difference between the wounds treated with the controls, in relation to the final healing time. Topical NFD shows an increase in the response to PMNs at all concentrations. With a concentration 20%, have been observed increase in lymphocytes and vascular proliferation, and a decrease in the synthesis of collagen and keratinocytes. The topical NFD, when evaluated independently of the concentration, had an effect on the three phases of the healing process, with increase of PMNs, vascular proliferation and collagen decrease. There is absorption of topical nifedipine by the treated wounds, causing increase mainly of PMNs in places not treated directly with the medicine.

Keywords: Nifedipine Topical. Healing. Pig.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
NFD	Nifedipina
SF	Soro Fisiológico
PMNs	Polimorfonucleares
ACC	Antagonista do Canal de Cálcio
EUA	Estados Unidos da América
OR	Odds Ratio
RPM	Rotações Por Minuto
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
QSP	Quantidade Suficiente Para
VS	<i>Versus</i>
m/v	massa e volume

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Úlcera de origem venosa - localização ao nível do maléolo medial, com fundo vermelho, acompanhada de hiperemia e fundo vermelho	28
Figura 2. Coto de amputação em um paciente diabético, portador de neuropatia ..	29
Figura 3. Úlcera de origem arterial - localização ao nível do dorso do pé, com fundo pálido, pulsos ausentes e muito dolorosa.....	29
Figura 4. Lesão traumática grave com perda óssea e de partes moles em paciente jovem vítima de acidente com moto	30
Figura 5. Cicatriz quelóide provocando grande deformidade em região auricular, com repercussão estética importante	36
Figura 6. Estrutura molecular da nifedipina	39
Figura 7. Úlcera hipertensiva - localização em face lateral da perna, com fundo vermelho, pulsos preservados e muito dolorosa	40
Figura 8. Centro de técnica cirúrgica experimental da Faculdade de Medicina Nova Esperança, onde foram realizados os ferimentos nos animais.....	43
Figura 9. Local de acondicionamento dos animais (baia)	44
Figura 10. Material para anestesia	45
Figura 11. Marcação da área a ser operada.....	46
Figura 12. Realização dos ferimentos	47
Figura 13. Ferimentos	47
Figura 14. Aplicação alternada da nifedipina	48
Figura 15. Distribuição das lesões e locais onde foi aplicada a nifedipina	49
Figura 16. Fotografias das feridas utilizando quadrados sobrepostos (A) e régua centimetrada (B)	53
Figura 17. Infiltrado acentuado de PMNs em meio a tecido fibroconectivo frouxo, em ferimento tratado com NFD	57
Figura 18. Ferimentos sem NFD: A - resposta moderada de PMNs e B - resposta discreta de PMNs.....	57
Figura 19. Presença acentuada de linfócitos em meio a tecido fibroconectivo frouxo, em ferimento tratado com NFD	60

- Figura 20.** Ferimentos sem NFD: A - resposta moderada de linfócitos e B - resposta discreta de linfócitos60
- Figura 21.** Ferimento tratado com NFD, mostrando resposta acentuada de capilares neoformados em meio à proliferação fibroblástica e infiltrado inflamatório misto61
- Figura 22.** Ferimentos sem NFD: A - resposta moderada de proliferação vascular e B - resposta discreta de proliferação vascular61
- Figura 23.** Ferimento tratado apenas com placebo, mostrando depósito acentuado de fibras colágenas, com paralelização das mesmas, em meio a um discreto infiltrado inflamatório misto.....62
- Figura 24.** Ferimentos tratados com NFD: A - resposta moderada de colágeno e B - resposta discreta de colágeno62
- Figura 25.** Presença acentuada de queratinócitos, com espessamento da epiderme em ferimento tratado apenas com placebo. A derme subjacente exhibe fibras colágenas paralelizadas.....63
- Figura 26.** Ferimentos tratados com NFD: A - resposta moderada de queratinócitos e B - resposta discreta de queratinócitos63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição quali-quantitativa do creme de NFD	42
Tabela 2. Critérios utilizados e resposta ocorrida no processo de cicatrização	52
Tabela 3. Proporção do nível acentuado de células PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular no porco 1	56
Tabela 4. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos no porco 1	56
Tabela 5. Proporção do nível acentuado de células PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular no porco 2	58
Tabela 6. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos no porco 2.....	58
Tabela 7. Proporção do nível acentuado de células PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular no porco 3	59
Tabela 8. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos no porco 3.....	59
Tabela 9. Proporção do nível acentuado de células PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular em todas as feridas submetidas à NFD <i>versus</i> as feridas tratadas com placebo nos animais 1, 2 e 3.	65
Tabela 10. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos em todas as feridas submetidas à nifedipina <i>versus</i> as feridas tratadas com placebo nos animais 1, 2 e 3.....	67
Tabela 11. Proporção do nível de células PMNs entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.....	68
Tabela 12. Proporção do nível de macrófagos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados	68
Tabela 13. Proporção do nível de linfócitos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados	69
Tabela 14. Proporção do nível de proliferação vascular entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados	69
Tabela 15. Proporção do nível de fibroblastos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados	70
Tabela 16. Proporção do nível de colágeno entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados	70

Tabela 17. Proporção do nível de queratinócitos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.....71

Tabela 18. Coeficientes do modelo de regressão linear de efeitos mistos na análise da associação do comportamento da medida da área da ferida ao longo do tempo segundo grupos controle e NFD72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Ocorrência de células em processo de cicatrização normal.....	33
Gráfico 2. Percentual de resposta acentuada nos níveis de PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular nos seis momentos analisados dos animais 1, 2 e 3	64
Gráfico 3. Percentual de resposta acentuada nos níveis de fibroblastos, colágeno e queracitócitos nos seis momentos analisados dos animais 1, 2 e 3	66
Gráfico 4. Trajetórias das áreas das feridas segundo os grupos controle e NFD ...	72
Gráfico 5. Área média das feridas segundo os grupos controle e NFD	73

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
™	Trademark
pH	Potencial Hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA	22
2. OBJETIVOS	24
2.1 GERAL	24
2.2 ESPECÍFICOS	24
3. REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 FERIDAS CUTÂNEAS	25
3.1.1 Grau de Contaminação	25
3.1.2 Forma de Cicatrização	26
3.1.3 Profundidade	26
3.1.4 Tempo para obter uma cicatrização adequada	26
3.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO	31
3.2.1 Inflamação	31
3.2.2 Proliferação	34
3.2.3 Maturação	35
3.3 PELE SUÍNA	37
3.4 NIFEDIPINA	38
4. METODOLOGIA	41
4.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DA NIFEDIPINA	41
4.1.1 Matérias-primas	41
4.1.2 Determinação do pH	42
4.2 ANIMAIS	42
4.3 ANESTESIA	44
4.4 CIRURGIA	45
4.5 FLUXOGRAMA	48
4.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	50
4.6.1 Coleta do material e fixação	50
4.6.2 Processamento histológico	50
4.6.3 Inclusão	50
4.6.4 Microtomia	51
4.6.5 Coloração	51

4.6.6 Parâmetros histológicos	52
4.7 AVALIAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	53
4.8 ANÁLISE DOS DADOS	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1 COMPARAÇÃO DOS FERIMENTOS TRATADOS COM NIFEDIPINA E OS FERIMENTOS TRATADOS COM PLACEBO, EM CADA UM DOS ANIMAIS INDIVIDUALMENTE	55
5.2 COMPARAÇÃO DOS FERIMENTOS TRATADOS COM NIFEDIPINA, INDEPENDENTE DA DOSE, E OS FERIMENTOS TRATADOS COM PLACEBO NOS ANIMAIS 1, 2 e 3.....	63
5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS CONTROLES DOS ANIMAIS 1, 2 e 3 COM OS CONTROLES DO ANIMAL 4	67
5.4 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E NIFEDIPINA QUANTO À ÁREA DA FERIDA	71
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICES.....	97
ANEXOS	138

1. INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO DO PROBLEMA

A pele humana é um órgão extremamente sofisticado e evoluído que recobre todo o corpo, sendo formada por três camadas (epiderme, derme e hipoderme) e apresenta várias funções: ajuda na regulação da temperatura corporal, evita a perda de líquidos, protege das agressões externas e, devido às terminações nervosas sensitivas, funciona como um dos órgãos do sentido (tato) (WANG et al., 2000; JUNKER, CATERSON e ERIKSSON, 2013; AGALE, 2013). Devido a sua importância para sobrevivência, no instante em que é violada, inicia-se imediatamente um complexo processo de cicatrização a fim de restaurar sua integridade (SINGER; CLARK, 1999; MARTIN; LEIBOVICH, 2005).

Os ferimentos na pele podem acontecer por causas externas (trauma, cirurgias) ou devido a doenças do próprio paciente (insuficiência venosa crônica, aterosclerose, diabetes, vasculites, neoplasias, distúrbios metabólicos e hematológicos, principalmente) (HONSIK et al., 2007; SEN et al., 2009; PHILIPS et al., 1994). Representam, em algumas situações, um desafio para os profissionais de saúde, com elevado custo social, econômico e emocional (CHAMANGA, 2014; NELZÉN et al., 1991).

As feridas são classificadas em quatro aspectos principais: tipo de contaminação (limpas, potencialmente contaminadas, contaminadas e infectadas), forma de cicatrização (primeira, segunda ou terceira intenção), profundidade (da epiderme até os planos muscular e ósseo) e de acordo com o tempo que levam para obter uma cicatrização adequada (agudas e crônicas) (NICKS et al., 2010; FAVAS, 2012; LEONG; PLILLIPS, 2015). Considerando que esses distúrbios são cada vez mais prevalentes, tanto as lesões provocadas por causas externas como as doenças crônicas, é de se esperar um aumento considerável dos recursos utilizados para o tratamento nos próximos anos.

O processo de cicatrização acontece a partir do momento em que há o dano e envolve várias fases que vão desde a hemostasia até a regeneração do tecido. Em uma dessas fases, acontece o fenômeno da angiogênese, tendo como mecanismo fundamental a vasodilatação. Essa etapa promove a chegada de mais células reparadoras e oxigênio ao local da lesão e pode ser influenciada por fatores

intrínsecos (doenças associadas) e extrínsecos como o uso de medicações (LEONG; PLILLIPS, 2015; AKHAVANI et al., 2008; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A nifedipina (NFD) é um medicamento utilizado há mais de três décadas no tratamento da doença hipertensiva, apresentando como efeito a dilatação arteriolar, a partir do bloqueio dos canais de cálcio nas células endoteliais (OIGMAN; FRITSCH, 1998; BOMBIG; PÓVOA, 2009; JARDIM, P.; JARDIM, T.; SOUZA, 2013). Alguns autores descrevem que a NFD pode ter algum benefício cicatrizante nos pacientes portadores de lesões crônicas específicas relacionadas ao vasoespasmio arteriolar, como as úlceras hipertensivas e as úlceras da esclerodermia, devido à melhor perfusão tecidual (HAFNER et al., 2010; FREIRE; FERNANDES; PINEIRO-MACEIRA, 2006; WOO et al., 1984; GASSER, 1991). Entretanto, a maioria dos trabalhos avalia a atuação da NFD na forma sistêmica com ingestão oral, sendo a maior parte como relatos de casos, ou ainda, observando o resultado em animais menores (ratos), com pouca aplicabilidade para uso humano, tendo em vista as grandes diferenças entre os tipos de pele (PATIL; AGNIHOTRI; SINGH, 2009; KIM; MUSTOE; CLARK, 2015).

A pele suína, entretanto, é considerada o melhor modelo experimental para comparação com a pele humana, devido às grandes semelhanças do ponto de vista histológico e funcional. Ambas apresentam, de forma similar, espessura, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, tecido celular subcutâneo e densidade de folículos capilares. Possuem tempo de regeneração da epiderme em torno de trinta dias, assim como a estrutura bioquímica semelhante do colágeno. Além disso, o processo de cicatrização entre os ferimentos nas peles suína e humana acontece através de reepitalização, diferente dos outros mamíferos menores onde ocorre por contração (HENGGE; WALKER; VOGEL, 1996; SULLIVAN et al., 2001; TFALI et al., 2012; VOLK; BOHLING, 2013; HOLLANDER et al., 2003).

O intuito do presente estudo é avaliar a possibilidade de aceleração do processo de cicatrização pela NFD na forma tópica, em feridas cutâneas de suínos, visando a uma possível utilização padronizada em humanos no futuro.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar o efeito da nifedipina tópica no processo de cicatrização de feridas cutâneas em suínos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o aparecimento de células inflamatórias (polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos).
- Verificar a ocorrência de células que constituem a fase proliferativa da cicatrização (neovascularização, fibroblastos e queratinócitos).
- Observar a formação do colágeno.
- Identificar a concentração da nifedipina que provoque maior resposta nas três fases do processo de cicatrização.
- Analisar a resposta histológica nos controles que foram expostos à nifedipina (animais 1, 2 e 3).
- Comparar o tempo de cicatrização completa das feridas tratadas com nifedipina tópica e com o placebo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FERIDAS CUTÂNEAS

Poucas doenças atingem tantas pessoas, independentemente da idade, país, crença religiosa, classe econômica ou qualquer outra característica pessoal, como as feridas cutâneas (AGALE, 2013). Em todas as fases da vida, o ser humano está sujeito a um acidente ou trauma que provoque desde um pequeno corte até as cirurgias mais complexas (HONSIK et al., 2007; SEN et al., 2009). A perda da integridade da pele, além de poder provocar um sangramento importante, pode também levar a quadros de infecção, sequelas motoras e estéticas ou mesmo morte (PHILIPS et al., 1994; CHAMANGA, 2014).

Textos antigos já mostravam a preocupação com esse assunto e indicavam tratamentos com substâncias como plantas, mel, argila, bile, clara de ovo, carne. Não mudou muito durante mais de dois mil anos, até que, a partir do século 19, alguns cirurgiões passaram a observar que a limpeza e o desbridamento melhoravam a evolução das feridas (FORREST, 1982; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006). Porém, apenas na última metade de século (principalmente nos últimos 30 anos) houve um maior entendimento do processo de cicatrização, assim como um maior investimento por parte das indústrias no desenvolvimento de substâncias e de materiais específicos que pudessem interferir na cicatrização (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

As feridas cutâneas podem ser causadas por traumas (mecânico, químico, físico, úlceras de pressão), cirurgias (incisão, excisão, punção) e por doenças localizadas ou sistêmicas (insuficiência venosa crônica, doença arterial periférica, pé-diabético, vasculites, neoplasia, distúrbios metabólicos e hematológicos, principalmente), sendo classificadas em quatro aspectos principais (FAVAS, 2012; NELZEN et al., 1991; NICKS et al., 2010; LEONG; PLILLIPS, 2015):

3.1.1 Grau de contaminação

- Limpas: são lesões que geralmente ocorrem em ambiente cirúrgico, mantendo toda técnica de assepsia e antisepsia. Não há abertura de víscera oca (trato respiratório, digestivo, gênito-urinário) e não possuem sinais de infecção.

- Potencialmente contaminadas: lesões que acontecem depois de acidentes com menos de 6 horas de evolução ou nos casos de cirurgias programadas e sem intercorrências que envolvam abertura de vísceras ocas (trato respiratório, digestivo, gênito-urinário), exceto cólon/reto.

- Contaminadas: Lesões com mais de 6 horas de evolução sem atendimento ou quando houve quebra grosseira da técnica cirúrgica, sem sinais inflamatórios. Cirurgias que envolvem cólon, reto e ânus também são consideradas contaminadas.

- Infectadas: Quando ocorrem sinais inflamatórios (dor, rubor, calor e edema) associados à presença de secreção purulenta e odor fétido.

3.1.2 Forma de cicatrização

- Primeira intenção: Quando a ferida tem as bordas aproximadas diretamente por um profissional, como por exemplo, nos casos de sutura, enxertos ou retalhos.

- Segunda intenção: Nesse caso, a ferida fica aberta, sendo cicatrizada por contração natural das bordas. Geralmente se opta por esse processo, quando a ferida está contaminada/infectada ou quando houve muita perda tecidual.

- Terceira intenção: Inicialmente a ferida fica aberta para tratar principalmente infecção, depois tem as bordas aproximadas diretamente por sutura, enxertos ou retalhos.

3.1.3 Profundidade

- I: Atinge apenas a epiderme.

- II: Atinge epiderme e derme.

- III: Atinge todas as camadas da pele (epiderme, derme e tecido celular subcutâneo).

- IV: Compromete os tecidos mais profundos (fáscia muscular, músculos, tendões e ossos).

3.1.4 Tempo para obter uma cicatrização adequada

- Crônica: Mais de 6 semanas.

- Aguda: Menos de 6 semanas.

As feridas crônicas são mais frequentes na população idosa, devido ao surgimento de comorbidades, sobretudo as doenças vasculares periféricas. Essas lesões atingem geralmente as camadas mais superficiais da pele (epiderme e derme) e comprometem mais os membros inferiores (KAHLE; HERMANNNS; GALLENKEMPER, 2011). Atingem 3% da população acima dos 60 anos, podendo chegar até 5% nos pacientes com mais de 80 anos (AGALE, 2013; MEKKES; LOOTS; VAN DER WAL, 2003). Provocam diminuição da qualidade de vida (dor, alteração do ciclo sono-vigília, constrangimento social), assim como também afastamento do trabalho, tendo importante impacto econômico (AGALE, 2013; MEKKES; LOOTS; VAN DER WAL, 2003; SCHUBERT, 2003). As principais causas dos ferimentos crônicos de pele, nos membros inferiores, são relacionadas às doenças do aparelho circulatório como a insuficiência venosa crônica, o pé diabético, arteriopatas obstrutivas e as úlceras de pressão, sendo estas últimas mais comuns nos pacientes que permanecem acamados por longos períodos (SOARES, 2012; MESQUITA, 2013).

As úlceras de origem venosa (Figura 1) são as mais frequentes, atingindo de 1-3% da população adulta, o que corresponde a 70% das lesões diagnosticadas em membros inferiores (AGALE, 2013; NELZÉN et al., 1991; AGUIAR et al., 2005). Ocorrem devido ao refluxo ou obstrução do sistema venoso (profundo, superficial ou perfurantes), o que leva ao aumento da pressão ao nível dos capilares, tendo como consequência extravasamento de fibrina e componentes do plasma no espaço intersticial. Além de ter como resposta um intenso processo inflamatório, a presença de fibrina fora dos capilares ocasiona diminuição da síntese de colágeno e inibe fatores de crescimento celular (FRANÇA; TAVARES, 2003; DEMIDOVA-RICE et al., 2012; MEKKES; LOOTS; VAN DER WAL, 2003). Clinicamente, a doença pode se manifestar com edema, hiperpigmentação (consequência do depósito de hemossiderina/hemoferritina na pele), lipodermatoesclerose (fibrose do tecido celular subcutâneo e derme devido ao contínuo processo inflamatório) e, nos casos mais graves, a ocorrência de úlceras que se caracterizam por apresentarem coloração vermelha e localização predominante ao nível do maléolo medial (AGUIAR et al., 2005; AGUS et al., 2005).



Figura 1. Úlcera de origem venosa - localização ao nível do maléolo medial, com fundo vermelho, acompanhada de hiperpigmentação e dermatoesclerose.

Fonte: Foto própria do autor.

Estima-se que 15% dos pacientes portadores de diabetes acabam desenvolvendo úlcera na região plantar em algum momento da vida, sendo esta condição responsável por cerca de 50% das amputações de membros inferiores (REIBER, 2002). Estudos mostram que ocorre risco aumentado de se desenvolver úlceras de difícil cicatrização, devido ao espessamento da membrana basal da microcirculação com consequente má oxigenação dos tecidos, levando ao surgimento da neuropatia sensitiva e motora (Figura 2) nos membros inferiores (ADLER et al., 1999; APFEL, 1999). As lesões neurotróficas, portanto, aumentam não só a chance de o paciente ser submetido a um desbridamento cirúrgico ou amputação, como também aumentam sobremaneira os custos das internações hospitalares (HOLZER et al., 1998).

No Brasil, o número de pacientes diabéticos praticamente dobrou em 30 anos, passando de 7,6% da população em 1980 para 15% em 2010. Dessa forma, são quase 12 milhões de brasileiros portadores dessa doença crônica, dos quais uma parte significativa já apresenta ou desenvolverá lesões tróficas, com as mais diversas sequelas, sobrecarregando o sistema de saúde (MILECH et al., 2016).



Figura 2. Coto de amputação em um paciente diabético, portador de neuropatia.

Fonte: Foto própria do autor.

As doenças obstrutivas arteriais representadas principalmente pela aterosclerose e vasculites também são responsáveis pelo surgimento de úlceras nos membros inferiores (Figura 3) e superiores. Trata-se de uma situação mais grave, tendo em vista que, muitas vezes, é necessária a amputação do membro ou uma cirurgia de revascularização, devido à necrose ou mesmo pela dor (JOHNSTON, 2007; OLIN, 2000).



Figura 3. Úlcera de origem arterial - localização ao nível do dorso do pé, com fundo pálido, pulsos ausentes e muito dolorosa.

Fonte: Foto própria do autor.

As feridas agudas acontecem mais em indivíduos jovens vítimas de traumas (Figura 4) ou em pacientes submetidos a algum procedimento cirúrgico. Geram milhões de lesões anualmente no Brasil, principalmente pelo alto número de acidentes (inclusive de trabalho) e agressões interpessoais. A violência provoca danos físicos, emocionais e econômicos difíceis de serem calculados, sobretudo pela grande subnotificação. Estima-se um gasto direto de 3,3% do PIB brasileiro, chegando até 10,5% de gasto indireto (reabilitação, diminuição da força produtiva e com previdência) (REICHENHEIM et al., 2011; BRASIL, 2005). Uma parte desses pacientes ocupam leitos dos hospitais para tratar lesões de pele que podem também evoluir para uma situação crônica. Anualmente, apenas nos Estados Unidos, são realizados mais de 50 milhões de procedimentos cirúrgicos, além de 11 milhões de ferimentos agudos, com gastos na ordem de bilhões de dólares (FRANZ; STEED; ROBSON, 2007; SINGER; DAGUM, 2008; HONSIK et al., 2007).



Figura 4. Lesão traumática grave com perda óssea e de partes moles em paciente jovem vítima de acidente com moto.

Fonte: Foto própria do autor.

3.2 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

No momento em que ocorre uma agressão, de imediato acontece uma reação complexa do organismo para tentar preservar ou restabelecer a morfologia e fisiologia dos tecidos, independente da região do corpo ou da causa (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999). A cicatrização, entretanto, é influenciada por diversos fatores, como idade, presença de corpo estranho, tecido desvitalizado, infecção, hipóxia tecidual, anemia, uso de drogas imunossupressores (LEONG; PLILLIPS, 2015; HAMMAR, 1993). Entender esse processo é de fundamental importância para os profissionais da saúde, tendo em vista que as condutas a serem tomadas, inclusive com o uso de medicamentos, dependem da correta interpretação dos aspectos clínicos da ferida (MANDELBAUM, S.; DI SANTIS; MANDELBAUM, M., 2003).

Para melhor compreensão, o processo de cicatrização pode ser dividido em três fases (inflamação, proliferação e maturação), apesar de acontecerem simultaneamente e se relacionarem entre si (LEONG; PLILLIPS, 2015).

3.2.1 Inflamação

O trauma provocado em um tecido lesa os vasos sanguíneos da região, com consequente exposição do endotélio. Este, por sua vez, libera uma proteína importante na regulação da cascata da coagulação (trombomodulina) que atua na vasoconstrição reflexa (diminui a perda hemorrágica e aproxima os elementos ao sítio de lesão). Imediatamente abaixo do endotélio, existe um tecido conjuntivo rico em colágeno tipos I e III e que, quando exposto, inicia o fenômeno da adesão plaquetária (MARDER et al., 2013; WERNER; GROSE, 2003).

Essa resposta inicial, além de ter papel fundamental no controle do sangramento, estimula as plaquetas a liberarem diversos mediadores e fatores quimiotáticos (fator de crescimento derivado da plaqueta, fator de crescimento transformante beta, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento alfa e fator de crescimento de células endoteliais) que atraem para o leito da lesão outras células fundamentais no processo de cicatrização (Gráfico 1), como neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos e fibroblastos (LEONG; PLILLIPS, 2015; AGHA et al., 2011; SMITH, 2000).

Os polimorfonucleares (PMNs) são neutrófilos que se caracterizam por apresentar o núcleo de forma multilobulada. Encontram-se circulando na corrente sanguínea, chegando rapidamente aos locais pela quimiotaxia dos mediadores inflamatórios. São, portanto, as primeiras células recrutadas à ferida onde inicialmente aderem à superfície endotelial e, em seguida, atravessam a parede do vaso no espaço entre as células endoteliais. Esse movimento é facilitado através da vasodilatação provocada pela histamina e heparina liberadas pelos mastócitos (ROSS; PAWLINA, 2016). A principal função dessas células é o combate a agentes infecciosos e corpos estranhos, exercida, sobretudo, pela capacidade de realizar fagocitose (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; BRINKMANN et al., 2004).

Semelhante aos PMNs, os monócitos são células de defesa com capacidade fagocítica que estão presentes no sangue periférico e logo são atraídas para o sítio inflamatório. Atuam ainda liberando mediadores inflamatórios como a interleucina 1 e o fator de necrose tumoral que contribuem para o processo inflamatório, mas sua principal função é se converter em macrófago nos tecidos. Dessa forma, após 48-72 horas, os macrófagos passam a ser as células de defesa predominante (NEVES, 2015; ROSS; PAWLINA, 2016; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Esse novo agente se caracteriza por apresentar o núcleo em forma de rim ou irregular, com grande citoplasma rico em lisossomos o que ajuda na grande capacidade de realizar fagocitose (à medida que aumenta o número de macrófagos na ferida, ocorre diminuição dos PMNs). Os macrófagos passam por transformações morfológicas e funcionais e, então, assumem o papel de coordenar o restante da fase inflamatória. A intensa liberação de mediadores por essas células (fator de crescimento derivado da plaqueta, fator de crescimento transformante beta, fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento alfa, fator de crescimento de células endoteliais, fator de crescimento de fibroblastos, fator de crescimento insulina-símile, interleucinas, fator de necrose tumoral, interferon gama e óxido nítrico) mostra sua importância na reparação dos tecidos (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; ROSS; PAWLINA, 2016).

Os linfócitos, além de atuarem na resposta imunológica aos antígenos, participam estimulando os fibroblastos (células essenciais na fase proliferativa), através de interleucina II e do fator ativador de fibroblastos. Passam a ser mais

presentes na ferida por volta do quinto e sexto dias (LEONG; PLILLIPS, 2015; BOYCE et al., 2000). Apresentam-se como células de núcleo esférico com alguma irregularidade e intensamente corado, além de citoplasma fino com pouca ou nenhuma organela visível. Existem três tipos de linfócitos (T, B e *natural Killer*), entretanto não é possível diferenciá-los em esfregaços sanguíneos ou em cortes histológicos, sendo necessária a utilização de técnicas imunohistoquímicas para esse fim (ROSS; PAWLINA, 2016).

O dano tecidual também faz com que os mastócitos liberem histamina e serotonina, provocando vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular. Essas alterações têm consequências inflamatórias locais (calor, rubor, edema e dor) e, dependendo da intensidade da resposta, também podem provocar repercussão sistêmica (febre, astenia) (LEONG; PLILLIPS, 2015; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

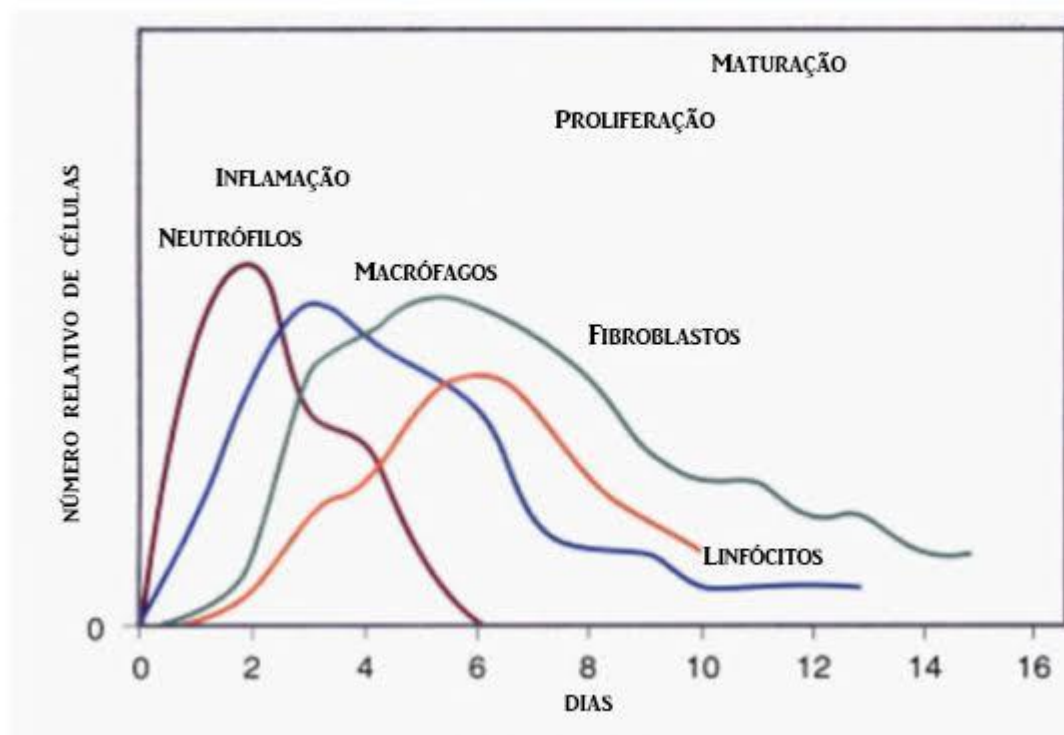


Gráfico 1. Ocorrência de células em processo de cicatrização normal.

