

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

FLÁVIA FERREIRA DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA *Calendula officinalis* L. NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE
CÃES. ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS**

RECIFE-PE
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

FLÁVIA FERREIRA DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DA *Calendula officinalis* L. NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE
CÃES. ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR** em Ciência Veterinária.

**RECIFE-PE
2006**

Catálogo na fonte

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M543a Menezes, Flávia Ferreira de
Avaliação da *Calendula officinalis* L. na cicatrização
cutânea de cães. Aspectos clínicos, histopatológicos e
histoquímicos.
/ Flávia Ferreira de Menezes - 2006.
82 f. : il.

Orientadora Maria Cristina de Oliveira Cardoso
Coelho. Tese (Doutorado em Ciência
Veterinária) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco. Departamento de Medicina
Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.708 96

1. Cão
2. Aspectos histoquímicos
3. Aspectos histopatológicos
4. Aspectos clínicos
5. Cicatrização
6. *Calendula officinalis*
7. Clínica veterinária
- I. Coelho, Maria Cristina de Oliveira Cardoso
- II. Título

Suely Manzi
Bibliotecária
CRB 809

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA *Calendula officinalis* L. NA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA DE
CÃES. ASPECTOS CLÍNICOS, HISTOPATOLÓGICOS E HISTOQUÍMICOS**

Tese de Doutorado elaborada por

FLÁVIA FERREIRA DE MENEZES

Aprovada pela

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho - Orientadora (UFRPE)

Profa. Dra Maria do Carmo Batista (UFPI)

Profa. Dra Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão – Co-orientadora (UFRPE)

Profa. Dra Ana Paula Monteiro Tenório (UFRPE)

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley (UFPE)

Profa. Dra Miriam Nogueira Teixeira (UFRPE)

Recife-PE
Março de 2006

**“Felicidade é o caminho que trilhamos
todos os dias até alcançarmos nossos
desejos.”**

Mike George.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos,

A **DEUS**, acima de tudo e de todos.

Ao meu **pai Jarbas** e **irmãos Fábio e Fabiana** pelo apoio e incentivo. E aos meus sobrinhos **Caio** e **Danilo** pelos momentos de descontração durante os períodos mais críticos.

A você **mamãe**, que mesmo não estando mais entre nós, continua nos iluminando.

À minha Orientadora Professora **Maria Cristina Oliveira Cardoso Coelho**, pela lição de vida, alegria, carinho, incentivo e ensinamentos dispensados em todos esses anos de amizade. E toda sua família **Giliate, Giliatino, André, Felipe** e **Maria Helena** pelo carinho e ajuda dispensada na finalização do trabalho.

À Co-orientadora Professora **Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão**, pelo carinho e amizade que sempre dedicou.

Ao querido, estimado, admirável e inseparável **Júlio Rodrigues Pereira Júnior**, companheiro de longas datas, não há como agradecer, definir ou medir seu carinho.

Ao **Laboratório Simões**, pela contribuição com o desenvolvimento do experimento.

Ao amigo, companheiro de curso e conselheiro **Ernesto Rodriguez Sallas**, obrigada por sua presença marcante, espírito guerreiro e incentivo que muito me inspiraram nos momentos mais difíceis.

Aos amigos **Fábio Brito** e **Marco Granja**, pelo companheirismo e momentos de descontração repletos de puro “besteirol”, essenciais nas fases mais críticas.

Ao professor Dr. **José Lamartine Aguiar** do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC/UFPE), pela ajuda imprescindível com as fotografias e pelo carinho e atenção dispensada.

Aos **professores da Área de Patologia**, por confiar o laboratório durante o processamento do material nos finais de semana.

Aos funcionários do Hospital Veterinário, **Ilma, Josi, Vera e Sr. Benedito**, que muito ajudaram durante o desenvolvimento do experimento.

À amiga **Grazielle Anahy de Sousa Aleixo** pela ajuda com a tradução dos textos.

À secretária da Pós-graduação **Edna Chérias**, pelos momentos de descontração e atenção dispensada.

Ao **Centro de Vigilância Ambiental da Prefeitura da Cidade do Recife (CVA/PCR)** pelo empenho no envio dos cães para realização do experimento.

Aos **cães**, que contribuíram de forma singular para o desenvolvimento do experimento, sem os quais não seria possível desenvolver este trabalho.

