



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

ANTÔNIO MEDEIROS DANTAS FILHO

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS DE REAÇÃO
BÁSICA E DO SEU ANTI-FATOR NA MATURAÇÃO DO COLÁGENO DE FERIDAS
INFECTADAS DA PELE DE RATOS**

RECIFE
2006

ANTÔNIO MEDEIROS DANTAS FILHO

EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS DE REAÇÃO BÁSICA (FCF β) E DO SEU ANTI-FATOR NA MATURAÇÃO DO COLÁGENO DE FERIDAS INFECTADAS DA PELE DE RATOS.

Tese Apresentada ao Colegiado do programa de pós-graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco Como Parte dos Requisitos Para Obtenção do Grau de Doutor em Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia

Orientador interno: Professor José Lamartine de Aguiar

Orientador externo: Professor Aldo da Cunha Medeiros

RECIFE
2006

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

D192e Dantas Filho, Antônio Medeiros.
Efeitos do fator de crescimento de fibroblastos de reação básica (FCF β) e do seu anti-fator na maturação do colágeno de feridas infectadas da pele de ratos / Antônio Medeiros Dantas Filho. – Recife: o autor, 2006.
58 f.; il.; 30 cm.

Orientador: José Lamartine de Aguiar.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Cirurgia.
Inclui referências.

1. Cicatrização. 2. Pele. 3. Fator de crescimento epidérmico. 4. Ratos. I. Aguiar, José Lamartine de (orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 075)

ANTÔNIO MEDEIROS DANTAS FILHO

**EFEITOS DO FATOR DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS DE REAÇÃO
BÁSICA (FCF β) E DO SEU ANTI-FATOR NA MATURAÇÃO DO COLÁGENO DE
FERIDAS INFECTADAS DA PELE DE RATOS.**

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do grau de Doutor em Cirurgia.

Aprovada em: 12/12/2006

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Edmundo Machado Ferraz
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sílvio da Silva Caldas Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Francisco Edilson Leite Pinto Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof^a. Dr^a. Maria Goretti Freire de Carvalho
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

RECIFE
2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Antonio e Nilda, a minha esposa Marília e as minhas filhas Maria Helena e Maria Fernanda, inspiração maior da minha vida, pelo apoio que todos têm dado à minha trajetória de estudos e vida acadêmica ora coroada.

AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração do presente trabalho, de caráter interdisciplinar, tornou-se indispensável a participação de colegas de outras áreas do conhecimento médico, por isso dedicamos nossos agradecimentos a todos que colaboraram na sua execução.

Ao professor Doutor Aldo da Cunha Medeiros, sábio e dedicado mestre, pelas horas empenhadas na orientação da elaboração desta tese de Doutorado, pelo momento ainda quando estudante da graduação médica acreditou em meu talento pessoal para a arte da cirurgia e vocação para a pesquisa clínica e experimental, meu muito obrigado.

Ao professor Doutor José Lamartine de Andrade Aguiar, coordenador do programa de pós-graduação em cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, por ter contribuído na elaboração desta tese não apenas como orientador rotineiro, mas como um amigo paciente que forjou em minha personalidade o que é ser um verdadeiro homem da pesquisa básica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio recebido. Ao professor Emérito, fundador da primeira de clínica cirúrgica, hoje disciplina de bases da técnica operatória, professor Carlos Ernani Rosado Soares, pelo apoio e exemplo de profissional dedicado à arte da medicina hipocrática.

Ao funcionário Ítalo Medeiros de Azevedo pela colaboração na elaboração de todas as etapas deste trabalho de tese, desde a realização do trabalho científico à análise estatística dos dados obtidos. Ao professor Luís Reginaldo de Menezes Rocha, pela elaboração do testes histológicos. Aos funcionários do departamento de patologia pela execução do trabalho de das lâminas da histologia. Ao magnífico Reitor da UFRN, Professor José Ivonildo do Rego. Ao Diretor do CCS-UFRN, professor Juarez da Costa Ferreira.

RESUMO

As feridas cirúrgicas abertas cicatrizam por contração de suas bordas e por migração de células epiteliais. A infecção é um dos principais fatores que afetam a evolução fisiológica das feridas operatórias. O objetivo do presente trabalho é verificar se a aplicação tópica do fator de crescimento de fibroblastos de reação básica (FCF β) através do estímulo exógeno à reação inflamatória e à fibrogênese afeta a maturação do colágeno. Realizou-se um estudo experimental em ratos Wistar com feridas infectadas da pele do dorso. Foram operados sessenta ratos (n=60) com peso de 270 \pm 23g, anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 20mg/kg, pela via intraperitoneal. Foram realizadas duas feridas excisionais com 1 cm², atingindo toda a espessura da pele do dorso dos animais, distando cerca de 4cm uma da outra, denominadas feridas F1 (para análise da inflamação) e F2 (para histoquímica do colágeno). As feridas dos animais do grupo A (n=30) foram contaminadas com solução multibacteriana e nos animais do grupo B (n=30) não se aplicou tal solução. Cada grupo foi dividido em três subgrupos: subgrupos A1, B1; A2, B2; A3 e B3. O tratamento tópico das feridas dos subgrupos A1 e B1 foi feito com solução salina, os ratos A2, B2 foram tratados com FCF β e os subgrupos A3 e B3 foram tratados com o anti-FCF β . A análise estatística foi realizada pelo teste F para variáveis paramétricas e pelo teste de Tukey para análise de comparações múltiplas com nível de significância de 0.05. Foram analisados: tempo para a completa cicatrização de F2, a síntese do colágeno dos tipos I e III, a reação inflamatória e a maturação do colágeno. Para análise qualitativa das fibras do colágeno utilizou-se o método histoquímico do *Picro Sirius Red*. A determinação da intensidade da resposta inflamatória e das moléculas do colágeno realizou-se com auxílio do programa *Image Pro-Plus, Media Cybernetics*. Os animais foram observados até o completo fechamento das feridas sendo então sacrificados com superdose de anestésico. Com relação a variável tempo de cicatrização, verificou-se que a solução contaminante retardou o tempo de cicatrização e a aplicação tópica de FCF β provocou reversão significativa do quadro. A resposta inflamatória foi mais intensa no subgrupo B2, revelando diferenças significantes com relação aos subgrupos B1 e A3. Na análise quantitativa do colágeno do tipo I observou-se que em todos os subgrupos tratados com o FCF β houve uma maior concentração quando comparado aos subgrupos não tratados. Com relação à análise quantitativa do colágeno do tipo III, observou-se uma baixa concentração dessa proteína nos animais do subgrupo B3, com diferença

significante comparando-se aos demais subgrupos. O FCF β contribuiu para acelerar o processo cicatricial, reduzindo o tempo médio de cicatrização de feridas infectadas e não infectadas da pele de ratos. Contribuiu para a maturação do colágeno através do aumento da densidade do colágeno do tipo I, bem como incrementou a produção do colágeno tipo III. O anticorpo anti-FCF β foi capaz de bloquear a produção do colágeno nas feridas estudadas.

Palavras-chave: Cicatrização. Pele. Fator de crescimento epidérmico. Ratos.

ABSTRACT

The open surgical wounds heal for contraction of their borders and by migration of epithelial cells. The infection is one of the main factors that affect the physiological evolution of the surgical wounds. The aim of this work is to observe if the topical application of basic fibroblast growth factors (FGF β) can modify the repair of infected open wounds, promoting an exogenous stimulus to the inflammatory reaction and fibrogenesis. An experimental study was performed in 60 male Wistar rats weighing 270 ± 23 g. After anesthesia with intraperitoneal pentobarbital 20mg/Kg, two open squared wounds (1cm²), 4cm distant of each other, were done in the dorsal skin of all the rats. These wounds were named F1 (for inflammation analysis) and F2 (for collagen study). In all the animals of group A (n=30) the wounds were contaminated with a multibacterial standard solution, and in the group B (n=30) the wounds were maintained sterile. Each group was divided into three subgroups: subgroup A1, B1; A2, B2 and A3, B3. The open wounds of A1 and B1 rats were topically treated with saline solution, A2 and B2 were treated with FCF β and the subgroups A3, B3 were treated with FCF β anti-factor. The F and Tukey tests were used for statistical analysis, considering $p<0.05$ as significant. The rats were observed until the complete wounds healing and were sacrificed with overdose of anesthetic. Measures were performed considering the time for the complete scarring of wounds, the synthesis of types I and III collagen, the inflammatory reaction and the maturation of collagen. For qualitative and quantitative histological analysis of collagen, the Picro Sirius Red staining was used. The inflammatory reaction was measured by the Image Pro-plus, Media Cybernetics software. It was observed that infection retarded significantly ($p<0.05$) the time of wound scarring and the topical application of FCF β reverted the inhibition of healing caused by bacteria. The inflammatory reaction was more intense in the subgroup B2 than B1 and A3, and the difference was significant ($p<0.05$). It was observed greater concentration of type I collagen in all the subgroups treated with FCF β , when compared to the untreated subgroups. Regarding the quantitative analysis of the type III collagen, it was observed a significant decreased concentration in B3 rats, comparing to the other subgroups. The FCF β accelerated the healing of open infected wounds, by reducing the medium time of scarring. It contributed with maturation of collagen, enhancing the type I collagen density. Additionally, the FCF β increased the

production of type III collagen. The anti-FCF β antibody was able to block the production of both type I and III collagen.

Keywords: Wound Healing. Skin. Epidermal Growth Factor. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Animal anestesiado, posicionado na mesa, antissepsia com povidona	33
Figura 2 - Ferida 1 e ferida 2 com 1cm ² (cranial e caudal)	33
Figura 3 - Aplicação tópica da solução contendo bactérias	34
Figura 4 - Aplicação do FCF β ou do anti FCF β	35
Figura 5 - Delineamento experimental com a distribuição dos 60 animais em grupos e N subgrupos, e seus respectivos tratamentos	35
Figura 6 - Densidade de células inflamatórias para todos os grupos	39
Figura 7 - A maior intensidade da reação inflamatória é vista nesta lâmina de um animal do subgrupo B2.....	40
Figura 8 - Reação inflamatória de lâmina de animal do subgrupo A3.....	40
Figura 9 - Animal do subgrupo B1 Subgrupo A3 H-E 200x.....	40
Figura 10 - Neste gráfico observa-se que há diferença na densidade do colágeno do tipo I entre o subgrupo B2 e os demais subgrupos. Porém, essa diferença é significativa apenas, quando comparada com o subgrupo A1 (p<0,05)	41
Figura 11 - Imagem com coloração pelo <i>picro-sirius red</i> de um animal do subgrupo B2, onde se observa alta densidade do colágeno tipo I, corado em vermelho (200X)	42
Figura 12 - Microfotografia de lâmina de animal do subgrupo A1, com baixa densidade de colágeno tipo I. (200x).....	42
Figura 13 - Média da densidade do colágeno tipo III.....	43
Figura 14 - Lâmina do subgrupo B3, com baixa densidade do colágeno do tipo III .	44
Figura 15 - Lâmina de animal do subgrupo A1, onde se vê grande densidade de fibras com coloração verde, colágeno tipo III (200x)	44
Figura 16 - Lâmina de tecido em cicatrização de animal do subgrupo A3, com alta densidade de colágeno tipo III. (200x)	45
Figura 17 - Lâmina de animal do subgrupo B2, onde se vê significativa concentração de colágeno tipo III (200x).....	45

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Média do tempo necessário para a completa cicatrização de F2 em cada subgrupo38
- Tabela 2** - Médias dos totais de células inflamatórias e densidade de cor do colágeno tipo III e tipo I, nos subgrupos estudados. Análise histológica por HE e picrossirius, respectivamente 46

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	16
3.	LITERATURA	17
3.1	Aspectos Gerais sobre cicatrização das feridas.	17
3.1.2	Aspectos gerais sobre cicatrização de feridas abertas.....	24
4.	FATORES DE CRESCIMENTO	28
4.1	Fatores de crescimento de fibroblastos (FCFs).....	29
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1	Reagentes:	32
5.2	Animais de experimentação	32
6.	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	33
7.	TRATAMENTO DAS FERIDAS	34
8.	ANÁLISE HISTOLÓGICA	36
9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
10.	RESULTADOS	38
10.1	Tempo de cicatrização.....	38
10.2	Histologia.....	39
10.3	Análise qualitativa do colágeno do tipo 1, pelo método do picro-sirius red a partir da determinação do uso de imagens digitalizadas.....	41
11.	ANÁLISE HISTOQUÍMICA QUALITATIVA DO COLÁGENO TIPO III ATRAVÉS DA COLORAÇÃO <i>PICRO-SIRIUS RED</i>	43
12.	DISCUSSÃO	47
13.	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

As feridas cirúrgicas abertas cicatrizam por dois mecanismos básicos: contração das bordas das feridas e por migração de células epiteliais. A contração diminui o tamanho da espessura total da ferida operatória através de movimentos centrípetos de toda a pele que circunda a ferida, em seguida os capilares da borda e da intimidade da ferida formam novos vasos, ocorre a migração e formação de fibroblastos que preenchem toda ela^{1,2}.

Muitas teorias relacionam o mecanismo de contração à capacidade dos fibroblastos em se contraírem e movimentarem-se na matriz extra celular. Se estes fibroblastos são células especializadas chamadas miofibroblastos, ou simplesmente fibroblastos regulares, que assumem tais atividades não está claro³.

As células especializadas, ou não, exercem suas funções movimentando-se no interior da ferida por meio de elementos fibróticos auxiliares, como fibrina e fibronectina, as quais funcionam como um guia ou um elemento de sustentação^{3,4,5,6}.

A cicatrização de feridas por contração é influenciada por muitas variáveis, tais como: uso de esteróides, diabetes, avitaminoses e infecção. A infecção é um dos principais fatores que alteram a evolução fisiológica do reparo tecidual^{4,5,6,7}.