Fonte: Adaptação de Leong e Plillips (2015) e Tazima, Vicente e Moriya (2008).

3.2.2 Proliferação

A fase de proliferação inicia-se em torno do terceiro dia e vai até duas ou três semanas após o trauma. Representa o momento em que a ferida prepara o leito para ser reparado, sendo possível identificar três etapas distintas: angiogênese, fibroplasia e epitelização (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A angiogênese é a formação de novos vasos, onde células endoteliais migram para o local a partir dos vasos pré-existentes, estimuladas por fatores ativadores liberados por macrófagos, plaquetas, fibroblastos e queratinócitos (fator de crescimento de fibroblastos – FCF, fator de permeabilidade vascular - FPV e fator de crescimento celular endotelial vascular – FCCEV). As células endoteliais ativadas liberam enzimas que degradam a membrana basal capilar e facilitam a migração dessas células para o tecido circundante (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999). A baixa na tensão de oxigênio no leito da ferida, tendo como consequência a formação de óxido nítrico e vasodilatação nos capilares remanescentes, também parece favorecer o surgimento de novos vasos (AKHAVANI et al., 2008; FOLKMAN; SHING, 1992; ARNOLD; WEST, 1991; O'REILLY et al., 1997). Essa etapa é fundamental porque, a partir desses novos vasos, é que chegarão oxigênio e nutrientes à área lesada (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). As células endoteliais são alongadas e se mostram achatadas em uma única camada, com os núcleos voltados para o lúmen, podendo sofrer processo de diferenciação para arteríolas ou vênulas (ROSS; PAWLINA, 2016; LEONG; PLILLIPS, 2015).

Os fibroblastos são células mesenquimais que estão numa fase quiescente, localizados no tecido conjuntivo, sendo atraídas pelos mediadores da fase inflamatória. Chegam ao local da ferida a partir do terceiro dia, por movimentos de diapedese, onde se diferenciam estimuladas principalmente por fatores liberados pelos macrófagos e plaquetas. São alongadas e, por serem responsáveis pela fibroplasia, com produção dos componentes da matriz extracelular e do colágeno, apresentam retículo endoplasmático e complexo de Golgi desenvolvidos. Entretanto, pelas técnicas usuais de coloração com hematoxilina e eosina, apenas o núcleo, também de formato alongado, é visualizado (ROSS; PAWLINA, 2016; JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2013; LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

Na epiderme normal, é possível distinguir quatro camadas de células principais (estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato lúcido). Os queratinócitos são formados na camada mais profunda (estrato basal) e, a partir daí, progridem para os segmentos mais superficiais. Durante esse movimento, perdem organelas, desidratam e acumulam queratina, formando então o estrato lúcido ou córneo (peles mais espessas), que permite o isolamento do corpo em relação ao meio externo. Podem se apresentar, portanto, com um aspecto colunar, poliédrico ou pavimentoso, de acordo com a camada em que se encontram. Ferimentos que não atingem o estrato basal, ou seja, que não interferem na porção germinativa da epiderme, apresentam cicatrização mais rápida (ROSS; PAWLINA, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A epitelização ocorre já a partir das primeiras 24 horas, através da migração, (liberação das ligações da camada basal, retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução dos desmossomos, formação de actina citoplasmática periférica) e proliferação dos queratinócitos localizados nas margens da lesão e dos folículos pilosos mais próximos (SANTORO; GALDINO, 2005). Essas células participam recobrando a lesão, formando uma crosta e também auxiliam na contração da ferida (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

3.2.3 Maturação

Além de favorecer um ambiente propício para a cicatrização a partir da produção de colágeno e da matriz extracelular, os fibroblastos participam da contração das bordas da ferida com fibrilas de actina e miosina, funcionando como células musculares contráteis (miofibroblastos). Essa modificação estrutural pode ser vista a partir do sexto dia, desaparecendo depois de quatro semanas (LEONG; PLILLIPS, 2015; AGHA et al., 2011; GABBIANI; CHAPONNIER; HUTTNER, 1978).

A partir da terceira semana, ocorre diminuição importante do tecido de granulação formado na fase proliferativa, assim como dos fibroblastos e a ferida passa a apresentar maior resistência tênsil, devido às ligações cruzadas entre as fibras de colágeno. Esta, por sua vez, é a proteína mais importante de todo o

processo de cicatrização, sendo responsável por manter a sustentação da ferida, evitando a ruptura da mesma durante o reparo. É produzida inicialmente nos ribossomos, passando como cadeias pró-alfa para o retículo endoplasmático dos fibroblastos. Nesta organela, as porções prolina e lisina recebem um grupamento hidroxila e são excretadas como uma molécula de pró-colágeno. Após sofrerem clivagem de alguns pró-peptídeos por proteases da matriz extra-celular, convertem-se em monômeros que, quando se unem, formam então as fibras de colágeno. Estas fibras podem ser coradas com eosina, e visualizadas no microscópio óptico como estruturas onduladas de largura e comprimentos variáveis (ROSS; PAWLINA, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; LEONG; PLILLIPS, 2015; BOGGIO, 2008).

Nessa fase da maturação, a ferida diminui rapidamente de tamanho e sofre um processo de remodelamento, entretanto, se houver desequilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno, as cicatrizes podem ter efeito extremamente indesejáveis do ponto de vista estético e funcional, como nas situações de cicatrizes hipertróficas (proliferação dentro das margens da ferida que podem regredir com o tempo) e queloides (proliferação além das margens da ferida que normalmente não regride com o tempo) (Figura 5) (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).



Figura 5. Cicatriz quelóide provocando grande deformidade em região auricular, com repercussão estética importante.

Fonte: Foto cedida gentilmente pelo cirurgião plástico Dr José Romero de Almeida Ferreira Filho

3.3 PELE SUÍNA

O ideal, em termos de estudos sobre cicatrização de feridas cutâneas, seria realizar as pesquisas nos próprios seres humanos, porém, importantes questões éticas impedem que isso aconteça. Não é recomendado utilizar, em humanos, medicações que não tenham sido testadas antes em modelo animal. Além disso, a necessidade de biópsias para análise histológica e a dificuldade em padronizar os diversos tipos de lesão com as mais variadas comorbidades dos pacientes, limitariam muito a capacidade de avaliação dos resultados (SULLIVAN, 2001; SVENSJO et al., 2000). Modelos *in vitro* servem principalmente para compreensão do funcionamento das células que participam da cicatrização, entretanto, com muito pouca aplicabilidade prática, devido à falta de interação com os outros agentes do processo (KIM; MUSTOE; CLARK, 2015). Quanto aos modelos *in vivo*, diversos animais têm sido utilizados no entendimento do processo de cicatrização. A maioria das pesquisas são realizadas com roedores (hamster, camundongo, coelhos) por serem de mais fácil manuseio e apresentarem baixo custo de aquisição e cuidados. Entretanto, esses animais possuem várias características distintas em relação à pele humana. Apresentam espessura fina da derme e epiderme, musculatura envolta no tecido celular subcutâneo, maior elasticidade, grande concentração de folículos pilosos, cicatrização predominantemente através de contração, além da resposta do sistema imune também ser muito diferente. Ou seja, a pele desses animais tem anatomia e fisiologia que permitem resultados pouco reprodutíveis em seres humanos (SULLIVAN, 2001; KIM; MUSTOE; CLARK, 2015; WANG et al., 2000; GALLANT-BEHM; HART, 2006; JUNG et al., 2013).

A pele suína, por outro lado, é considerada modelo padrão para comparação com a pele humana, devido às grandes semelhanças do ponto de vista histológico e funcional (SULLIVAN, 2001; HENGGE; WALKER; VOGEL, 1996; BERNATCHEZ et al., 1998; TFAILI et al., 2012). Em relação à histologia, ambas apresentam, de forma similar, espessura derme/epiderme, tecido celular subcutâneo desenvolvido, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, densidade de folículos capilares, disposição dos vasos sanguíneos e estrutura bioquímica semelhante da principal proteína envolvida no processo de cicatrização (colágeno). É possível também observar similaridade do ponto de vista funcional, tendo em vista que ambas possuem tempo semelhante de meia-vida da epiderme (em torno de 30 dias), a

cicatrização ocorre por reepitelização e o sistema imune da pele de ambos são parecidos (SULLIVAN, 2001; SEATON; HOCKING; GIBRAN, 2015; VOLK; BOHLING, 2013).

Muito da compreensão do processo de cicatrização das lesões cutâneas em humanos deve-se aos estudos realizados em modelo animal suíno. Há mais de meio século, por exemplo, Ross e Benditt já mostravam as mudanças que ocorriam no leito das feridas, o momento do aparecimento das células inflamatórias, a importância dos fibroblastos e do colágeno, estudando esse modelo animal (ROSS; BENDITT, 1961). Ao longo do tempo, diversos outros estudos comprovaram essas observações iniciais e apontam o modelo suíno como sendo o ideal para o estudo da cicatrização (HOLLANDER et al., 2003; ZHANG; MONTEIRO-RIVIERE, 1997; VARDAXIS et al., 1997).

3.4 NIFEDIPINA

A nifedipina (NFD) é um medicamento utilizado como anti-hipertensivo desde a década de 1970, pertencente à classe dos antagonistas dos canais de cálcio (ACC). O cálcio tem a capacidade de provocar a contração da musculatura lisa do coração e das artérias, além de atuar na excitação do nó sinoatrial e no sistema de condução atrioventricular. As células endoteliais periféricas apresentam reservas limitadas de cálcio, assim, quando ocorre o bloqueio desse íon, o resultado é a vasodilatação, com consequente diminuição da pressão arterial (KATZUNG, 2017; OIGMAN; FRITSCH, 1998; BROWN et al., 2000).

Dentro da classe dos ACC, há o grupo das dihidropiridinas (nifedipina) e das não-dihidropiridinas. Ambas atuam impedindo a entrada de cálcio no interior das células do sistema cardiovascular, ligando-se à subunidade α_1 dos canais tipo L. Sendo que as primeiras atuam mais nas células endoteliais dos vasos periféricos, enquanto as segundas possuem efeito tanto no coração (produz depressão da contratilidade miocárdica e da condução sinoatrial), como na periferia (BOMBIG; PÓVOA, 2009; JARDIM, P.; JARDIM, T.; SOUZA, 2013; DOLLERY, 1991).

A NFD é uma substância cristalina amarela que apresenta como fórmula química $C_{17}H_{18}N_2O_6$ (Figura 6), e as seguintes características físico-químicas: ponto de fusão entre 172-174°, ser praticamente insolúvel em água; levemente solúvel em

álcool; muito solúvel em clorofórmio ou acetona. As soluções são extremamente fotossensíveis e apresenta (Log *P*) de 2,2 como coeficiente de partição octanol / água. Possui meia vida de duas horas, é metabolizada no fígado e excretada na urina (predominantemente) e nas fezes (DE SANTIS, 2008; NIFEDIPINE, 2016).

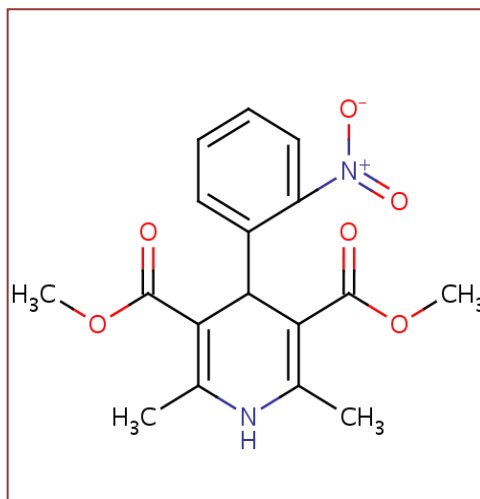


Figura 6. Estrutura molecular da nifedipina.

Fonte: NIFEDIPINE. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01115>>

As únicas formas de apresentação padronizada da NFD são a oral e a endovenosa, com doses variando entre 10 mg e 60 mg e 3 e 10 microgramas por quilo, respectivamente. É indicada principalmente para o controle da pressão arterial, ou ainda, no tratamento da angina crônica estável (KATZUNG, 2017; POOLE-WILSON et al., 2004).

A forma semissólida ainda não é padronizada, mas pode apresentar algumas vantagens em relação à apresentação oral: facilidade de administração ser aplicada de forma tópica, não agressão ao trato gastrointestinal e menores efeitos colaterais (DE SANTIS, 2008; BORNSTEIN et al., 2010; CHIU; TSAI, 2011).

A NFD é utilizada tradicionalmente na prática médica como anti-hipertensivo, entretanto, devido ao seu efeito de vasodilatação arterial/arteriolar, alguns autores têm descrito que essa medicação pode ter algum benefício cicatrizante nos pacientes portadores de lesões cutâneas específicas relacionadas a vasoespasmos arteriolar como as úlceras hipertensivas (Figura 7) e as úlceras da esclerodermia, devido à melhor perfusão tecidual (HAFNER et al., 2010; FREIRE; FERNANDES; PINEIRO-MACEIRA, 2006; WOO et al., 1984; GASSER, 1991).



Figura 7. Úlcera hipertensiva - localização em face lateral da perna, com fundo vermelho, pulsos preservados e muito dolorosa.

Fonte: Foto própria do autor.

Estudos mostram que acontece aumento da velocidade do fluxo capilar, observada através da capilorosopia e diminuição da resistência periférica, indicando vasodilatação arteriolar com consequente melhora da oferta de oxigênio e nutrientes para os tecidos, em pacientes que utilizaram NFD por via oral (GASSER, 1991; FISHER; SNART, 1984; BELCARO; NICHOLAIDES, 1989; CESARONE; LAURORA; BELCARO, 1992).

A literatura sugere benefícios na cicatrização de feridas, utilizando a NFD, em animais menores (ratos) (EBADI et al., 2003; PAL, KHAZANCHI e MOUDGIL, 1991; BRASHAR, UDUPA, S. e UDUPA, A., 2005; PATIL, AGNIHOTRI e SINGH, 2009), entretanto, com pouca utilidade para uso humano, tendo em vista as grandes diferenças histológicas e funcionais entre esses dois tipos de pele (KIM; MUSTOE; CLARK, 2015; HENGGE; WALKER; VOGEL, 1996; TFAILI et al., 2012; VOLK; BOHLING, 2013).

Encontramos relatos de casos isolados que mostram bons resultados com a NFD tópica, porém sem padronização de concentrações ou posologia para cada

situação específica, além de não apresentarem outras comprovações da eficácia, a não ser apenas a observação clínica individual de cada pesquisador (TORSIELLO; KOPACKI, 2000; ISRAEL, 2003).

4. METODOLOGIA

4.1 DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES DA NIFEDIPINA

4.1.1 Matérias-primas

Para as formulações em estudo foram utilizadas as seguintes matérias-primas: nifedipina (LT- ALL060102, ALL CHEMISTRY, fabricada em 01/09/2015 e com validade 01/08/2017), Edta, álcool cetosteárilico 30/70, Bht, glicerina bidestilada, óleo de silicone, propilenoglicol, cosmoguard, xalifin e água purificada.

As emulsões foram preparadas pela técnica de inversão de fases, aquecendo-as separadamente, sendo a fase aquosa (1) vertida lentamente sob a oleosa (2), ambas a 70°C e sob agitação mecânica constante (agitador mecânico Fisaton - modelo 713 D) a 600 rpm até completo arrefecimento. O silicone e conservante foram acrescidos a 30°C devido ao caráter termossensível dos mesmos, sendo esta denominada “a frio” (3). A água utilizada na preparação das formulações foi obtida por osmose reversa. Após preparação da base, a NFD foi incorporada nas formulações a frio. As formulações foram produzidas em laboratório com condições de umidade e temperatura monitoradas, seguindo as boas práticas de manipulação (ANVISA, 2007). Os componentes das formulações e suas funções são apresentados na tabela 1.

FORMULAÇÃO 1 – (F1) NIFEDIPINA 1%

FORMULAÇÃO 2 – (F2) NIFEDIPINA 10%

FORMULAÇÃO 3 – (F3) NIFEDIPINA 20%

Tabela 1. Composição quali-quantitativa do creme de nifedipina

COMPONENTES	FUNÇÃO	F1	F2	F3
Nifedipina	Princípio ativo	1%	10%	20%
1-EDTA dissódico	Quelante	0,1%	0,1%	0,1%
1-Água purificada q.s.p*	Veículo	100%	100%	100%
2-BHT	Antioxidante	0,1%	0,1%	0,1%
2-Alcool cetosteárilico 30/70	Cera autoemulsionante	5%	5%	5%
2-Glicerina bidestilada	Umectante	6%	6%	6%
2-Propilenoglicol	Solubilizante	5%	5%	5%
2-Xalifin	Cera autoemulsionante	15%	15%	15%
3-Cosmoguard	Conservante	0,2%	0,2%	0,2%
3-Oleo de silicone	Silicone	4%	4%	4%

*q.s.p. (quantidade suficiente para)

4.1.2 Determinação do pH

A determinação do pH das formulações foi realizada com as amostras dispersas em água purificada obtida por osmose reversa (10% m/v), a 25° C, utilizando pHmetro (Gehaka modelo PG 1800) e eletrodo de solução FC09 calibrado com soluções pH 4,0 e 7,0. O teste foi realizado em triplicata (ANVISA, 2010). Como resultado, obtivemos formulações com pH (F1- 5,7 / F2- 5,9/ F3- 5,6)

4.2 ANIMAIS

Utilizamos 4 fêmeas de suínos da raça Pietrain, com peso entre 15 Kg e 20 Kg, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina Nova Esperança (FAMENE), em João Pessoa - Paraíba (Figuras 8 e 9), sendo a pesquisa realizada entre os dias 08 de junho e 13 de julho de 2016.

Os animais ficaram em baias individuais apropriadas, com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie. As condições ambientais foram controladas com temperatura de 20 +/- 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo que a umidade relativa do ar e o ruído foram os próprios do ambiente. A pesquisa foi aprovada pelo

Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Nova Esperança (FAMENE), obedeceu às orientações da Lei Federal nº 11.794/2008 (Brasil, 2008) e às recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Em todos os momentos, esteve presente um médico veterinário da FAMENE, para que tivéssemos um melhor controle do experimento, assim como os cuidados necessários com os animais.



Figura 8. Centro de técnica cirúrgica experimental da Faculdade de Medicina Nova Esperança, onde foram realizados os ferimentos nos animais.

Fonte: Foto própria do autor.



Figura 9. Local de acondicionamento dos animais (baia).

Fonte: Foto própria do autor.

4.3 ANESTESIA

Os animais foram imobilizados para que a administração das injeções fosse conduzida sem riscos para o animal ou pesquisadores. Assim, aguardamos tempo suficiente para que o animal se adaptasse à manipulação e se tornasse familiarizado com a equipe. A manipulação incorreta ou brusca poderia implicar estresse e, conseqüentemente, desequilíbrio de funções orgânicas, o que determinaria a ocorrência de alterações fisiológicas. Na noite anterior ao experimento, os animais foram mantidos em jejum alimentar.

Ao se realizar a anestesia (procedimento feito pelo médico veterinário), priorizou-se promover a contenção delicada do animal, na busca de se atingir um grau razoável de relaxamento muscular para facilitar o procedimento cirúrgico, produzindo analgesia suficiente a fim de que o animal não sofresse. A anestesia foi, portanto, uma combinação de narcose, relaxamento e analgesia.

Assim, os animais receberam inicialmente uma dose de xilazina (1-2 mg/Kg) para a sedação e analgesia, em seguida, foi administrada como relaxante muscular a ketamina na dose de 2mg/Kg e realizada a entubação oro-traqueal com tubo número 7. O plano anestésico foi mantido com o halogenado isoflurano sob máscara inalatória na concentração de 1% a 2%, e com propofol na dose de 20 a 50mg

(infusão contínua) em veia auricular, sendo feito o repique de acordo com a resposta do animal (Figura 10). O animal permaneceu sob monitorização com cardioscópio, oximetria de pulso, capnógrafo e avaliação do reflexo córneo-palpebral, durante o procedimento (ALSAAD et al., 2015; SINGER; MACCLAIN, 2003; PHILANDRIANOS et al., 2012).

Nesse estudo, os animais se recuperaram da anestesia sem anormalidade nos parâmetros monitorados.



Figura 10. Material para anestesia.

Fonte: Foto própria do autor.

4.4 CIRURGIA

Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito ventral, sendo realizada tricotomia, marcação da área com caneta dermatográfica apropriada para pele de dois quadrados sobrepostos (2,5 cm x 2,5 cm e 4 cm x 4 cm), a fim de padronizar o tamanho dos ferimentos e realizar o acompanhamento fotográfico (Figura 11).

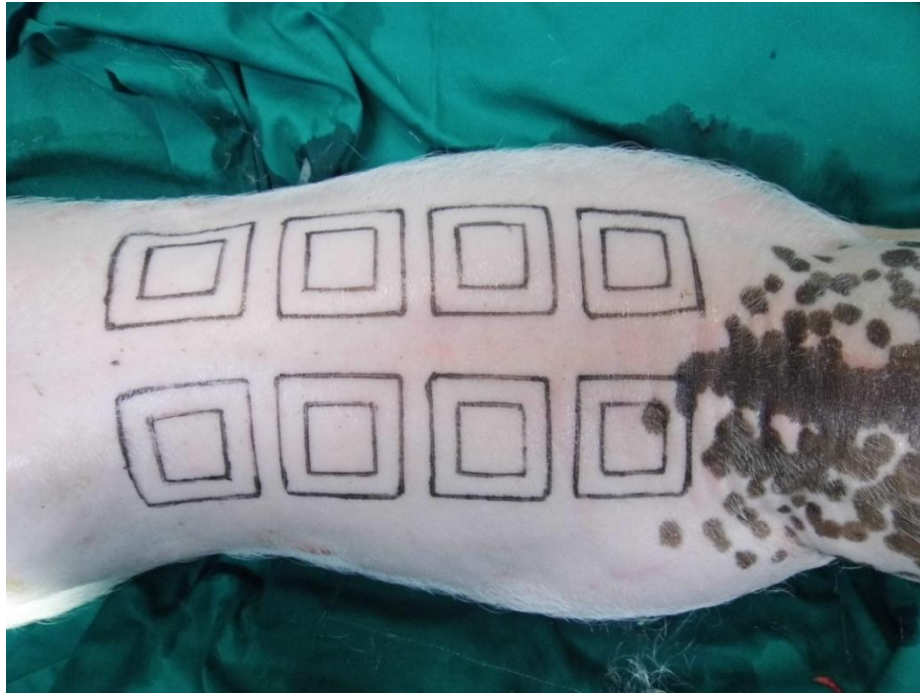


Figura 11. Marcação da área a ser operada.

Fonte: Foto própria do autor.

Foi feita antissepsia com clorexidina degermante, seguida de clorexidina alcoólica a 4% de toda a região dorsal, e posicionou-se o campo fenestrado esterilizado.

Procedeu-se com a retirada de pele total até a fáscia muscular dorsal, medindo 2,5 cm x 2,5 cm, sendo conseguido hemostasia apenas com compressão local. Limpamos com soro fisiológico 0,9% e, de forma alternada, fizemos o curativo com NFD. Cobrimos com gaze estéril de algodão e atadura de crepom estéril (Figuras 12, 13 e 14).

Os ferimentos e a coleta do material para análises histológica e fotográfica foram realizados pelos autores da pesquisa.



Figura 12. Realização dos ferimentos.
Fonte: Foto própria do autor.

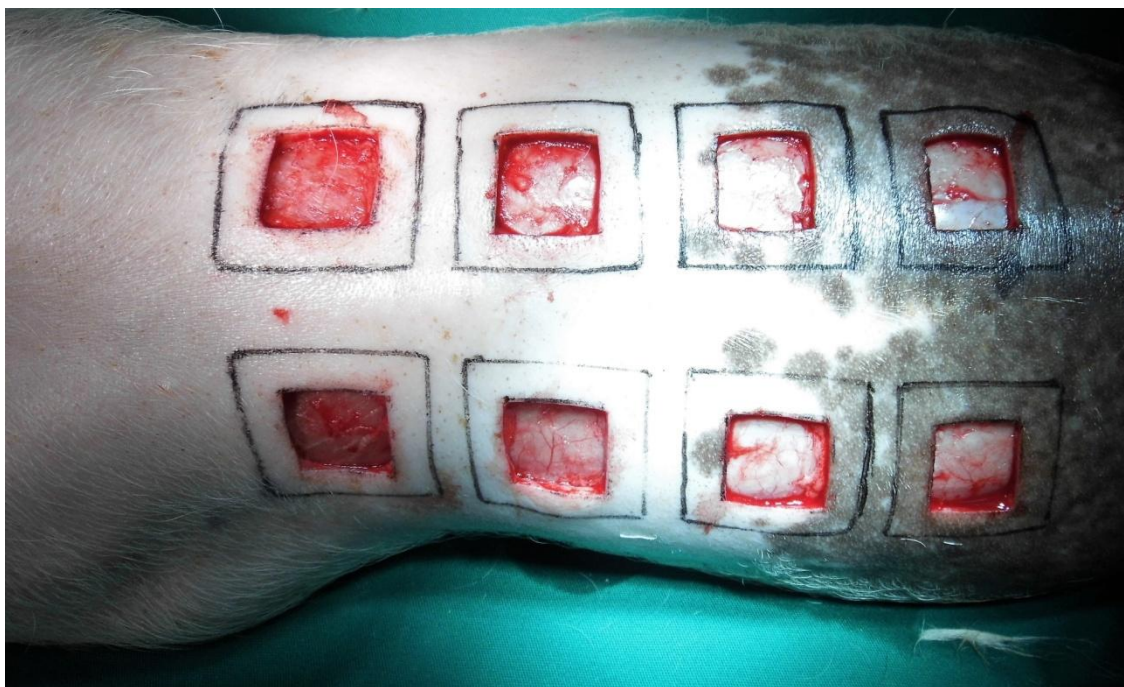


Figura 13. Ferimentos.
Fonte: Foto própria do autor.



Figura 14. Aplicação alternada da nifedipina.

Fonte: Foto própria do autor.

4.5 FLUXOGRAMA

Os quatro animais foram colocados em baias separadas, sendo identificados pelos números 1, 2, 3 e 4. Cada ferimento recebeu uma letra correspondente, seguindo uma ordem da esquerda para direita e da região cranial à caudal (A, B, C, D, E, F, G, H). O animal 1 recebeu NFD tópica a 1% nas lesões A, D, E e H. O animal 2 recebeu NFD tópica a 10% nas lesões B, C, F e G. O animal 3 recebeu NFD tópica a 20% nas lesões A, D, E e H. Antes de aplicarmos a NFD, umidificamos as feridas com soro fisiológico (SF) 0,9%. Nas demais lesões e no animal 4, o curativo foi feito apenas com SF 0,9% (Figura 15). Realizamos troca de curativo a cada dois dias, assim como nos dias da coleta dos dados. Os 32 ferimentos foram submetidos à biópsia com *punch* de 4 mm nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28, e foram fotografados nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 33.