A **todas as pessoas** que adotaram os cães e lhes deram uma nova oportunidade de vida, com carinho, dedicação e principalmente com amor, meu eterno agradecimento.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo concedimento dos 48 meses de bolsa.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

	RESUMO.....	x
	ABSTRACT.....	xii
	LISTA DE FIGURAS.....	xiv
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	11
4	EXPERIMENTO 1	16
	Avaliação da pomada de <i>Calendula officinalis</i> L. durante o processo cicatricial de feridas cutâneas em cães.....	17
	Resumo.....	17
	Abstract.....	18
	Introdução.....	18
	Material e Métodos.....	20
	Resultados e Discussão.....	23
	Conclusão.....	36
	Referências Bibliográficas.....	36
5	EXPERIMENTO 2	40
	Efeito da <i>Calendula officinalis</i> L. sobre a colagenogênese e diferenciação do colágeno na cicatrização cutânea de cães.....	41
	Resumo.....	41
	Abstract.....	42
	Introdução.....	42
	Material e Métodos.....	46
	Resultados e Discussão.....	48
	Conclusão.....	53
	Referências Bibliográficas.....	53
6	EXPERIMENTO 3	
	Avaliação da contração primária após produção de falhas cutâneas na pele de cães.	56

Resumo.....	57
Abstract.....	57
Introdução.....	58
Material e Métodos.....	60
Resultados e Discussão.....	61
Conclusão.....	64
Referências Bibliográficas.....	64

RESUMO

Título: Avaliação *Calendula officinalis* L. na cicatrização cutânea de cães. Aspectos clínicos, histopatológicos e histoquímicos.

Autor: Flávia Ferreira de Menezes

Orientadora: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

A pesquisa e a aplicação de medicamentos com princípios naturais vêm sendo cada vez mais desenvolvidas e procuradas a fim de tratar diversas patologias, tanto para os seres humanos como para os animais. Na rotina veterinária se observa que os traumas envolvendo cães ocorrem com um alto percentual desencadeando perdas cutâneas de diferentes graus. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de cicatrização de feridas cutâneas tratadas topicamente com uma pomada teste composta de calêndula e vaselina, através de estudos clínicos, histopatológicos e histoquímicos. Para o estudo foram utilizados 18 cães machos, adultos, peso médio de $10,9 \pm 2,8$ Kg, sem raça definida que compuseram três grupos (A, B e C) com seis animais cada e diferindo apenas no tempo experimental, ou seja, no grupo A, a avaliação transcorreu durante sete dias, no do grupo B, em 14 dias e os do grupo C, em 28 dias. Em cada animal foram produzidas três lesões separadas entre si por aproximadamente 5 cm, na região torácica lateral as quais foram submetidas ao seguinte protocolo de tratamento: pomada de calêndula, de vaselina e solução de cloreto de sódio 0,9%. A troca dos curativos das feridas e a avaliação clínica ocorreram diariamente até o dia estipulado para da biopsia, ou seja, ao 7º, 14º e ao 28º dia. Os parâmetros clínicos observados foram: estado geral do animal, eriçamento dos pêlos, edema, eritema, dor ao toque, secreção, crosta, tecido de granulação, tecido cicatricial, contração da ferida, reações de sensibilidade cutânea, facilidade de aplicação e aderência do curativo. Exames histopatológicos foram realizados pela coloração Hematoxilina e Eosina e os histoquímicos através do Masson e picrossírius. Nos resultados se observou que ao 7º dia as feridas tratadas com cloreto de sódio apresentaram aderência da compressa de gaze a área cruenta, crostas ressecadas e espessas e coloração vermelha escura e fosca; as dos demais grupos mostravam-se com uma intensidade de cor e brilho. As tratadas com pomada de calêndula e vaselina demonstraram presença discreta de tecido de granulação na área central da lesão e tecido cicatricial nas bordas. Ao 14º dia as feridas que receberam calêndula e vaselina caracterizavam-se pela presença de crosta, tecido de granulação preenchendo a área cruenta e tecido cicatricial; as tratadas com solução de cloreto de sódio 0,9% apresentavam uma maior quantidade de exsudato considerado inflamatório. As avaliações clínicas das feridas estudadas no grupo 28º dias ocorreram até o 18º dia, pois a partir deste momento todas feridas encontravam-se cicatrizadas. No 7º dia de tratamento a avaliação histopatológica se constatou que nas feridas tratadas com pomada de calêndula não houve reepitelização total, o epitélio nas margens da ferida estava hiperplásico, com cristas epidérmicas profundas e início de proliferação epitelial. O tecido de granulação apresentou-se bem diferenciado com grande quantidade de fibroblastos ativos na síntese de