Muitos são os caminhos pelos quais a bactéria pode afetar a contração das feridas e o seu fechamento. Ficou demonstrado por Perry e Sutkin et al (1989), que as bactérias secretam ativadores exógenos de plasminogênio, e contêm no seu exudato inflamatório enzimas proteolíticas que em conjunto afetam os elementos fibrinosos da matrix extracelular, bloqueando a contração da ferida⁸.

Da mesma forma, Peacock (1991) afirma que as bactérias são capazes de inibir a síntese de novos capilares, implicando, portanto, negativamente nos dois mecanismos capazes de promoverem a contração das feridas.⁹

Tem sido demonstrado que a aplicação tópica do Fator de crescimento de Fibroblasto de reação básica (FCF β), influencia a contração de feridas abertas quando há contaminação local. Sendo capaz de reverter a inibição da contração causada pelas bactérias em feridas de pele de ratos contaminadas com *Escherichia coli*, diminuindo o tempo necessário para o fechamento completo da ferida operatória. Outro aspecto

importante é que, apesar de diminuir o tempo de cicatrização, ocorre uma redução da resistência tênsil da ferida, verificados pelos testes de resistência às tensões^{7,10}.

Hayward et al em 1992 e Stenberg et al em 1999 revelaram em modelo experimental que o FCF β é capaz de reverter os efeitos da infecção sobre a contração das feridas abertas em praticamente todas as fases da cicatrização através do estímulo à migração de fibroblastos^{7,10}. Broadley et al revelaram em 1989, que a neutralização do FCF β por um anti-corpo específico é capaz de reverter suas funções, causando uma significativa redução de DNA, proteínas e conteúdo do colágeno¹¹.

Tudo leva a crer que o ambiente cicatricial infectado exerce influências sobre o modo de agir das citocinas da cicatrização como revelado por Ono et al (1999) em experimentos nos quais a aplicação tópica do FCF β foi capaz de inibir significativamente a contração de feridas em cicatrização por segunda intenção, na ausência de infecção, o que pode ter um benefício na prevenção de cicatrizes hipertróficas e queloidianas¹².

Da mesma forma Kamamoto et al (2003) que o FCF β foi capaz de inibir a formação de cicatrizes hipertróficas e queloidianas, assim como o TCF β foi capaz de induzir a formação das mesmas¹³.

Medeiros et al (2001), assim como McGee et al (1988) revelaram que o FCF β foi capaz de influenciar significativamente os parâmetros da cicatrização de feridas incisionais como a densidade do colágeno e a resistência à tensão, não submetidas a situações desfavoráveis, como infecção, uso de esteróides, radioterapia e imunossupressores, concluindo que o FCF β é capaz de afetar positivamente a cicatrização^{14,15}.

Verifica-se que o FCF β é capaz de melhorar a performance da cicatrização de feridas incisionais e feridas excisionais infectadas, diminuindo o seu tempo de fechamento, aumentando a síntese do DNA da matriz extra celular, sem aumentar a resistência às tensões das feridas¹⁰.

Resumidamente, tem-se verificado que o FCF β atua na matriz extracelular, estimula a angiogênese, a migração de fibroblastos com a conseqüente neovascularização e fibrogênese, promovendo o fechamento da ferida operatória aberta infectada, contribuindo para maior resistência à tensão^{3,4,5,6,7,8,9,10}.

Assim sendo, o propósito do presente trabalho foi estudar o efeito tópico do FCF β e seu anti-fator, em um modelo experimental com indução de infecção em feridas abertas

de pele de ratos, verificando especificamente, tempo de cicatrização e sua ação na expressão do colágeno tipos I e III, bem como sua maturação.

2. OBJETIVOS

1. Estudar a influência do uso tópico do Fator de crescimento de reação básica (FCF β) e do seu anti-fator, em lesões abertas e infectadas da pele de ratos, sobre o tempo de cicatrização, a reação inflamatória, a maturação e a síntese do colágeno tipos I e III.

3. LITERATURA

3.1 Aspectos Gerais sobre cicatrização das feridas.

A cicatrização é um processo dinâmico de restauração dos tecidos vivos. Envolve uma série complexa de eventos que ocorrem na matriz extracelular e têm a participação fundamental das células inflamatórias, e de seus mediadores na diferenciação de fibroblastos^{15,16,17}.

A capacidade de regenerar tecidos vivos foi substituída nos mamíferos pela cicatrização, que não deve ser comparada à mais primitiva função multirregenerativa, vista em anfíbios e no reparo das feridas fetais.^{18, 19,20.}

A evolução do processo de cicatrização é caracterizada por uma resposta inflamatória com formação do tecido de granulação, síntese do colágeno e remodelagem do mesmo. Ultimamente, vem crescendo o conhecimento sobre a atuação dos fatores de crescimento de fibroblastos nos fenômenos da cicatrização. Os efeitos e funções das células envolvidas são modificados e reguladas “in vivo” por estes fatores que são naturalmente secretados na própria ferida²¹.

Após o trauma tecidual, a exposição do colágeno subendotelial ativa a função plaquetária induzindo a liberação de ADP, serotonina e epinefrina. Com a formação do tampão plaquetário, ocorre a ativação da cascata da coagulação, formação da rede de fibrina e ao mesmo tempo uma intensa migração leucocitária⁹.

A participação de hormônios na cicatrização, originários da α -desgranulação plaquetária, não se limita apenas aos mediadores inflamatórios. Após a α -desgranulação plaquetária ocorre a liberação dos fatores de crescimento e das integrinas como a fibronectina, a laminina e a trombospondina.^{22,23}.

As feridas evoluem com um exsudato inflamatório ricamente protéico, leucócitos polimorfonucleares, monócitos e granulócitos, formação do coágulo e de uma rede de fibrina. Inserido nesse contexto estão as células responsáveis pela restauração tecidual que são as células endoteliais e principalmente os fibroblastos.^{24,25}

A rede de fibrina funciona como um substrato de anteparo à movimentação dos fibroblastos. Estes se movimentam, não por fluxo citoplasmático, mas por contato de aderência com o substrato. Portanto, a rede de fibrina funciona como um guia para contato célula-célula, permitindo a penetração do fibroblastos no interior da ferida operatória, a qual será preenchida por fibras de colágeno²⁵.

A formação inadequada da rede de fibrina, como a observada na deficiência do fator XIII (fator estabilizador de fibrina), está associada à cicatrização deficiente das feridas, secundária tanto a uma menor aderência das células na área inflamatória, quanto a uma quimiotaxia reduzida.⁹ Os fibroblastos fixam-se na seqüência – glicina - ácido aspártico existente na fibronectina, unem-se às moléculas de actina, com isso sinais quimiotáxicos passam através da membrana celular, permitindo a sua migração²⁶.

A resposta inflamatória é altamente necessária à restauração tecidual. Tanto a inibição da inflamação quanto sua ativação aumentada podem afetar o metabolismo do colágeno. Esse aspecto pode ser observado nos pacientes diabéticos e em uso prolongado de esteróides, nos quais a contaminação bacteriana prolonga a resposta inflamatória e impede o início da fase proliferativa.^{27,28} Da mesma forma, Olotuye e Barone (1997) demonstraram que o aumento da resposta inflamatória ao trauma tecidual aumenta a liberação dos fatores de crescimento derivados de plaquetas, levando à formação de cicatrizes hipertróficas, o que mostra que a resposta inflamatória interfere na síntese do colágeno²⁹.

Logo após o trauma tecidual, e na própria fase inflamatória, ocorre na intimidade da ferida operatória fenômenos proliferativos celulares, os quais constituem a re-epitelização e a proliferação de células endoteliais e fibroblastos.³⁰ Classicamente há a presença de apenas dois tipos celulares que vão interferir na síntese do colágeno, os macrófagos e os fibroblastos. Entretanto, os estudos atuais demonstram um terceiro tipo que atua ativamente nessa fase, que são as células endoteliais.^{30,31,32,33,34}

Segundo Steed (1997) e Thornton e Barbul (1997), a formação do tecido de granulação, da matriz extracelular e a deposição das fibras do colágeno são os principais

eventos que caracterizam a passagem da fase inflamatória para a fase de fibroplasia. Os fibroblastos migram para o interior ferida e se multiplicam em resposta aos mediadores liberados durante a inflamação^{35,36}.

Os macrófagos, em geral no terceiro dia de evolução da ferida, participam no processo de síntese do colágeno, através da função de fagocitose, facilitando a migração dos fibroblastos³⁴. Os mesmos promovem indiretamente a angiogênese, estimulam a formação de um grupo de substâncias moduladoras da cicatrização chamadas fatores de crescimento. Tais fatores são angiogênicos e estimuladores da síntese de fibroblastos, portanto os macrófagos são mediadores da fibroplasia e da angiogênese^{3,6}.

A fibronectina é uma proteína de aderência, como a laminina, trombospondina e o fator de Von Willebrand, os quais atuam permitindo a aderência entre as células e a difusão de nutrientes entre as mesmas. A fibronectina possui também outras propriedades, além de ser um poderoso quimiotático para os monócitos circulantes estimulando a diferenciação dos monócitos em macrófagos teciduais ativos.^{19,20}. A ativação dos macrófagos faz-se inicialmente pela ação de fatores provenientes das plaquetas e dos detritos produtos da fagocitose celular, sendo os lipopolissacarídeos de membrana e IFN- γ fortes elementos estimuladores, principalmente para macrófagos murinos¹⁷.

O macrófago ativado tem implicações fundamentais em vários aspectos da cicatrização das feridas, induzindo a produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF- α), IFN- γ , IL- β e IL-6, além da ativação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) resultando na produção de óxido nítrico, que desempenha importantes funções, incluindo propriedades antimicrobianas^{17,37,38}. A superprodução do óxido nítrico a partir de macrófagos ativados representa um importante mecanismo pelo qual a sua ação citotóxica atua contra uma ampla variedade de microorganismos. Apesar do papel benéfico do óxido nítrico como elemento ativo do sistema imunológico, a sua produção sustentada pode tornar-se deletéria^{38,39}. O óxido nítrico tem emergido como uma importante substância em vários processos fisiológicos, inclusive a cicatrização das feridas. O mesmo é produto do metabolismo endógeno da L-arginina pela ação enzimática da óxido nítrico sintetase induzida (iNOS). Atualmente tem-se dado crescente importância à sua influência no metabolismo do colágeno³⁹.

Okada et al demonstram em 2003 que através da manipulação genética é possível modular-se a intensidade dos efeitos da iNOS sobre o metabolismo do NO, diminuindo

sua concentração em até 25%, sem no entanto, modificar a síntese e a concentração sérica de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IFN- γ , IL -6 e IL-2³⁸.

Assim como outros autores demonstraram ser possível regular a ação da óxido nítrico sintetase induzida, Hsu et al (2005) revelaram ser possível modular a ação da arginase, tanto “*in vitro*” quanto “*in vivo*”, a partir da modulação dos fatores transcricionais tipo C/EBP β que são indutores da ação da arginase^{38,39,40}. Hsu et al (2006) revelaram que a ação da iNOS e as concentrações da mesma e do seu metabólito, o óxido nítrico, estão aumentadas na cicatriz queloidiana, enquanto que estão em concentrações normais no tecido perilesional. Ainda ficou demonstrado que a expressão do colágeno do tipo I está aumentada na cicatriz queloidiana³⁹.

As moléculas do colágeno são os componentes de maior importância da matriz extracelular e ainda provê resistência às tensões tanto da pele normal quanto das áreas em cicatrização. Durante o processo cicatricial atua modulando a migração e a proliferação celular, exercendo importante ação nos processos de contração das feridas⁴¹.

Dos tipos de colágeno identificados, sabe-se que na pele fetal o colágeno do tipo III predomina, que apresenta particularidades como não induzir de maneira acentuada a α -desgranulação plaquetária, o que afeta a produção dos fatores de crescimento derivados de plaquetas. Na pele dos adultos predomina o colágeno tipo I^{8,36,41}.

Há diferentes métodos de ensaio experimental e clínico para detectar e quantificar os vários tipos de colágeno existentes durante a cicatrização das feridas. Estes incluem métodos químicos como determinação da hidroxiprolina tecidual, métodos de coloração como Tricrômico de Massom, extração de proteínas teciduais de tubos e esponjas implantados no subcutâneo de animais por gel de eletroforese, gel de imunohistoquímica com análise de hibridização de mRNA em tecidos. Atualmente é o método mais usado, no entanto, depende de auto-anticorpos específicos a espécies animais estudadas, o que dificulta o seu uso em alguns modelos estudados^{8,15,36,41}.

O tipo de colágeno prevalente na ferida e nos tecidos vivos intactos sofre ampla variação, desde variações individuais dentro da mesma espécie a variações em indivíduos de espécies diferentes, dependendo do processo biológico vigente. Órgãos de peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos quando corados com o *Sirus Red* e estudado com microscopia de polarização ótica apresentam diferentes colorações para diferentes tipos de colágeno^{42,43}. O uso do corante *Sirus Red* ou *Picrosirus Red* como método histoquímico de detecção do colágeno tecidual foi inicialmente proposto por Junqueira et al (1978)⁴². Trata-se de um

método de coloração tecidual baseado na propriedade de bi-refringência natural que tem o colágeno. É de uso corrente em muitos laboratórios de patologia experimental, tem aplicação relativamente simples, de baixo custo operacional e produz belas imagens coloridas sob luz polarizada ⁴². As fibras do colágeno apresentam uma bi-refringência natural decorrente do arranjo espacial\estrutural das mesmas. Tais estruturas, sob luz polarizada, emitem uma amplitude de cores sobre um fundo preto e branco que possibilita a diferenciação de certas fibras do colágeno ^{39,40,41,42}.

O colágeno do tipo I, o qual tende a formar fibras espessas, apresenta um arranjo espacial com fibras próximas uma das outras, nas quais sua bi-refringência varia de um amarelo intenso a uma cor com tonalidade variada do vermelho. As fibras do colágeno do tipo III são mais finas, de forma que a cor produzida pela bi-refringência é produto da espessura das fibras e do arranjo espacial das moléculas do colágeno ^{40,41,42}.