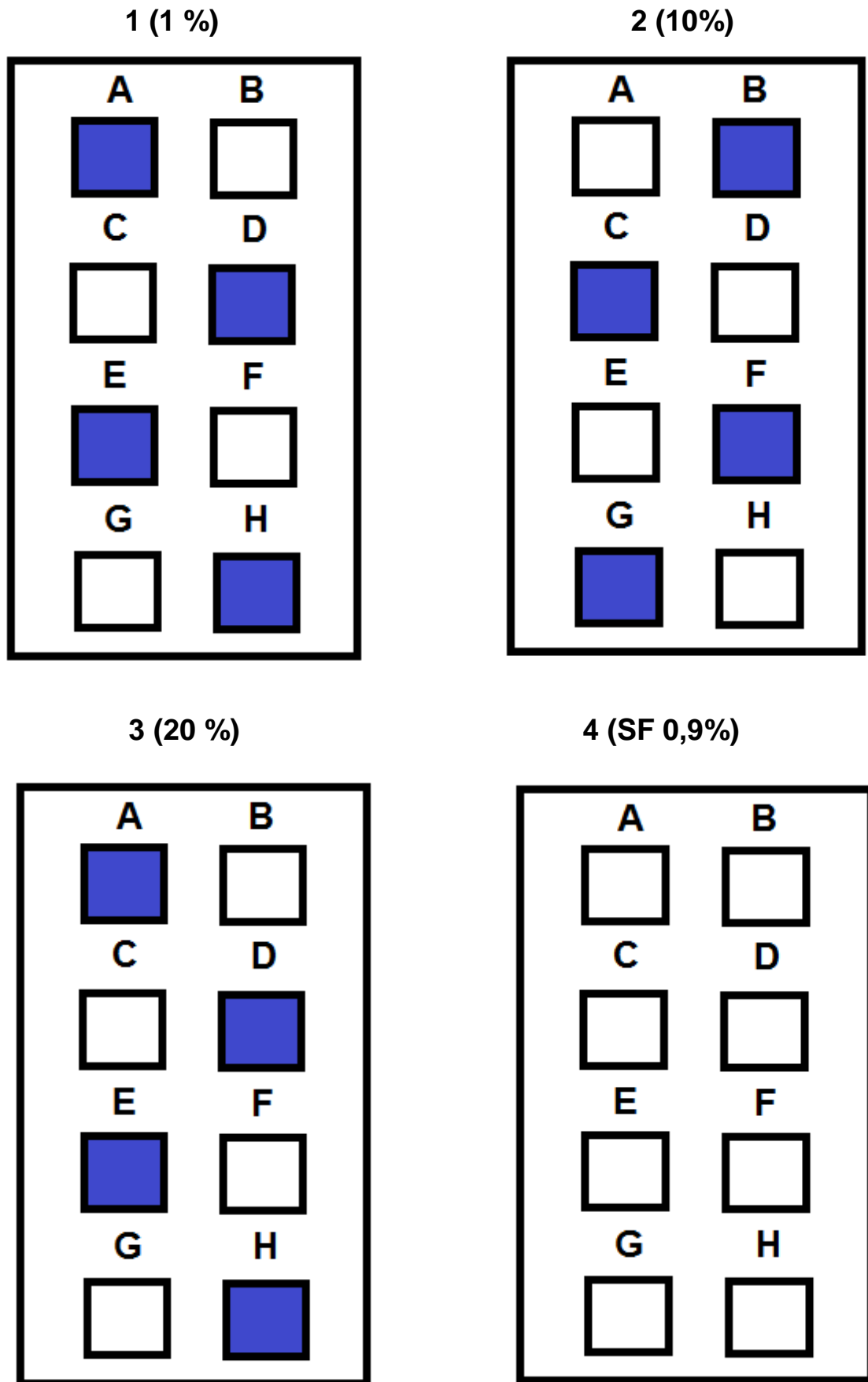


Figura 15. Distribuição das lesões e locais onde foi aplicada a nifedipina.
Fonte: Foto própria do autor.

4.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

4.6.1 Coleta do material e fixação

Foram realizadas biópsias da pele dos animais que posteriormente foram fixadas em formalina. As biópsias seguiram o procedimento padrão, utilizando *punch* descartável de 4mm, após infiltração local de solução anestésica contendo cloridrato de lidocaína à 2%. Os fragmentos obtidos dos ferimentos foram devidamente acondicionados em frascos separados, com identificação própria, contendo solução tamponada de formaldeído a 4% para realização da fixação química, em seguida enviados ao Serviço de Anatomia Patológica (Citopath Laboratório Médico, localizado na rua Antônio Rabelo Júnior, 170, Sala 508, Edifício Eco Medical Center, Miramar, João Pessoa, sob responsabilidade da médica Ana Flávia Nóbrega de Paiva).

4.6.2 Processamento histológico

A preparação das lâminas seguiu procedimento específico para esse tipo de avaliação (ELENITSAS et al., 2009; ROSAI, 2011). Assim, após o tempo de fixação de 24 horas, o material fora cortado tangencialmente e incluído em cassetes plásticos para o processamento histológico com as devidas identificações. No histotécnico, o material foi mergulhado numa sequência de frascos contendo álcool absoluto a 99%. Após a desidratação, seguiu-se o processo de diafanização ou clareamento, utilizando-se o Xilol num total de três banhos sequenciais. Por fim, o material foi infiltrado por parafina líquida, mantida a uma temperatura de 62° C, passando por dois banhos consecutivos, sendo o tempo médio de cada banho de 60 minutos. Com o endurecimento da parafina, obtivemos um bloco contendo o fragmento do tecido em seu interior.

4.6.3 Inclusão

Nesta etapa, os cassetes contendo material são mergulhados em parafina líquida a 60° C e colocados na estufa sob a mesma temperatura por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, as cápsulas foram abertas e

preenchidas com parafina líquida aquecida, sempre acompanhadas da identificação correspondente.

4.6.4 Microtomia

Após o resfriamento em placas de refrigeração, os blocos foram levados para o micrótomo, sendo realizadas secções com espessura média de 5 micrômetros. As fitas foram distendidas em água pré-aquecida a 56°C e então coletadas em lâminas de vidro.

4.6.5 Coloração

A bateria de coloração processou-se nos seguintes passos:

- Desparafinar em xilol por 10min
- Hidratar em álcool
- Imersão em álcool absoluto
- Imersão em álcool absoluto
- Imersão em álcool 95%
- Imersão em álcool 95%
- Lavar em água corrente durante 3 minutos
- Corar pela hemtoxilina durante 5 minutos
- Lavar em água corrente durante 5 minutos
- Corar pela eosina durante 30 segundos
- Imersão em álcool 95%
- Imersão em álcool 95%
- Imersão em álcool absoluto
- Imersão em álcool absoluto
- Imersão em xilol

Colocou-se uma gota de bálsamo Canadá sobre o corte. Sobrepondo-se a este, uma lamínula, que foi comprimida sobre o corte, de modo a espalhar a resina em uma fina camada.

4.6.6 Parâmetros histológicos

Para efeito de comparação, consideramos 4 graus distintos de acordo com a presença nos cortes histológicos (Tabela 2) dos agentes envolvidos no processo de cicatrização (GARROS et al., 2006; MOLGAT et al., 1995).

- Ausente (0): quando não se observava a presença.
- Discreto (1): quando observados de forma isolada, sendo possível distinguir com facilidade áreas livres de infiltrado.
- Moderado (2): quando observados de forma irregular, com bastantes áreas livres de infiltrados.
- Acentuado (3): quando observados em grande frequência, formando agregados densos e poucas áreas livres de infiltrados.

Tabela 2. Critérios utilizados e resposta ocorrida no processo de cicatrização

	Ausente (0)	Discreto (1)	Moderado (2)	Acentuado (3)
1 - Polimorfonucleares				
2 - Macrófagos				
3 - Linfócitos				
4 - Proliferação vascular				
5 - Fibroblastos				
6 - Colágeno				
7 - Queratinócitos				

Para um ganho no poder da amostra e evitar possível viés de análise histológica quanto aos parâmetros discreto e moderado, optamos por considerar como ocorrência de resposta ou resposta positiva no experimento, apenas o parâmetro tido como acentuado e como ausência de resposta ou resposta negativa, os parâmetros ausente, discreto e moderado.

4.7 AVALIAÇÃO FOTOGRÁFICA

As feridas foram fotografadas nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 33, utilizando máquina fotográfica modelo DMC-LZ30tm, Panasonic, resolução de 16 *mega pixels*, com as imagens obtidas num ângulo de 90 graus em relação ao plano das feridas a uma distância aproximada de 30 cm (MIOT et al., 2009; PRESSLEY et al., 2007). Para corrigir eventuais diferenças de distância, utilizamos como referência para as fotos do dia 1, um quadrado desenhado (4 cm x 4 cm) sobreposto aos ferimentos (2,5 cm x 2,5 cm). Nos demais dias de coleta, uma régua centimetrada foi colada ao lado dos ferimentos (Figura 16).

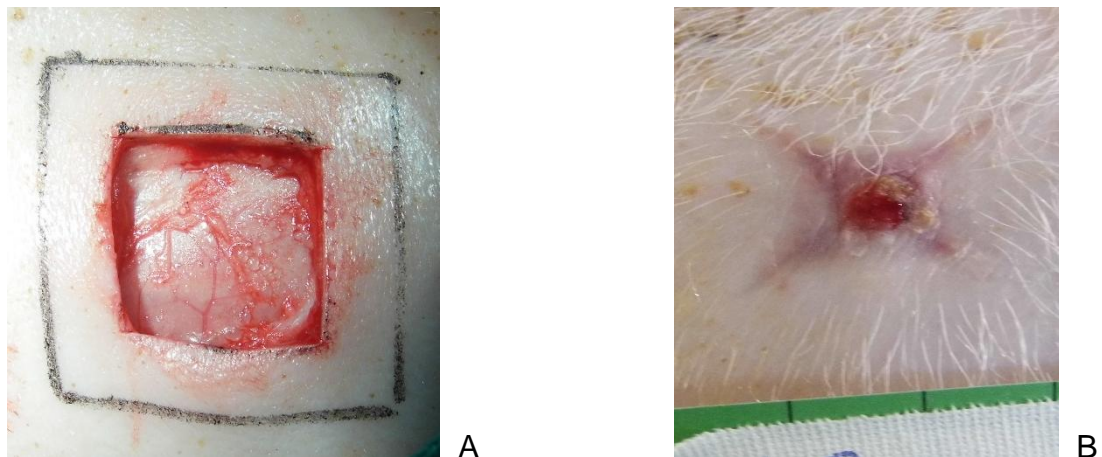


Figura 16. Fotografias das feridas utilizando quadrados sobrepostos (A) e régua centimetrada (B).

Fonte: Fotos próprias do autor.

As imagens foram importadas pelo software ImageJ, versão 1.51 j8. Um único operador realizou a análise das imagens. Para isto, utilizou-se uma adaptação na metodologia proposta por SALMONA et al., 2016, sendo as áreas calculadas em cm².

O grau de contração da ferida foi calculado conforme descrito por Ramsey et al.⁹⁹, na qual W_o = área inicial da ferida no dia 0 e W_i = área da ferida no dia da avaliação: $[(W_o - W_i) / W_o] \times 100$ = porcentagem de contração.

4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise de dados histológicos foi aplicado um modelo longitudinal logístico de efeitos mistos. Assim, foi considerada como variável resposta (dependente) a produção acentuada das diferentes células avaliadas tendo como variável explicativa os grupos de comparação (controle, NFD 1%, 10% e 20%). Tendo como referência o grupo controle, foi estimada a Odds Ratio (OR) com seu respectivo intervalo de confiança para os grupos NFD, sendo uma análise independente por dose (para cada porco comparada com seu controle), e uma outra análise independente da dose (grupo tratado e controle considerando todos os porcos). A interpretação de uma OR em um estudo longitudinal consiste na razão de chances da categoria analisada comparada a categoria de referência correspondente ao período em análise, tendo como pressuposto que essa associação é linear em todo o período de análise. A significância estatística adotada no estudo foi de 5% ($p < 0,05$) e o software utilizado foi o STATA versão 12.0.

Para a comparação dos grupos, segundo a evolução da área da ferida ao longo do tempo, foi aplicado um modelo de regressão linear de efeitos mistos, considerando a forma não estruturada (*unstructured*) como matriz de correlação.

5. RESULTADOS

Apresentaremos as comparações entre os ferimentos tratados com NFD e placebo em cada animal individualmente, assim como as comparações entre todos os ferimentos tratados com NFD e todos os ferimentos tratados com placebo nos três primeiros porcos. A seguir, mostraremos os resultados quando comparamos os controles dos três primeiros animais e os controles do animal 4 e, por fim, a redução da área ocorrida entre os ferimentos.

5.1 COMPARAÇÃO DOS FERIMENTOS TRATADOS COM NIFEDIPINA E OS FERIMENTOS TRATADOS COM PLACEBO, EM CADA UM DOS ANIMAIS INDIVIDUALMENTE

A comparação de feridas tratadas com NFD a 1% *versus* placebo, que correspondem ao porco 1, revelou que nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 o recrutamento de PMNs com a droga foi 3 (75%), 4 (100%), 3 (75%), 4 (100%), 0 (0%) e 3 (75%), enquanto com placebo 1 (25%), 0 (0%), 3 (75%), 4 (100%), 1 (25%) e 1 (25%), respectivamente, sendo OR = 3,5 (IC 95%: 1,04 – 11,7), com $p = 0,04$. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos outros parâmetros. Nas tabelas 3 e 4 são demonstradas as comparações em todos os momentos avaliados. As Figuras 17 e 18 mostram a diferença entre a resposta acentuada, moderada e discreta em relação aos PMNs.

Tabela 3. Proporção do nível acentuado de células polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular no porco 1.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	3 (75%)	3 (75%)	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)	3 (75%)	2 (50%)	3 (75%)
14º dia	4 (100%)	4 (100%)	1 (25%)	2 (50%)	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
21º dia	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	2 (50%)	3 (75%)
28º dia	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)
Coefficientes								
Nifedipina 1%	OR = 3,5 (IC95%: 1,04 – 11,7)		OR = 1,4 (IC95%: 0,28 – 7,14)		OR = 0,28 (IC95%: 0,07 – 1,07)		OR = 1,76 (IC95%: 0,52 – 5,93)	
p-valor	0,044		0,682		0,063		0,361	

Tabela 4. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos no porco 1.

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	0 (0%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
14º dia	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)
21º dia	4 (100%)	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)	1 (25%)	2 (50%)
28º dia	4 (100%)	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)
Coefficientes						
Nifedipina 1%	OR = 3,32 (IC95%: 0,52 – 21,3)		OR = 1,0 (IC95%: 0,12 – 8,62)		OR = 2,44 (IC95%: 0,36 – 16,3)	
p-valor	0,206		1,000		0,358	

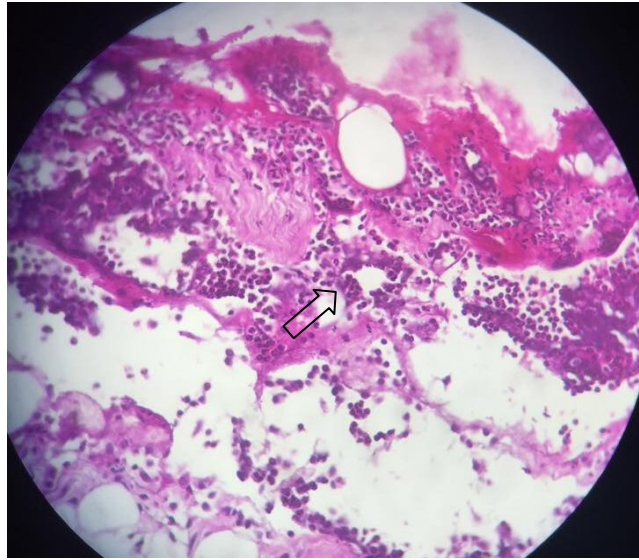


Figura 17. Infiltrado acentuado (seta) de PMNs em meio a tecido fibroconectivo frouxo, em ferimento tratado com NFD (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

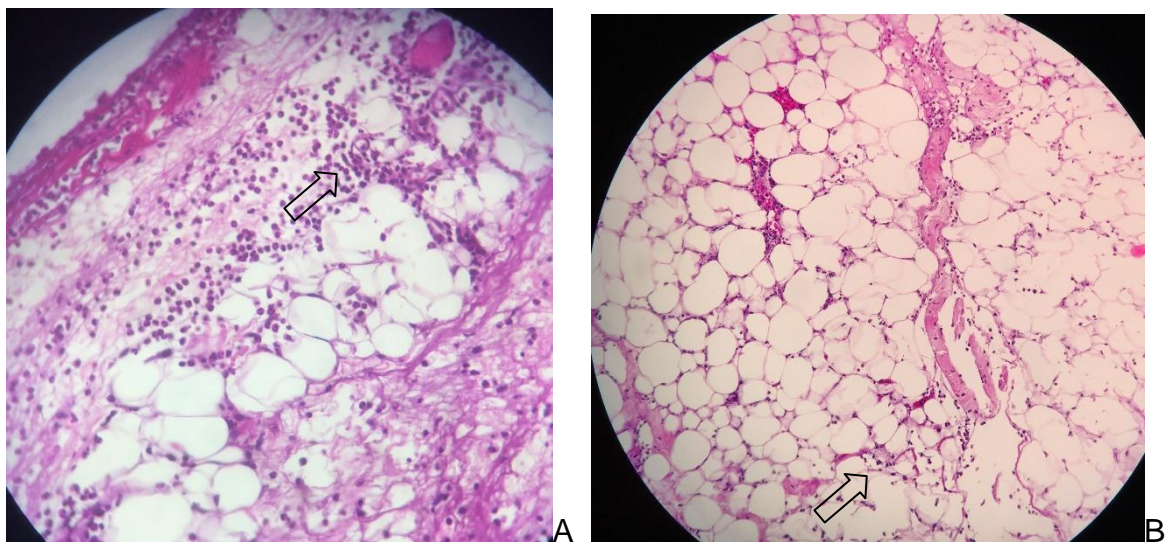


Figura 18. Ferimentos sem NFD: A - resposta moderada (seta) de PMNs e B - resposta discreta (seta) de PMNs (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

As Tabelas 5 e 6 referem-se à comparação entre os ferimentos tratados com NFD 10% e o grupo placebo, que correspondem ao porco 2. Os resultados foram semelhantes à análise com a NFD 1%, onde apenas na produção dos PMNs houve diferença estatisticamente significativa, sendo que com uma OR maior (OR = 11,8 e $p < 0,001$).

Tabela 5. Proporção do nível acentuado de células polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular no porco 2.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	1 (25%)	2 (50%)	3 (75%)	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)	4 (100%)	3 (75%)
14º dia	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	4 (100%)	4 (100%)
21º dia	3 (75%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
28º dia	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (75%)
Coefficientes								
Nifedipina 10%	OR = 11,8 (IC95%: 2,99 – 46,2)		OR = 0,27 (IC95%: 0,05 – 1,51)		OR = 2,92 (IC95%: 0,50 – 17,1)		OR = 1,78 (IC95%: 0,52 – 6,12)	
p-valor	<0,001		0,137		0,235		0,355	

Tabela 6. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos no porco 2.

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	1 (25%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
14º dia	4 (100%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	4 (100%)
21º dia	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)
28º dia	2 (50%)	1 (25%)	4 (100%)	2 (50%)	4 (100%)	2 (50%)
Coefficientes						
Nifedipina 10%	OR = 1,00 (IC95%: 0,28 – 3,54)		OR = 0,02 (IC95%: 0,04 – 10,2)		OR = 1,39 (IC95%: 0,28 – 6,94)	
p-valor	1,000		0,986		0,685	

As Tabelas 7 e 8 referem-se à comparação entre os ferimentos tratados com NFD 20% e o grupo placebo, que correspondem ao porco 3. Nessa dosagem de NFD, houve diferença estatística na produção dos PMNs (Figuras 17 e 18), com uma OR mais elevada que o animal 2 (OR = 22,1 e $p < 0,001$). Ocorreu também aumento estatisticamente significativo nos níveis acentuados em relação aos linfócitos (Figuras 19 e 20) e na proliferação vascular (Figuras 21 e 22).

Houve ainda diferença estatisticamente significativa nos níveis de colágeno e queratinócitos quando comparados os grupos, porém com uma menor chance de produção acentuada para o grupo tratado com NFD (Figuras 23, 24, 25 e 26), sendo essa diferença evidenciada principalmente nos dois últimos dias de coleta, ou seja, na última semana do experimento.

Tabela 7. Proporção do nível acentuado de células polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular no porco 3.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	1 (25%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	1 (25%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
14º dia	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	2 (50%)	3 (75%)
21º dia	0 (0%)	4 (100%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (75%)
28º dia	0 (0%)	2 (50%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	3 (75%)
Coefficientes								
Nifedipina 20%	OR = 22,1 (IC95%: 4,67 – 104,0)		OR = 0,16 (IC95%: 0,02 – 1,52)		OR = 11,1 (IC95%: 1,01 – 20,8)		OR = 4,84 (IC95%: 1,30 – 18,0)	
p-valor	<0,001		0,111		0,049		0,019	

Tabela 8. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos no porco 3.

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
14º dia	3 (75%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
21º dia	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)	1 (25%)	2 (50%)	0 (0%)
28º dia	3 (75%)	2 (50%)	4 (100%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)
Coefficientes						
Nifedipina 20%	OR = 0,78 (IC95%: 0,20 – 3,10)		OR = 0,02 (IC95%: 0,00 – 0,28)		OR = 0,05 (IC95%: 0,01 – 0,66)	
p-valor	0,727		0,005		0,023	

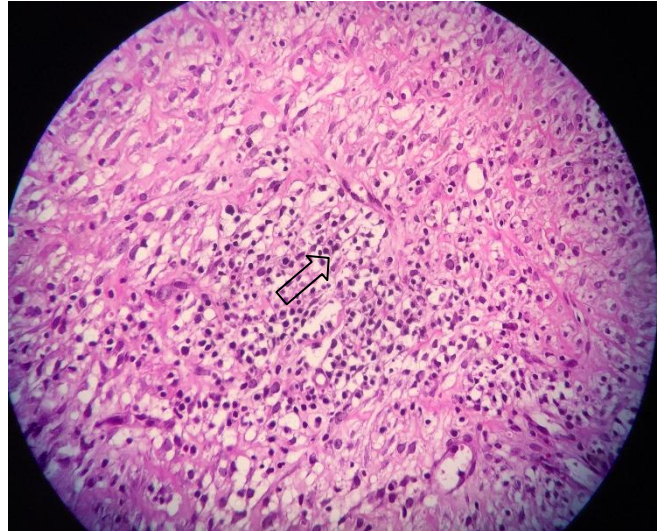


Figura 19. Presença acentuada (seta) de linfócitos em meio a tecido fibroconectivo frouxo, em ferimento tratado com NFD (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

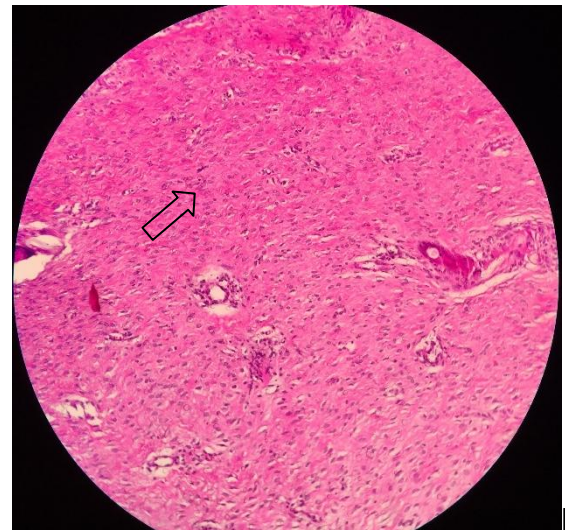
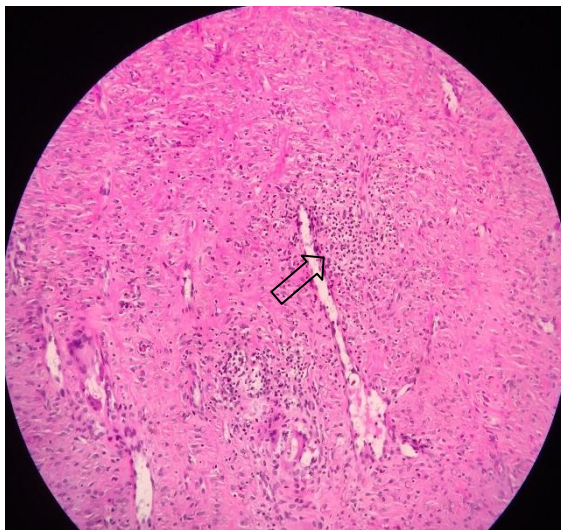


Figura 20. Ferimentos sem NFD: A - resposta moderada (seta) de linfócitos e B - resposta discreta (seta) de linfócitos (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

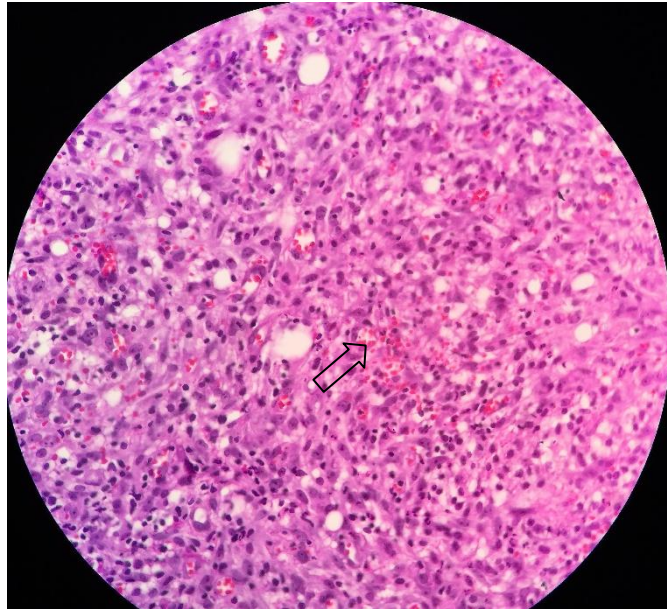


Figura 21. Ferimento tratado com NFD, mostrando resposta acentuada (seta) de capilares neoformados em meio à proliferação fibroblástica e infiltrado inflamatório misto (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

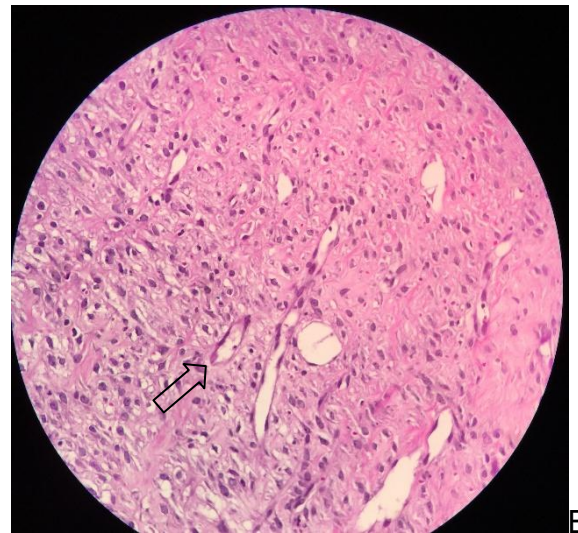
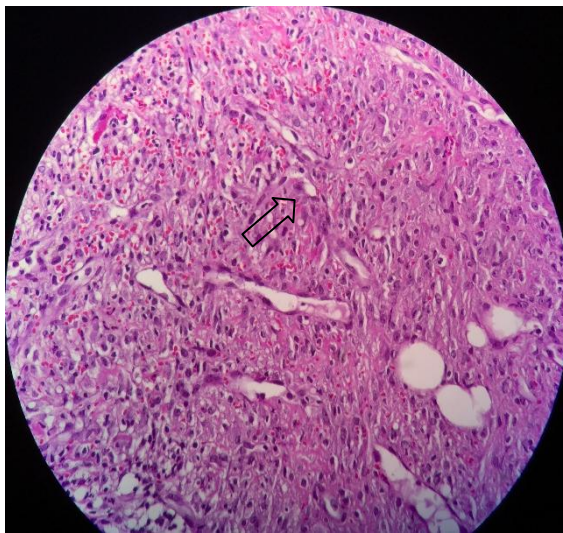


Figura 22. Ferimentos sem NFD: A - resposta moderada (seta) de proliferação vascular e B - resposta discreta (seta) de proliferação vascular (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