colágeno, macrófagos e vasos neoformados. Neste mesmo período nas feridas tratadas com vaselina e solução de cloreto de sódio 0,9% não foram observadas reepitelização. No 14º dia as feridas, independente do tratamento instituído, apresentaram o epitélio hiperplásico na borda da lesão e com formação de cristas epidérmicas, além da presença de crosta no leito da ferida. Nas feridas tratadas com cloreto de sódio 0,9% no 14º dia observou-se a presença de vasos congestos no tecido de granulação e ainda exsudato inflamatório intenso determinando um retardo na evolução do processo cicatricial em relação às feridas tratadas com pomada de calêndula e vaselina. O aspecto clínico e a organização das estruturas celulares se mostraram mais evidentes em feridas cutâneas tratadas com a pomada de *Calendula officinalis* L. o que torna o produto uma opção para aplicação tópica nos processos cicatriciais de pele.

Palavras-chave: cicatrização; feridas, calêndula, cães.

ABSTRACT

Title: *Calendula officinalis* L. evaluation on cutaneous cicatrization in dogs. Clinical, histopathological and histochemistry aspects.

Author: Flávia Ferreira de Menezes

Adviser: Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho

The research and the application of medicines with natural origin are being more developed and searched in order to treat several pathologies, such as for human beings as for animals. In the veterinary routine it is observed that the traumas involving dogs happens with a high percentual resulting in cutaneous losses of different degrees. In view of that, the present work had as objective evaluate the cicatrization process of cutaneous wounds treated topically with an test pomade composed with calendula and vaseline, through clinical, histopathological and histochemistry studies. For the study 18 male dogs, adults, medium weight of $10,9 \pm 2,8$ Kg, without defined breed were used. They composed three groups (A, B and C) with six animals each and just differing in the experimental time, in other words, in group A, the evaluation lasted for seven days, in group B, 14 days and in group C, 28 days. In each animal were produced three lesions separated amongst themselves for approximately 5 cm, in the lateral thoracic area which were submitted to the following protocol treatment: calendula pomade, vaseline pomade and sodium chloride solution 0,9% (SF). The change in the wounds curatives and the clinical evaluation happened daily until the day stipulated for the biopsy, in other words, at the 7th, 14th and 28th day. The clinical parameters observed were: general state of the animal, bristling of the hair, edema, erythema, pain at touch, secretion, crust, granulation tissue, cicatricial contraction, contraction of the wound, reactions of cutaneous sensibility, easiness of application and adherence of the curative. Histopathological exams were accomplished by the hematoxilin-eosin coloration and the histochemistry through Masson trichrome and picrosirius red staining. In the results it was observed that to the 70 day the wounds treated with SF presented adherence of the gauze compress to the wound, very dry and thick crusts and dark and opaque red coloration; the one of the other groups were shown with an intensity color and shine. The ones treated with calendula and vaseline pomade demonstrated discreet presence of granulation tissue in the central area of the lesion and cicatricial tissue in the borders. To the 14th day the wounds that received calendula and vaseline were characterized by the presence of crust, granulation tissue filling and cicatricial tissue; the ones treated with SF presented a larger amount of exsudate considered inflammatory. The clinical evaluations of the wounds studied in the group of 28 days happened until the 18th day, because starting from this moment all wounds were scarred. In the 7th day of treatment the histopathological evaluation verified that the wounds treated with calendula pomade were not total reepithelized, the epithelium in the margins of the wound were hyperplasic, with deep epidermic crests and beginning of epithelial proliferation. The granulation tissue was differentiated with great amount of active fibroblasts in the collagen synthesis, macrophages and neofomed vessels. In this same period in the wounds treated with vaseline and sodium chloride solution 0,9% (SF)

reepithelization were not observed. In the 14th day the wounds, independent on the instituted treatment, presented the hyperplasic epithelium in the border of the lesion and with formation of epidermic crests, besides the presence of crust in the bed of the wound. In the wounds treated with SF on the 14th day was observed the presence of congests vessels in the granulation tissue and still intense inflammatory exsudate determining a retard in the evolution of the cicatricial process in relation to the wounds treated with calendula and vaseline pomade. In the histopathological qualitative analyses staining with picosirius the wounds evaluated to the 70 day, independent of the treatment, demonstrated the presence of collagen's fibers with greenish coloration, considered as type III collagen fibers. In the evaluations accomplished at the 14^o day was observed the presence of fibers with greenish coloration in smaller amount and red coloration in larger amount, besides presenting a more defined and evident organization pattern in the wounds treated with calendula, when compared with the ones treated with vaseline and SF, suggesting the presence of type I and III fibers collagens. To the 28 days, the lesions had predominance of collagens fibers of red coloration in the center of the lesion, suggesting the presence of type I collagen, the organization pattern was more defined characterizing a steady fiber, and the wounds treated with calendula pomade the ones that presented more organized structures. The clinical aspect and the organization of the cellular structures were shown more evident in cutaneous wounds treated with the *Calendula officinalis* L. pomade that turns the product an option for topical application in the cicatricial processes of the skin.