Nos tecidos em cicatrização, dependendo da fase de reparação tecidual e do modelo experimental estudado, as fibras do colágeno podem apresenta-se à microscopia de polarização ótica com diferentes tonalidades de cores que simbolizam a fase do processo de maturação e remodelagem do colágeno, o que torna possível diferenciar os colágenos do tipo I e III⁴¹.

Em um estudo experimental comparativo realizado em fetos de cordeiros e em cordeiros adultos visando analisar a molécula do colágeno tanto do aspecto quantitativo quanto qualitativo, Cuttle et al (2005) verificaram que a ferida fetal cicatriza mantendo seu aspecto arquitetural normal com fibras de colágeno arranjadas regularmente. Isso foi observado tanto na fase inicial da cicatrização quanto nas fases mais tardias, enquanto que nos cordeiros adultos observaram um padrão de organização do colágeno irregular com estrutura pobremente definida, em todas as fases do período cicatricial ⁴¹. Outro aspecto importante também observado por estes autores é quanto ao tipo de fibra do colágeno e sua concentração. Segundo eles, o colágeno do tipo III predominou na cicatrização do feto e a sua contribuição na concentração total do colágeno variou de 51% a 95% entre o período de 7 a 14 dias e no período do 60º dia da cicatrização⁴¹. Nas feridas dos cordeiros adultos observou-se considerável concentração de fibras espessas mais amarelas e vermelhas, maior do que as fibras verdes em todas as fases. Em nenhum momento o índice de colágeno tipo III foi maior do que o colágeno tipo I⁴¹.

As moléculas do colágeno são as proteínas mais abundantes do corpo, sendo os principais componentes do tecido conectivo, sendo constituída por três cadeias de

polipeptídeos, dispostas em espiral, formando uma densa e compacta estrutura em tríplice hélice estabilizada por pequenos aminoácidos, prolina e glicina^{43,44,45}.

Estas estruturas formam as fibrilas do colágeno que tem de 10 a 300 nanômetros (nm) de diâmetro. As fibrilas formam as fibras que têm vários micrômetros de diâmetro, sendo facilmente visíveis à microscopia ótica. Há cerca de 25 diferentes tipos de camadas- α as quais formam, a partir de arranjo espacial, cerca de 20 diferentes tipos de colágeno, os quais são característicos de diferentes tecidos^{18,19,20}.

As fibras do colágeno são de diferentes diâmetros e estão arranjadas de diferentes padrões em diversos tecidos. O colágeno do tipo I é mais comum no osso, pele, tendões e na fase tardia da cicatrização, o tipo II é o colágeno próprio das cartilagens e o tipo III é encontrado em grande extensão nos tecidos embrionários, em feridas na fase precoce da cicatrização e no tecido conectivo da pele, vasos sanguíneos, ureter, pulmão e fígado³⁵.

Durante a fase de maturação do colágeno ocorre uma diminuição da síntese global de suas moléculas e um ganho de resistência tênsil da cicatriz. É nesta fase que começam a agir as enzimas de degradação do colágeno, que são as collagenases, com a finalidade de modular a nova síntese do colágeno. A fonte das collagenases na ferida é: células inflamatórias, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos e o ácido hialurônico³⁷. A collagenase é a enzima responsável pela degradação das fibras maduras do colágeno, secretada na sua forma inativa ou latente a qual é ativada por uma protease procollagenase ativadora. Esta última também é secretada como um zimogênio inativo que é ativado por outras proteases. Entre as enzimas proteolíticas capazes de ativar o complexo procollagenase ativador, especula-se que a plasmina produzida pelo plasminogênio ativador seja uma delas, além do FCF β ⁴⁶.

Durante o processo cicatricial as células endoteliais migram em direção às margens da ferida, aparentemente em resposta a sinais quimiotáticos exercidos por plaquetas, macrófagos e fatores de crescimento. Formam-se assim brotos capilares, os quais enviam processos celulares que se unem a brotos semelhantes para formarem novas alças capilares^{19,20,47}. Além dessa atuação na formação de novos vasos sanguíneos, as células endoteliais auxiliam a migração dos fibroblastos durante a fase de síntese de colágeno, através da produção do plasminogênio o qual degrada o excesso de fibrina^{31,46}.

A formação das moléculas do colágeno sofre alterações à medida que a angiogênese atende às necessidades metabólicas, e a concentração de lactato diminui passando a tornar-se mais lenta, predominando, então, os fenômenos de reabsorção das fibras⁴⁶. Alguns estudos

têm demonstrado que os fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento dos Fibroblastos de reação ácida (FCF α), o Fator de Crescimento Transformador, o Fator de Crescimento Epidérmico e o Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas aceleram o processo de cicatrização das feridas de pele, cada um com suas funções específicas^{48,49,50}.

Os Fatores de Crescimento são definidos como glicopeptídeos ou peptídeos que promovem o crescimento, a divisão e a migração celular no tecido lesado. Como tais, eles participam de vários aspectos da cicatrização das feridas, incluindo quimiotaxia, mitogênese e angiogênese. Também estimulam a formação da matriz extracelular, a remodelagem e maturação dos tecidos em cicatrização^{48,49,50,51}. De todos eles, o Fator de Crescimento de Fibroblastos básico (FCF β) parece ser o que tem o mais amplo espectro de ações sobre as células. Atuando como mitógeno, quimiotáxico e regulador da síntese protéica, influencia essencialmente todas as células envolvidas na cicatrização das feridas^{49,52,53}.

Fiddes et al (1991) e Yayon e Klaksbrum (1990) revelaram que os efeitos mitogênicos e quimiotáxico dos FCF β são dirigidos primariamente para células derivadas do mesoderma, como células endoteliais, fibroblastos, condrócitos, osteoblastos, células musculares lisas e melanócitos^{23,24}. Para Folkman e Klagsbrun (1990), o FCF β promove o crescimento e regeneração de órgãos e tecidos “in vivo” e, como fator angiogênico, estimula a produção de células endoteliais, de proteases e a migração celular²⁵. Diversos estudos têm testado os FCF β em lesões de pele, a maioria de localização dérmica e subdérmica. Fiddes et al²³ observaram maior número de fibroblastos, capilares e uma maior deposição de colágeno em esponjas de polivinil contendo FCF β implantadas no subcutâneo de ratos, achados semelhantes foram verificados por Davidson e Broadley.²⁶ Ao nível da derme e epiderme, McGee et al demonstraram uma aceleração do processo de cicatrização com uma única injeção intraincisional de FCF β ¹⁵.

Da mesma forma tem-se observado que feridas de animais diabéticos, em uso de corticosteróide e na presença de infecção têm apresentado aumento da angiogênese, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno significativamente mais elevados que nos controles. Estudos clínicos em que o FCF β foi usado em úlceras crônicas de decúbito e em lesões oculares mostraram resultados satisfatórios²⁷.

Os efeitos fisiológicos do FCF β são dose dependente. Como ficou demonstrado por Imaizumi et al (1996), o FCF β em doses de 1ng/ml é capaz de inibir a contração de feridas abertas não infectadas por ação de fibroblastos, apesar de duplicar o número de células no oitavo dia de cicatrização⁵².

Apesar de tantos estudos, ainda permanecem pontos controversos acerca dos possíveis efeitos fisiológicos dos FCF β sobre o metabolismo celular no processo biológico de reparo tecidual.

3.1.2 Aspectos gerais sobre cicatrização de feridas abertas.

As feridas abertas cicatrizam por um processo bimodal caracterizado pela contração das bordas da ferida e migração de células epiteliais, diminuindo a espessura total de ferida aberta, através de um movimento centrípeto de toda a pele que circunda a ferida não suturada^{7,46,51}. Dois mecanismos estão envolvidos no fechamento das feridas abertas, os citados fenômenos proliferativos e o mal compreendido mecanismo de contração das bordas da ferida aberta em cicatrização²⁸.

A contração das bordas de uma ferida em cicatrização é benéfica por permitir a redução da área total da ferida, mas pode tornar-se nociva quando contribui com as cicatrizes hipertróficas. O mal compreendido fenômeno de contração das feridas abertas parece estar diretamente ligado à ação tanto dos fibroblastos quanto dos miofibroblastos^{54,55}.

Na matriz extracelular ocorrem fenômenos proliferativos caracterizados por uma intensa neoformação de capilares sanguíneos e aporte de fibroblastos. Esses fenômenos culminam com a formação dos elementos estruturais do tecido em cicatrização representados pelo colágeno^{2,4,35,36,37}. Os fatores de crescimento de fibroblastos de reação básica têm uma ação sobre as feridas em cicatrização, mesmo sendo lesões crônicas como queimaduras complicadas por infecção, como ficou demonstrado por Hayward et al (1992), que relataram que o índice de fechamento de queimaduras crônicas foi maior no grupo tratado por FCF β , do que no grupo não tratado⁷.

Outros autores em 1991 tinham demonstrado que o FCF β também agiria em feridas abertas excisionais e infectadas. Os índices de fechamento foram maiores no grupo tratado do que no não tratado, apesar da resistência às tensões terem sido menores comparada ao grupo controle⁴¹.

Erlich et al (1990) revelaram através de estudo experimental *in vitro* que a contração de um gel de colágeno faz-se às custas, principalmente, da locomoção de unidades de fibroblastos presentes em maior concentração no centro desse gel, do que pela ação contrátil de unidades de miofibroblastos os quais estão em maior concentração na periferia gel⁵⁶. Portanto, o fechamento de uma ferida operatória excisional em cicatrização, de acordo com os

resultados desse trabalho, faz-se mais em decorrência da locomoção das unidades de fibroblastos no gel de colágeno do que pela ação contrátil de miofibroblastos. A alta concentração de miofibroblastos na matriz extra celular, de feridas em cicatrização, pode levar a defeitos do processo de contração das bordas das feridas, no entanto, permanece um ponto controverso, como podemos verificar a partir destes trabalhos abaixo referidos.

O miofibroblasto é uma célula que apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas tanto de um fibroblasto comum quanto de músculo liso. Normalmente o miofibroblasto encontra-se em altas concentrações na fase inicial do processo cicatricial promovendo forças contráteis, contribuindo para o fechamento da ferida, e em seguida desaparece por apoptose. No entanto, as populações de miofibroblastos podem permanecer por um tempo além da fase inicial da cicatrização, podendo contribuir para a formação de cicatrizes hipertróficas^{56,57,58,59}.

O tipo de ferida parece influenciar na concentração final dos miofibroblastos, como foi sugerido por Luomanen et al (1988). Segundo estes autores, as feridas excisionais provocam uma maior proliferação de miofibroblastos na matriz extra-celular quando comparada a feridas incisionais e em feridas provocadas pelo Laser⁶⁰.

Outros autores têm revelado resultados semelhantes, como Zeinoun et al (2001), que revelaram que a perda de miofibroblastos, uma das células responsáveis pela contração das feridas, observada nas feridas por Laser de dióxido de carbono, evoluem com mínima contratura cicatricial, caracterizando resultados conflitantes com outros estudos⁶¹.

O reparo de feridas abertas excisionais dá-se a partir do preenchimento de sua matrix extracelular por moléculas de colágeno, sintetizados por fibroblastos, para os quais deslocamento e o contato célula a célula tornam-se imprescindíveis, sendo que os miofibroblastos também atuam no processo de fechamento das feridas excisionais.

Este aspecto da capacidade motriz dos fibroblastos no cerne do processo de reparo, da matrix extracelular, também ficou demonstrado por Hunt et al (1993) e por Madden et al (1993), mostrando a íntima relação entre a rede de fibrina, permitindo a locomoção do fibroblasto, e a síntese do colágeno^{46,62}. Não é apenas a rede de fibrina que contribui com o ambiente adequado à migração dos fibroblastos permitindo uma síntese fisiológica das moléculas do colágeno^{9,15}. Mcgee et al (1998) revelaram que a fibronectina é uma molécula que tem importante participação na matrix extracelular. Segundo tais estudos, a síntese do colágeno fica comprometida em feridas contaminadas por bactérias Gram-negativas, possivelmente por

destruírem tais moléculas. Outra variável que pode afetar a formação da rede de fibrina é a deficiência do fator XII da coagulação (fator estabilizador de fibrina)^{9,15}.

Diferentes elementos como deficiências vitamínicas, esteróides, diabetes e contaminação bacteriana, afetam o índice de fechamento das feridas abertas excisionais, como mencionado por MacGee A et al, sendo a contaminação bacteriana os elemento mais implicado¹⁵.

Robson et al (1994) demonstraram em estudo experimental que substâncias com ação antibacteriana são capazes de inibir os efeitos deletérios das bactérias sobre as feridas abertas em cicatrização⁶³. Tais autores demonstraram que a aplicação tópica de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) melhorava o índice de fechamento de feridas abertas contaminadas com *Escherichia coli* quando comparadas a feridas abertas e contaminadas com o mesmo inóculo bacteriano e não tratadas, mostrando que a diminuição das unidades formadoras de colônias de bactérias tornava-se benéfico ao processo de cicatrização⁶³.

Em 2003 Kanda et al revelaram através de técnicas de imunohistoquímica a forte presença de receptores celulares para os FCF β no núcleo dos miofibroblastos de áreas em cicatrização, sugerindo que tais receptores seriam os responsáveis pela cadeia de ligação entre os FGF β e estas células durante o processo de cicatrização⁵³.

Funato H et al revelaram em 1997 que a aplicação do FCF β em feridas de palato foram capazes de provocar a apoptose de miofibroblastos e inibir a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos⁵³.

A contração de feridas em seres humanos tem aspectos positivos e negativos. É benéfica por promover a redução da área total de ferida, entretanto, a formação de escaras hipertróficas, estenoses de órgãos e contratura são indesejáveis, tanto do aspecto estético quanto funcional^{58,59,60,61,62,63}.