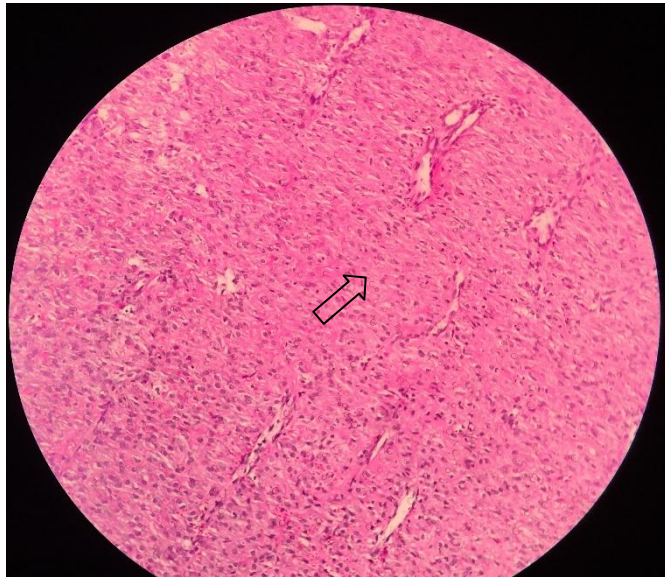


Figura 23. Ferimento tratado apenas com placebo, mostrando depósito acentuado (seta) de fibras colágenas, com paralelização das mesmas, em meio a um discreto infiltrado inflamatório misto (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

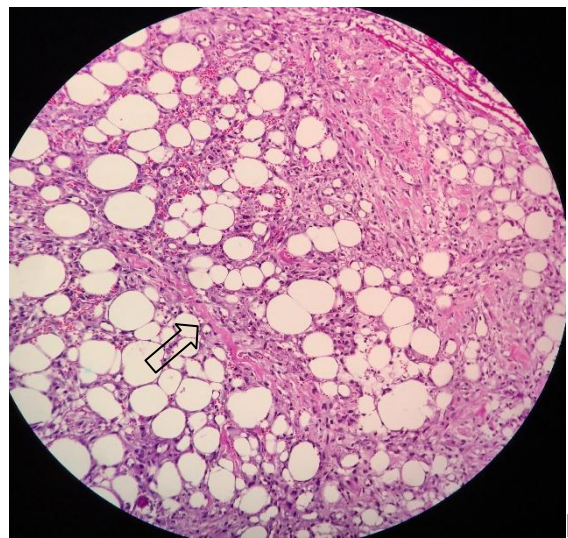
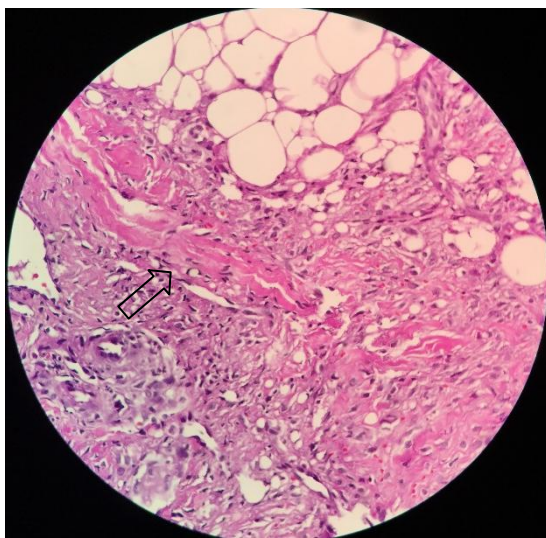


Figura 24. Ferimentos tratados com NFD: A - resposta moderada (seta) de colágeno e B - resposta discreta (seta) de colágeno (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

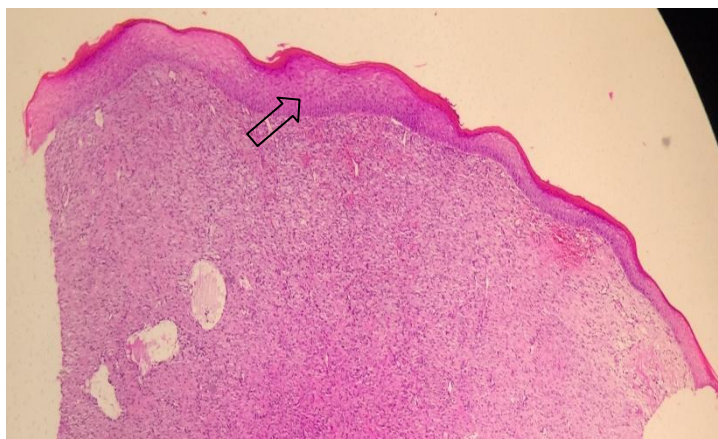


Figura 25. Presença acentuada (seta) de queratinócitos, com espessamento da epiderme em ferimento tratado apenas com placebo. A derme subjacente exhibe fibras colágenas paralelizadas (aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

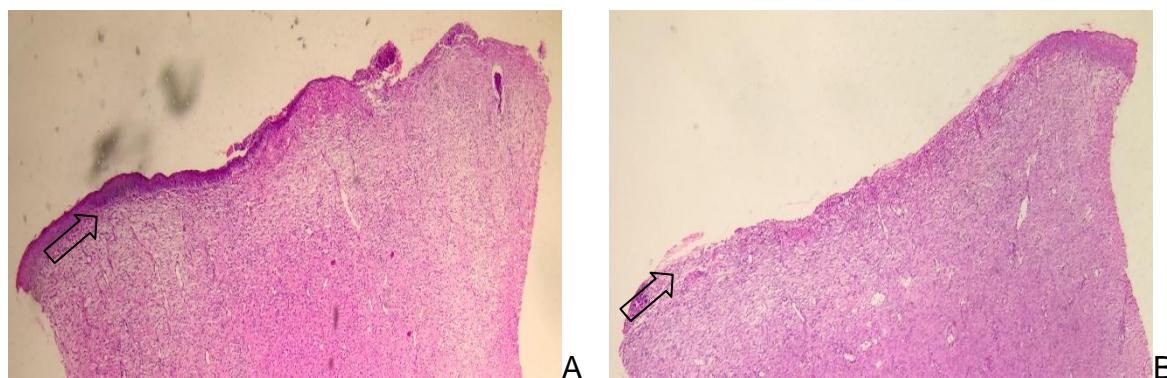


Figura 26. Ferimentos tratados com NFD: A - resposta moderada (seta) de queratinócitos e B - resposta discreta (seta) de queratinócitos(aumento 40x). **Fonte:** Foto própria do autor.

5.2 COMPARAÇÃO DOS FERIMENTOS TRATADOS COM NIFEDIPINA, INDEPENDENTE DA DOSE, E OS FERIMENTOS TRATADOS COM PLACEBO NOS ANIMAIS 1, 2 E 3

Na avaliação dos níveis de PMNs, observa-se baixa atividade das células em todos os momentos do grupo controle, enquanto que, nos grupos que receberam a NFD, os níveis acentuados foram mais frequentes em todos os momentos do

experimento ($p < 0,001$). Ou seja, uma ferida tratada com nifedipina tem 8,48 vezes mais chance de produzir um número de células acentuado do que uma ferida tratada com placebo. No que se refere aos níveis de macrófagos, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as feridas tratadas pela NFD com o grupo placebo. Em relação aos níveis de linfócitos também não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos. Na avaliação da proliferação vascular, observa-se que o grupo NFD apresenta atividade acentuada mais frequente a partir do sétimo dia. Comparado ao placebo, houve diferença estatisticamente significativa, com 2,24 vezes ($p = 0,019$) maior chance de produção acentuada ao longo do tempo (Gráfico 2 e Tabela 9).

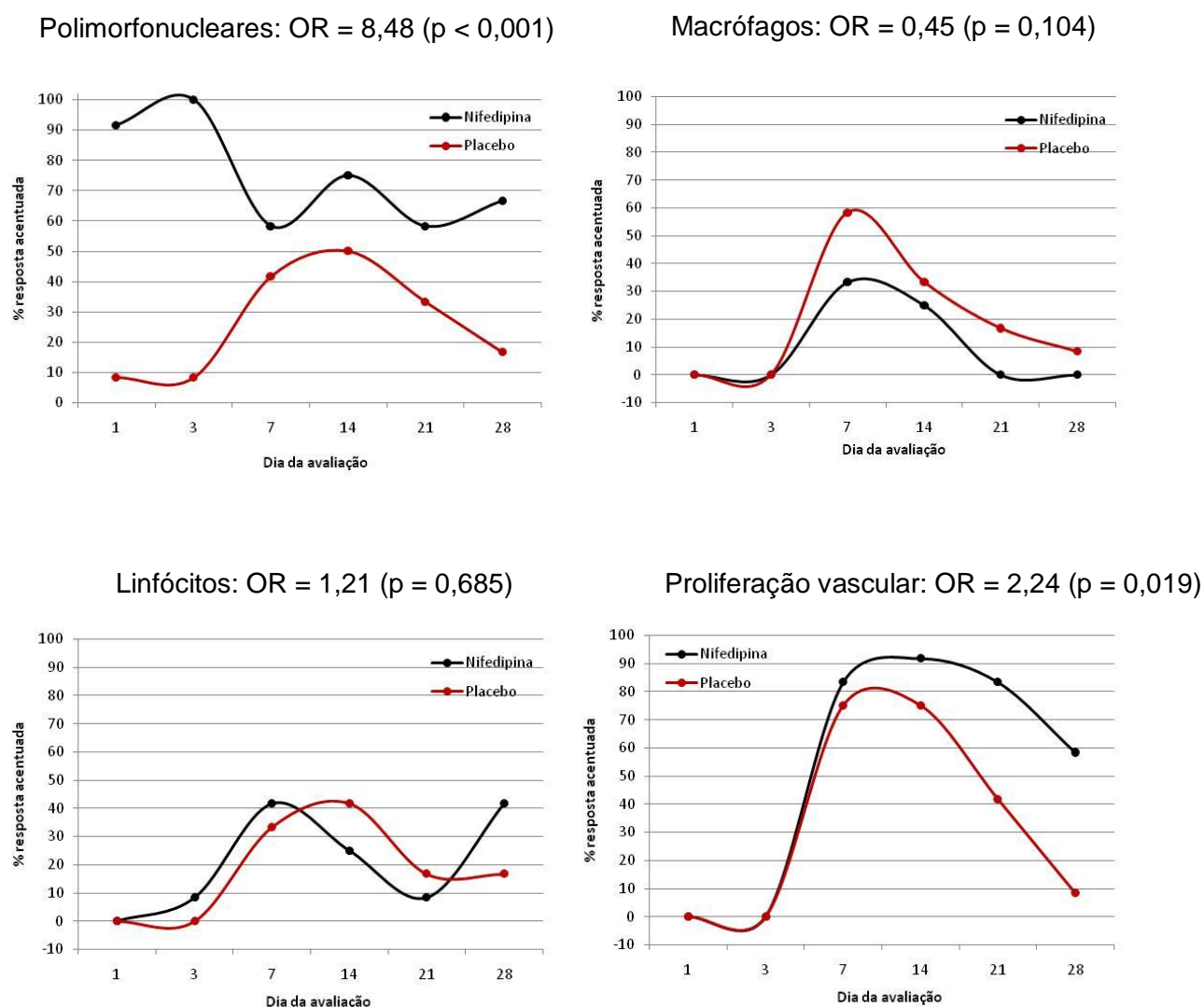


Gráfico 2. Percentual de resposta acentuada nos níveis de PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular nos seis momentos analisados dos animais 1, 2 e 3.

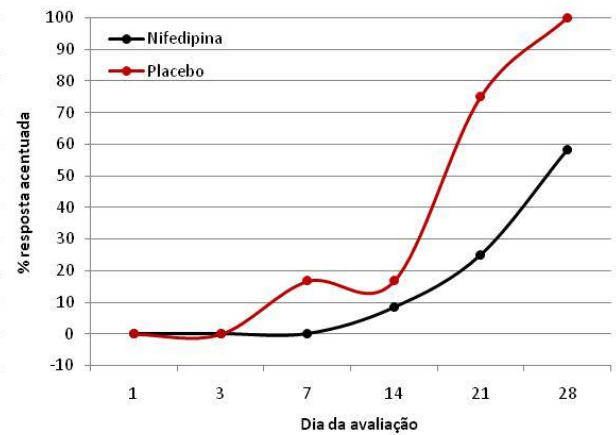
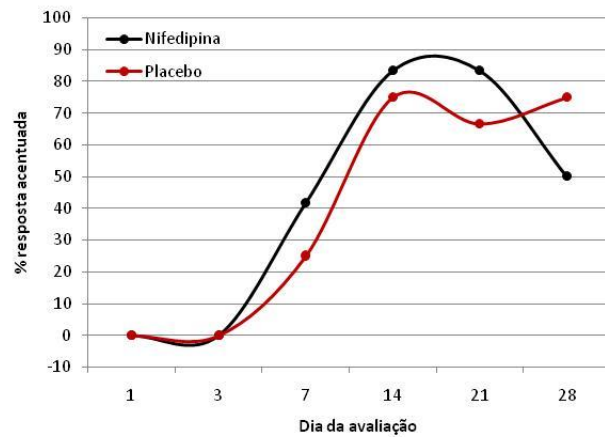
Tabela 9. Proporção do nível acentuado de células PMNs, macrófagos, linfócitos e proliferação vascular em todas as feridas submetidas à nifedipina *versus* as feridas tratadas com placebo nos animais 1, 2 e 3.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	1 (8,3%)	11 (91,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	1 (8,3%)	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	5 (41,7%)	7 (58,3%)	7 (58,3%)	4 (33,3%)	4 (33,3%)	5 (41,7%)	9 (75%)	10 (83,3%)
14º dia	6 (50%)	9 (75%)	4(33,3%)	3 (25%)	5 (41,7%)	3 (25%)	9 (75%)	11 (91,7%)
21º dia	4 (33,3%)	7 (58,3%)	2 (16,7%)	0 (0%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)	5(41,7%)	10 (83,3%)
28º dia	2 (16,7%)	8 (66,7%)	1 (8,3%)	0 (0%)	2 (16,7%)	5 (41,7%)	1 (8,3%)	7 (58,3%)
Coefficientes								
Nifedipina	OR = 8,48 (IC95%: 3,99 – 18,0)		OR = 0,45 (IC95%: 0,16 – 1,18)		OR = 1,21 (IC95%: 0,48 – 3,08)		OR = 2,24 (IC95%: 1,14 – 4,38)	
p-valor	<0,001		0,104		0,674		0,019	

Em relação aos níveis de fibroblastos, não houve diferença estatisticamente significativa. Quanto aos níveis de colágeno, observa-se que o grupo NFD teve um menor percentual de atividade acentuada (OR 0,06/p = 0,006). Na avaliação dos queratinócitos, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados as feridas tratadas pela NFD com o grupo placebo (Gráfico 3 e Tabela 10).

Fibroblastos: OR = 1,18 (p = 0,735)

Colágeno: OR = 0,06 (p = 0,006)



Queratinócitos: OR = 0,78 (p = 0,544)

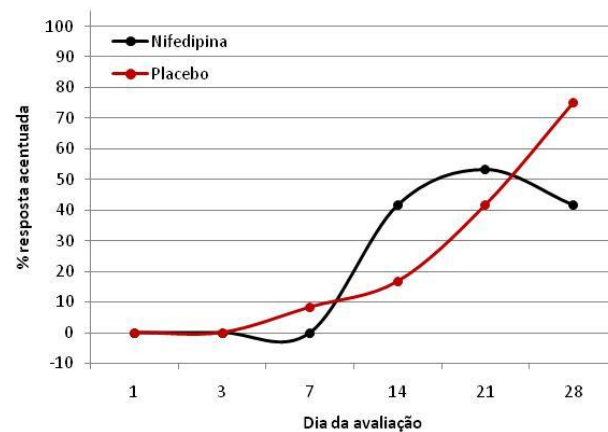


Gráfico 3. Percentual de resposta acentuada nos níveis de fibroblastos, colágenos e queratinócitos nos seis momentos analisados dos animais 1, 2 e 3.

Tabela 10. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno e queratinócitos em todas as feridas submetidas à nifedipina *versus* as feridas tratadas com placebo nos animais 1, 2 e 3.

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	3 (25%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)
14º dia	9 (75%)	10 (83,3%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)	2 (16,7%)	5 (41,7%)
21º dia	8 (66,7%)	10 (83,3%)	9 (75%)	3 (25%)	5 (41,7%)	4 (33,3%)
28º dia	9 (75%)	6 (50%)	12 (100%)	7 (58,3%)	9 (75%)	5 (41,7%)
Coefficientes						
Nifedipina	OR = 1,18 (IC95%: 0,53 – 2,61)		OR = 0,06 (IC95%: 0,01 – 0,45)		OR = 0,78 (IC95%: 0,35 – 1,73)	
p-valor	0,735		0,006		0,544	

5.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS CONTROLES DOS ANIMAIS 1, 2 E 3 COM OS CONTROLES DO ANIMAL 4

A comparação entre os ferimentos tratados apenas com placebo nos porcos que fizeram uso da NFD (animais 1, 2 e 3) com os ferimentos também tratados apenas com placebo no porco que não teve exposição à NFD (animal 4), mostra que ocorre interferência nos ferimentos que não fizeram uso direto, mas que foram expostos ao medicamento.

Observamos um aumento estatisticamente significativo dos PMNs nos ferimentos não tratados diretamente, mas expostos à NFD (Tabela 11). Além disso, no animal 1 aconteceu maior resposta com relação aos linfócitos ($p = 0,029$) (Tabela 13) e no animal 2 ocorreu aumento no nível de proliferação vascular ($p = 0,016$) (Tabela 14).

Os demais parâmetros (macrófagos, fibroblastos, colágeno e queratinócitos) não mostraram resultados com significado estatístico (Tabelas 12, 15, 16 e 17).

Tabela 11. Proporção do nível de células PMNs entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento				
	Controle	Controle NIFEDIPINA	Controle NIFEDIPINA	Controle NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
7º dia	5 (62,5%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)
14º dia	1 (12,5%)	4 (100%)	0 (0%)	2 (50%)
21º dia	1 (12,5%)	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)
28º dia	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)	0 (0%)
Controle versus Controle NEFIDINA 1% $p = 0,001$				
Controle versus Controle NEFIDINA 10% $p = 0,001$				
Controle versus Controle NEFIDINA 20% $p = 0,001$				

Tabela 12. Proporção do nível de macrófagos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento				
	Controle	Controle NIFEDIPINA	Controle NIFEDIPINA	Controle NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7º dia	3 (37,5%)	2 (50%)	3 (75%)	2 (50%)
14º dia	3 (37,5%)	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
21º dia	1 (12,5%)	0 (0)	1 (25%)	1 (25%)
28º dia	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0)	1 (25%)
Controle versus Controle NEFIDINA 1% $p = 0,745$				
Controle versus Controle NEFIDINA 10% $p = 0,963$				
Controle versus Controle NEFIDINA 20% $p = 0,536$				

Tabela 13. Proporção do nível de linfócitos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento	Controle	Controle	Controle	Controle
		NIFEDIPINA	NIFEDIPINA	NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7º dia	3 (37,5%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0)
14º dia	0 (0)	4 (100%)	0 (0)	1 (25%)
21º dia	2 (12,5%)	1 (25%)	1 (25%)	0 (0)
28º dia	0 (0)	2 (50%)	0 (0)	0 (0)
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 1% p = 0,029				
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 10% p = 0,564				
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 20% p = 0,564				

Tabela 14. Proporção do nível de proliferação vascular entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento	Controle	Controle	Controle	Controle
		NIFEDIPINA	NIFEDIPINA	NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0)	1 (25%)	0 (0)	0 (0)
3º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0%)	0 (0)
7º dia	6 (75%)	2 (50%)	4 (100%)	3 (75%)
14º dia	6 (75%)	3 (75%)	4 (100%)	2 (50%)
21º dia	1 (12,5%)	2 (50%)	3 (75%)	0 (00)
28º dia	0 (0)	1 (25%)	0 (0)	0 (0)
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 1% p = 0,221				
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 10% p = 0,016				
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 20% p = 0,308				

Tabela 15. Proporção do nível de fibroblastos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento	Controle	Controle	Controle	Controle
		NIFEDIPINA	NIFEDIPINA	NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7º dia	4 (50%)	0 (0)	1 (25%)	2 (50%)
14º dia	8 (100%)	2 (50%)	4 (100%)	3 (75%)
21º dia	7 (87,5%)	4 (100%)	3 (75%)	1 (25%)
28º dia	7 (87,5%)	4 (100%)	2 (50%)	3 (75%)
Controle versus Controle NEFIDINA 1% p = 0,470				
Controle versus Controle NEFIDINA 10% p = 0,184				
Controle versus Controle NEFIDINA 20% p = 0,053				

Tabela 16. Proporção do nível de colágeno entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento	Controle	Controle	Controle	Controle
		NIFEDIPINA	NIFEDIPINA	NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7º dia	1 (12,5%)	0 (0)	0 (0)	2 (50%)
14º dia	0 (0)	1 (25%)	0 (0)	1 (25%)
21º dia	5 (62,5%)	2 (50%)	3 (75%)	4 (100%)
28º dia	8 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)
Controle versus Controle NEFIDINA 1% p = 0,947				
Controle versus Controle NEFIDINA 10% p = 0,212				
Controle versus Controle NEFIDINA 20% p = 0,770				

Tabela 17. Proporção do nível de queratinócitos entre os grupos controle ao longo dos 6 momentos analisados.

Momento	Controle	Controle	Controle	Controle
		NIFEDIPINA	NIFEDIPINA	NIFEDIPINA
		1 %	10 %	20 %
1º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7º dia	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (25%)
14º dia	2 (25%)	0 (0)	1 (25%)	1 (25%)
21º dia	1 (12,5%)	1 (25%)	2 (50%)	2 (50%)
28º dia	8 (100%)	2 (50%)	4 (100%)	3 (75%)
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 1% p = 0,414				
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 10% p = 0,392				
Controle <i>versus</i> Controle NEFIDINA 20% p = 0,414				

5.4 COMPARAÇÃO DOS GRUPOS CONTROLE E NIFEDIPINA QUANTO À ÁREA DA FERIDA

O modelo nos mostra que há uma redução média de 0,188 cm² na área das feridas a cada 7 dias de tempo de observação, redução esta estatisticamente significativa (p<0,001). Porém, quando comparados os grupos, a diferença média ao longo do tempo foi de 0,016cm², não havendo diferença estatisticamente significativa na redução da área da ferida no período analisado. A média da medida da ferida, independente do grupo, foi de 5,552 cm², de acordo com a constante do modelo (Tabela 18).

Esses achados do modelo podem ser observados nos gráficos 4 e 5, onde o gráfico 4 expressa a trajetória da medida da área de cada ferida, nos grupos NFD e controle, e o gráfico 5 mostra a trajetória média da medida da área das feridas dos dois grupos, sendo identificada uma igualdade no comportamento nos diferentes momentos analisados.

Tabela 18. Coeficientes do modelo de regressão linear de efeitos mistos na análise da associação do comportamento da medida da área da ferida ao longo do tempo segundo grupos controle e NFD.

Área	Coeficiente β	IC (95%)	p-valor
Momentos	-0,188	-0,200 a -0,176	<0,001
Grupos	0,016	-0,252 a 0,285	0,904
Constante	5,552	5,276 a 5,825	<0,001

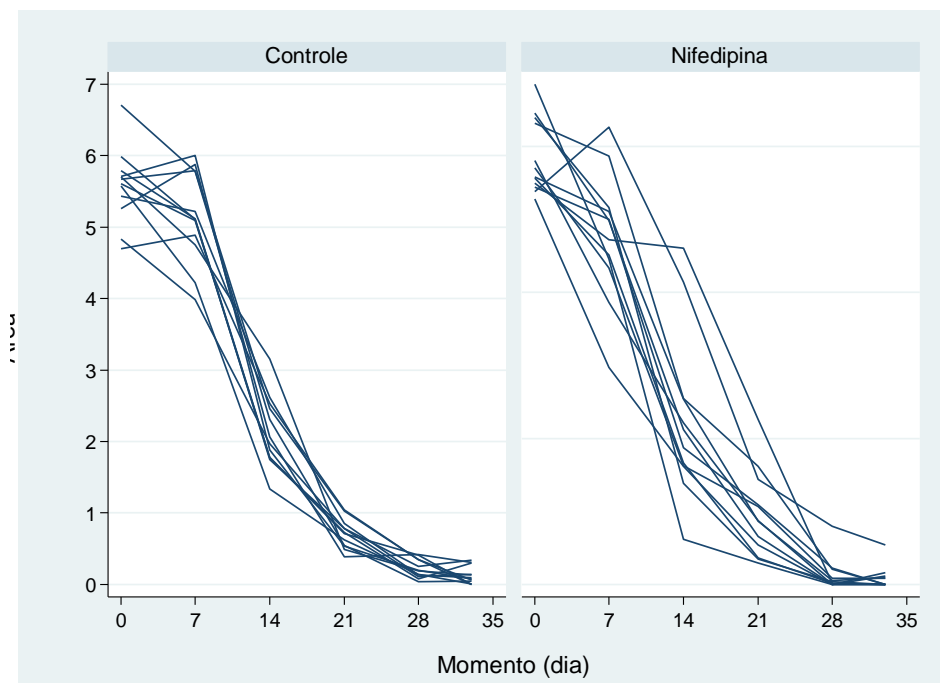


Gráfico 4. Trajetórias das áreas das feridas segundo os grupos controle e NFD.

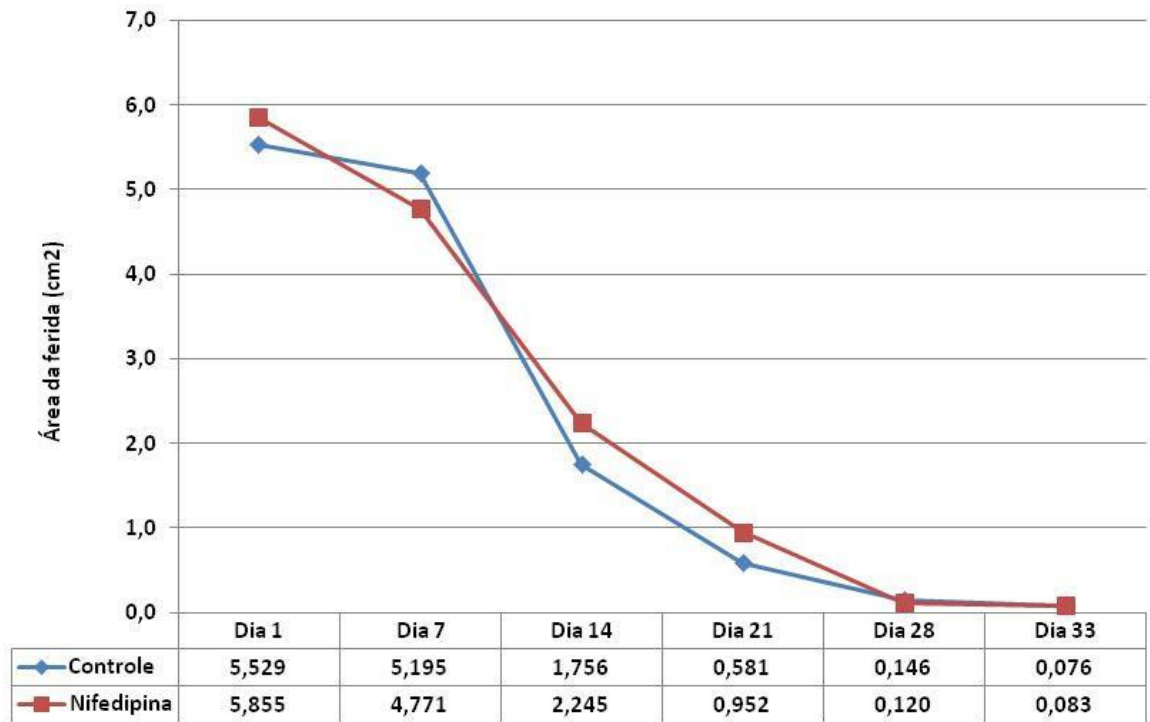


Gráfico 5. Área média das feridas segundo os grupos controle e NFD.

6. DISCUSSÃO

Nossa pesquisa avaliou os dados dos efeitos da NFD na forma tópica, em 32 ferimentos de quatro animais distintos do mesmo modelo (suíno), tido como padrão para estudo sobre cicatrização de feridas cutâneas (SULLIVAN, 2001; HENGGE; WALKER; VOGEL, 1996; BERNATCHEZ et al., 1998; TFAILI et al., 2012; SEATON; HOCKING; GIBRAN, 2015; VOLK; BOHLING, 2013). A coleta ocorreu em seis momentos diferentes, permitindo que observássemos o processo de cicatrização em ferimentos tratados diretamente com a NFD, assim como naqueles que sofreram alguma influência do efeito sistêmico ocorrido pela absorção do medicamento (controles de cada animal 1, 2 e 3) e naqueles sem qualquer exposição (animal 4).