Key-word: Cicatrization, wounds, calendula, dogs

LISTA DE FIGURAS

Página

- Figura 1 *Calendula officinalis* conhecida popularmente como malmequer, maravilha e margarida dourada.
- Figura 1A Observar a utilização do paquímetro para verificação da distância entre as falhas cutâneas; **B**, feridas cutâneas antes da aplicação dos tratamentos; **C** (aplicação dos tratamentos), C1-ferida recoberta com pomada de calêndula, C2-ferida recoberta com vaselina, C3-ferida umedecida com solução de cloreto de sódio.
- Figura 2 A Ferida tratada com pomada de calêndula. Observar presença de crosta delgada no leito da lesão (seta); **B**-ferida do grupo vaselina. Crosta delgada em toda a área cruenta (seta). **C** – Ferida tratada com solução de cloreto de sódio. Observar crosta escura e aderida no centro da lesão (seta)
- Figura 3 Aspecto macroscópico das feridas ao 14^o dia. **A**- ferida tratada com solução de cloreto de sódio. Observar coloração da área cruenta (seta) **B**– ferida do grupo vaselina. Observar margens arredondadas e granulação. **C**– ferida do grupo calêndula. Observar coloração do tecido de granulação (seta).
- Figura 4 Média das áreas das feridas tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L., vaselina e solução de cloreto de sódio no dia inicial, ao terceiro e sexto dia de pós-operatório.
- Figura 5 Média das áreas das feridas tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L., vaselina e solução de cloreto de sódio no dia inicial, ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o dia de pós-operatório.
- Figura 6 Média das áreas das feridas tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L., vaselina e solução de cloreto de sódio no dia inicial, ao 3^o, 6^o, 9^o, 12^o, 15^o e 18^o dia de pós-operatório.
- Figura 7 Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula aos sete dias. Observar crosta (estrela) e epitélio hiperplásico com cristas epidérmicas (seta). (Masson, obj 10x).
- Figura 8 Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos sete dias. Observar processo inflamatório intenso (setas). (HE, obj.10 x).
- Figura 9 Fotomicrografia de ferida tratada com solução fisiológica aos sete dias. Observar presença de processo inflamatório intenso (seta) abaixo da crosta (estrela). (Masson, obj.10 x).

- Figura 10 Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula após 14 dias. Observar presença de vasos congestos (seta). (Masson, obj.10x).
- Figura 11 Ferida tratada com vaselina após 14 dias. Observar presença de crosta espessa (estrela), infiltrado inflamatório (seta fina) e presença de vasos congestos (seta grossa). (Masson, obj.10x).
- Figura 12 Fotomicrografia de ferida tratada com solução fisiológica após 14 dias. Observar presença de vasos congestos e fibroblastos ativos (ampliação). Masson, obj.10x/(ampliação 40x).
- Figura 13 Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula, após 28 dias. Observar diferenciação das camadas epiteliais da pele (estrela). Presença de vasos neoformados (seta larga) e fibras colágenas na derme (seta). (HE, obj. 40x).
- Figura 14 Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos 28 dias. Observar epitélio reconstituído com aspecto delgado (seta fina). Presença de vasos remanescentes do tecido de granulação (seta grossa), presença de fibras colágenas. (Masson, obj: 10x)
- Figura 15 Fotomicrografia ferida tratada com solução fisiológica após 28 dias. Observa-se reepitelização com epitélio hiperplásico e com cristas epidérmicas (setas) (HE, obj 10x).

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

SF: Solução Fisiológica

TS: Tempo de sangria

TC: Tempo de coagulação

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e apresenta importância clínica por refletir uma variedade de processos patológicos externos e internos. Trata-se de uma barreira de proteção do organismo, individualizando o meio interno, mas permitindo uma interação controlada frente ao meio ambiente, favorecendo a manutenção da temperatura, minimizando perdas de água e o ingresso de agentes físicos, químicos e microbianos (BANKS, 1992). Histologicamente duas camadas são identificadas: um epitélio superficial (epiderme), organizada em cinco camadas (basal, granulosa, espinhosa, lúcida e queratinosa) que é renovada continuamente; e uma camada fibrosa (derme), a qual repousa sobre um estrato de tecido conjuntivo. A derme é separada da epiderme por uma membrana basal, sendo composta principalmente por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, apresentando-se bastante vascularizada e inervada, apresentando também glândulas sebáceas e sudoríparas e folículos pilosos (DYCE et al., 1990).