Ono et al revelaram em 1999 que a aplicação tópica do FCF β associado a um gel de colágeno e fibroblastos ou isoladamente foi capaz de inibir a contratura de feridas excisionais, estimular a população de fibroblastos. Também observaram que as fibras do colágeno se organizavam de forma mais linear e horizontal quando na ausência do FCF β ¹². Estes aspectos também foram observados por Imaizumi et al (1996), onde ficou demonstrado que a aplicação do FCF β inibe a contratura do látice de colágeno⁵². Também ficou demonstrado por Shin e Minn em 2003 que os miofibroblastos estão fortemente envolvidos nos mecanismos de contratura, em modelo experimental com um látice de colágeno contendo fibroblastos e

miofibroblastos. A contratura no grupo com miofibroblastos foi dia a dia maior do que no grupo com fibroblastos⁶⁴. Os miofibroblastos são células especializadas na contração de feridas excisionais e participam ativamente no processo de formação de escaras hipertrófica. Ttais acontecimentos podem ser modulados por uma gama de substâncias, inclusive os FCFβ
58,59,60,61,62,63

4. FATORES DE CRESCIMENTO

Os fatores de crescimento de fibroblastos são moléculas polipeptídicas que controlam o crescimento, a diferenciação e o metabolismo das células durante cada uma das três fases da cicatrização^{18,65,66,67,68}. Estão presentes em pequenas quantidades em todos os tecidos orgânicos, porém exercem uma poderosa influência local sobre o reparo das feridas. Esses polipeptídeos interagem com receptores específicos na superfície das células, dando origem a respostas específicas determinadas pelas vias de transdução mediadas por receptores dentro das células alvo^{1,2,21,22,23}.

Segundo Steed (1997), os fatores de crescimento agem em toda as fases da cicatrização de maneira direta, estimulando a proliferação de fibroblastos, a angiogênese, quimiotaxia a macrófagos e neutrófilos. De maneira indireta contribui para produzir collagenases, que vão degradar as fibras do colágeno na fase de remodelação³⁵.

A família dos fatores de crescimento é composta por vários representantes, que podem ser designados de acordo com o seu tecido de origem, como por exemplo, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), com sua ação biológica, fator de crescimento e de transformação (TGF) ou de acordo com a célula alvo, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e o fator de crescimento epidérmico (EGF)^{16,43,44,45}. Essas macromoléculas podem agir localmente e à distância. Quando os fatores de crescimento agem como hormônios, eles são transportados através do plasma ligados a grandes proteínas carreadoras. Apesar de poderem circular na corrente sanguínea, eles não têm uma ação sistêmica, como demonstrado por alguns estudos^{45,69}.

Os estudos iniciais não deixaram claro qual a verdadeira participação dos fatores de crescimento na cicatrização fetal, na qual dois aspectos estão mais ou menos definidos: há uma baixa concentração de fatores de crescimento na matriz extracelular da ferida em cicatrização no feto e seus fibroblastos têm poucos receptores para os fatores de crescimento^{18,19,20}. Esses dois aspectos, aliados a outros como, maior concentração do ácido hialurônico (AH), a capacidade do AH em modular a organização das fibras do colágeno, demonstrado por Hellstrom e Laurent (1994), provavelmente são os responsáveis maiores pelo reparo tecidual no feto sem a formação de cicatrizes⁷⁰.

Krummel e Nelson (1987) realizaram trabalho experimental, no qual demonstraram que o TGF- β 1 modifica o padrão de cicatrização fetal, para um modelo tipo cicatrização do

adulto e ainda revelaram que a síntese do AH não se modificava com a presença do TGF- β 1⁷¹. Estes estudos revelaram que a matriz extracelular fetal, assim como o próprio fibroblasto fetal, respondem a concentrações progressivamente crescentes de fatores de crescimento, o PDGF e o TGF- β 1, de maneira que é possível modular-se a cicatrização fetal, com o uso desses fatores, assim como, também é possível modular-se a cicatrização do adulto com o uso dos anti-fatores de crescimento, como também ficou demonstrado por Broadley e Aquino (1989)¹¹. Olutoye e Barone (1997) realizaram estudo experimental *in vitro*, no qual procuraram demonstrar que o colágeno, sendo o principal indutor fisiológico da agregação e da α -degranulação plaquetária na matriz extracelular do adulto, também poderia ser um indutor da agregação e α - desgranulação plaquetária na matriz extracelular fetal²⁹.

Este estudo demonstrou que o colágeno do adulto é um indutor da α - desgranulação plaquetária, apesar de não induzir a agregação, e que as plaquetas fetais podem produzir fatores de crescimento²⁹.

4.1 Fatores de crescimento de fibroblastos (FCFs)

Os fatores de crescimento de fibroblastos regulam uma imensa cadeia de eventos fisiológicos relacionados à vida celular que vão desde a apoptose, proliferação, diferenciação, a composição da matrix extracelular, quimiotaxia, adesão celular, migração e processos de crescimento celular. Constituem uma família de polipeptídeos mitogênicos fortemente relacionados. Atualmente sabe-se da existência de 22 membros desta família, os quais compartilham de uma seqüência homóloga de aminoácidos.^{72,73}

As ações dos fatores de crescimento de fibroblastos (FCFs) são muito variadas. Muitas variáveis biológicas concorrem para esta diversificação fisiológica. Entre elas podemos destacar o tipo de célula no qual está agindo, o momento biológico, o *status* bioquímico, e o ambiente físico-químico no qual a célula encontra-se⁶². De forma que, os FCFs podem exercer impacto fisiológico desde o desenvolvimento embriológico, processos fisiológicos como angiogênese, cicatrização das feridas, até a exercer uma atividade inapropriada em processos patológicos como neoplasias, doença de Alzheimer's, retinopatia diabética, desordens neurovegetativas e aterosclerose, inclusive fenômenos biológicos no processo de reparo tecidual como na inibição das escaras cicatricais^{74,75,76}.

Os FCFs exercem suas ações fisiológicas por meio de ligação com receptores de superfície celular de alta afinidade, os quais fazem parte da família de receptores da tirosina

quinase. Para melhor conhecimento destes elementos os cDNAs de quatro receptores específicos do FCFs foram geneticamente reproduzidos, são eles: FCFR-1, FCFR-2, FCFR-3 e FCFR-4^{47,53,77,78}. Todos os receptores têm em comum uma estrutura protéica geral caracterizada por uma seqüência clara de aminoácidos terminais dispostos como três imunoglobulinas extracelulares (designadas IGg I, II e III), uma única membrana envolvendo toda a superfície e uma tirosina quinase separada e dominante⁷⁹.

Os FCFs afetam a cicatrização das feridas por vários caminhos. Estimulam a proliferação dos fibroblastos através de uma ação direta sobre macrófagos, inibem a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, e agem indiretamente inibindo a ação dos fatores de crescimento e transformação- β (TCF- β), que são potentes indutores da diferenciação e proliferação de fibroblastos em miofibroblastos. Esta ação faz-se através da “down regulation” sobre o receptor 85-kDa do TCF- β ^{28,74,75,76}.

Os miofibroblastos são em tese as células responsáveis pela contração das bordas de uma ferida excisional em cicatrização. Permanece um ponto controverso na literatura tal afirmativa. Segundo Garner et al (1995) e Moulin et al (1996) há duas teorias acerca da contração das feridas excisionais^{80,81}. A primeira teoria considera o miofibroblasto como a célula principal no processo de contração, segundo a qual o miofibroblasto exerce a contração das bordas das feridas via “*gap junções*” entre os mesmos, funcionando à semelhança de fibras musculares. Esta teoria é fortalecida por experimentos nos quais estas células isoladas de feridas em contração ou de escaras hipertróficas promovem a contração de látices de colágeno de maneira mais intensa do que células isoladas de pele normal⁶⁴.

A segunda teoria advoga que a contração da ferida, em cicatrização, faz-se mais às custas de células migratórias que se movem através de uma rede de fibrina aplicando uma força centrípeta entre células e a matrix extracelular, culminando com o fechamento da ferida operatória. Muito embora o miofibroblasto esteja presente neste ambiente biológico, são os fibroblastos que apresentam esta propriedade de movimentar-se no interior da matrix extracelular^{82,83,84}.

O fator de crescimento de fibroblastos de reação básica (FCF β) acelera a cicatrização de feridas abertas e infectadas, assim como de feridas em ratos diabéticos e tratados com esteróides^{11,49}. O mecanismo pelo qual este processo se dá não está claro. De acordo com o trabalho de Stenberg et al (1989), a ferida aberta infectada tratada com fator de crescimento de fibroblastos de reação básica não parece cicatrizar por estímulo à síntese do colágeno¹⁰.

Ono et al (1999) revelaram que o FCF β é inibidor da contração de feridas abertas tanto isoladamente como associado a um gel contendo colágeno¹². Da mesma forma, Khouw et al revelaram que o FCF β inibe a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos e que o TGF-beta estimula. Está claro que o TGF-beta acelera o fechamento das feridas abertas infectadas sem, no entanto, promover a formação de escaras hipertróficas⁵⁴.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes:

Foram utilizados: o Fator de Crescimento de Fibroblastos de reação básica (FCF β) estabilizado em heparina, humano, recombinante, de procedência SIGMA; anticorpo Anti-FCF β da mesma procedência e *Direct Red 80* de procedência *Aldrich Chemical Co.*

5.2 Animais de experimentação

Os animais foram provenientes do Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental Prof. Clóvis Travassos Sarinho - CCS-UFRN. Foram usados 60 ratos da linhagem Wistar, todos do sexo masculino com peso 270 ± 23 g, submetidos a um período de aclimatação de sete dias no laboratório, antes de iniciados os experimentos. Mantidos em gaiolas individuais de polipropileno em ambiente com controle de partículas, temperatura 24°C, alternando-se 12 horas claro-escuro. Foram separados aleatoriamente em grupos e subgrupos e observados em gaiolas individuais durante todo o experimento, onde receberam água e alimento Labina-Purina[®] “ad libitum”.

6. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No dia anterior à operação os animais permaneceram por um período de jejum de 12 horas recebendo apenas água. Todos foram submetidos a anestesia com pentobarbital sódico, na dose de 20 mg/Kg, por via intraperitoneal, depilação da pele dorsal, contenção na mesa de operações em decúbito ventral e anti-sepsia com PVPI 1% (Figura 1). Foram criadas duas feridas de 1cm² de espessura total da pele do dorso, distando 4cm uma da outra, sendo a primeira mais cranial denominada F1 e a segunda mais caudal, F2 (Figura 2).



Figura 1. Animal anestesiado, posicionado na mesa, antissepsia com povidona.



Figura 2: ferida 1 e ferida 2 com 1cm² (cranial e caudal)

7. TRATAMENTO DAS FERIDAS

Os 60 animais que compõem o experimento foram divididos aleatoriamente da forma que pode ser observada na figura 5. No grupo A (n=30), imediatamente após o procedimento cirúrgico, foi feita a aplicação tópica nas feridas abertas de 0,1ml de solução composta de 1g de fezes frescas dos próprios ratos e 1ml de solução salina (Figura 3). No dia seguinte, constatada a infecção através da presença de secreção purulenta nas feridas F1 e F2, no subgrupo A1 (n=10) foi aplicada solução salina (1ml) sobre as feridas. Nos animais do subgrupo A2 (n=10) as feridas foram tratadas com solução de FCF β na dose de 10ng diluído em solução salina, correspondendo a 10 microlitros de solução. Nas feridas do sub-grupo A3 (n=10), além do FGF- β foi aplicado o anti-fator de crescimento na mesma diluição. (Figura 4).

Nos animais do grupo B (n=30) foram realizados os mesmos procedimentos do grupo A, sem indução de infecção nas feridas.

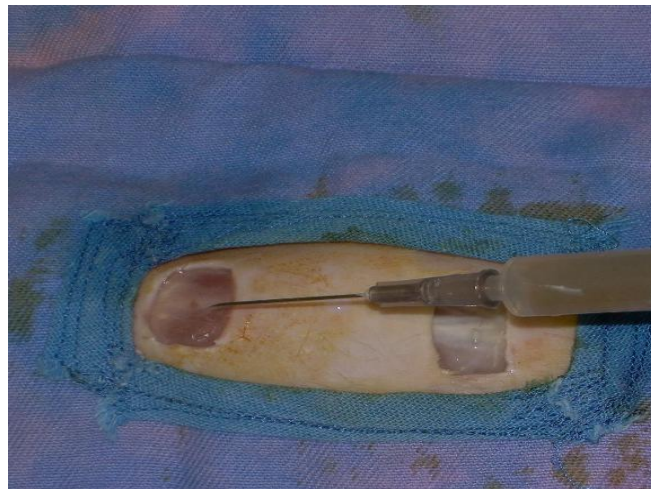


Figura 3. aplicação tópica da solução contendo bactérias.



Figura 4. Aplicação do FCF β ou do anti FCF β .

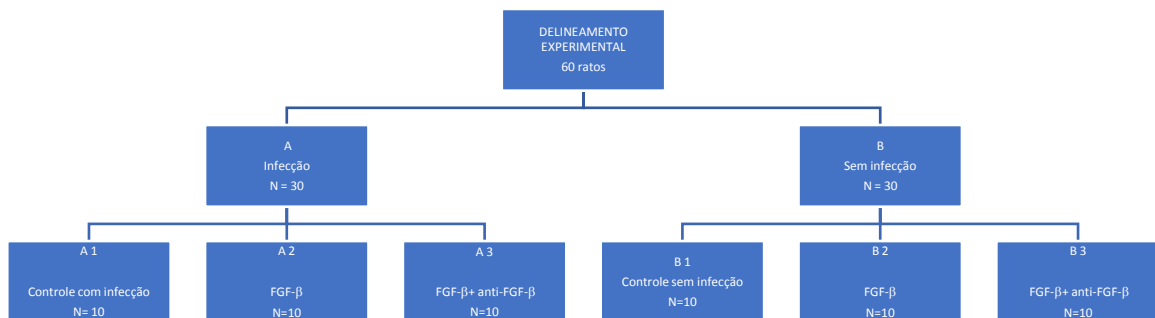


Figura 5. Delineamento experimental com a distribuição dos 60 animais em grupos e subgrupos, e seus respectivos tratamentos.