A utilização de três concentrações diferentes da NFD (1%, 10% e 20%), respectivamente nos três primeiros animais, foi para se tentar estabelecer qual seria a concentração que provocaria melhor resposta histológica ou de redução da área de cicatrização, com menor efeito sistêmico.

A análise comparativa entre as feridas tratadas com NFD e as feridas que utilizaram apenas placebo, em cada animal individualmente, ou seja, porco 1 (NFD 1% vs placebo), porco 2 (NFD 10% vs placebo) e porco 3 (NFD 20% vs placebo) revelou que houve uma resposta acentuada progressiva e estatisticamente significativa em relação aos PMNs, de acordo com a concentração [1% (OR 3,5/ $p=0,044$), 10% (OR 11,8/ $p<0,001$) e 20% (OR 22,1/ $p<0,001$)].

Tal resposta progressiva não é percebida em relação aos outros parâmetros (macrófagos, linfócitos, proliferação vascular, fibroblastos, colágeno e queratinócitos), entretanto, no animal 3 especificamente que utilizou a maior concentração (20%), observamos diferença estatística entre os ferimentos também em relação aos linfócitos, proliferação vascular, formação do colágeno e queratinócitos. Sendo que, os ferimentos que fizeram uso do creme apresentaram mais resposta acentuada para linfócitos (OR 11,1/ $p = 0,049$) e proliferação vascular (OR 4,84/ $p=0,019$) e, ao mesmo tempo, menos resposta acentuada para colágeno (OR 0,02/ $p=0,005$) e queratinócitos (OR 0,05/ $p=0,023$).

Quando avaliamos os 12 ferimentos tratados com NFD (independentemente da concentração) em relação aos 12 ferimentos tratados com placebo nos três primeiros animais, percebemos que persistem resultados estatisticamente significativos a favor dos ferimentos tratados com medicamento no aumento dos

PMNs (OR 8,48/ $p < 0,001$), no aumento da proliferação vascular (OR 2,24/ $p = 0,019$) e na diminuição nos níveis de colágeno (OR 0,06/ $p = 0,006$). Ou seja, mesmo quando colocamos os vários fatores que poderiam provocar algum viés nos resultados (exposição a concentrações diferentes da NFD, coleta, interpretação da histologia, número dos ferimentos, cuidados com os animais durante o tempo da pesquisa), encontramos resultados estatisticamente significativos para PMNs, proliferação vascular e colágeno.

Para entender se havia absorção sistêmica do medicamento, comparamos os controles dos porcos 1, 2 e 3 com os controles do porco 4. Nenhum desses ferimentos recebeu medicamento. Entretanto, os ferimentos dos três primeiros animais poderiam sofrer influência de um possível efeito sistêmico provocado pela absorção da NFD nos ferimentos tratados diretamente com a medicação. Já no animal 4, isso não ocorreria porque todos os ferimentos foram tratados exclusivamente com placebo.

Dessa forma, verificamos que, nos ferimentos controles dos três primeiros animais, mesmo sem exposição direta à NFD, houve aumento estatisticamente significativo de PMNs em todas as concentrações quando comparados com os ferimentos controles do animal 4. Houve também, maior resposta com relação aos linfócitos no porco 1 e mais proliferação vascular no porco 2 quando comparados ao porco 4. Esses resultados sugerem que a NFD tópica possa ter algum efeito sistêmico, sobretudo em relação ao aumento dos PMNs.

Estudos avaliando a resposta da NFD na forma tópica, utilizando o modelo animal proposto neste estudo ainda são escassos. Miller et al. (1985) analisaram 16 porcos, sendo 8 expostos à NFD e 8 controles, com 4 ferimentos em região dorsal cada um. O estudo não mostrou diferença estatística entre os grupos, mas chamamos à atenção pela via de administração da droga (oral) e os parâmetros utilizados para avaliar os resultados (apenas tamanho do ferimento).

A utilização da NFD para estudos sobre cicatrização é mais encontrada em roedores (ratos), seja na forma oral (PAL, KHAZANCHI e MOUDGIL, 1991; BRASHAR, UDUPA, S. e UDUPA, A, 2005; PATIL, AGNIHOTRI e SINGH, 2009) ou tópica. Ebadi et al. (2003) estudaram o efeito da NFD tópica na concentração de 3% em ratos diabéticos e não diabéticos. Ao final do experimento, houve maior resposta no escore da fase de inflamação nos animais que fizeram uso da NFD tópica, tanto nos diabéticos (14,5 vs 6,5; $p < 0,005$) como nos não diabéticos (11,3 vs 5,8; $p < 0,05$).

em relação ao placebo. Ainda no grupo dos diabéticos, a utilização da NFD também interferiu na fase de maturação (7,4 vs 13,6; $p < 0,05$). Em ambos, não houve diferença em relação à fase de proliferação.

Davis et al. (1999) avaliaram a evolução de retalhos provocados na região dorsal de 61 ratos, utilizando três medicamentos na forma tópica (NFD, salicilato de trolamina e nitroglicerina). Os animais foram divididos em seis grupos sendo grupo 1 (controle - vaselina inerte), grupo 2 (NFD), grupo 3 (salicilato de trolamina), grupo 4 (nitroglicerina), grupo 5 (combinação de NFD e nitroglicerina) e grupo 6 (NFD, nitroglicerina e salicilato de trolamina). Os resultados mostraram que houve uma redução estatisticamente significativa da área, em todos os grupos que fizeram uso das medicações tópicas em relação ao controle.

Apesar da importância inquestionável dos estudos sobre cicatrização da pele utilizando ratos como modelo experimental, salientamos que não é o modelo ideal para pesquisas que examinam essa questão, tendo em vista as grandes diferenças em relação à pele humana (espessura fina da derme e epiderme, musculatura envolta no tecido celular subcutâneo, maior elasticidade, grande concentração de folículos pilosos, cicatrização predominantemente através de contração e a resposta do sistema imune muito diferente) (SULLIVAN, 2001; KIM; MUSTOE; CLARK, 2015; WANG et al., 2000; GALLANT-BEHM; HART, 2006; JUNG et al., 2013).

A cicatrização ocorre em três fases distintas (inflamação, proliferação e maturação), apesar de acontecerem simultaneamente (LEONG; PHILLIPS, 2015; AGHA et al., 2011; SMITH, 2000). Na primeira fase, acontece a chegada de células inflamatórias, a partir dos vasos remanescentes no leito da ferida. Acreditamos que o efeito vasodilatador da NFD pelo bloqueio da entrada de cálcio nas células endoteliais, favoreça o aparecimento tão importante dos PMNs encontrado no nosso estudo (OIGMAN e FRITSCH, 1998; BROWN et al., 2000; BOMBIG e PÓVOA, 2009; JARDIM, P., JARDIM, T. e SOUZA, 2013; DOLLERY, 1991).

Os PMNs expressam moléculas de adesão na superfície que interagem com ligantes específicos do endotélio, atravessando a parede dos vasos no espaço entre as células endoteliais (LEONG e PHILLIPS, 2015; SINGER E CLARK, 1999; MENDONÇA E COUTINHO-NETTO, 2009; TAZIMA, VICENTE E MORIYA, 2008; MARTIN E LEIBOVICH, 2005; JUNKER, CATERSON e ERIKSSON, 2013; ROSS; PAWLINA, 2016). Assim, a NFD poderia facilitar a chegada dessas células inflamatórias ao leito da ferida, tendo em vista o aumento do espaço intercelular

provocado pela dilatação dos vasos (OIGMAN; FRITSCH, 1998; BOMBIG; PÓVOA, 2009; JARDIM, P.; JARDIM, T.; SOUZA, 2013; HAFNER et al., 2010; GASSER, 1991; FISHER; SNART, 1984).

Ainda na fase inflamatória, no animal 3, que utilizou a maior concentração (20%), observamos também diferença estatística em relação aos linfócitos. Essas células estão relacionadas ao sistema imune, sendo encontradas normalmente na circulação periférica (JUNQUEIRA; CARNEIRO 2013). A resposta mais acentuada dos linfócitos, nos ferimentos tratados com o creme a 20%, pode ter sido devido à ação da NFD, já que o mecanismo de atravessar a parede dos vasos é semelhante entre os leucócitos (MARTIN; LEBOVICH, 2005), ou seja, a passagem dessas células para o leito da ferida fica facilitada pelo aumento do espaço intercelular endotelial ocasionado pela vasodilatação.

A outra célula da fase inflamatória, investigada na nossa pesquisa, foi o macrófago. Surge na ferida a partir da conversão sofrida pelos monócitos, sendo responsável por coordenar o restante dessa fase, através da intensa liberação de mediadores, a partir do segundo dia (NEVES, 2015; ROSS; PAWLINA, 2016; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; LEONG; PLILLIPS, 2015). Nos ferimentos tratados com NFD 1%, houve aumento da resposta acentuada (OR 1,4/p=0,682), entretanto houve diminuição progressiva nos ferimentos tratados com NFD 10% (OR 0,27/p=0,137) e 20% (OR 0,16/p=0,111), respectivamente. Ou seja, apesar de não ter havido resultado estatisticamente significativo, os resultados sugerem que, nas concentrações maiores, ocorre inibição dos macrófagos.

Mesmo que ainda não se compreenda ao certo os mecanismos quimiotáticos para os macrófagos, percebe-se um aumento importante da concentração de cálcio na fase inflamatória, dessa forma, a inibição da entrada desse íon pelos bloqueadores de canal de cálcio podem interferir na maturação e na síntese de mediadores inflamatórios (LANSDOWN, 2002). Antes mesmo da interferência direta sobre os macrófagos, mostrou-se que, para haver ativação dos monócitos (células precursoras dos macrófagos), faz-se necessário o influxo de cálcio através dos canais específicos, tendo sido demonstrado em estudo *in vitro* que a NFD foi capaz de diminuir, nessas células, a produção de citocinas que influenciam na cicatrização de feridas (interleucinas 1 e 6, fator de necrose tumoral alfa e interferon gama) (MATSUMORI, A.; NISHIO, R.; NOSE, Y, 2010).

A fase proliferativa é o momento de preparação da ferida para ser reparada. Nessa fase, ocorrem três etapas distintas: angiogênese, fibroplasia e epitelização (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). A formação de novos vasos (angiogênese) acontece pela migração de células endoteliais dos vasos pré-existentes, através dos espaços intercelulares da parede desses mesmos vasos, facilitada pela vasodilatação (LEONG; PLILLIPS, 2015; AKHAVANI et al., 2008; FOLKMAN; SHING, 1992; ARNOLD; WEST, 1991; O'REILLY et al., 1997). Possivelmente, o efeito vasodilatador da NFD interferiu nessa etapa da cicatrização, tendo em vista a maior ocorrência de proliferação vascular encontrada nos ferimentos tratados com o creme. Entretanto, esse efeito só foi observado na maior concentração (20%) isoladamente ou quando avaliamos todos os ferimentos tratados com NFD em relação aos controles dos três primeiros animais (OR 4,84/ $p=0,019$ e OR 2,24/ $p=0,019$, respectivamente). O aumento da proliferação vascular não foi acompanhado de um aumento estatisticamente significativo do número de fibroblastos. Essas células já existem nos tecidos de forma quiescente. Talvez a vasodilatação não seja tão importante para a chegada dessas células aos locais de ferimento como é para as células inflamatórias e para a própria proliferação vascular, tendo em vista que seu deslocamento ocorre mais por movimento próprio (diapedese) estimulado pelos fatores quimiotáticos (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Na fase proliferativa, os fibroblastos assumem a responsabilidade de conduzir a cicatrização por produzirem proteínas essenciais da matriz-extracelular, dentre elas, o colágeno (fibroplasia). São células que já estão presentes no tecido conjuntivo em estado de repouso, sendo ativadas e diferenciadas pelo estímulo dos mediadores inflamatórios liberados principalmente pelos macrófagos e plaquetas (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008; BOGGIO, 2008). No nosso estudo, nenhuma concentração mostrou resultado estatisticamente significativo em relação a esse parâmetro. Entretanto, pesquisas com cultura de fibroblastos indicam a importância do cálcio na estabilização da membrana plasmática, assim como na migração, proliferação e regulação na síntese de proteínas e mediadores da cicatrização por essas células (LANSDOWN, 2002; BOGGIO, 2008; WEIMANN; HERMANN, 1999).

Ainda na fase proliferativa, há início da síntese do colágeno a partir dos fibroblastos. Isso persiste até a fase de maturação onde passa a haver um equilíbrio entre a produção e a degradação, sendo a força tênsil da cicatriz mantida pelas ligações cruzadas entre os feixes de colágeno (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). No nosso estudo, houve diminuição estatisticamente significativa do colágeno nos ferimentos tratados com NFD a 20% isoladamente (OR 0,02/p=0,005) e quando avaliamos todos os ferimentos tratados com NFD em relação aos controles dos três primeiros animais (OR 0,06/p=0,006). O cálcio funciona estimulando a síntese proteica, sobretudo quando está associado a uma proteína citosólica (calmodulina), formando o complexo cálcio-calmodulina. Este composto participa na liberação do ácido araquidônico proveniente da membrana plasmática, permitindo a produção de importantes estimuladores do processo de cicatrização (prostaglandinas e leucotrienos), além de atuar também na produção da proteína C quinase a qual atua estimulando a proliferação dos fibroblastos (BOGGIO, 2008; KANG; LEE; HIGGINBOTHAM, 1997). ROTH (1996) mostrou que a ausência de cálcio no interior de fibroblastos, provocada por bloqueadores dos canais de cálcio, interferiu na síntese do colágeno de forma significativa. De forma semelhante, (LEE; PING, 1990), descreveram que fibroblastos expostos à NFD (*in vitro*) apresentam diminuição da incorporação da prolina na matriz extra-celular. A prolina, assim como a lisina, é excretada da célula como uma molécula de pró-colágeno. Após sofrer modificações da sua estrutura por proteases do meio extra-celular, converte-se em monômeros que, quando unidos, ajudam na formação das fibras de colágeno (LEONG; PLILLIPS, 2015; BOGGIO, 2008).

Quando ocorre mais síntese do que degradação do colágeno, os pacientes apresentam cicatrizes hipertróficas (proliferação dentro das margens da ferida que pode regredir com o tempo) ou queloides (proliferação além das margens da ferida que normalmente não regride com o tempo). Essas cicatrizes proliferativas provocam efeitos não desejáveis do ponto de vista estético e, dependendo da área do corpo como, por exemplo, articulações, também provocam limitação funcional (LEONG; PLILLIPS, 2015; BOGGIO, 2008). Portanto, é possível que a utilização de um creme à base de NFD tenha algum efeito benéfico em pessoas com tendência a essas duas situações.

Boggio et al. (2014) estudaram o efeito de um bloqueador de canal de cálcio (verapamil) na cicatriz de pacientes submetidos à cirurgia plástica. Foram recrutados

120 casos (60 de mamoplastia e 60 de abdominoplastia), sendo divididos em dois grupos (A - controle e B - experimento). Os pacientes do grupo experimento fizeram uso de um gel à base de verapamil (bloqueador de canal de cálcio) duas vezes por dia a partir do sétimo dia de cirurgia, durante 90 dias. A comparação entre os grupos mostrou uma melhor qualidade do aspecto estético das feridas nos pacientes que fizeram uso do medicamento, tanto nas mamoplastias como nas abdominoplastias (80% e 75,2% *versus* 48% e 51,2%, respectivamente, $p < 0,05$).

A epitelização ocorre já a partir das primeiras 24 horas com a participação dos queratinócitos que estão localizados nas margens da lesão e nos folículos pilosos mais próximos. Essas células participam recobrando a ferida, formando uma crosta e também auxiliam na contração da ferida (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Estudos com cultura de queratinócitos descrevem a importância do cálcio para que ocorra a migração e proliferação dessas células (RESING, 1993; SANTORO; GALDINO, 2005; YUSPA et al., 1988). Além disso, a citocina que promove esse estímulo (KGF - Fator de Crescimento dos Queratinócitos) é produzida pelos fibroblastos que, como já discutimos acima, também sofre inibição na falta de cálcio (LEONG; PLILLIPS, 2015; MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). No nosso estudo, houve redução dos queratinócitos apenas nos ferimentos tratados com NFD a 20% em relação aos controles do mesmo animal (OR 0,05/ $p = 0,023$).

Assim, o bloqueio da entrada do cálcio nas células, pela NFD, pode ter promovido inibição na produção de colágeno pelos fibroblastos e diminuição do número de queratinócitos nas feridas do animal 3, porém, na comparação dos 12 ferimentos tratados com medicação com os 12 ferimentos tratados com placebo, apenas o colágeno sofreu interferência. Provavelmente, esse achado ocorreu pelo fato dos queratinócitos continuarem ativos mesmo em baixas concentrações desse íon (LANSDOWN, 2002).

Na maturação, ocorre diminuição importante do tecido de granulação formado na fase proliferativa, assim como dos fibroblastos e a ferida passa a apresentar maior resistência tênsil, devido às ligações cruzadas entre as fibras de colágeno. Nessa fase, a ferida diminui rapidamente de tamanho e sofre um processo de remodelamento (LEONG; PLILLIPS, 2015; SINGER; CLARK, 1999; TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). Para avaliar esta última etapa, acompanhamos, durante o período da pesquisa, o tamanho da área dos ferimentos. Quando comparamos

todos os ferimentos tratados com NFD com os controles, percebemos que houve uma redução importante das feridas que utilizaram o medicamento na primeira semana, entretanto esse efeito foi perdido a partir do décimo quarto dia, acabando por cicatrizarem praticamente ao mesmo tempo (gráfico 5). Acreditamos que os benefícios obtidos nas fases iniciais com o aumento das células inflamatórias (PMNs e linfócitos) e da proliferação vascular, foram compensados pela inibição dos queratinócitos e diminuição na produção de colágeno. Assim, essa capacidade de estimular algumas células e inibir outras, pode ter contribuído para o fato de não ter havido diferença estatisticamente significativa em relação à redução da área no período final da pesquisa.

Alguns autores utilizam a NFD por via oral para feridas cutâneas relacionadas ao vasoespasma arteriolar como as úlceras hipertensivas e as úlceras da esclerodermia, devido a melhor perfusão tecidual (HAFNER et al., 2010; FREIRE; FERNANDES; PINEIRO-MACEIRA, 2006; WOO et al., 1984; GASSER, 1991). Estudos mostram que acontece aumento da velocidade do fluxo capilar, observada através da capilorosopia e diminuição da resistência periférica, indicando vasodilatação arteriolar com consequente melhora da oferta de oxigênio e nutrientes para os tecidos, em pacientes que utilizaram nifedipina por via oral (GASSER, 1991; FISHER; SNART, 1984; BELCARO; NICHOLAIDES, 1989; CESARONE; LAURORA; BELCARO, 1992).

A NFD tópica para tratamento de feridas cutâneas é descrita na prática médica com relatos de casos isolados sem padronização das concentrações, ou seja, é prescrita sem que haja uma recomendação na bula do produto (*off-label*) (SMITH, 2010).

Torsiello e Kopacki (2000) relataram dois casos. O primeiro caso é de uma mulher de 43 anos portadora de diabetes que apresentava uma úlcera em calcâneo direito há sete anos. Utilizou-se um preparado de nifedipina a 8% duas vezes ao dia, sendo obtida a cicatrização no período de 8 semanas e sem efeitos colaterais. O segundo caso foi de um garoto de 8 anos que sofreu necrose da pele do pé no lugar que foi colocado um expansor para corrigir uma área de cicatriz hipertrófica prévia. Para o tratamento dessa área necrosada, foi feito uso tópico de nifedipina a 2% duas vezes por dia, com o paciente apresentando cicatrização completa em três semanas.

Israel (2003) também relatou o caso de um homem de 55 anos tratado de uma úlcera na perna esquerda, após fratura devido queda de aproximadamente 3,5 metros. Já vinham sendo feitos desbridamentos e curativos por dois anos, sem sucesso. Após 42 dias de tratamento com NFD tópica a 16% associada a um outro gel para fim analgésico contendo misoprostol 0,0024%, fenitoína 1%, metronidazol 2% e lidocaína 2%, o paciente apresentou uma redução de 95% da área da ferida.

A NFD tópica ainda é encontrada na literatura como sendo efetiva no tratamento de pacientes portadores de fissura anal ou de pós-operatório de hemorroidectomia. Nestes casos, acredita-se que o mecanismo de ação se deva pelo fato da NFD promover um relaxamento das células musculares lisas do próprio canal anal que se encontra hipertônico. Assim, a inibição do espasmo muscular dessa região proporciona alívio da dor e melhora da perfusão local, facilitando a cicatrização dessas lesões (AGRAWAL; KAUSHAL; GUPTA, 2013; GOLFAM et al., 2010; BASSO et al., 2011).

A alta prevalência dos ferimentos de pele, em todas as faixas etárias, com todos os custos envolvidos, sejam sociais, emocionais ou econômicos, faz com que haja uma busca por medicamentos que possam ajudar na recuperação dos pacientes (SCHUBERT, 2003; SOARES, 2012; MESQUITA, 2013; HONSIK et al., 2007; NICKS et al., 2010).

O presente estudo, portanto, sugere que a NFD tópica possa interferir na cicatrização de feridas principalmente na concentração de 20%, tendo em vista que atua nas três fases da cicatrização (inflamatória, proliferativa e maturação), promovendo principalmente aumento de células inflamatórias (PMNs e linfócitos), aumento da proliferação vascular e diminuição do colágeno e queratinócitos, respectivamente.

Trabalhos futuros poderão confirmar esses efeitos, assim como identificar qual seria o melhor momento para utilização da NFD na forma tópica para se obter os benefícios específicos de cada etapa do processo de cicatrização.

As principais limitações do nosso estudo foram: ausência na literatura de uma concentração específica da NFD na forma tópica o que nos obrigou a testar três concentrações diferentes, assim como a falta de parâmetros específicos que permitissem uma comparação mais fidedigna das respostas encontradas na histologia, número relativamente pequeno de animais e não possibilidade de cálculo amostral por questões éticas.

7. CONCLUSÕES

- A utilização da NFD tópica provoca aumento dos polimorfonucleares, independente da concentração. Na concentração de 20%, além do aumento dos polimorfonucleares, ocorre também maior resposta dos linfócitos.
- A NFD tópica nas concentrações menores (1% e 10%) não provoca alteração na fase proliferativa, entretanto, há aumento da proliferação vascular e diminuição dos queratinócitos nos ferimentos tratados com o creme na concentração de 20%.
- Ferimentos tratados com nifedipina tópica na concentração de 20% apresentam diminuição da formação de colágeno.
- As três concentrações utilizadas neste estudo provocaram resposta na fase inflamatória, porém apenas a maior (20%) interfere também nas fases de proliferação e maturação.
- É possível que haja absorção sistêmica da NFD tópica, provocando aumento principalmente de polimorfonucleares em locais não tratados diretamente com o medicamento.
- Não há diferença em relação ao tempo final de cicatrização entre os ferimentos tratados com NFD e os controles.

REFERÊNCIAS

- ADLER, A. I. et al. Lower-extremity amputation in diabetes. The independent effects of peripheral vascular disease, sensory neuropathy, and foot ulcers. **Diabetes Care**, v. 22, n. 7, p. 1029-1035, 1999.
- AGALE, S. V. Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis and management. **Ulcers**, p.1-9, 2013.
- AGHA, R. et al. A Review of the Role of Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing. **Journal of Surgical Research**, v. 171, n. 2, p. 700-708, 2011.
- AGRAWAL, V.; KAUSHAL, G.; GUPTA, R. Randomized controlled pilot trial of nifedipine as oral therapy vs topical application in the treatment of fissure-in-ano. **The American Journal of Surgery**, v. 206, p. 748-751, 2013.
- AGUIAR, E. T. de et al. Úlcera de insuficiência venosa crônica. **J. Vasc. Br.**, v. 4, supl. 2, p. 195-200, 2005.
- AGUS, G.B. et al. Guidelines for the diagnosis and therapy of the vein and lymphatic disorders. **Int Angiol**. v. 24, n. 2, p. 107-68, 2005.
- AKHAVANI, M. A. et al. Angiogenesis and plastic surgery. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 61, n. 12, p. 1425-1437, 2008.
- ALSAAD, S. M. S. et al. Analysis of depth of ablation, thermal damage, wound healing, and wound contraction with erbium YAG laser in a Yorkshire pig model. **Journal of Drugs in Dermatology**, v. 14, n. 11, p. 1245-1252, 2015.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/260079/5ª+edição>>. Acesso em: 10 set. 2016.

_____. **Resolução RDC n. 67, de 08 de outubro de 2007:** dispõe sobre boas práticas de manipulação de preparações magistrais e oficinais para uso humano em farmácias. 2007. Disponível em:

<<http://www20.Anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/item/rdc-67-de-8-de-outubro-de-2007>>. Acesso em: 10 set. 2016.

APFEL, S. C. Neurotrophic factors and diabetic peripheral neuropathy. **European Nerulogy**, v. 41, n. I, p. 27-34, 1999.

ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacol Ther.**, v. 52, p. 407-422, 1991.

BASSO, M. P. et al. Comparação do efeito do metronidazol tópico 10% associado à nifedipina tópica 0,3% versus nifedipina tópica 0,3% isolada no pós-operatório de hemorroidectomia pela técnica híbrida. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 31, n. 2, p. 131-138, 2011.

BELCARO, G.; NICHOLAIDES, A. Microvascular evaluation of the effects of nifedipine in vascular patients by laser-Doppler flowmetry. **The Journal of Vascular Diseases**, v. 40, n. 8, p. 689-694, 1989.

BERNATCHEZ, S. F. et al. Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. **Wound Rep Reg**, v. 6, p. 223-233, 1998.

BOGGIO, R. F. **Efeitos do bloqueador de canal de cálcio (verapamil) sobre fibroblastos dérmicos humanos**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2008.

BOGGIO, R. F. et al. Topical verapamil as a scar modulator. **Aesth Plast Surg.**, v. 38, p. 968-975, 2014.

BOMBIG, M. T. N.; PÓVOA, R. Interações e associações de medicamentos no tratamento anti-hipertensivo: antagonistas dos canais de cálcio. **Rev Bras Hipertens.**, v. 16, n. 4, p 226-230, 2009.

BORNSTEIN, J. et al. Topical nifedipine for the treatment of localized provoked vulvodynia: a placebo-controlled study. **J Pain.**, v. 1, n. 12, p. 1403-1409, 2010.

BOYCE, D. E. et al. The role of lymphocytes in human dermal wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 143, n. 1, p. 59-65, 2000.

BRASHAR, H. N.; UDUPA, S. L.; UDUPA, A. L. Effect of nifedipine and amlodipine on dead space wound healing in rats. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 43, n. 3, p. 294-296, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Impacto da violência na saúde dos brasileiros**. Brasília, 2005. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Presidência da República. **Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008**. 2008. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 10 set. 2016.

BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532-1535, 2004.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. A brief history of wound care. **Plast Reconst Surg**, v. 117, n. 6, p. 6-11, 2006.

BROWN, M. J. et al. Morbidity and mortality in patients randomised to double-blind treatment with a long-acting calcium-channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a Goal in Hypertension Treatment (INSIGHT). **The Lancet**, v. 356, p. 366-372, 2000.

CESARONE, M. R.; LAURORA, G.; BELCARO, G. V. Microcirculation in systemic hypertension. **Angiology.**, v. 43, n. 11, p. 899-903, 1992.

CHAMANGA, E. T. Understanding the impact of leg ulcer bandaging on patient quality of life. **JCN**, v. 28, n. 1, p. 40-47, 2014.

CHIU, H. Y.; TSAI, T. F. Topical use of systemic drugs in dermatology. A comprehensive review. **J Am Acad Dermatol.**, v. 65, p. 1048, 2011.

DAVIS, R. E. et al. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. **Arch Facial Plast Surg.**, n. 1, p. 27-32, 1999.

DEMIDOVA-RICE, T.N. et al. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. **Adv Skin Wound Care.** v. 25, n. 7, p. 304–314, 2012.

DE SANTIS, A. K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina:** desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

DOLLERY, C. Clinical pharmacology of calcium antagonists. **Am J Hypertens**, v. 4(suppl), p. 88S-95S, 1991.

EBADI, A. et al. Healing effect of topical nifedipine on skin wounds of diabetic rats. **DARU**, v. 1, n. 1, p. 1-4, 2003.

ELENITSAS, R. et al. Laboratory Methods. In: ELDER, D. E. et al. **Histopathology of Skin**. 5. ed. s. l.: Lippincott Williams and Wilkins, 2009.