8. ANÁLISE HISTOLÓGICA

No oitavo dia de pós-operatório a ferida mais cranial (F1) foi totalmente ressecada, colocada no fixador formol 10% por três dias. Foi parafinizada, cortada em 5 μ através de micrômetro. Os cortes foram desparafinizados e corados com hematoxilina e eosina, para análise histológica da reação inflamatória. Os animais foram observados por um período necessário ao completo fechamento das feridas cirúrgicas localizadas na região mais caudal (F2), anotando-se o tempo de cicatrização na manhã em que as feridas mostravam-se totalmente epitelizadas. Em seguida, os ratos foram sacrificados com superdose de anestésico, a cicatriz cirúrgica foi ressecada em toda sua extensão, preparada para estudo histoquímico pelo método do “*picrosirus-red*”, afim de detalhar a densidade dos colágenos tipos I e III, bem como sua maturação. Cortes histológicos de 5 μ foram desparafinizados, hidratados e tratados durante noventa minutos em uma solução 0,1% de Red Sirius (*Direct Red 80 Aldrich Chemical Co.*) dissolvida em solução aquosa saturada de ácido pícrico. As sessões foram em seguida lavadas em água corrente e coradas com hematoxilina de Harris por 6 horas. As lâminas foram examinadas em microscópio ótico convencional com fonte de luz forte, utilizando 2 filtros de luz polarizada para estudar a bi-refringência do colágeno especificamente corado. Sobre luz polarizada, as fibras são vistas como discretas pontes de cores sobre um fundo preto. O colágeno do tipo I, que tende a formar fibras mais espessas constituídas por fibrilas compactas e densas, e com melhor arranjo espacial na sua bi-refringência, foi identificado quando variou de amarelo intenso a vermelho leve. O colágeno do tipo III, que tende a formar fibras mais finas com fibrilas menos compactas e mais separadas, foi identificado quando apareceu corado na cor verde, na bi-refringência.

A análise quantitativa dos achados histológicos foi realizada quanto à maturação colágeno de acordo com a sua birefringência, utilizando-se um sistema digitalizador e analisador de imagens. A área total dos campos microscópicos foi observada utilizando-se microscópio ótico (Olimpus B-50), cuja imagem foi capturada por câmera digital Samsung e digitalizada através de Software Image Pro-plus, versão 4.0 (Media Cybernetics - LP, USA). O campo digitalizado foi dividido pelo programa em unidades de imagem denominadas *picture elements* ou *pixels*, com coordenadas definidas. Foram avaliados por microscopia ótica, vinte campos aleatórios de cada lâmina. Após selecionada a resolução desejada, os impulsos óticos foram digitalizados, resultando em uma imagem de cada campo a qual foi armazenada, sendo processada em sistema multimídia. As lâminas foram examinadas para quantificação de células, fibras e elementos da reação inflamatória.

9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita utilizando-se o teste F e o teste de Tukey, através do software Statistica versão 6.0. As diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1 Tempo de cicatrização

Durante todo o procedimento os animais foram observados quanto ao padrão respiratório e as complicações respiratórias e a taxa global de mortalidade foi de 10%. O tempo necessário para a completa cicatrização da ferida f2 no subgrupo A1 foi de 21,5 dias, no subgrupo A2 12,87, no subgrupo A3 20,87 dias. No subgrupo B1 9,70 dias, no subgrupo B2 13,50 dias, no subgrupo B3 15,40 dias (Tabela 1). Não foram observadas cicatrizes hipertróficas em ambos os grupos.

Tabela 1: expressa a média do tempo necessário para a completa cicatrização de F2 em cada subgrupo

<i>Códigos dos subgrupos</i>	<i>Variável</i>	<i>Tempo de cicatrização (dias)*</i>
	<i>Subgrupos</i>	
A1	Infecção sem FCFβ	21,50 ± 1,60 ^a
A2	Infecção + FCFβ	12,87 ± 0,83 ^b
A3	Infecção + FCFβ + Anti- FCFβ	20,87 ± 1,64 ^a
B1	Sem infecção sem FCFβ	13,50 ± 1,18 ^b
B2	Sem infecção + FCFβ	9,70 ± 1,70 ^c
B3	Sem Infecção + FCFβ + Anti- FCFβ	15,40 ± 1,50 ^d

*Média ±desvio padrão.

Parâmetros assinalados com a mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$).

Na tabela 1, observando-se o tempo de cicatrização dos animais do subgrupo A1, percebe-se diferença significativa com relação a todos os demais subgrupos, com exceção do A3. Ocorreu diferença significativa no tempo de cicatrização do subgrupo A2, quando comparado com os demais, com exceção do subgrupo B1. Portanto, o tratamento das feridas com FCFβ foi capaz de acelerar o processo cicatricial tanto na ferida com infecção quanto sem infecção e a sua inibição através do seu anti-FCFβ retardou o processo cicatricial.

10.2 Histologia

Quanto à densidade da reação inflamatória, observa-se no gráfico abaixo (Figura 6) que houve diferenças estatísticas no número de células entre os vários grupos ao término do experimento. O gráfico sugere que o grupo A3, cujas feridas infectadas foram tratadas com FCF β + anti-FCF β , teve menor densidade no número médio de células inflamatórias do que os demais grupos.

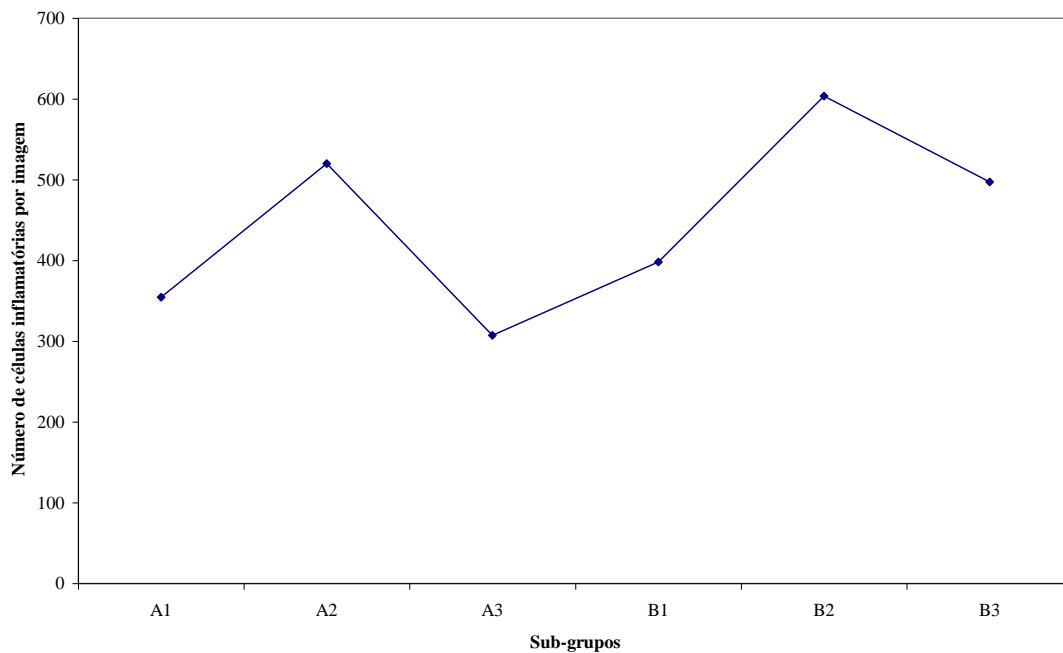


Figura 6: Densidade de células inflamatórias para todos os grupos.

A1, Infecção sem FCF β ; A2, Infecção + FCF β ; A3, Infecção + FCF β + Anti- FCF β ;
 B1, Sem infecção sem FCF β ; B2, Sem infecção + FCF β ; B3, Sem Infecção + FCF β + Anti- FCF β .

Na análise de variância através do uso de teste paramétrico, verificou-se que houve diferença significativa entre pelo menos um dos subgrupos comparando-se com os demais ($F=4,278$ com $p=0,003$), ou seja, verificou-se que o subgrupo B2 apresentou a maior densidade de reação inflamatória e difere dos demais com relação a esse parâmetro. Através do teste de Tukey para análise das comparações múltiplas com nível de significância de 5%, observou-se que há diferença significativa entre o subgrupo B2 e os subgrupos A1, A3 e B1 (Tabela 3). As figuras 7, 8 e 9 mostram alguns detalhes histopatológicos observados em lâminas dos tecidos de alguns animais e seus respectivos subgrupos.

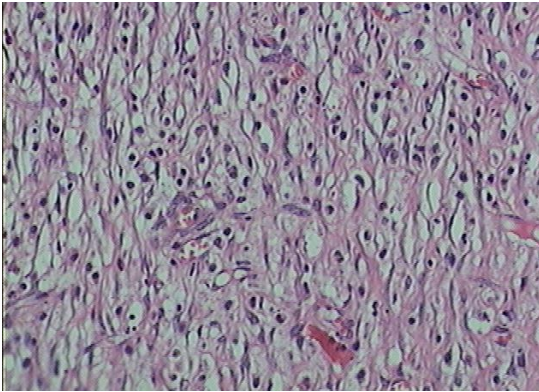


Figura 7. A maior intensidade da reação inflamatória é vista nesta lâmina de um animal do subgrupo B2.

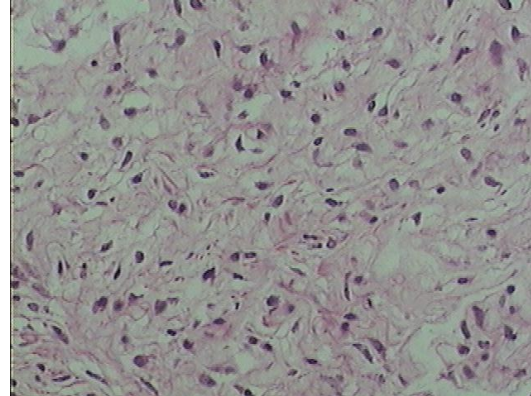
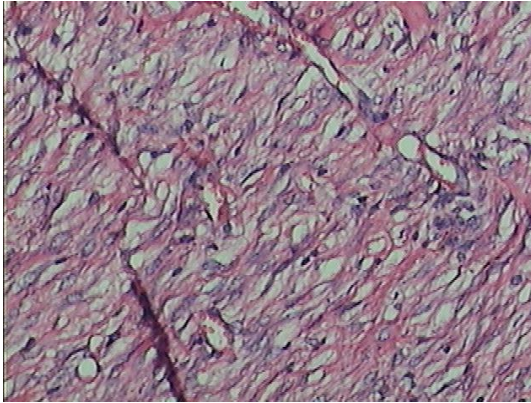


Figura 8: Reação inflamatória de lâmina de animal do subgrupo A3.



**Figura 9: animal do subgrupo B1
Subgrupo A3 H-E 200x**

10.3 Análise qualitativa do colágeno do tipo 1, pelo método do picro-sirius red a partir da determinação do uso de imagens digitalizadas.

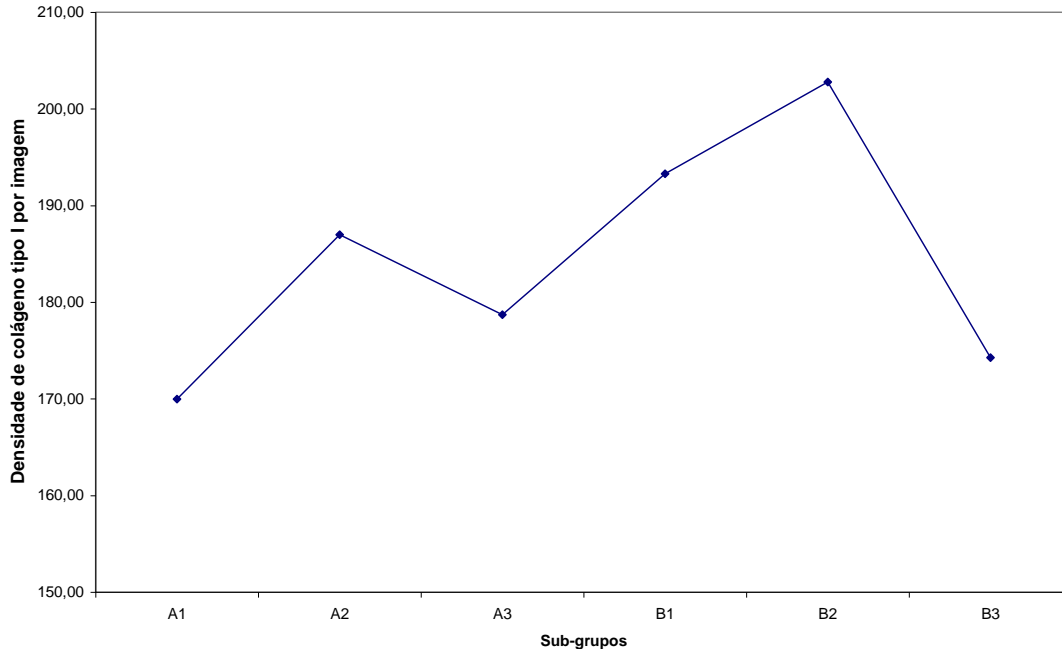


Figura 10. Neste gráfico observa-se que há diferença na densidade do colágeno do tipo I entre o subgrupo B2 e os demais subgrupos. Porém, essa diferença é significativa apenas, quando comparada com o subgrupo A1 ($p < 0,05$).

A1, Infecção sem FCF β ; A2, Infecção + FCF β ; A3, Infecção + FCF β + Anti- FCF β ;

B1, Sem infecção sem FCF β ; B2, Sem infecção + FCF β ; B3, Sem Infecção + FCF β + Anti- FCF β .