FAVAS, P. M. M. S. **Prevalência e características das feridas na população do distrito de Leiria**. 2012. Dissertação (Mestrado em Feridas e Viabilidade Tissular) - Universidade Católica Portuguesa, 2012.

FISHER, M. M.; SNART, A. G. Nifedipine in ulnar artery occlusion. **Journal of Vascular Diseases**, v. 5, p. 320-328, 1984.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J Biol Chem.**, v. 267, p. 10931-10934, 1992.

FORREST, R. D. Early history of wound treatment. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 75, n. 3, p. 198-205, 1982.

FRANZ, M. G.; STEED, D. L.; ROBSON, M. C. Optimizing healing of the acute wound by minimizing complications. **Curr Probl Surg**, v. 44, p. 691-763, 2007.

FRANÇA, L.H.G.; TAVARES, V. Insuficiência venosa crônica. Uma atualização. **J Vasc Br.** v. 2, n. 4, p. 318-328, 2003.

FREIRE, B. M.; FERNANDES, N. C.; PINEIRO-MACEIRA, J. Úlcera hipertensiva de Martorell: relato de caso. **An Bras Dermatol.**, v. 81, n. 5, supl. 3, p. 327-331, 2006.

GABBIANI, G.; CHAPONNIER, C.; HUTTNER, I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. **J Cell Biol.**, v. 76, p. 561-568, 1978.

GALLANT-BEHM, C. L.; HART, D. A. Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. **Wound Rep Reg.**, v. 14, p. 46-54, 2006.

GARROS, I. C. et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, supl 3, p. 55-65, 2006.

GASSER, P. Reaction of capillary blood cell velocity in nailfold capillaries to nifedipine and ketanserin in patients with vasoospastic disease. **The Journal of International Medical Research**, v. 19, p. 24-31, 1991.

GOLFAM, F. et al. The effect of topical nifedipine in treatment of chronic anal fissure. **Acta Medica Iranica**, v. 8, n. 5, p. 295-299, 2010.

HAFNER, J. et al. Martorell hypertensive ischemic leg ulcer: a model of ischemic subcutaneous arteriolosclerosis. **Arch Dermatol.**, v. 146, n. 9, p. 961-968, 2010.

HAMMAR, H. Wound healing. **Int J Dermatol.**, v. 32, p. 6-15, 1993.

HENGGE, U. R.; WALKER, P. S.; VOGEL, J. C. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. **J Clin Invest.**, v. 97, n. 12, p. 2911-2916, jun., 1996.

HOLLANDER, D. A. et al. Standardized qualitative evaluation of scar tissue properties in an animal wound healing model. **Wound Repair Regen.**, v. 11, n. 2, p. 150-157, mar.-abr., 2003.

HOLZER, S. E. S. et al. Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. **Clinical Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 169-181, 1998.

HONSIK, K. A. et al. Sideline skin and wound care for acute injuries. **Current Sports Medicine Reports**, v. 6, p. 147-154, 2007.

ISRAEL, A. Topical gel for the treatment of a refractory leg ulcer; case report. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 7, n. 3, p. 176-178, 2003.

JARDIM, P. C. B.; JARDIM, T. S. V.; SOUZA, W. K. S. de. Qual(ais) o(s) antagonistas dos canais de cálcio mais indicado(s) no tratamento da hipertensão arterial? **Rev Bras Hipertens**, v. 20, n. 2, p. 78-82, 2013.

JOHNSTON, K. W. A Perna Cronicamente Isquêmica. In: RUTHERFORD, R. B. (Ed.). **Cirurgia Vascular**. Rio de Janeiro: Dilivros, 2007.

JUNG, Y. et al. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors. **Int Wound J.**, v. 10, p. 295-305, 2013.

JUNKER, J. P.; CATERSON, E. J.; ERIKSSON, E. The microenvironment of wound healing. **J Craniofac Surg.**, v. 24, n. 1, p. 12-16, jan., 2013.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAHLE, B.; HERMANN, H. J.; GALLENKEMPER, G. Evidence-Based Treatment of Chronic Leg Ulcers. **Dtsch Arztebl Int.**, v. 108, n. 14, p. 231-237, 2011.

KANG, Y.; LEE, D.A.; HIGGINBOTHAM, E.J. In vitro evaluation of antiproliferative potential of calcium channel blockers in human Tenon's fibroblasts. **Exp Eye Res**, V. 64, p. 913–925, 1997.

KATZUNG, B. G. Vasodilatadores e tratamento da angina de peito. In: KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia: básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH; 2017.

KIM, D. J.; MUSTOE, T.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing in aging small mammals: A systematic review. Cutaneous wound healing in aging small mammals: A systematic review. **Wound Repair Regen.**, v. 27, p. 1-31, 2015.

LANSDOWN, A.B.G. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. **Wound Repair and Regeneration**. v. 10, n.5, p. 271-285, 2002.

LEE, R. C.; PING, J. Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. **Journal of Surgical Research**, v. 49, p. 463-466, 1990.

LEONG, M.; PHILLIPS, L. G. Cicatrização de feridas. In: TOWNSEND, C. M. et al. **Tratado de Cirurgia: a base biológica da cirurgia moderna**. 19. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An Bras Dermatol.**, v. 78, p. 525-240, 2003.

MARDER, V. J. et al. The field of hemostasis and thrombosis: Selected translational achievements Hemostasis and Thrombosis. In: _____. **Basic Principles and Clinical Practice**. 6. ed. [s. l.]: Lippincott, Williams & Wilkins, 2013.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 11, p. 599-607, 2005.

MATSUMORI, A.; NISHIO, R.; NOSE, Y. Calcium Channel Blockers Differentially Modulate Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Circulation Journal**, v. 74, p. 567-571, 2010.

MEKKES, J. R.; LOOTS, M. A.; VAN DER WAL, A. C. Causes, investigation and treatment of leg ulceration. **Br J Dermatol.**, v. 148, n. 3, p. 388-401, 2003.

MENDONÇA, R. S.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **An Bras Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 257-262, 2009.

MESQUITA, R. M. G. R. **Caracterização do tratamento de feridas complexas em um hospital geral**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Roraima, Roraima, 2013.

MILECH, A. et al. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: A. C. Farmacêutica, 2016.

MILLER, A. P. et al. The lack of effect of nifedipine on failing skin flaps. **J Dermatol Surg Oncol.**, v. 11, n. 6, p. 612-613, 1985.

MIOT, H. et al. Úlceras crônicas dos membros inferiores: Avaliação pela fotografia digital. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 55, n. 2, p. 145-148, 2009.

MOLGAT, Y. M. et al. Comparative study of wound healing in porcine skin with CO₂ laser and other surgical modalities: preliminary findings. **International Journal of Dermatology**, v. 34, n. 1, p. 42-47, 1995.

NELZÉN, O. et al. Chronic leg ulcers: an underestimated problem in primary health care among elderly patients. **J Epidemiol Community Health**, v. 45, n. 3, p. 184-187, set., 1991.

NEVES, E.M.S.F.T. **Macrófago: biologia, diversidade e função**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

NICKS, B. A. et al. Acute wound management: revisiting the approach to assessment, irrigation, and closure considerations. **Int J Emerg Med.**, v. 3, n. 4, p. 399-407, 2010.

NIFEDIPINE. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB01115>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

OIGMAN, W.; FRITSCH, M. T. Antagonistas de canais de cálcio. **Hiperativo**, v. 2, p.104-109, 1998.

OLIN, J. W. Thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). **N Engl J Med.**, v. 343, p. 864-869, 2000.

O'REILLY, M. S. et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell**, v. 88, p. 277-285, 1997.

PAL, S.; KHAZANCHI, R. K.; MOUDGIL, K. An experimental study on the effect of nifedipine on ischaemic skin flap survival in rats. **Br. J. Plast Surg.**, v. 44, n. 4, p. 299-301, 1991.

PATIL, P. A.; AGNIHOTRI, R. L.; SINGH, K. R. Influence of calcium channel blockers on wound healing – an experimental study. **Pharmacology**, v. 2, p. 1125-1135, 2009.

PHILANDRIANOS, C. et al. Comparison of five dermal substitutes in full-thickness skin wound healing in a porcine model. **Burns**, v. 38, p. 820-829, 2012.

PHILIPS, T. et al. A study of the impact of leg ulcers on quality of life: Financial, social, and psychologic implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 1, p. 49-53, 1994.

POOLE-WILSON, P. A. et al. Effect of long-action nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with stable angina requiring treatment (ACTION trial): randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 364, n. 4, p. 849-857, 2004.

PRESSLEY, Z. M. et al. Digital image analysis: a reliable tool in the quantitative evaluation of cutaneous lesions and beyond. **Arch Dermatol.**, v. 43, n. 10, p. 1331-1333, 2007.

RAMSEY, D. T. et al. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

REIBER, G. E. Epidemiologia das úlceras e amputações do pé diabético. In: BOWKER, J. H.; PFEIFER, M. A. (Eds.). **O pé diabético**. Rio de Janeiro: Dilivros, 2002.

REICHENHEIM, M. E. et al. Violência e lesões no Brasil: efeitos, avanços alcançados e desafios futuros. **The Lancet**, p. 75-89, 2011.

RESING, K.A. et al. Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca⁺⁺ in the second stage. **J Biol Chem**, v. 268, p. 25139–45, 1993.

ROSAI, J. Gross Techniques in Surgical Pathology. In: _____. **Surgical Pathology**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia**: texto e atlas. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

ROSS, R.; BENDITT, E. P. Wound healing and collagen formation. **The journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 11, p. 677-700, 1961.

ROTH, M. et al. Ca²⁺ channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 11, p. 5478-82, 1996.

SALMONA, K. B. C. et al. Estudo comparativo entre as técnicas manual e automática de demarcação de borda para avaliação de área de úlceras por pressão. **Enferm. Foco**, v. 7, n. 2, p. 42-46, 2016.

SANTORO, M. M.; GALDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, p. 274-286, 2005.

SCHUBERT, V. Skin ulcers - venous leg ulcers, diabetic foot ulcers and pressure ulcers. **Geriatric Care and Treatment**, p. 215-231, 2003.

SEATON, M.; HOCKING, A.; GIBRAN, N. S. Porcine models of cutaneous wound healing. **Ilar Journal**, v. 56, n. 1, p. 127-138, 2015.

SEN, C. K. et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. **Wound Repair Regen**, v. 17, n. 6, p. 763-771, 2009.

SINGER, A. J.; CLARK, A. F. Cutaneous Wound Healing. **N Engl J Med.**, v. 341, n. 2, p. 738-746, 1999.

SINGER, A. J.; DAGUM, A. B. Current management of acute cutaneous wounds. **N Engl J Med**, v. 359, p.1037-1046, 2008.

SINGER, A. J.; MACCLAIN, A. S. Development of a porcine excisional wound model. **Acad Emerg Med.**, v. 10, n. 10, p. 1029-1033, 2003.

SMITH, P. D. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. **J Surg Res**, v. 92, p. 11-17, 2000.

SMITH, R. G. Off-label use of prescription medication: A literature review. **Wounds**, v. 22, n. 4, p. 78-86, 2010.

SOARES, M. F. **Impacto da úlcera de perna na vida da família**: um estudo de caso. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SULLIVAN, T. P. The pig as a model for human wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 9, n. 2, p. 66-76, 2001.

SVENSJO, T. et al. Accelerated healing of full-thickness skin wounds in a wet environment. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 9, p. 602-612, 2000.

TAZIMA, M. F.; VICENTE, Y. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

TFAILI, S. et al. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. **Analyst**, v. 137, n. 16, p. 3673-3682, ago., 2012.

TORSIELLO, M. J.; KOPACKI, M. H. Transdermal Nifedipine for wound healing: case reports. **Int. J. Pharm. Compounding**, v. 4, n. 5, p. 356-358, 2000.

VARDAXIS, N. J. et al. Confocal laser scanning microscopy of porcine skin: implications for human wound healing studies. **J Anat.**, v. 190, p. 601-611, 1997.

VOLK, S. W.; BOHLING, M. W. Comparative wound healing--are the small animal veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research? **Wound Repair Regen**, v. 21, n. 3, p. 372-381, maio-jun., 2013.

WANG, J. F. et al. Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. **Connective Tissue Research**, v. 41, n. 3, p. 195-211, 2000.

WEIMANN, B.I.; HERMANN, D. Studies on wound healing: effects of calcium d-panetothenate on migration, proliferation and protein synthesis of human dermal fibroblasts in culture. *Int J Vitam Nutr Res*, v. 69, p. 113–119, 1999.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. ***Physiol Rev.***, v. 83 p. 835-870, 2003.

WOO, T. et al. Nifedipine in scleroderma ulcerations. ***International Journal of Dermatology***, v. 23, p. 678-680, 1984.

YUSPA, S. H. et al. Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. ***Annals of The New York Academy of Sciences***, v. 12, p. 191-196, 1988.

ZHANG, Z.; MONTEIRO-RIVIERE, A. Comparison of integrins in human skin, pig skin, and perfused skin: an in vitro skin toxicology model. ***Journal of Applied Toxicology***, v. 17, n. 4, p. 247-253, 1997.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Artigo: EFEITO DA NIFEDIPINA TÓPICA NA OCORRÊNCIA DE LEUCÓCITOS EM FERIDAS DE PELE EM MODELO SUÍNO

1. Introdução

A pele humana é um órgão extremamente sofisticado e evoluído que recobre todo o corpo^{1,2}. Os ferimentos na pele podem acontecer por causas externas ou devido a doenças do próprio paciente e representam, em algumas situações, um desafio para os profissionais de saúde, com elevado custo social, econômico e emocional^{3,4,5}.

O processo de cicatrização acontece a partir do momento em que há o dano e envolve três fases (inflamatória, proliferativa e maturação) que acontecem simultaneamente e se relacionam entre si⁶. Na primeira fase, há o recrutamento das células de defesa como os polimorfonucleares (PMNs), macrófagos e linfócitos que tem a função de combater agentes infecciosos e corpos estranhos^{6,7,8,9,10}.

A nifedipina (NFD) é um medicamento utilizado há mais de três décadas no tratamento da doença hipertensiva, apresentando como efeito a dilatação arteriolar, a partir do bloqueio dos canais de cálcio nas células endoteliais^{11,12,13,14,15}. Alguns autores descrevem que a NFD pode ter algum benefício cicatrizante nos pacientes portadores de lesões crônicas específicas relacionadas a vasoespasma arteriolar como as úlceras hipertensivas e as úlceras da esclerodermia, devido a melhor perfusão tecidual^{16,17,18}. Entretanto, a maioria dos trabalhos avalia a atuação da NFD na forma sistêmica com ingestão oral, sendo a maior parte como relatos de casos, ou ainda, observando o resultado em animais menores (ratos), com pouca praticidade para uso humano, tendo em vista as grandes diferenças entre os tipos de pele^{19,20}.

A pele suína é considerada o melhor modelo experimental para comparação com a pele humana, devido às grandes semelhanças do ponto de vista histológico e funcional. Ambas apresentam, de forma similar, espessura, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, tecido celular subcutâneo e densidade de folículos capilares. Possuem tempo de regeneração da epiderme em torno de trinta dias, assim como a estrutura bioquímica semelhante do colágeno. Além disso, o processo de cicatrização entre os ferimentos nas peles suína e humana acontece através de

reepitalização, diferente dos outros mamíferos menores onde ocorre por contração^{21,22,23,24}.

2. Objetivos

O objetivo primário foi avaliar se feridas de pele tratadas com NFD tem maior recrutamento de PMNs, macrófagos e linfócitos quando comparadas às tratadas com placebo, enquanto o secundário foi identificar eventuais diferenças no recrutamento dessas células com o uso de diferentes concentrações da droga.

3. Metodologia

3.1 Animais

Utilizamos 4 fêmeas saudáveis de porcos da raça Pietrain, com peso entre 15 Kg e 20 Kg. Os animais ficaram em baias individuais apropriadas, com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie. As condições ambientais foram controladas com temperatura de 20 +/- 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo que a umidade relativa do ar e o ruído foram os próprios do ambiente. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Nova Esperança (FAMENE).

3.2 Anestesia

Os animais receberam inicialmente uma dose de xilazina (1-2 mg/Kg) para a sedação e analgesia, em seguida foi administrado como relaxante muscular a ketamina na dose de 2mg/Kg e realizada a entubação oro-traqueal com tubo numero 7. O Plano anestésico foi mantido com o halogenado isoflurano sob máscara inalatória na concentração de 1% a 2%, e com propofol na dose de 20 a 50mg (infusão contínua) em veia auricular, sendo feito o repique de acordo com a resposta do animal. O animal permaneceu sob monitorização dos aspectos ventilatórios e hemodinâmicos durante todo o procedimento^{25,26}.

3.3 Cirurgia

Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito ventral, sendo realizada tricotomia, marcação da área com caneta dermatográfica apropriada para pele de um quadrado (2,5 cm x 2,5 cm), a fim de padronizar o tamanho dos ferimentos.

Fizemos antissepsia com clorexidina degermante, seguida de clorexidina alcoólica a 4% de toda a região dorsal e posicionamos o campo fenestrado esterilizado.

Procedemos com a retirada de pele total até a fáscia muscular dorsal, sendo conseguida hemostasia apenas com compressão local. Limpamos com soro fisiológico 0,9% e, de forma alternada, fizemos o curativo com NFD. Cobrimos com gaze estéril de algodão e atadura de crepom estéril.

3.4 Fluxograma

Os quatro animais foram colocados em baias separadas, sendo identificados pelos números 1, 2, 3 e 4. Cada ferimento recebeu uma letra correspondente, seguindo uma ordem da esquerda para direita e da região cranial à caudal (A, B, C, D, E, F, G, H). O animal 1 recebeu NFD tópica a 1% nas lesões A, D, E e H. O animal 2 recebeu NFD tópica a 10% nas lesões B, C, F e G. O animal 3 recebeu NFD tópica a 20% nas lesões A, D, E e H. Antes de aplicarmos a NFD, umidificamos as feridas com soro fisiológico (SF) 0,9%. Nas demais lesões e no animal 4, o curativo foi feito apenas com SF 0,9%. Realizamos troca de curativo a cada dois dias, assim como nos dias da coleta dos dados. Os 32 ferimentos foram submetidos à biópsia com *punch* de 4 mm nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28

3.5 Avaliação Microscópica

Para efeito de comparação, consideramos 4 graus distintos de acordo com a presença nos cortes histológicos dos agentes envolvidos no processo de cicatrização^{27,28}:

- Ausente (0): quando não se observava a presença.
- Discreto (1): quando observados de forma isolada, sendo possível distinguir com facilidade áreas livres de infiltrado.
- Moderado (2): quando observados de forma irregular, com bastantes áreas livres de infiltrados.
- Acentuado (3): quando observados em grande frequência, formando agregados densos e poucas áreas livres de infiltrados.

3.6 Análise dos Dados

Para a análise de dados histológicos foi aplicado um modelo longitudinal logístico de efeitos mistos. Assim, foi considerada como variável resposta (dependente) a produção acentuada das diferentes células avaliadas tendo como variável explicativa os grupos de comparação (controle, nifedipina 1%, 10% e 20%). Tendo como referência o grupo controle foi estimada a Odds Ratio (OR) com seu respectivo intervalo de confiança para os grupos nifedipina, sendo uma análise independente por dose (para cada porco comparada com seu controle) e uma outra análise independente da dose (grupo tratado e controle considerando todos os porcos). A interpretação de uma OR em um estudo longitudinal consiste na razão de chances da categoria analisada comparada a categoria de referência correspondente ao período em análise, tendo como pressuposto que essa associação é linear em todo o período de análise. A significância estatística adotada no estudo foi de 5% ($p < 0,05$) e o software utilizado foi o SPSS v 21.

4. Resultados

A comparação de feridas tratadas com NFD a 1% *versus* placebo revelou que nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 o recrutamento de PMNs com a droga foi 3 (75%), 4 (100%), 3 (75%), 4 (100%), 0 (0%) e 3 (75%), enquanto com placebo 1 (25%), 0 (0%), 3 (75%), 4 (100%), 1 (25%) e 1 (25%), respectivamente, sendo OR = 3,5 (IC 95%: 1,04 – 11,7), com $p = 0,04$. Não houve diferença estatisticamente significativa em relação aos outros parâmetros (tabela 1).

Em relação aos ferimentos tratados com NFD 10% e o grupo placebo, os resultados foram semelhantes à análise com a NFD 1%, onde apenas na produção dos PMNs houve diferença estatisticamente significativa, sendo que com uma OR maior (OR = 11,8 e $p < 0,001$) (tabela 2).

A comparação de feridas tratadas com nifedipina a 20% *versus* placebo mostra que, nessa dosagem de NFD, houve diferença estatística na produção dos PMNs, com uma OR mais elevada que o animal 2 (OR = 22,1 e $p < 0,001$), e que também ocorre aumento estatisticamente significativo nos níveis acentuados em relação aos linfócitos (OR = 11,1 e $p = 0,049$) (tabela 3).

A comparação de todas as feridas tratadas com NFD (12 feridas) *versus* todas com placebo (12 feridas) revelou que nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28 a presença de PMNs com a droga foi 11 (91,7%), 12 (100%), 7 (58,3%), 9 (75%), 7 (58,3%) e 8 (66%), enquanto com placebo 1 (8,3%), 1 (8,3%), 5 (41,7%), 6 (50%), 4 (33,3%) e 2 (16,7%), sendo OR = 8,48 (IC 95%: 3,99 – 18), $p < 0,001$. Na tabela 4 são demonstradas as comparações em todos os momentos avaliados dos PMNs, macrófagos e linfócitos.

A figura 1 demonstra exemplos de análise histológica de feridas tratadas com e sem NFD, sendo observadas respostas acentuada e discreta de PMNs, respectivamente.

5. Discussão

Nesse estudo, a utilização tópica de NFD a 1%, 10% e 20% em feridas de pele foi associada ao maior recrutamento de PMNs quando comparadas ao uso de placebo. Ao mesmo tempo, quando observamos a resposta dessas células, independente da concentração, foi associada uma maior quantidade de PMNs do que o placebo, com razão de chance 8,4 vezes maior (IC: 3,99 – 18). Foi observado, ainda, que o uso de NFD a 20% foi associado a maior presença de linfócitos, quando comparado ao placebo.

A cicatrização das feridas de pele ocorre em três fases distintas (inflamação, proliferação e maturação), apesar de acontecerem simultaneamente. Destaque-se que, na primeira fase, ocorre a chegada de células inflamatórias, a partir dos vasos remanescentes no leito da ferida^{29,30}.

A administração da NFD por via oral para tratamento de feridas cutâneas relacionadas ao vasoespasma arteriolar (úlceras hipertensivas e as úlceras da esclerodermia), melhora a perfusão tecidual^{16,17,18}.

Estudos demonstraram que, com a NFD por via oral, ocorreu aumento da velocidade do fluxo capilar para os ferimentos, observada através da capilorosopia e diminuição da resistência periférica, indicando vasodilatação arteriolar com consequente melhora da oferta de oxigênio e nutrientes para os tecidos^{31,32,33}.

Parece que esse efeito vasodilatador da NFD^{12,15}, pelo bloqueio da entrada de cálcio nas células endoteliais, favorece o recrutamento de células inflamatórias, tendo em vista que os leucócitos expressam moléculas de adesão na superfície que interagem com ligantes específicos do endotélio, atravessando a parede dos vasos no espaço entre as células endoteliais^{6,7,8,34}. Assim, a NFD poderia facilitar a chegada dessas células inflamatórias ao leito da ferida, já que provoca o aumento do espaço intercelular devido à dilatação dos vasos. Essa seria a possível explicação do maior número de PMNs e linfócitos nas feridas tratadas com a droga no nosso estudo.

Por outro lado, a diferenciação de monócitos em macrófagos depende, em parte, da disponibilidade do cálcio^{35,36}. Como já mencionado, a NFD reduz a disponibilidade desse íon e, possivelmente, essa seja a razão de não ter havido diferença na presença de macrófagos entre os ferimentos que fizeram uso da droga e os ferimentos que fizeram uso do placebo.

Miller e col³⁷ analisaram 16 porcos, sendo que para 8 foi administrado NFD oral e para 8 placebo. Em cada porco foram realizados 4 ferimentos na região dorsal. O desfecho avaliado foi o tamanho do ferimento, não havendo diferença favorável á NFD. Salientamos que, de forma diferente desses autores, nosso estudo utilizou a via tópica e o desfecho mensurado foi a avaliação de células envolvidas na cicatrização.

A utilização da NFD para estudos sobre cicatrização foi também estudada em roedores (ratos), seja na forma oral^{38,39,40} ou na forma tópica.

Ebadi e col⁴¹ estudaram o efeito da NFD tópica na concentração de 3% em ratos diabéticos e não diabéticos. Ao final do experimento, houve melhor escore de inflamação (fase de inflamação) nos animais diabéticos que fizeram uso da NFD tópica, (11,3 vs 5,8; $p < 0,05$). Os autores concluíram que a droga teve impacto positivo na fase inflamatória.

Davis et al⁴² avaliaram a evolução de retalhos provocados na região dorsal de 61 ratos, utilizando três medicamentos na forma tópica (NFD, salicilato de trolamina e nitroglicerina). Os animais foram divididos em seis grupos sendo grupo 1 (controle - vaselina inerte), grupo 2 (NFD), grupo 3 (salicilato de trolamina), grupo 4 (nitroglicerina), grupo 5 (combinação de NFD e nitroglicerina) e grupo 6 (NFD, nitroglicerina e salicilato de trolamina). Os resultados mostraram que houve uma redução estatisticamente significativa da área, em todos os grupos que fizeram uso das medicações tópicas em relação ao controle.

Apesar da importância inquestionável dos estudos sobre cicatrização da pele utilizando ratos como modelo experimental, enfatizamos que não é o modelo ideal para pesquisas que examinam essa questão, tendo em vista as grandes diferenças em relação à pele humana (espessura fina da derme e epiderme, musculatura envolta no tecido celular subcutâneo, maior elasticidade, grande concentração de folículos pilosos, cicatrização predominantemente através de contração e a resposta do sistema imune muito diferente)^{21,43,44,45}.

A NFD tópica para tratamento de feridas cutâneas é descrita na prática médica em relatos de casos isolados sem padronização das concentrações, ou seja, é prescrita sem que haja uma recomendação na bula do produto (*off-label*)⁴⁶.

Torsiello e Kopacki⁴⁷ relataram dois casos. O primeiro caso foi de uma mulher de 43 anos portadora de diabetes Mellitus que apresentava uma úlcera em calcâneo direito há sete anos. Utilizou-se um preparado de nifedipina a 8% duas vezes ao dia,

sendo obtida a cicatrização no período de 8 semanas e sem efeitos colaterais. O segundo caso foi de um menino de 8 anos que sofreu necrose da pele do pé no lugar que foi colocado um expansor para corrigir uma área de cicatriz hipertrófica prévia. Para o tratamento dessa área necrosada, foi feito uso tópico de nifedipina a 2% duas vezes por dia, com o paciente apresentando cicatrização completa em três semanas.

Em outro relato de caso um homem de 55 anos foi tratado de uma úlcera na perna esquerda, após fratura devido queda de aproximadamente 3,5 metros. Já vinham sendo feitos desbridamentos e curativos por dois anos, sem sucesso. Após 42 dias de tratamento com NFD tópica a 16% associada a um outro gel para fim analgésico contendo misoprostol 0,0024%, fenitoína 1%, metronidazol 2% e lidocaína 2%, o paciente apresentou uma redução de 95% da área da ferida⁴⁸.

A alta prevalência dos ferimentos de pele, em todas as faixas etárias, com todos os custos envolvidos, sejam sociais, emocionais ou econômicos, faz com que haja uma busca por medicamentos que possam contribuir na recuperação dos pacientes^{3,49,50,51}.

Nesse sentido a busca por uma droga eficaz, segura e de baixo custo tem representa um alvo da comunidade científica. A NFD pode ser considerada uma candidata a preencher tais critérios. O presente estudo demonstrou potencialidade de benefício na cicatrização com uso tópico desse fármaco por maior recrutamento de células PMNs e linfócitos. Estudos adicionais são necessários nessa linha de pesquisa a fim de esclarecer real valor da droga no tratamento de feridas de pele.

Existem limitações nessa pesquisa, sendo as principais: ausência na literatura de uma concentração específica da NFD na forma tópica, falta de parâmetros específicos que permitissem uma comparação mais fidedigna das respostas encontradas na histologia, não possibilidade de cálculo amostral devido questões éticas.

6. Conclusões

- As três concentrações utilizadas neste estudo provocaram resposta na fase inflamatória da cicatrização, com aumento dos polimorfonucleares.
- Na concentração de 20%, além do aumento dos polimorfonucleares, ocorre também maior resposta dos linfócitos.