A análise de variância paramétrica constatou os valores $F = 3,345$ e p-valor igual a 0,015, significando que pelo menos um ou mais subgrupos diferem entre si. Na análise das comparações múltiplas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%, observou-se que a densidade do colágeno do subgrupo B2 tem diferença significativa apenas, quando comparado com o subgrupo A1 (Figura 10). Esses dados significam que quando as feridas não infectadas foram tratadas com FCF β , ocorreu o estímulo para produção de colágeno tipo I, proteína que predomina nas feridas com alto grau de maturação. Quando foi acrescentado o anti-FCF β às feridas (subgrupos A3, B3), houve redução da densidade do colágeno tipo I aproximando-se daquela observada no controle (A1). Nas feridas infectadas o tratamento com FCF β (subgrupo A2) contribuiu para aumentar a densidade do colágeno tipo I em relação ao controle (subgrupo A1) e o acréscimo do anti-FCF β fez reduzir essa densidade (subgrupo A3). Entretanto, as diferenças na densidade entre esses subgrupos não se mostraram significantes ($p > 0,05$).

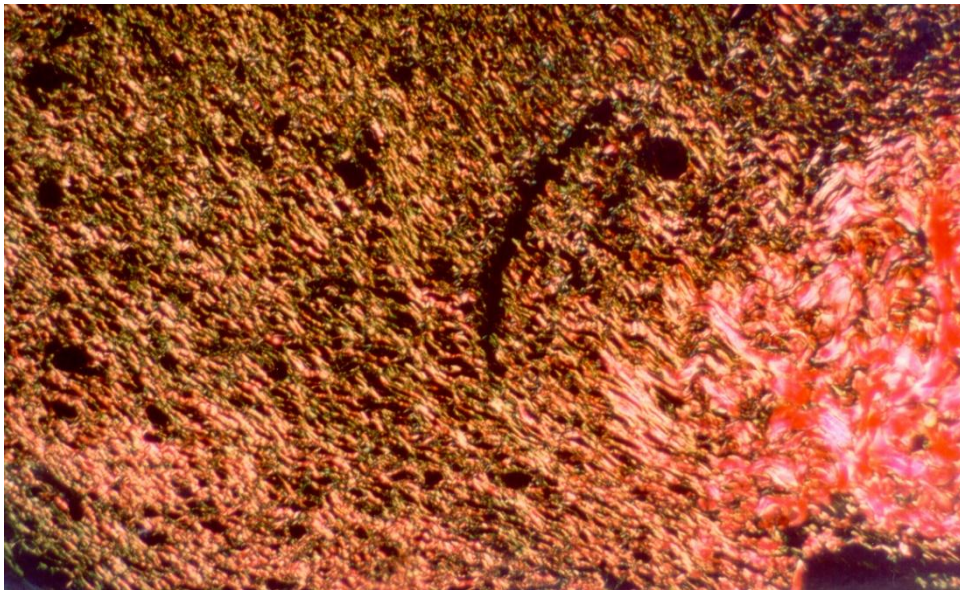


Figura 11. Imagem com coloração pelo *picro-sirius red* de um animal do subgrupo B2, onde se observa alta densidade do colágeno tipo I, corado em vermelho (200X).

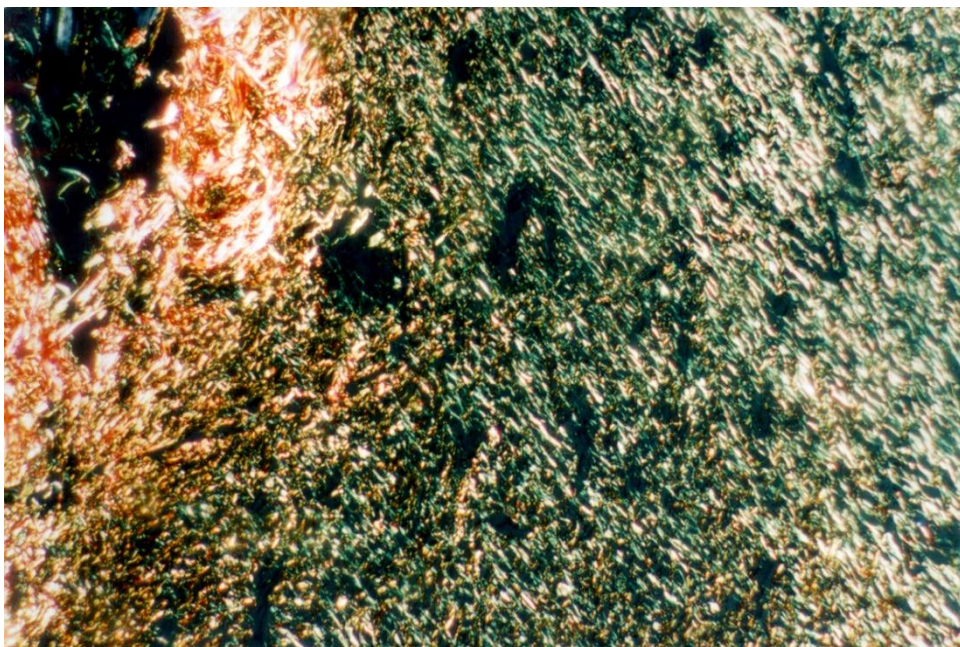


Figura 12. Microfotografia de lâmina de animal do subgrupo A1, com baixa densidade de colágeno tipo I. (200x).

11. ANÁLISE HISTOQUÍMICA QUALITATIVA DO COLÁGENO TIPO III ATRAVÉS DA COLORAÇÃO *PICRO-SIRIUS RED*.

Na análise da concentração do colágeno do tipo III observou-se que O FCF β estimulou a produção de colágeno tipo III indistintamente em feridas infectadas e não infectadas (subgrupos A1, A2, A3, B1 e B2) e que ocorreu diferença significativa entre a produção de colágeno tipo III quando foram comparados esses subgrupos com o subgrupo B3 ($p < 0,05$). Ou seja, o do anti-FCF β bloqueou a ação do FCF β como estimulante da a síntese do colágeno do tipo III em feridas não infectadas (subgrupo B3). A produção do colágeno tipo I foi sempre significativamente maior do que a do colágeno tipo III em todos os grupos, sobressaindo-se o subgrupo B2, cujas feridas não infectadas foram tratadas com FCF β .

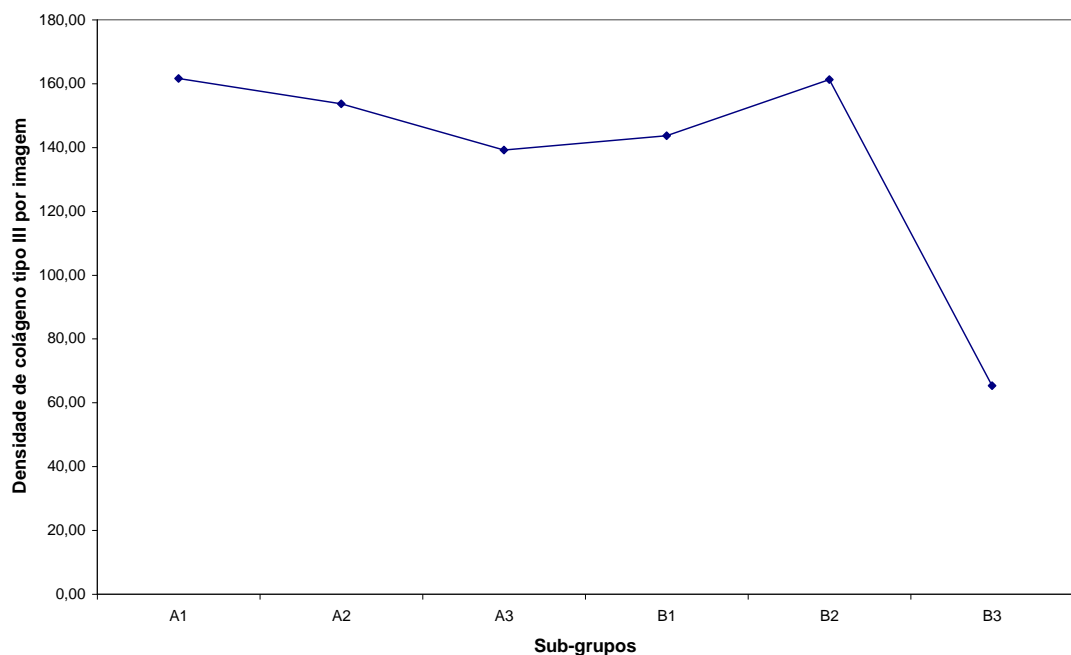


Figura 13. Média da densidade do colágeno tipo III .

A1, Infecção sem FCF β ; A2, Infecção + FCF β ; A3, Infecção + FCF β + Anti- FCF β ;

B1, Sem infecção sem FCF β ; B2, Sem infecção + FCF β ; B3, Sem Infecção + FCF β + Anti- FCF β .

Na análise de comparações múltiplas pelo teste de Tukey observou-se que há diferença ($p < 0,05$) entre o subgrupo B3 e os demais subgrupos (Figura 13). A figura 14 demonstra a baixa concentração de colágeno tipo III em lâmina do subgrupo B3, onde quase não são vistas fibras de coloração verde. Nas figuras 15 (subgrupo A1), 16 (do subgrupo A3) e 17 (subgrupo B2) observa-se alta densidade do colágeno tipo III, correspondendo aos subgrupos onde a presença desse tipo de colágeno foi elevada.

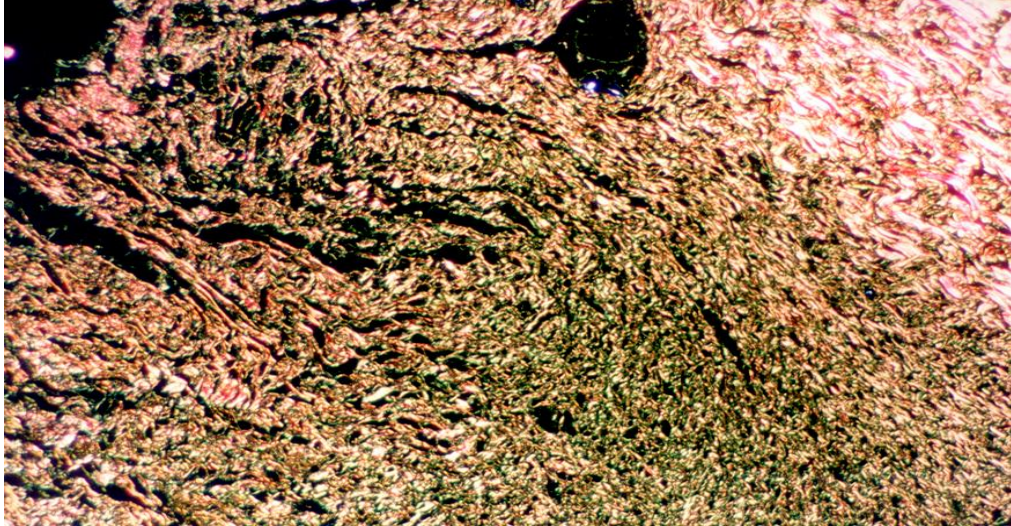


Figura 14: Lâmina do subgrupo B3, com baixa densidade do colágeno do tipo III.

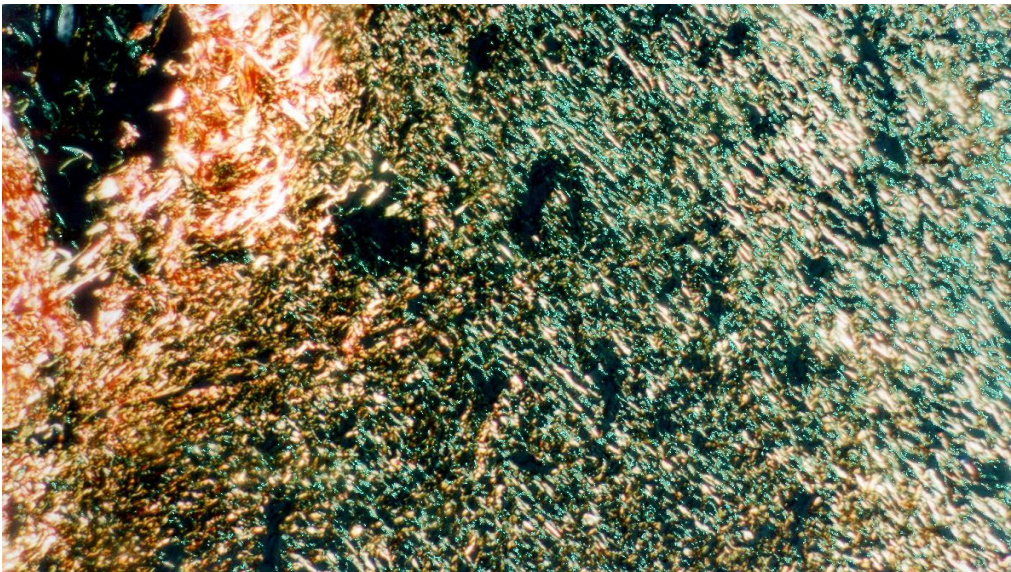


Figura 15: Lâmina de animal do subgrupo A1, onde se vê grande densidade de fibras com coloração verde, colágeno tipo III (200x).



Figura 16: Lâmina de tecido em cicatrização de animal do subgrupo A3, com alta densidade de colágeno tipo III. (200x).

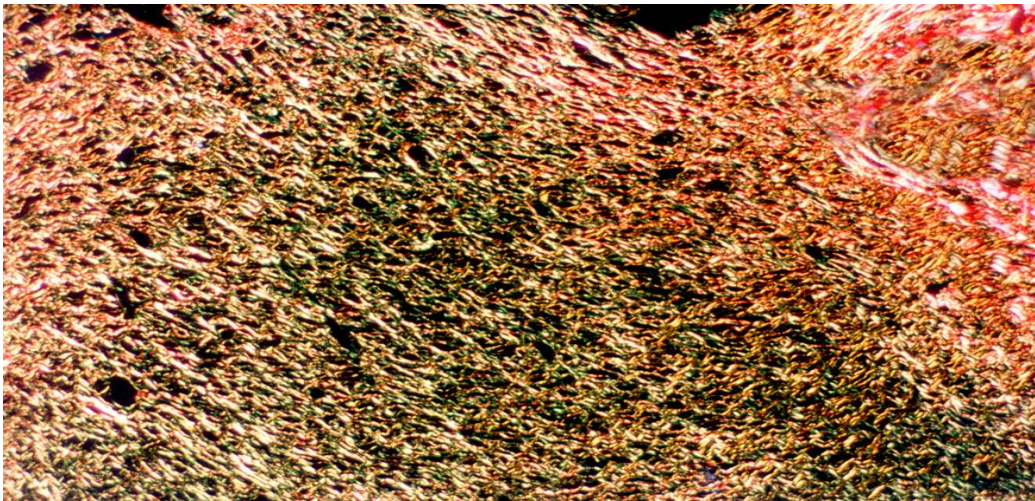


Figura 17. Lâmina de animal do subgrupo B2, onde se vê significante concentração de colágeno tipo III (200x).