Tabela 1. Comparações da presença de polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos em feridas tratadas com nifedipina 1% versus placebo.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	3 (75%)	3 (75%)	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)	3 (75%)
14º dia	4 (100%)	4 (100%)	1 (25%)	2 (50%)	4 (100%)	1 (25%)
21º dia	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
28º dia	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)
Coefficientes						
Nifedipina 1%	OR = 3,5 (IC95%: 1,04 – 11,7)		OR = 1,4 (IC95%: 0,28 – 7,14)		OR = 0,28 (IC95%: 0,07 – 1,07)	
p-valor	0,044		0,682		0,063	

Tabela 2. Comparações da presença de polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos em feridas tratadas com nifedipina 10% versus placebo.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
7º dia	1 (25%)	2 (50%)	3 (75%)	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
14º dia	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
21º dia	3 (75%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	1 (25%)
28º dia	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
Coefficientes						
Nifedipina 10%	OR = 11,8 (IC95%: 2,99 – 46,2)		OR = 0,27 (IC95%: 0,05 – 1,51)		OR = 2,92 (IC95%: 0,50 – 17,1)	
p-valor	<0,001		0,137		0,235	

Tabela 3. Comparações da presença de polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos em feridas tratadas com nifedipina 20% versus placebo.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	1 (25%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	1 (25%)	2 (50%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
14º dia	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)	1 (25%)
21º dia	0 (0%)	4 (100%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
28º dia	0 (0%)	2 (50%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
Coefficientes						
Nifedipina 20%	OR = 22,1 (IC95%: 4,67 – 104,0)		OR = 0,16 (IC95%: 0,02 – 1,52)		OR = 11,1 (IC95%: 1,01 – 20,8)	
p-valor	<0,001		0,111		0,049	

Tabela 4. Comparações da presença de polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos em feridas tratadas com nifedipina *versus* placebo nos animais 1, 2 e 3.

Momentos	Polimorfonucleares (Acentuado)		Macrófagos (Acentuado)		Linfócitos (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	1 (8,3%)	11 (91,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	1 (8,3%)	12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,3%)
7º dia	5 (41,7%)	7 (58,3%)	7 (58,3%)	4 (33,3%)	4 (33,3%)	5 (41,7%)
14º dia	6 (50%)	9 (75%)	4 (33,3%)	3 (25%)	5 (41,7%)	3 (25%)
21º dia	4 (33,3%)	7 (58,3%)	2 (16,7%)	0 (0%)	2 (16,7%)	1 (8,3%)
28º dia	2 (16,7%)	8 (66,7%)	1 (8,3%)	0 (0%)	2 (16,7%)	5 (41,7%)
Coefficientes						
Nifedipina	OR = 8,48 (IC95%: 3,99 – 18,0)		OR = 0,45 (IC95%: 0,16 – 1,18)		OR = 1,21 (IC95%: 0,48 – 3,08)	
p-valor	<0,001		0,104		0,674	

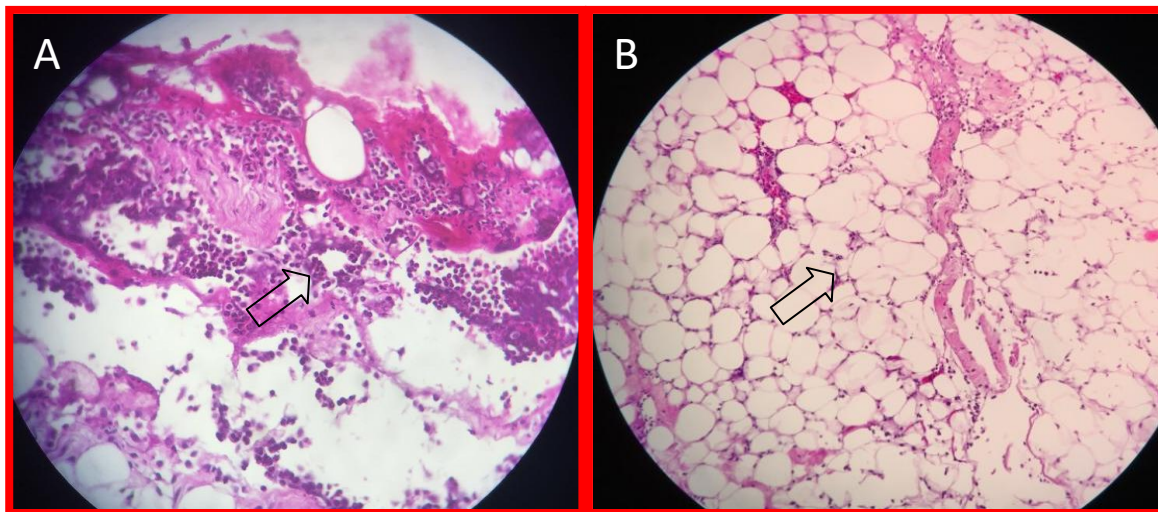


Figura 1

- A. Ferida tratada COM nifedipina, mostrando resposta acentuada de polimorfonucleares (seta)
- B. Ferida tratada SEM nifedipina, mostrando resposta discreta de polimorfonucleares (seta)

7. Referências

1. Agale SV. Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis and management. *Ulcers*; 2013:1-9.
2. Wang JF, Olson ME, Reno CR, Kulyk W, Wright JB, Hart DA. Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. *Connect Tissue Res*. 2000;41(3):195-211.
3. Honsik KA, Romeo MW, Hawley CJ, Romeo SJ, Romeo JP. Sideline skin and wound care for acute injuries. *Current Sports Medicine Reports*. 2007;6:147-154.
4. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(6):763-71.
5. Chamanga ET. Understanding the impact of leg ulcer bandaging on patient quality of life. *JCN* 2014; 28 (1): 40-7.
6. Leong M, Plillips LG. Cicatrização de feridas. *In*: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. *Tratado de Cirurgia: a base biológica da cirurgia moderna* 19ª edição, Elsevier, 2015; 151-177.
7. Mendonça RS, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*. 2009; 84(3):257-62.
8. Tazima MF, Vicente YA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2008; 41(3):259-64.
9. Akhavani MA, Sivakumar B, Paleolog EM, Kang N. Angiogenesis and plastic surgery. 2008; 61(12): 1425–1437.
10. Favas PMMS. Prevalência e características das feridas na população do distrito de Leiria. Dissertação apresentada na Universidade Católica Portuguesa, 2012.
11. Oigman W, Fritsch MT. Antagonistas de canais de cálcio. *Hiperativo* 1998;2:104-109.
12. Brown MJ, Palmer CR, Castaigne A, de Leeuw PW, Mancia G, Rosenthal T *et al*. Morbidity and mortality in patients randomised to double-blind treatment with a long-acting calcium-channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a Goal in Hypertension Treatment (INSIGHT). *The Lancet* 2000; 356: 366–72.
13. Bombig MTN, Póvoa R. Interações e associações de medicamentos no tratamento anti-hipertensivo – Antagonistas dos canais de cálcio. *Rev Bras Hipertens*. 2009; 16(4):226-230.

14. Jardim PCB, Jardim TSV, de Souza WKS. Qual(ais) o(s) antagonistas dos canais de cálcio mais indicado(s) no tratamento da hipertensão arterial? *Rev Bras Hipertens* vol. 2013; 20(2):78-82.
15. Dollery C. Clinical pharmacology of calcium antagonists. *Am J Hypertens* 1991;4(suppl):88S-95S.
16. Hafner J, Noble S, Partsch H, Lauchli S, Mayer D, Amann-Vesti B et al. Martorell hypertensive ischemic leg ulcer: a model of ischemic subcutaneous arteriolosclerosis. *Arch Dermatolol*. 2010; 146(9):961-8.
17. Woo T, Wong RC, Campbell JP, Goldfarb MT, Voorhees JJ, Callen JP. Nifedipine in scleroderma ulcerations. *International Journal of Dermatology*. 1984; 23:678-680.
18. Gasser P. Reaction of capillary blood cell velocity in nailfold capillaries to nifedipine and ketanserin in patients with vasospastic disease. *The Journal of International Medical Research*. 1991; 19:24-31.
19. Volk SW, Bohling MW. Comparative wound healing--are the small animal veterinarian's clinical patients an improved translational model for human wound healing research? *Wound Repair Regen*. 2013 May-Jun;21(3):372-81
20. Kim DJ, Mustoe T, Clark RA. Cutaneous wound healing in aging small mammals: A systematic review. *Cutaneous wound healing in aging small mammals: A systematic review*. *Wound Repair Regen*. 2015; 27:1-31.
21. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001; 9(2); 66-76.
22. Hengge UR, Walker PS, Vogel JC. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2911-6.
23. Tfaili S, Gobinet C, Josse G, Angiboust JF, Manfait M, Piot O. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. *Analyst*. 2012 Aug 21;137(16):3673-82.
24. Hollander DA, Erli HJ, Theisen A, Falk S, Kreck T, Müller S. Standardized qualitative evaluation of scar tissue properties in an animal wound healing model. *Wound Repair Regen*. 2003 Mar-Apr;11(2):150-7.
25. Alsaad SMS, Ross EV, Smith WJ, DeRienzo DP. Analysis of depth of ablation, thermal damage, wound healing, and wound contraction with erbium YAG laser in a Yorkshire pig model. *Journal of Drugs in Dermatology* 2015;vol 14 (11):1245-1252.
26. Singer AJ, MacClain AS. Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med* 2003;vol 10 (10):1029-1033.

27. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2006;vol 21 (suplemento 3): 55-65.
28. Molgat YM, Pollack SV, Hurwitz JJ, Bunas SJ, Manning T, McCormack KM, et al. Comparative study of wound healing in porcine skin with CO₂ laser and other surgical modalities: preliminary findings. *International Journal of Dermatology* 1995;vol 34(1): 42-47.
29. Agha R, Ogawa R, Pietramaggiori G, Orgill DP. A Review of the Role of Mechanical Forces in Cutaneous Wound Healing. *Journal of Surgical Research*. 2011. 171 (2): 700–708.
30. Smith PD, Kuhn MA, Franz MG, Wachtel TL, Wright TE, Robson MC. Initiating the inflammatory phase of incisional healing prior to tissue injury. *J Surg Res* 2000;92:11-17.
31. Fisher MM, Snart AG. Nifedipine in ulnar artery occlusion. *Journal of Vascular Diseases*. 1984; 5: 320-8.
32. Belcaro G, Nicholaides A. Microvascular evaluation of the effects of nifedipine in vascular patients by laser-Doppler flowmetry. *The Journal of Vascular Diseases*. 1989; 40(8):689-694.
33. Cesarone MR, Laurora G, Belcaro GV. Microcirculation in systemic hypertension. *Angiology*. 1992 Nov;43(11):899-903.
34. Martin P, Leibovich J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*. 2005; 15(11): 599-607.
35. Lansdown, ABG. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair and Regeneration*. 2002; 10(5):271-285.
36. Matsumori A, Nishio R, Nose Y. Calcium Channel Blockers Differentially Modulate Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Circulation Journal*. 2010; 74, 567-571.
37. Miller AP, Falcone RE, Nappi J, Redmon HA. The lack of effect of nifedipine on failing skin flaps. *J Dermatol Surg Oncol*. 1985;11(6):612-13.
38. Pal S, Khazanchi RK, Moudgil K. An experimental study on the effect of nifedipine on ischaemic skin flap survival in rats. *Br J Plast Surg*. 1991; 44(4):299-301.
39. Brashar HN, Udupa SL, Udupa AL. Effect of nifedipine and amlodipine on dead space wound healing in rats. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(3):294-6.
40. Patil PA, Agnihotri RL, Singh KR. Influence of calcium channel blockers on wound healing – an experimental study. *Pharmacologyonline*. 2009;2:1125-35.

41. Ebadi A, Cheraghali AM, Qoshoni H, Eimani H. Healing effect of topical nifedipine on skin wounds of diabetic rats. *DARU*. 2003; 11(1):1-4.
42. Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. *Arch Facial Plast Surg*. 1999;(1):27-32.
43. Gallant-Behm CL, Hart DA. Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. *Wound Rep Reg* 2006;14:46-54.
44. Jung Y, Son D, Kwon S, Kim J, Han K. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors. *Int Wound J* 2013; 10:295-305.
45. Bernatchez SF, Parks JP, Grussing DM, Matalas SL, Nelson GS. Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. *Wound Rep Reg* 1998;6:223-233.
46. Smith RG. Off-label use of prescription medication: A literature review. *Wounds*. 2010;22(4):78-86.
47. Torsiello MJ, Kopacki MH. Transdermal Nifedipine for wound healing: case reports. *Int. J. Pharm. Compounding*, v.4, n.5, p.356-358, 2000.
48. Israel A. Topical gel for the treatment of a refractory leg ulcer; case report. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. V.7, n.3, p.176 – 178, 2003.
49. Nicks BA, Ayello EA, Woo K, George DN, Sibbald RG. Acute wound management: revisiting the approach to assessment, irrigation, and closure considerations. *Int J Emerg Med*. 2010;3(4):399–407.
50. Schubert V. Skin ulcers - venous leg ulcers, diabetic foot ulcers and pressure ulcers. *Geriatric Care and Treatment* 2003: 215-231.
51. Soares MF. Impacto da úlcera de perna na vida da família: um estudo de caso. *Dissertação (Mestrado em Ciências)* apresentada na Universidade de São Paulo, 2012.

APÊNDICE 2 - Artigo: EFEITOS DA NIFEDIPINA TÓPICA NA ANGIOGÊNESE, CÉLULAS PROLIFERATIVAS E COLÁGENO EM MODELO SUÍNO DURANTE PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO

1. Introdução

Poucas doenças atingem tantas pessoas, independentemente da idade, país, crença religiosa, classe econômica ou qualquer outra característica pessoal, como as feridas cutâneas¹. Em todas as fases da vida, o ser humano está sujeito a um acidente ou trauma que provoque desde um pequeno corte, até as cirurgias mais complexas^{2,3}.

No momento em que ocorre uma agressão, de imediato acontece uma reação complexa do organismo para tentar preservar ou restabelecer a morfologia e fisiologia dos tecidos, independente da região do corpo ou da causa^{4,5}.

A fase de proliferação inicia-se em torno do terceiro dia e vai até duas ou três semanas após o trauma. Representa o momento em que a ferida prepara o leito para ser reparado, sendo possível identificar três etapas distintas: angiogênese, fibroplasia e epitelização^{6,7}. Essas etapas ocorrem simultaneamente e envolvem a participação de células endoteliais com proliferação vascular, fibroblastos, produção de colágeno e queratinócitos⁸.

A nifedipina (NFD) é um medicamento utilizado há mais de três décadas no tratamento da doença hipertensiva, apresentando como efeito a dilatação arteriolar, a partir do bloqueio dos canais de cálcio nas células endoteliais^{9,10,11}. Alguns autores descrevem que a NFD pode ter algum benefício cicatrizante nos pacientes portadores de lesões crônicas específicas relacionadas a vasoespasma arteriolar como as úlceras hipertensivas e as úlceras da esclerodermia, devido a melhor perfusão tecidual^{12,13,14,15}.

Diversos animais têm sido utilizados no entendimento do processo de cicatrização. A maioria das pesquisas são realizadas com roedores (hamster, camundongo, coelhos) por serem de mais fácil manuseio e apresentarem baixo custo de aquisição e cuidados. Entretanto, esses animais possuem várias características distintas em relação à pele humana^{16,17,18,19}. A pele suína, entretanto, é considerada o melhor modelo experimental para comparação com a pele humana,

devido às grandes semelhanças do ponto de vista histológico e funcional. Ambas apresentam, de forma similar, espessura, glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas, tecido celular subcutâneo e densidade de folículos capilares. Possuem tempo de regeneração da epiderme em torno de trinta dias, assim como a estrutura bioquímica semelhante do colágeno. Além disso, o processo de cicatrização entre os ferimentos nas peles suína e humana acontece através de reepitalização, diferente dos outros mamíferos menores onde ocorre por contração^{16,20,21,22}.

2. Objetivos

Avaliar se feridas de pele tratadas com NFD tópica apresentam maior neoformação vascular, assim como analisar a ocorrência dos fibroblastos, queratinócitos e a formação do colágeno.

3. Metodologia

3.1 Animais

Utilizamos 4 fêmeas saudáveis de porcos da raça Pietrain, com peso entre 15 Kg e 20 Kg. Os animais ficaram em baias individuais apropriadas, com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie. As condições ambientais foram controladas com temperatura de 20 +/- 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo que a umidade relativa do ar e o ruído foram os próprios do ambiente. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Nova Esperança (FAMENE).

3.2 Anestesia

Os animais receberam inicialmente uma dose de xilazina (1-2 mg/Kg) para a sedação e analgesia, em seguida foi administrado como relaxante muscular a ketamina na dose de 2mg/Kg e realizada a entubação oro-traqueal com tubo numero 7. O Plano anestésico foi mantido com o halogenado isoflurano sob máscara inalatória na concentração de 1% a 2%, e com propofol na dose de 20 a 50mg

(infusão contínua) em veia auricular, sendo feito o repique de acordo com a resposta do animal. O animal permaneceu sob monitorização dos aspectos ventilatórios e hemodinâmicos durante todo o procedimento^{23,24}.

3.3 Cirurgia

Após anestesia, os animais foram colocados em decúbito ventral, sendo realizada tricotomia, marcação da área com caneta dermatográfica apropriada para pele de um quadrado (2,5 cm x 2,5 cm), a fim de padronizar o tamanho dos ferimentos.

Fizemos antissepsia com clorexidina degermante, seguida de clorexidina alcoólica a 4% de toda a região dorsal e posicionamos o campo fenestrado esterilizado.

Procedemos com a retirada de pele total até a fáscia muscular dorsal, sendo conseguida hemostasia apenas com compressão local. Limpamos com soro fisiológico 0,9% e, de forma alternada, fizemos o curativo com NFD. Cobrimos com gaze de algodão e atadura de crepom estéreis.

3.4 Fluxograma

Os quatro animais foram colocados em baias separadas, sendo identificados pelos números 1, 2, 3 e 4. Cada ferimento recebeu uma letra correspondente, seguindo uma ordem da esquerda para direita e da região cranial à caudal (A, B, C, D, E, F, G, H). O animal 1 recebeu NFD tópica a 1% nas lesões A, D, E e H. O animal 2 recebeu NFD tópica a 10% nas lesões B, C, F e G. O animal 3 recebeu NFD tópica a 20% nas lesões A, D, E e H. Antes de aplicarmos a NFD, umidificamos as feridas com soro fisiológico (SF) 0,9%. Nas demais lesões e no animal 4, o curativo foi feito apenas com SF 0,9%. Realizamos troca de curativo a cada dois dias, assim como nos dias da coleta dos dados. Os 32 ferimentos foram submetidos à biópsia com *punch* de 4 mm nos dias 1, 3, 7, 14, 21 e 28

3.5 Avaliação Microscópica

Para efeito de comparação, consideramos 4 graus distintos de acordo com a presença nos cortes histológicos dos agentes envolvidos no processo de cicatrização^{25,26}:

- Ausente (0): quando não se observava a presença.
- Discreto (1): quando observados de forma isolada, sendo possível distinguir com facilidade áreas livres de infiltrado.
- Moderado (2): quando observados de forma irregular, com bastantes áreas livres de infiltrados.
- Acentuado (3): quando observados em grande frequência, formando agregados densos e poucas áreas livres de infiltrados.

3.6 Análise dos Dados

Para a análise de dados histológicos foi aplicado um modelo longitudinal logístico de efeitos mistos. Assim, foi considerada como variável resposta (dependente) a produção acentuada das diferentes células avaliadas tendo como variável explicativa os grupos de comparação (controle, nifedipina 1%, 10% e 20%). Tendo como referência o grupo controle foi estimada a Odds Ratio (OR) com seu respectivo intervalo de confiança para os grupos NFD, sendo uma análise independente por dose (para cada porco comparada com seu controle) e uma outra análise independente da dose (grupo tratado e controle considerando todos os porcos). A interpretação de uma OR em um estudo longitudinal consiste na razão de chances da categoria analisada comparada a categoria de referência correspondente ao período em análise, tendo como pressuposto que essa associação é linear em todo o período de análise. A significância estatística adotada no estudo foi de 5% ($p < 0,05$) e o software utilizado foi o SPSS v 21.

4. Resultados

A comparação de feridas tratadas, tanto com NFD a 1% como com NFD 10% com as respectivas feridas tratadas apenas com placebo, revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados (tabelas 1 e 2).

Entretanto, na comparação entre os ferimentos tratados com NFD 20% e o grupo placebo, que correspondem ao porco 3, houve aumento estatisticamente significativo nos níveis acentuados na proliferação vascular (OR = 4,84 e $p = 0,019$) e, ao mesmo tempo, houve também menor resposta acentuada para queratinócitos e produção de colágeno (OR 0,05 e $p = 0,023$; 0,02 e $p = 0,005$) (tabela 3).

Quando comparamos todas as feridas tratadas com NFD (12 feridas) *versus* todas com placebo (12 feridas), observamos que persiste aumentada a proliferação vascular (OR = 2,24 e $p = 0,019$) e diminuída a produção de colágeno (OR 0,06 e $p = 0,006$) (tabela 4).

A figura 1 demonstra exemplos de análise histológica de feridas tratada com e sem NFD, sendo observadas respostas acentuada e discreta da proliferação vascular.

5. Discussão

A fase proliferativa é o momento de preparação da ferida para ser reparada, sendo possível distinguir três fases distintas (angiogênese, fibroplasia e epitelização), apesar de acontecerem simultaneamente^{6,7,8}. A formação de novos vasos (angiogênese) acontece pela migração de células endoteliais dos vasos pré-existent, através dos espaços intercelulares da parede desses mesmos vasos, facilitada pela vasodilatação^{6,27,28,29,30}. Possivelmente, o efeito vasodilatador da NFD interferiu nessa etapa da cicatrização, tendo em vista a maior ocorrência de proliferação vascular encontrada nos ferimentos tratados com o creme. Entretanto, esse efeito só foi observado na maior concentração (20%) isoladamente ou quando avaliamos todos os ferimentos tratados com NFD em relação aos controles dos três primeiros animais (OR 4,84/p=0,019 e OR 2,24/p=0,019, respectivamente). O aumento da proliferação vascular não foi acompanhado de um aumento estatisticamente significativo do número de fibroblastos. Essas células já existem nos tecidos de forma quiescente. Talvez a vasodilatação não seja tão importante para a chegada dessas células aos locais de ferimento, tendo em vista que seu deslocamento ocorre mais por movimento próprio (diapedese) estimulado pelos fatores quimiotáticos^{6,7,8}.

Na fase proliferativa, os fibroblastos assumem a responsabilidade de conduzir a cicatrização por produzirem proteínas essenciais da matriz-extracelular, dentre elas, o colágeno (fibroplasia). São células que já estão presentes no tecido conjuntivo em estado de repouso, sendo ativadas e diferenciadas pelo estímulo dos mediadores inflamatórios liberados principalmente pelos macrófagos e plaquetas^{6,7,8,31,32}. No nosso estudo, nenhuma concentração mostrou resultado estatisticamente significativo em relação a esse parâmetro. Entretanto, pesquisas com cultura de fibroblastos indicam a importância do cálcio na estabilização da membrana plasmática, assim como na migração, proliferação e regulação na síntese de proteínas e mediadores da cicatrização por essas células^{33,34}.

Ainda na fase proliferativa, há início da síntese do colágeno a partir dos fibroblastos. Isso persiste até a fase de maturação onde passa a haver um equilíbrio entre a produção e a degradação, sendo a força tênsil da cicatriz mantida pelas ligações cruzadas entre os feixes de colágeno^{6,7,32}. No nosso estudo, houve diminuição estatisticamente significativa do colágeno nos ferimentos tratados com

NFD a 20% isoladamente (OR 0,02/ $p=0,005$), e quando avaliamos todos os ferimentos tratados com NFD em relação aos controles dos três primeiros animais (OR 0,06/ $p=0,006$). O cálcio funciona estimulando a síntese proteica, sobretudo quando está associado a uma proteína citosólica (calmodulina), formando o complexo cálcio-calmodulina. Este composto participa na liberação do ácido araquidônico proveniente da membrana plasmática, permitindo a produção de importantes estimuladores do processo de cicatrização (prostaglandinas e leucotrienos), além de atuar também na produção da proteína C quinase a qual atua estimulando a proliferação dos fibroblastos^{7,33}. Roth et al³⁵ mostraram que a ausência de cálcio no interior de fibroblastos, provocada por bloqueadores dos canais de cálcio, interferiu na síntese do colágeno de forma significativa. De forma semelhante, Lee e Ping³⁶ descreveram que fibroblastos expostos à NFD (*in vitro*) apresentam diminuição da incorporação da prolina na matriz extra-celular. A prolina, assim como a lisina, é excretada da célula como uma molécula de pró-colágeno. Após sofrer modificações da sua estrutura por proteases do meio extra-celular, converte-se em monômeros que, quando unidos, ajudam na formação das fibras de colágeno^{6,7}.

Quando ocorre mais síntese do que degradação do colágeno, os pacientes apresentam cicatrizes hipertróficas (proliferação dentro das margens da ferida que pode regredir com o tempo) ou queloides (proliferação além das margens da ferida que normalmente não regride com o tempo). Essas cicatrizes proliferativas provocam efeitos não desejáveis do ponto de vista estético e, dependendo da área do corpo como, por exemplo, articulações, também provocam limitação funcional^{6,7}. Portanto, é possível que a utilização de um creme à base de NFD tenha algum efeito benéfico em pessoas com tendência a essas duas situações.

Boggio et al³⁷ estudaram o efeito de um bloqueador de canal de cálcio (verapamil) na cicatriz de pacientes submetidos à cirurgia plástica. Foram recrutados 120 casos (60 de mamoplastia e 60 de abdominoplastia), sendo divididos em dois grupos (A - controle e B - experimento). Os pacientes do grupo experimento fizeram uso de um gel à base de verapamil (bloqueador de canal de cálcio) duas vezes por dia a partir do sétimo dia de cirurgia, durante 90 dias. A comparação entre os grupos mostrou uma melhor qualidade do aspecto estético das feridas nos pacientes que fizeram uso do medicamento, tanto nas mamoplastias como nas abdominoplastias (80% e 75,2% *versus* 48% e 51,2%, respectivamente, $p < 0,05$).

A epitelização ocorre já a partir das primeiras 24 horas com a participação dos queratinócitos que estão localizados nas margens da lesão e nos folículos pilosos mais próximos. Essas células participam recobrando a ferida, formando uma crosta e também auxiliam na contração da ferida^{6,8}. Estudos com cultura de queratinócitos descrevem a importância do cálcio para que ocorra a migração e proliferação dessas células^{38,39,40}. No nosso estudo, houve redução dos queratinócitos apenas nos ferimentos tratados com NFD a 20% em relação aos controles do mesmo animal (OR 0,05/p = 0,023).

Assim, o bloqueio da entrada do cálcio nas células, pela NFD, pode ter promovido inibição na produção de colágeno pelos fibroblastos e diminuição do número de queratinócitos nas feridas do animal 3, porém, na comparação dos 12 ferimentos tratados com medicação com os 12 ferimentos tratados com placebo, apenas o colágeno sofreu interferência. Provavelmente, esse achado ocorreu pelo fato dos queratinócitos continuarem ativos mesmo em baixas concentrações desse íon³³.

Miller e col⁴¹ analisaram 16 porcos, sendo que para 8 foi administrado NFD oral e para 8 placebo. Em cada porco foram realizados 4 ferimentos na região dorsal. O desfecho avaliado foi o tamanho do ferimento, não havendo diferença favorável à NFD. Salientamos que, de forma diferente desses autores, nosso estudo utilizou a via tópica e o desfecho mensurado foi a avaliação de células envolvidas na cicatrização.

A utilização da NFD para estudos sobre cicatrização foi também estudada em roedores (ratos), seja na forma oral^{42,43,44} ou na forma tópica.

Ebadi et al⁴⁵ estudaram o efeito da NFD tópica na concentração de 3% em ratos diabéticos e não diabéticos. Ao final do experimento, houve maior resposta no escore da fase de inflamação nos animais que fizeram uso da NFD tópica, tanto nos diabéticos (14,5 vs 6,5; $p < 0,005$) como nos não diabéticos (11,3 vs 5,8; $p < 0,05$) em relação ao placebo. Ainda no grupo dos diabéticos, a utilização da NFD também interferiu na fase de maturação (7,4 vs 13,6; $p < 0,05$). Em ambos, não houve diferença em relação à fase de proliferação.