Tabela 2: Médias dos totais de células inflamatórias e densidade de cor do colágeno tipo III e tipo I, nos subgrupos estudados. Análise histológica por HE e picrossírius, respectivamente.

<i>Variáveis</i>		<i>INFLAMAÇÃO HE*¹</i>	<i>COLÁGENO III²</i>	<i>COLÁGENO I^{*2}</i>
<i>Grupos</i>				
A1	Controle com infecção	398,00 ± 211,51	161,62 ± 8,63 ^{a**}	193,28 ± 7,29 ^{**}
A2	FCFβ + Infecção	519,87 ± 122,37	153,64 ± 7,52 ^{**}	186,97 ± 12,71 ^{**}
A3	FCFβ+ Anti-FCFβ + Infecção	307,37 ± 102,22 ^b	139,14 ± 22,32 ^{a**}	178,69 ± 29,89 ^{**}
B1	Controle sem infecção	354,60 ± 120,08 ^a	143,68 ± 9,03 ^{**}	169,96 ± 12,23 ^{a**}
B2	FCFβ sem infecção	603,62 ± 213,17 ^{ab}	161,29 ± 7,75 ^{**}	202,77 ± 18,77 ^{a**}
B3	FCFβ + Anti-FCFβ	497,50 ± 100,64	65,38 ± 14,92 ^{§**}	174,25 ± 19,04 ^{**}

Média ± desvio padrão.

*Valores com pelo menos uma letra igual diferem significativamente a um nível de 5% através do teste de Tukey.

**Diferença significativa entre o colágeno III e colágeno I a um nível de 5% pelo teste *t* para amostras pareadas.

§ Difere significativamente de todos os grupos através do teste de Tukey a um nível de 5%.

1 - Quantidade de células inflamatórias por imagem.

2 - Densidade de cor por imagem.

12. DISCUSSÃO

Entre as diferentes expectativas do sucesso do tratamento cirúrgico, pode-se ressaltar a cicatrização, fenômeno que envolve resistência dos tecidos suturados, estética e recuperação da função. Em se tratando em suturas de pele, esses aspectos são essenciais^{1,2,3,4}. No presente trabalho foi adotado um modelo experimental em ratos Wistar por ser um animal de fácil obtenção, de manejo anestésico e cirúrgico padronizado, de uso difundido, com os quais há um amplo conhecimento na investigação científica^{10,14,49,60}.

A anestesia com pentobarbital sódico intra peritonial na dose de 20mg/kg foi a técnica escolhida pela sua fácil execução, por apresentar uma rápida absorção e efeito prolongado no rato, possibilitando um tempo cirúrgico e um plano anestésico seguros e satisfatórios¹⁰.

O modelo cirúrgico experimental proposto permitiu uma análise evolutiva temporal da produção das fibras do colágeno. A análise histoquímica dos tipos do colágeno pelo método do *picrosirius red* baseia-se na birrefringência apresentada pelas suas fibras, quando expostas à luz polarizada^{41,42}.

O fator de crescimento de fibroblastos de reação básica é um polipeptídeo indutor da fibrogênese, miogênese e angiogênese de forma que a sua ação local pode estimular uma série de processos biológicos^{1,7,11,12,14,15}. Os trabalhos realizados por Greenhalg et al (1999) revelaram que feridas cirúrgicas de ratos diabéticos geneticamente modificados se beneficiavam com a aplicação tópica do FCFβ e do PDCF, diminuindo o tempo necessário à completa cicatrização de suas feridas, enquanto naqueles nos quais as feridas não eram tratadas o processo cicatricial não se fazia de forma semelhante⁴⁹.

A infecção é uma das variáveis que afetam os parâmetros da cicatrização e vários são os possíveis caminhos naturais pelos quais as bactérias podem atuar no sentido de trazer prejuízos ao processo de reparo tecidual. Peacock (1991) revelou que a bactéria secreta um ativador exógeno de plasminogênio e proteases capazes de contribuir para o lise de proteínas tais como a fibrina, além de bloquear a migração de fibroblastos e a formação de novos vasos⁹.

Brian et al (1989) revelaram que feridas excisionais e infectadas podem se beneficiar com a aplicação tópica do FCFβ. Usando a dose de 10µg/ml nos animais tratados, observaram uma redução no tempo de cicatrização. Da mesma forma, Hayward et al (1992) revelaram que queimaduras crônicas em fase de granulação beneficiam-se com a aplicação do FCFβ com dose dez vezes maior, ou seja, de 100µg/ml¹⁰.

Os resultados do presente trabalho revelaram que a infecção afeta o tempo de cicatrização retardando o fechamento das feridas, como visto nos animais com infecção sem o tratamento tópico com FCF β , onde o tempo médio de cicatrização por segunda intenção foi de 21,5 dias. Quando as feridas infectadas foram tratadas com FCF β , o tempo médio foi de 12,8 dias. Nos animais sem infecção o tempo médio de cicatrização foi de 13,5 dias e nos animais que receberam o FCF β houve uma redução no tempo médio para 9,7 dias. A literatura é controversa quanto aos mecanismos biológicos envolvidos nesta redução do tempo para a completa cicatrização. Os elementos biológicos que concorrem para a restauração tecidual são a resposta inflamatória com migração de polimorfonucleares, macrófagos, a migração de fibroblastos com a deposição de colágeno e a angiogênese, favorecendo o surgimento de novos vasos. Em todos estes fenômenos o FCF β atua beneficentemente ^{1,11,12,13,14,15,21,23,25,26,27}.

Mcgee et al (1988) e Slavin et al (1992) observaram que ao nível da derme e epiderme ocorre uma aceleração do processo de cicatrização com uma única injeção intraincisional de FCF β em feridas de animais diabéticos, em uso de corticosteróide e na presença de infecção. Nesses casos observaram aumento da angiogênese, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno mais satisfatórios que nos controles ^{15,27}. Em estudos clínicos, Folkman e Klaksbrun (1987), Robson et al (1992) e Folkman (1992) fizeram o uso tópico de FCF β em úlceras pépticas crônicas, em úlceras de decúbito e em lesões oculares. Observaram uma redução do tempo de cicatrização, com uma maior resposta inflamatória e maior deposição de colágeno nas lesões ^{25,28,85}.

Medeiros et al (2001) observaram que a aplicação intraincisional de uma única dose de FCF β em feridas suturadas foi capaz de estimular a proliferação de polimorfonucleares, macrófagos e fibroblastos com um aumento da síntese de colágeno e ganho de resistência à tensão nas cicatrizes ¹⁴. No entanto, Stenberg et al (1989) observaram dados conflitantes com a literatura. De acordo com os resultados dos estudos destes autores, o FCF β realmente é capaz de inibir o retardo na cicatrização provocado por bactérias que colonizam uma ferida excisional. Aplicando doses FGF β que variavam de 1.5 μ g/cm², 10 μ g/cm² a 100 μ g/cm² o tempo médio de cicatrização foi menor em relação aos grupos com infecção não tratados com FCF β . Além disso, a resistência à tensão foi menor nos grupos cujas feridas foram tratadas com FCF β , com ou sem infecção do que nos grupos dos animais não tratados ¹⁰.

O modelo experimental utilizado no presente trabalho foi semelhante ao de Stenberg et al, no qual realizou uma única aplicação tópica do FCF β na dose de 10 μ g/ml em veículo de acetato de sódio com pH 5.0. No presente trabalho aplicou-se 10 μ g/ml no primeiro dia da

cicatrização. A resistência às tensões não foi testada no presente trabalho, pois tratou-se de modelo experimental de cicatrização em feridas abertas quadrangulares por segunda intenção, e não de ferida incisa suturada. No entanto, em modelo experimental de feridas incisionais Medeiros et al (2001) observaram que uma única aplicação intraincisional do FCF β foi capaz de aumentar a resistência às tensões das feridas tanto no sétimo quanto do vigésimo primeiro dia de cicatrização¹⁴.

O fator de crescimento de fibroblastos é um forte indutor da fibrogênese, entretanto, estimula fortemente a produção de collagenases, enzimas que destroem as fibras do colágeno. Portanto, é possível que sua ação desordenada diminua a concentração global do colágeno, diminuindo a resistência das feridas às tensões, o que pode ter ocorrido no trabalho de Stenberg et al¹⁰.

A formação do tecido de granulação é parte fundamental do processo de reparo tecidual, envolve resposta inflamatória, migração celular seguida por proliferação celular e síntese de tecido conectivo^{1,2,3,4,14,15,24,25,26,27}. No presente trabalho experimental observou-se forte resposta inflamatória nos grupos tratados com o FCF β , com relação aos demais subgrupos não tratados, mostrando-se uma variável importante no processo de reparo tecidual.

O FCF β é um potente estimulador da resposta inflamatória no sítio da cicatrização. Tal estímulo tem sido demonstrado em situações adversas onde sabidamente há deficiência na formação e migração de polimorfonucleares e macrófagos, como no caso de animais diabéticos geneticamente modificados e em modelos experimentais de feridas em cicatrização tratadas com corticóides^{1,2,8,15,16}.

A contaminação bacteriana de uma ferida operatória é um potente indutor da resposta inflamatória, ativa a liberação de linfócitos, citocinas e macrófagos, além de fator de necrose tumoral e interleucinas^{8,9}. No modelo experimental ora analisado, demonstrou-se que a resposta inflamatória foi mais intensa no subgrupo sem infecção e tratado com o FCF β , até maior do que no subgrupo tratado com FCF β , com infecção, caracterizando um ponto contraditório com a literatura. No entanto, verificou-se que nos animais tratados com FCF β com ou sem infecção, a resposta inflamatória foi mais intensa do que nos animais não tratados ou naqueles em que houve inibição do FCF β com o anti-FCF β com ou sem infecção.

As fibras do colágeno são um dos principais componentes da matriz extracelular, sendo o responsável pela resistência tênsil das feridas. Durante o processo de cicatrização das feridas, o colágeno atua como um agente modulador da proliferação e migração celular, tornando-se um importante elemento no fechamento das feridas excisionais, o responsável maior pelo ganho de resistência das cicatrizes^{3,5,12}.

Os FCF β s são um grupo de potentes polipeptídeos, semelhantes a hormônios, que afetam uma ampla variedade de sistemas biológicos, incluindo o reparo tecidual, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Atuam em células de linhagem mesodérmica, tais como células endotélias, condrócitos, osteoblastos, células musculares lisas, melanócitos e fibroblastos^{1,2,7,14,15,76}. A aplicação intralesional de uma única dose do FCF-b em feridas incisionais é capaz de provocar estímulo à produção das fibras do colágeno, como ficou demonstrado por vários autores^{14,15,26}.

A resistência às tensões das feridas operatórias é produto de uma somatória de fatores, tais como: a concentração do colágeno, a espessura de suas fibras e seu nível de organização, como ficou demonstrado por White e Barbul⁷⁶.

Foi demonstrado no presente trabalho que a aplicação tópica do fator de crescimento foi capaz de estimular a concentração global do colágeno tanto do colágeno do tipo III quanto do tipo I, como foi observado em outros estudos^{14,15}. No entanto, os trabalhos de Stenberg et al (1991) e de Broadley et al (1989) revelaram que a aplicação intralesional do FCF-b em feridas excisionais infectadas e incisionais não infectadas, respectivamente, inibiu a síntese do colágeno^{10,11}.

No presente trabalho observou-se que a inibição do fator de crescimento de fibroblastos pelo anti-FCF β prejudicou a formação do colágeno do tipo III, tanto no subgrupo com infecção quanto no subgrupo sem infecção. A aplicação do FCF β aumentou a síntese global do colágeno, em maior intensidade o do tipo I, certamente contribuindo para a indução da maturação das feridas.

Outro aspecto ainda mais importante verificado no presente estudo foi o fato do FCF β ter aumentado a concentração do colágeno do tipo I, quando comparado com a concentração do colágeno do tipo III em todos os subgrupos analisados, fato que pode ser observado na tabela 3, correspondendo a um estímulo extra para aceleração do tempo de cicatrização e de estimular a maturação do colágeno, observação esta corroborada por vários estudos da literatura^{1,2,3,4,7,12,14,15,47,49,51,52,53}.

O uso do FCF β em feridas abertas não infectadas contribuiu para estimular a síntese do colágeno tipo III, que se manteve com densidade elevada durante o tratamento com FCF β exógeno. Entretanto, quando se acrescentou o anti-FCF β , ocorreu uma queda brusca e significativa na síntese desse colágeno, especialmente em feridas não infectadas. Pode-se inferir portanto, que a atuação do FCF β nessas feridas foi fundamental para a síntese do

colágeno tipo III. Nas feridas infectadas o anti-FCF β não conseguiu bloquear a síntese do colágeno tipo III, cuja densidade manteve-se elevada.

13. CONCLUSÕES

Nas condições do nosso experimento podemos concluir com margem de segurança de 95% que: A) A aplicação tópica intralesional do fator de crescimento de fibroblastos de reação básica contribuiu para alterar positivamente a evolução da cicatrização de feridas abertas da pele de ratos, infectadas e não infectadas, no que diz respeito ao tempo de cicatrização e reação inflamatória.

B) Contribuiu para a maturação do colágeno através do aumento da densidade do colágeno do tipo I, quando comparado com o colágeno tipo III, que também teve sua produção incrementada.

C) O anticorpo anti-FCF β foi capaz de reduzir significativamente a produção do colágeno tipo III e I, nas feridas tratadas com o FCF β .

REFERÊNCIAS

- 01 - Herndon D, Hayward P, Ratan R, Barrow R. Growth hormones and factors in surgical patients. *Adv Surgery*. 1992; 25: 65-97.
- 02 - Cromack D, Porras-Reyes B, Mustoe T. Currents concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. *J Trauma*. 1990;30:129-133.
3. Abercombie M Flint MH, James DW. Wound contraction in relation to collagen formation in scorbutic guinea pigs. *J Embriol Expl Morph*. 1956; 4: 167-173.
4. Mcgrath MH, Simon RH. Wound geometry and kinetics of wound contraction. *Plast Reconstr Surg*. 1983;1:66-72.
5. Ehrlick HP, Grislis G, Hunt TK. Evidence for the involvement of microtubules in wound contraction. *Am J Surg* 1977;133: 703-706.
6. Skalli O, Gabbiani G. The biology of the myofibroblast relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. In; R A F Clark, PM Henson. *The molecular and cellular biology of wound repair* 1988; New York: Plenum, chap. 17, 373-402.
7. Hayward P, Hokanson J, Heggers J. Fibroblast growth factor reverses the bacterial retardation of wound contraction. *Am J Surg*. 1992; 163:288-293.
8. Perry AW, Sutkin HS, Gottlieb LD. Skin graft survival- The bacterial answer. *Ann Plast Surg*. 1989; 22:479-483.
9. Peacock JR E E. A cicatrização e os cuidados com as feridas. In: Schwartz, Seymour I, Shires G, T, Frank S C. *Princípios de Cirurgia*. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991. Cap. 8, p. 251-271.
10. Stenberg BD, Phillips LG, Hokanson JA. Effect of b-fgf on the inhibition of contraction caused by bacteria. *J Surg Res*. 1999; 50: 47-50.
11. Broadley KN, Aquino AM Woodward S.. Brief communication: nonoespecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest*. 1989; 61:571-575.
12. Ono I, Tateshita T, Inoue M. The collagen matrix containing basic fibroblast growth factor on wound contraction. *J Biomed Master Res*. 1999; 48:251-271.
13. Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A. A wound contraction experimental model for studying keloides and wound healing modulators. *Artif Org*. 2003; 27:701-705.
14. Medeiros AC, Dantas Filho AM, FP Lima et al. Efeitos do fator de crescimento de fibroblastos na cicatrização da pele de ratos. *Anais Fac Med Univ Fed Pernambuco*. 2001; 46:78-82.

15. McGee G, Davdson J, Bukley A. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res.* 1988; 45:145-153.
16. Adzick NS. Cicatrização da ferida: características biológicas e clínicas. In: Sabiston Jr DV, Lyverly HK. *Tratado de Cirurgia: as bases biológicas da prática cirúrgica moderna.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999; 194-206.
17. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approach to wound management. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 244-269.
18. Longaker MT, Adzick NS. Studies in fetal wound healing: VII. Fetal wound healing may be modeling by hialuronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J Pediatr Surg.* 1990; 25: 430-433.
19. Lorenz HP, Longaker MT. Scarless wound repair. A human fetal skin model. *Development.* 1992; 114: 253-259
20. Mast BA, Haynes JH. In vivo degradation of fetal wound hyaluronic acid results in increased fibroplasia collagen deposition and neovascularization. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 89: 503-509.
21. McGrath MH. Peptide growth factors and wound healing. *Clin Plast Surg.* 1990; 17: 421-432.
22. Schweigerer L. Basic fibroblast growth factor as a wound healing hormone. *Trends Pharm Sci.* 1988; 9: 427-428.
23. Fiddes J, Hebda P, Hayward P. Preclinical wound-healing studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann N Y Acad Sci.* 1991; 638: 316-328.
24. Yayon A, Klagsbrum M. Autocrine regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor. *Cancer Metast Rev.* 1990; 9:191-202.
25. Folkman J, Klagsbrum M. Angiogenic factors. *Science.* 1987; 235: 442-447.
26. Davidson J, Bradley K. Manipulation of the wound healing process with basic fibroblast growth factor. *Ann NY Acad Sci.* 1991; 638: 306-315.
27. Slavin J, Nash J, Kingsnorth A. Effect of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor on steroid-impaired healing intestinal wounds. *Br J Surg.* 1992; 79: 69-72.
28. Robson M, Phillips L, Lawrence W. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of cronic pressure sores. *Ann Surg.* 1992; 216: 401-408.
29. Olutoye B O, Barone E J. Collagen cytokine release by fetal platelets: Implications in scarless healing. *J Pediatr Surg.* 1997;32:827-830.

30. Madden J W, Arem A J. A cicatrização das feridas . In: SABISTON JR, David C. Tratado de Cirurgia : As bases biológicas da prática Cirúrgica Moderna. 14. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1993.v.1, cap. 10 , p. 156-168.
31. Hunt T K, Goodson WH. Cicatrização de Feridas .In: WAY, Laurence W. Cirurgia: diagnóstico e Tratamento. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 1993. Cap. 8, p.67-76.
32. Krane S M, Neer R M. Tecido Conjuntivo . In : SMITH JR, Lloyd H.; THIER , Samuel O. Fisiopatologia : Os Princípios Biológicos da Doença. 2 ed . São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil, 1990; Cap.9, p. 564-603.
33. Modulin M; Bevilacqua R G. Cicatrização das Feridas. In : RAIA, Arrigo A.; ZERBINI, Euclides de Jesus. Clínica Cirúrgica Alípio Corrêa Neto. 4 ed. São Paulo: Sarvier , 1994; v.1, cap. 13, p. 133-137.
34. Bailay AJ. Collagen polymorfism in experimental granulation tissue. Biochem Biophys Res Commun. 1975; 66: 1160-64.
35. Steed DL. The role of growth factors in wound healing. Surg Cl North Am. 1997; 77: 571-582.
36. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. Surg Cl North Am. 1997; 77:547-570.
37. Ehrlichman RJ, Seckel B R, Bryan DJ, Moschella. Common complications of wound healing: preventions and management. Surg Cl North Am. 1991;70:1405-1415.
38. Okada S, Obata S, Hatano M. Dominant-negative effects of the C-fos family gene products on inducible NO synthetase expression in macrophagos. Int Immunol. 2003; 15:1275-1282.
39. Hsu YC, Hsiao M, Wang LF, Chien YW, Lee WR. Nitric oxide produced by INOS is associated with collagen syntesis in keloid scar formation. Nitric Oxide. 2006; 14:327-324.
40. Albina JE, Mahiney EJ, Daley JM. Macrophage arginase regulation by CCAAT/ENHANCER-Binding protein. Shock. 2005; 23:166-172.
Brew EC, Mitchell MB, Harken AH. Fibroblast growth factors in operative wound healing. J Am Coll Surg. 1995; 180: 499-505.
41. Cuttle L, Nataatnadjia M, Fraser JF. Collagen in the scarless fetal skin wound: detection with picosirius red. Wound Rep Reg. 2005; 13: 198-204.
42. Junqueira LCU, Cossermely W, Brentani R. Differential staining of collagens type-I, Type-II and Type-III by picosirius red and polarization microscopy. Arch Hist Japn. 1978; 41: 267-274.
43. Arora PD, Narani N, McColloch P. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin fibroblast. Am J Pathol. 1999; 45:438-452.

44. Baird A, Walicke PA. Fibroblast growth factors. *Br Med Bull.* 1989; 45: 439-452.
45. Bettinger DA, Yager DR. The effect of Tgf- β on keloid fibroblast proliferation and collagen synthesis. *Plast Reconstr Surg.* 1996;98:827-833.
46. Hunt TK, H William, Goodson III. Cicatrização de feridas. In: Scharzt SI, Shires GT, Spencer FC. *Princípios de Cirurgia.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993; 77-79.
47. Gosporadowicz D. Basic Science and pathology: Fibroblast growth factor: Chemical structure and biologic function. *Clin Orthop Res.* 1990; 257:231-248.
48. Gold LI, Sung JJ, Siebert JW. Type I(RI) and type II(RII) receptors for transforming growth factor- β isoforms are expressed subsequent to transforming growth factor β ligands during excisional wound repair. *Am J Pathol.* 1997; 150: 209-222.
49. Greenhalgh DG, Sprugel KH. Murray MJ, Ross R. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *Am J Pathol.* 1990;136:1235-1246.
50. Haynes JH, Johwson DE. Platelet derived growth factor induces fetal wound fibrosis. *J Pediatr Surg.* 1994; 29:1405-1408.
51. Herba PA, Klingbeil CK, Abrahan JA. Basic fibroblast growth stimulation of epidermal wound healing in pigs. *J Invest Dermatol.* 1990; 95: 626-631.
52. Imaizumi T, Jean-Luis F, Dubertret ML. Effect of human basic fibroblast growth factor on fibroblast proliferation, cell volume, collagen lattice contraction: in comparison with acid type. *J Dermatol Sci.* 1996; 11: 134-141.
53. Kanda T, Funato N, Baba Y. Evidence for fibroblast growth factor receptors in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *Arch Oral Biol.* 2003;48:213-221.
54. Khouw IM, Wachem PB, Platinga JA. TGF- β and FGF- β affect the differentiation of proliferating porcine fibroblast into myofibroblast in vitro. *Biomaterials.* 1999; 20:1815-1822.
55. Lanning DA, Diegelman RF, Yager DR. Fibroblast induction with transforming growth- β and β 3 in cutaneous fetal excisional wounds. *J Pediatr Surg.* 2002; 35:183-187.
56. Ehrlick HP, Rajaratman JB. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an vitro model of wound contraction. *Tissue Cell.* 1990; 22:407-417.
57. Doukas J, Blease K, Craig D. Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle. *Moll Ther.* 2002; 5:517-527.
58. Ehrlick HP, Keefr KA, Myers LR. Vanadate and absence of myofibroblasts in wound contraction. *Arch Surg.* 1999; 134:494-501.
59. Funato N, Moriyama K, Shimokawa H. Basic fibroblast growth factor induces apoptosis in myofibroblasts cell isolated from rat palatal mucosa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 240:21-26.

60. Loumanen M, Lehto VP, Meurman JH. Myofibroblast in healing laser wounds of rat tongue mucosa. *Arch. Oral Biol.* 1988; 33:17-23.
61. Zeinoun T, Dourov N, Aftimos G. Myofibroblasts in healing laser excision wounds. *Arch Oral Biol.* 2001; 28:74-79.
62. Madden JW, Aren AJ. A cicatrização das feridas. In: Sabiston JR, David C. *Tratado de Cirurgia: As bases biológicas da prática cirúrgica moderna.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993; 156-168.
63. Robson M, Kucukcelebi A, Carp SS. Effects of granulocyte – macrophage colony-stimulating factor wound contraction. *Eur J Cl Microbiol Infect Dis.* 1994; 13:41-46.
64. Shim D, Minn KW. Effect of myofibroblast on contracture of hipertrofphic scar. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 113: 633-640.
65. Brew EC. Fibroblast growth factors in operative wound healing. *J Am Coll Surg.* 1995; 180: 499-505.
66. Shipley G D, Keeble W W. Growth of normal human keratinocytis and fibroblasts in serum – free medium is stimulated by acid and basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol.* 1989;138:511-518.
67. Siebert J W, Burd D A R.. Fetal wound healing: biochemical study of scarless healing. *Plast Reconstr Surg.* 1990; 85:495-504.
68. Thomas K A . Fibroblast growth factors. *FASEB J.* 1997;1:434-440.
69. Buckley A, Davidson JM. Sustained release of epidermal growth accelerates wounds repair. *Proc Nat Acad Sci.* 1985; 82:7340-7344.
70. Hellstrom S, Laurent C. Hyaloronan and tympanic membrane perforations. An experimental study. *Acta Oto Laryng.* 1994; 442: 54-61.
71. Krummel TM, Nelson JM. Fetal response to injury and its modulation with transforming growth factor beta. *Surg Forum.* 1987; 38:622-630.
72. Mignatti, P, Rifkin, DB. Release of basic fibroblast growth factor , an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomom or an novel secretory mechanism? *J Cell Biochem.* 1991;47:201-207.
73. Mcgrath, M H. Peptide growth factor and wound healing. *Cl Plast Surg.* 1990;17:421-432.
74. Tsuboi BR, Ryfkin DB. Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing- impaired db\db mice. *J Med.* 1990; 172:245-251.
75. Tsuboi BR, Shi C M. Co-administration of insulin- like growth factor (IgF)-I and IgF – binding protein-1 stimulates wound healing in animal models. *J Invest Dermatol.* 1995; 104:199-203.

76. Witte M B, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Cl North Am.* 1997; 77: 509-527.
77. De Iongh RV, Lavicu FJ Chamberlain CG. Differential expression of fibroblast growth factor receptors during rat lens morphogenesis and growth. *Invest Ophthal Vis Sci.* 1997; 38:1688-1699.
78. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent development in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol.* 1989; 109:1-6.
79. Takenaka H, Yasuno H, Kishimoto S. Immunolocalization of fibroblast growth factors receptors in normal and wounded human skin. *Arch Dermatol Res.* 2002; 294: 331-338.
80. Garner WL, Rittenberg T, Ehrlich HP. Hipertrofic scar fibroblast accelerate collagen gel contraction. *Wound Rep Res.* 1995; 3: 185-191.
81. Moulin V, Castiloux G, Jean A. In vitro models to study wound healing fibroblast. *Burns.* 1996; 22:359-362.
82. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001; 2(3) Reviews-3005.
83. Szerbenyi G, Fallon JF. Fibroblast growth factors multifuncionla signaling factors. *Int Rev Cytol.* 1999; 185: 45-106.
84. Herba PA, Collins MA, Tharp MD. Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermathol Clin.* 1993;11:685-696.