Davis et al⁴⁶ avaliaram a evolução de retalhos provocados na região dorsal de 61 ratos, utilizando três medicamentos na forma tópica (NFD, salicilato de trolamina e nitroglicerina). Os animais foram divididos em seis grupos sendo grupo 1 (controle - vaselina inerte), grupo 2 (NFD), grupo 3 (salicilato de trolamina), grupo 4

(nitroglicerina), grupo 5 (combinação de NFD e nitroglicerina) e grupo 6 (NFD, nitroglicerina e salicilato de trolamina). Os resultados mostraram que houve uma redução estatisticamente significativa da área, em todos os grupos que fizeram uso das medicações tópicas em relação ao controle.

Torsiello e Kopacki⁴⁷ relataram dois casos. O primeiro caso foi de uma mulher de 43 anos portadora de diabetes Mellitus que apresentava uma úlcera em calcâneo direito há sete anos. Utilizou-se um preparado de NFD a 8% duas vezes ao dia, sendo obtida a cicatrização no período de 8 semanas e sem efeitos colaterais. O segundo caso foi de um menino de 8 anos que sofreu necrose da pele do pé no lugar que foi colocado um expansor para corrigir uma área de cicatriz hipertrófica prévia. Para o tratamento dessa área necrosada, foi feito uso tópico de NFD a 2% duas vezes por dia, com o paciente apresentando cicatrização completa em três semana.

Em outro relato de caso um homem de 55 anos foi tratado de uma úlcera na perna esquerda, após fratura devido queda de aproximadamente 3,5 metros. Já vinham sendo feitos desbridamentos e curativos por dois anos, sem sucesso. Após 42 dias de tratamento com NFD tópica a 16% associada a um outro gel para fim analgésico contendo misoprostol 0,0024%, fenitoína 1%, metronidazol 2% e lidocaína 2%, o paciente apresentou uma redução de 95% da área da ferida⁴⁸.

A NFD tópica para tratamento de feridas cutâneas é descrita na prática médica com relatos de casos isolados sem padronização das concentrações, ou seja, é prescrita sem que haja uma recomendação na bula do produto (*off-label*)⁴⁹.

Existem limitações nessa pesquisa, sendo as principais: ausência na literatura de uma concentração específica da NFD na forma tópica, falta de parâmetros específicos que permitissem uma comparação mais fidedigna das respostas encontradas na histologia, não possibilidade de cálculo amostral devido questões éticas.

6. Conclusão

- A NFD tópica nas concentrações menores (1% e 10%) não provoca alteração na fase proliferativa, entretanto, há aumento da proliferação vascular e diminuição dos queratinócitos nos ferimentos tratados com o creme na concentração de 20%.
- Ferimentos tratados com nifedipina tópica na concentração de 20% apresentam diminuição da formação de colágeno.

Tabela 1. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno, queratinócitos e proliferação vascular no porco 1.

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%	Controle	Nifedipina 1%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	0 (0%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)	3 (75%)
14º dia	2 (50%)	3 (75%)	1 (25%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)	4 (100%)
21º dia	4 (100%)	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)	1 (25%)	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)
28º dia	4 (100%)	3 (75%)	4 (100%)	4 (100%)	2 (50%)	2 (50%)	1 (25%)	1 (25%)
Coefficientes								
Nifedipina 1%	OR = 3,32 (IC95%: 0,52–21,3)		OR = 1,0 (IC95%: 0,12 – 8,62)		OR = 2,44 (IC95%: 0,36–16,3)		OR = 1,76 (IC95%: 0,52 – 5,93)	
p-valor	0,206		1,000		0,358		0,361	

Tabela 2. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno, queratinócitos e proliferação vascular no porco 2

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%	Controle	Nifedipina 10%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	1 (25%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4(100%)	3 (75%)
14º dia	4(100%)	4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	4 (100%)	4(100%)	4 (100%)
21º dia	3 (75%)	3 (75%)	3 (75%)	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)	3 (75%)	4 (100%)
28º dia	2 (50%)	1 (25%)	4 (100%)	2 (50%)	4 (100%)	2 (50%)	0 (0%)	3 (75%)
Coefficientes								
Nifedipina 10%	OR = 1,00 (IC95%: 0,28 –3,54)		OR = 0,02 (IC95%: 0,04 –10,2)		OR = 1,39 (IC95%: 0,28 – 6,94)		OR = 1,78 (IC95%: 0,52 – 6,12)	
p-valor	1,000		0,986		0,685		0,355	

Tabela 3. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno, queratinócitos e proliferação vascular no porco 3.

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%	Controle	Nifedipina 20%
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	2(50%)	0 (0%)	2 (50%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (75%)	4 (100%)
14º dia	3(75%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)	2 (50%)	3 (75%)
21º dia	1(25%)	3 (75%)	4(100%)	1 (25%)	2 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (75%)
28º dia	3(75%)	2 (50%)	4(100%)	1 (25%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	3 (75%)
Coefficientes								
Nifedipina 20%	OR = 0,78 (IC95%: 0,20 – 3,10)		OR = 0,02 (IC95%: 0,00 – 0,28)		OR = 0,05 (IC95%: 0,01 –0,66)		OR = 4,84 (IC95%: 1,30–18,0)	
p-valor	0,727		0,005		0,023		0,019	

Tabela 4. Proporção do nível acentuado de fibroblastos, colágeno, queratinócitos e proliferação vascular nas feridas submetidas à nifedipina versus as feridas tratadas com placebo nos animais 1, 2 e 3

Momentos	Fibroblastos (Acentuado)		Colágeno (Acentuado)		Queratinócitos (Acentuado)		Proliferação vascular (Acentuado)	
	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina	Controle	Nifedipina
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
1º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
3º dia	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
7º dia	3 (25%)	5 (41,7%)	2(16,7%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	9 (75%)	10 (83,3%)
14º dia	9 (75%)	10(83,3%)	2(16,7%)	1 (8,3%)	2(16,7%)	5 (41,7%)	9 (75%)	11 (91,7%)
21º dia	8(66,7%)	10(83,3%)	9 (75%)	3 (25%)	5(41,7%)	4 (33,3%)	5(41,7%)	10 (83,3%)
28º dia	9 (75%)	6 (50%)	12(100%)	7 (58,3%)	9 (75%)	5 (41,7%)	1 (8,3%)	7 (58,3%)
Coefficientes								
Nifedipina	OR = 1,18 (IC95%: 0,53 – 2,61)		OR = 0,06 (IC95%: 0,01 – 0,45)		OR = 0,78 (IC95%: 0,35 – 1,73)		OR = 2,24 (IC95%: 1,14 – 4,38)	
p-valor	0,735		0,006		0,544		0,019	

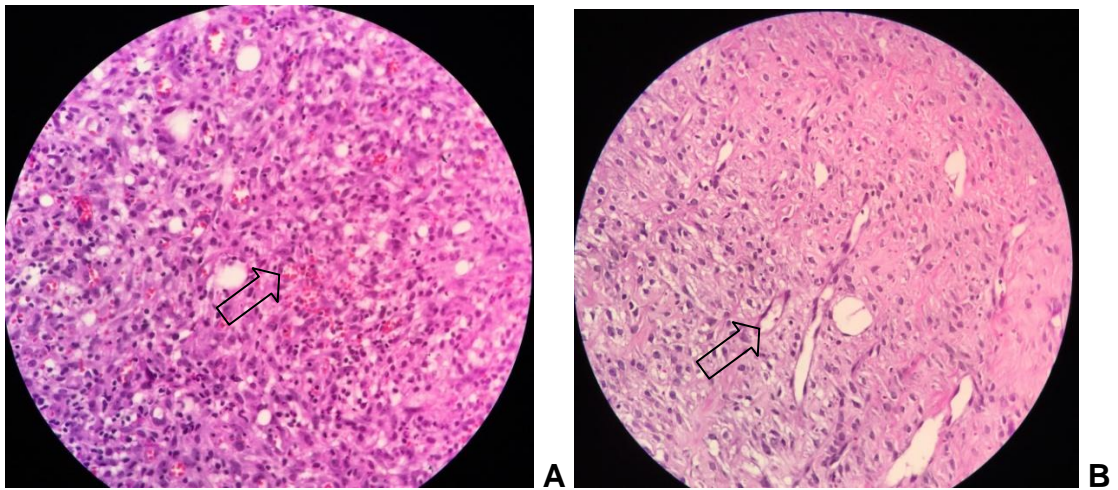


Figura 1

- A. Ferida tratada COM nifedipina, mostrando acentuada proliferação vascular (seta)
- B. Ferida tratada SEM nifedipina, mostrando discreta proliferação vascular (seta)

7. Referências

1. Agale SV. Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis and management. *Ulcers*; 2013;1-9.
2. Honsik KA, Romeo MW, Hawley CJ, Romeo SJ, Romeo JP. Sideline skin and wound care for acute injuries. *Current Sports Medicine Reports*. 2007;6:147-154.
3. Sen CK, Gordillo GM, Roy S, Kirsner R, Lambert L, Hunt TK, et al. Human skin wounds: a major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair Regen*. 2009; 17(6):763-71.
4. Mendonça RS, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol*. 2009; 84(3):257-62.
5. Martin P, Leibovich J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 2005; vol 15 (11): 599-607.
6. Leong M, Phillips LG. Cicatrização de feridas. *In: Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. Tratado de Cirurgia: a base biológica da cirurgia moderna 19ª edição, Elsevier, 2015; 151-177.*
7. Boggio, RF. Efeitos do bloqueador de canal de cálcio (verapamil) sobre fibroblastos dérmicos humanos. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, 2008.
8. Singer AJ, Clark AF. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med*.1999; 341 (2):738-746.
9. Katzung, BG. Vasodilatadores e tratamento da angina de peito. *In: Katzung, BG, Trevor, AJ. Farmacologia: básica e clínica. 13. ed. Porto Alegre: AMGH; 2017.*
10. Brown MJ, Palmer CR, Castaigne A, de Leeuw PW, Mancina G, Rosenthal T *et al.* Morbidity and mortality in patients randomised to double-blind treatment with a long-acting calcium-channel blocker or diuretic in the International Nifedipine GITS study: Intervention as a Goal in Hypertension Treatment (INSIGHT). *The Lancet* 2000; 356: 366–72.
11. Oigman W, Fritsch MT. Antagonistas de canais de cálcio. *Hiperativo* 1998;2:104-109.
12. Hafner J, Noble S, Partsch H, Lauchli S, Mayer D, Amann-Vesti B *et al.* Martorell hypertensive ischemic leg ulcer: a model of ischemic subcutaneous arteriolosclerosis. *Arch Dermatol*. 2010; 146(9):961-8.
13. Freire BM, Fernandes NC, Pineiro-Maceira J. Úlcera hipertensiva de Martorell: relato de caso. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(5 supl 3): S327-31.

14. Woo T, Wong RC, Campbell JP, Goldfarb MT, Voorhees JJ, Callen JP. Nifedipine in scleroderma ulcerations. *International Journal of Dermatology*. 1984; 23:678-680.
15. Gasser P. Reaction of capillary blood cell velocity in nailfold capillaries to nifedipine and ketanserin in patients with vasoespastic disease. *The Journal of International Medical Research*. 1991; 19:24-31.
16. Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. *Wound Repair Regen*. 2001; 9(2); 66-76.
17. Gallant-Behm CL, Hart DA. Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model. *Wound Rep Reg* 2006;14:46-54.
18. Wang JF, Olson ME, Reno CR, Kulyk W, Wright JB, Hart DA. Molecular and cell biology of skin wound healing in a pig model. *Connect Tissue Res*. 2000;41(3):195-211.
19. Jung Y, Son D, Kwon S, Kim J, Han K. Experimental pig model of clinically relevant wound healing delay by intrinsic factors. *Int Wound J* 2013; 10:295-305.
20. Hengge UR, Walker PS, Vogel JC. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2911-6.
21. Bernatchez SF, Parks JP, Grussing DM, Matalas SL, Nelson GS. Histological characterization of a delayed wound healing model in pig. *Wound Rep Reg* 1998;6:223-233.
22. Tfaili S, Gobinet C, Josse G, Angiboust JF, Manfait M, Piot O. Confocal Raman microspectroscopy for skin characterization: a comparative study between human skin and pig skin. *Analyst*. 2012 Aug 21;137(16):3673-82.
23. Alsaad SMS, Ross EV, Smith WJ, DeRienzo DP. Analysis of depth of ablation, thermal damage, wound healing, and wound contraction with erbium YAG laser in a Yorkshire pig model. *Journal of Drugs in Dermatology* 2015;vol 14 (11):1245-1252.
24. Singer AJ, MacClain AS. Development of a porcine excisional wound model. *Acad Emerg Med* 2003;vol 10 (10):1029-1033.
25. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2006;vol 21 (suplemento 3): 55-65.
26. Molgat YM, Pollack SV, Hurwitz JJ, Bunas SJ, Manning T, McCormack KM, et al. Comparative study of wound healing in porcine skin with CO₂ laser and other surgical modalities: preliminary findings. *International Journal of Dermatology* 1995;vol 34(1): 42-47.

27. Akhavani MA, Sivakumar B, Paleolog EM, Kang N. Angiogenesis and plastic surgery. 2008; 61(12): 1425–1437.
28. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. J Biol Chem. 1992;267:10931-4.
29. Arnold F, West DC. Angiogenesis in wound healing. Pharmacol Ther. 1991; 52:407-422.
30. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS *et al*. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell, 1997; Vol. 88: 277–285.
31. Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. J Cell Biol 1978;76:561-568.
32. Tazima MF, Vicente YA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. Medicina (Ribeirão Preto). 2008; 41(3):259-64.
33. Lansdown ABG. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. Wound Repair and Regeneration. 2002; 10(5):271-285.
34. Weimann BI, Hermann D. Studies on wound healing: effects of calcium d-panetothenate on migration, proliferation and protein synthesis of human dermal fibroblasts in culture. Int J Vitam Nutr Res. 1999; 69:113–119.
35. Roth, M, Eickelberg O, Kohler E, Erne P, Block LH. Ca²⁺ channel blockers modulate metabolism of collagens within the extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(11): 5478-82.
36. Lee RC, Ping J. Calcium antagonists retard extracellular matrix production in connective tissue equivalent. Journal of Surgical Research. 1990; 49:463-466.
37. Boggio RF, Boggio LF, Galvão BL, Machado-Santelli GM. Topical verapamil as a scar modulator. Aesth Plast Surg. 2014; 38: 968-975.
38. Santoro MM, Galdino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. Experimental Cell Research. 2005; 304:274–286.
39. Yuspa SH, Hennings H, Tucker RW, Jaken S, Kilkenney AE, Roop DR. Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. Annals of The New York Academy of Sciences 1988;12:191-196.
40. Resing KA, Al-Alawi N, Fleckman P, Blomquist C, Dale BA. Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of Ca⁺⁺ in the second stage. J Biol Chem. 1993; 268: 25139–45.

41. Miller AP, Falcone RE, Nappi J, Redmon HA. The lack of effect of nifedipine on failing skin flaps. *J Dermatol Surg Oncol*. 1985;11(6):612-13.
42. Pal S, Khazanchi RK, Moudgil K. An experimental study on the effect of nifedipine on ischaemic skin flap survival in rats. *Br J Plast Surg*. 1991; 44(4):299-301.
43. Brashar HN, Udupa SL, Udupa AL. Effect of nifedipine and amlodipine on dead space wound healing in rats. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(3):294-6.
44. Patil PA, Agnihotri RL, Singh KR. Influence of calcium channel blockers on wound healing – an experimental study. *Pharmacologyonline*. 2009;2:1125-35.
45. Ebadi A, Cheraghali AM, Qoshoni H, Eimani H. Healing effect of topical nifedipine on skin wounds of diabetic rats. *DARU*. 2003; 11(1):1-4.
46. Davis RE, Wachholz JH, Jassir D, Perlyn CA, Agrama MH. Comparison of topical anti-ischemic agents in the salvage of failing random-pattern skin flaps in rats. *Arch Facial Plast Surg*. 1999;(1):27-32.
47. Torsiello MJ, Kopacki MH. Transdermal Nifedipine for wound healing: case reports. *Int. J. Pharm. Compounding*, v.4, n.5, p.356-358, 2000.
48. Israel A. Topical gel for the treatment of a refractory leg ulcer; case report. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. V.7, n.3, p.176 – 178, 2003.
49. Smith RG. Off-label use of prescription medication: A literature review. *Wounds*. 2010;22(4):78-86.

APÊNDICE 3 - Banco de dados da análise histológica

ID	FERIDA	DATA	POLIMORFONUCLEARES	MACRÓFAGOS	LINFOMONONUCLEARES	PROLIFERAÇÃO VASCULAR	FIBROBLASTOS	COLÁGENO	QUERATINÓCITOS
PORCO 1	A	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 1	B	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 1	C	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 1	D	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 1	E	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 1	F	09/06/2016	2	0	1	0	0	0	0
PORCO 1	G	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 1	H	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 2	A	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 2	B	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 2	C	09/06/2016	3	0	1	0	0	0	0
PORCO 2	D	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 2	E	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 2	F	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 2	G	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 2	H	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 3	A	09/06/2016	3	0	0	2	0	0	0
PORCO 3	B	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 3	C	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 3	D	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 3	E	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 3	F	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 3	G	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 3	H	09/06/2016	3	0	2	0	0	0	0
PORCO 4	A	09/06/2016	2	0	2	0	0	0	0
PORCO 4	B	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 4	C	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 4	D	09/06/2016	-	-	-	-	-	-	-
PORCO 4	E	09/06/2016	2	0	2	0	0	0	0
PORCO 4	F	09/06/2016	2	0	1	0	0	0	0
PORCO 4	G	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
PORCO 4	H	09/06/2016	1	0	1	0	0	0	0
OBSERVAÇÕES:									
CLASSIFICAÇÃO									
PORCO 1F	AMOSTRA PEQUENA					AUSENTE (0)			
PORCO 4C	AMOSTRA SUPERFICIAL E PEQUENA					DISCRETO (1)			
PORCO 4D	AMOSTRA COMPROMETIDA, MATERIAL INSUFICIENTE					MODERADO (2)			
						ACENTUADO (3)			

ID	FERIDA	DATA	POLIMORFONUCLEARES	MACRÓFAGOS	LINFOMONONUCLEARES	PROLIFERAÇÃO VASCULAR	FIBROBLASTOS	COLÁGENO	QUERATINÓCITOS
PORCO 1	A	22/06/2016		3	3	3	2	2	2
PORCO 1	B	22/06/2016		2	3	3	2	3	2
PORCO 1	C	22/06/2016		1	3	3	3	2	1
PORCO 1	D	22/06/2016		1	2	3	3	3	3
PORCO 1	E	22/06/2016		2	2	3	3	2	2
PORCO 1	F	22/06/2016		3	3	3	3	2	1
PORCO 1	G	22/06/2016		2	3	2	2	2	0
PORCO 1	H	22/06/2016		3	2	3	3	2	1
PORCO 2	A	22/06/2016		2	2	3	3	2	1
PORCO 2	B	22/06/2016		2	2	3	3	2	3
PORCO 2	C	22/06/2016		3	3	3	3	2	3
PORCO 2	D	22/06/2016		2	2	3	3	2	1
PORCO 2	E	22/06/2016		2	2	3	3	2	2
PORCO 2	F	22/06/2016		3	2	3	3	2	3
PORCO 2	G	22/06/2016		2	2	3	3	2	3
PORCO 2	H	22/06/2016		1	2	3	3	2	3
PORCO 3	A	22/06/2016		3	3	3	3	2	1
PORCO 3	B	22/06/2016		3	2	2	3	3	1
PORCO 3	C	22/06/2016		2	2	3	3	2	1
PORCO 3	D	22/06/2016		2	2	2	2	2	0
PORCO 3	E	22/06/2016		3	2	3	3	2	1
PORCO 3	F	22/06/2016		2	1	2	2	2	3
PORCO 3	G	22/06/2016		3	3	3	3	2	0
PORCO 3	H	22/06/2016		3	2	3	3	2	2
PORCO 4	A	22/06/2016		3	2	3	3	2	3
PORCO 4	B	22/06/2016		2	2	2	3	2	2
PORCO 4	C	22/06/2016		1	2	3	3	2	1
PORCO 4	D	22/06/2016		2	2	2	3	2	3
PORCO 4	E	22/06/2016		2	2	3	3	2	0
PORCO 4	F	22/06/2016		2	2	3	3	2	1
PORCO 4	G	22/06/2016		2	2	3	3	2	0
PORCO 4	H	22/06/2016		2	2	3	3	2	1

[illegible]

Os valores destacados em vermelho mostram aumento da área em relação à medida anterior (possível trauma) ou podem ser considerados como sendo 0 (zero) devido à cicatrização quase finalizada.

ANEXOS

ANEXO 1 - Aprovação pelo Comitê de Ética para a realização da pesquisa



Escola de Enfermagem Nova Esperança Ltda.

Mantenedora da Escola Técnica de Enfermagem Nova Esperança - CEM, da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança - FACENE, da Faculdade de Medicina Nova Esperança - FAMENE e da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró - FACENE/RN



COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO EM ANIMAIS (CEUA)

CERTIDÃO

Com base na Lei 11.794 de 08 de out de 2008, que regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, além dos princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que embasaram sua criação. Obedecendo aos critérios estabelecidos por eles, o Comitê de Ética na Utilização em Animais das Faculdades Nova Esperança, em sua 2ª Reunião Ordinária realizada em 10 de fevereiro 2015, resolveu considerar, APROVADO, o projeto de pesquisa intitulado "*Etudo do efeito da Nifedipina Oral e Tópica sobre a cicatrização de feridas cutâneas em suínos*", protocolo número: 0024.2015.1.

Pesquisador responsável: Augusto César Lacerda Brasileiro e dos colaboradores: Dinaldo Cavalcante de Oliveira, Angélica Fernandes de Lacerda; Julianna Maria Silva de Amorim, Gariellla Sancho Leite, Josann Fredeico Ribeiro, Camilla de Almeida Franca Falcão, Marina Daantas Henrique, Thaís Irineu Moura Alencar Falcão e Laís Lima Dantas.

Esta certidão não tem validade para fins de publicação do trabalho, certidão para este fim será emitida após apresentação do relatório final de conclusão da pesquisa.

Escola/Famene Faculdade Nova Esperança
Maria do Socorro Guedes Nobrega
Coordenadora do CEUA Comitê de Ética
na Utilização de Animais Facene/Famene

João Pessoa, 09 de abril de 2015


Coordenadora do CEUA Facene /Famene

ANEXO 2 - Aprovação do relatório final pelo Comitê de Ética.



Escola de Enfermagem Nova Esperança Ltda.

Mantenedora da Escola Técnica de Enfermagem Nova Esperança – CEM, da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – FACENE, da Faculdade de Medicina Nova Esperança – FAMENE e da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança de Mossoró – FACENE/RN

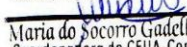


COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO EM ANIMAIS (CEUA)

CERTIDÃO

Com base na Lei 11.794 de 08 de out de 2008, que regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, além dos princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que embasaram sua criação. Obedecendo aos critérios estabelecidos por eles, o Comitê de Ética na Utilização em Animais das Faculdades Nova Esperança, em sua 2ª Reunião Ordinária realizada em 10 de fevereiro de 2015, resolveu considerar, APROVADO, o projeto de pesquisa intitulado “Efeitos da Nifedipina Tópica na Cicatrização de feridas Cutâneas”, protocolo número: 0024.2015.1. Pesquisador responsável: Augusto César Lacerda Brasileiro e colaboradores: Dinaldo Cavalcante de Oliveira; Angélica Fernandes de Lacerda; Juliana Maria S. Amorim; Gabriella S. Leite; Josan F. Ribeiro; Camila A.F. Falcão; Marina D. Henrique; Thaíz I.M.A. Falcão e Laís L. Dantas.

João Pessoa, 24 de maio de 2017

Facene/Famene Faculdade Nova Esperança

 Maria do Socorro Gadelha Nóbrega
 Coordenadora do CEUA-Comitê de Ética
 na Utilização de Animais Facene/Famene

Maria do Socorro Gadelha Nóbrega
Coordenadora do CEUA Facene /Famene


ANEXO 3 - Laudo de Análise de Referência da Nifedipina

DILECTA FARM. DE MANIPULACAO LTDA.
NFe normal de saída 148517 série 2 em 12/01/2016

Nifedipina Micronizada

Fabricação 01/09/2012	Validade 01/08/2017	Lote ALL 060102	Procedência NACIONAL Origem ÍNDIA	P. Mol. 346.33 Fórmula C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆	DCB 06352	CAS 21829-25-4
--------------------------	------------------------	--------------------	--	---	--------------	-------------------

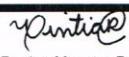
Insuno Farmacêutico



All Chemistry
Produtos Naturais & Farmacêuticos

Ensaio e Especificações	Resultado	Referência	Laboratório
ARMAZENAMENTO			
Em recipientes bem fechados, protegidos da luz.	De acordo	FB V Ed.	All Chemistry
ASPECTO			
Cristais amarelos inodoros e insípidos.	De acordo	FB V Ed.	All Chemistry
CLORETOS			
Máximo de 0,02% (200 ppm)	< 0,02%	FB V Ed.	All Chemistry
DOSEAMENTO			
Entre 98% e 102%. C ₁₇ H ₁₈ N ₂ O ₆ em relação a subst. seca.	99,34%	FB V Ed.	All Chemistry
IDENTIFICAÇÃO A			
Positivo IR	De acordo	FB V Ed.	All Chemistry
IDENTIFICAÇÃO B			
Positivo UV - VIS	De acordo	FB V Ed.	All Chemistry
IDENTIFICAÇÃO OBSERVAÇÃO			
Os testes de identificação C e D poderão ser omitidos se forem realizados os testes A e B.	De acordo	FB V Ed.	All Chemistry
METAIS PESADOS			
Máximo de 0,001% (10 ppm)	< 0,001%	FB V Ed.	All Chemistry
PERDA POR SECAGEM			
Máximo de 0,5%. Determinar em 2g de amostra seco a 60 °C sob pressão reduzida por 3h.	0,07%	FB V Ed.	All Chemistry
PONTO DE FUSÃO			
Entre 171°C e 175°C.	172°C	FB V Ed.	All Chemistry
RESÍDUO POR INCINERAÇÃO			
Máximo de 0,1%.	0%	FB V Ed.	All Chemistry
SOLUBILIDADE			
Praticamente insolúvel em água, ligeiramente solúvel em etanol e metanol. Facilmente solúvel em clorofórmio, acetona e diclorometano. Solúvel em acetato de etila.	De acordo	FB V Ed.	All Chemistry
SUBSTÂNCIAS RELACIONADAS			
Máximo de 1%. Impurezas individuais	0%	FB V Ed.	All Chemistry
SULFATOS			
Máximo de 0,05% (500 ppm)	< 0,05%	FB V Ed.	All Chemistry
Ensaios Adicionais			
IMPUREZAS ORGÂNICAS VOLÁTEIS			
Cumprir com o requerimento.	De acordo	USP 34	Fabricante
MATERIA EXTRANHA			
Solução a 10% em acetona não deve conter matéria estranha	De acordo	USP 34	Fabricante
TAMANHO DA PARTÍCULA			
90% menos que 70 micron	De acordo	USP 34	Fabricante
TITULAÇÃO ÁCIDO PERCLÓRICO			
Máximo de 0,12mL. de ácido perclórico 0,1/g	0,08mL	USP 34	Fabricante
Fabricante: SUCHEM Lote do Fabricante: 1209145			
Informações importantes: Manter abrigado da luz.			

Os itens analisados pelo laboratório de controle de qualidade All Chemistry estão em conformidade com suas respectivas especificações. Os demais ensaios estão de acordo com o certificado de análise do fornecedor ou do fabricante.



Cintia Regina Maestre Paschoal
CRF-SP: 33.229



DILECTA FARM. DE MANIPULACAO LTDA.
NFe normal de saída 148517 série 2 em 12/01/2016

Nifedipina Micronizada

Fabricação	Validade	Lote	Procedência	P. Mol.	DCB	CAS
01/09/2012	01/08/2017	ALL 060102	NACIONAL	346.33	06352	21829-25-4
Categoria			Origem	Fórmula		
Insumo Farmacêutico			ÍNDIA	C17H18N2O6		

Manter em recipiente fechado.
Manter em temperatura ambiente.

Certificado de Qualidade All Chemistry Número ALL 060102-1 em 15/12/2015
Fracionamentos: 060102-2

Os itens analisados pelo laboratório de controle de qualidade All Chemistry estão em conformidade com suas respectivas especificações. Os demais ensaios estão de acordo com o certificado de análise do fornecedor ou do fabricante.

Cintia Regina Maestre Paschoal
Cintia Regina Maestre Paschoal
CRF-SP: 33.229