A cicatrização de feridas pode ser compreendida como uma seqüência regulada de eventos celulares e bioquímicos, organizada para recuperar a integridade do tecido após uma injúria (PARK e BARBUL, 2004), e muitos fatores podem influenciar a progressão do processo cicatricial (GOGIA, 1992; SPENCE e WONG, 1997, PRATHIBA e GUPTA, 2000). Trata-se de um processo dinâmico, contínuo e complexo, em que diferentes fases se superpõem e se relacionam reciprocamente (TOGNINI et al., 1998; BECKERT et al., 2005). Este processo se inicia logo após uma lesão tecidual (SPENCE e WONG, 1997), compreendendo uma série de eventos biológicos que começam com a coagulação sanguínea no sítio da lesão, e terminam com remodelação (BARBOSA e SOUZA, 1986; MADDEN e AREM, 1991; ZACHARIAS et al., 1991; MODOLIN, 1992; HUNT e HOPF, 1997; ROBSON, 1997; STEED, 1997, CALVIN, 1998, BELLO e PHILLIPS, 2000). Cada fase da cicatrização apresenta eventos e aspectos celulares característicos, como proliferação, diferenciação e migração celular, sem os quais o processo pode não evoluir (BECKERT, et al., 2005).

Muitos fatores influenciam a progressão da cicatrização das feridas, principalmente o fato da ferida ser aberta ou fechada (SPENCE e WONG, 1997). As feridas abertas, com ou

sem perda de tecido, apresentam problemas clínicos diferentes daqueles das feridas incisadas e suturadas. Embora os processos morfológicos e químicos básicos atuantes nas feridas fechadas participem nas feridas abertas, a contração torna-se um aspecto importante nestas feridas, e a epitelização assume um papel proeminente (MADDEN e AREM, 1991; MEDEIROS, 1992).

Segundo ALISON (1992) e MODOLIN (1992), a cicatrização por primeira intenção (ou união primária) refere-se à cicatrização de feridas limpas, passíveis de terem suas margens suturadas, sendo observada nas feridas cirúrgicas, que ocorrem sem contaminação bacteriana significativa e com o mínimo prejuízo tecidual. A cicatrização que ocorre em ferimentos abertos e que dependem exclusivamente da contração, são denominadas de cicatrização por segunda intenção (ou união secundária) Assim, preparar adequadamente o leito de uma ferida é essencial para sua adequada evolução, no sentido de favorecer os processos endógenos e fisiológicos de cicatrização. Este preparo está baseado na compreensão crescente dos processos moleculares relacionados e em um estado contínuo, em que a compreensão destas novas informações possam efetivamente favorecer a prática clínico e cirúrgica (SCHULTZ et al., 2005).

A ferida aberta é afetada por uma série de influências externas que podem prolongar o processo de cicatrização resultando em mais inflamação, edema e fibrose do que a cicatrização das feridas fechadas (SPENCE e WONG, 1997, KILIÇ et al., 2002).

Nos últimos 20 anos, têm sido relatados vários estudos etnofarmacológicos, objetivando melhores resultados cicatriciais. Produtos naturais ou secundários de plantas, microrganismos ou animais continuam a ser um importante segmento de pesquisa em drogas de uso clínico, a despeito das descobertas relevantes feitas através da química orgânica sintética. Tal segmento tem sido considerado tão importante, que a Organização Mundial de Saúde tem considerado programas básicos de desenvolvimento e validação de medicamentos de origem natural, especialmente em países em desenvolvimento (PRYIA et al., 2004).

A *Calendula officinalis* pertence à família Asteraceae (Compositae) e é cultivada como planta ornamental e medicinal. É uma planta cultivada desde a idade Média originária da Europa, sendo usada como estimulante da atividade hepática, secreção biliar e atenuante

de espasmos gástricos ou intestinais. Em aplicações externas, produtos obtidos por decocção, tinturas ou pomadas de calêndula são aconselhados para o tratamento de feridas em geral, inclusive lesões crônicas como escaras e úlceras. Considerando ainda sua atividade antimicrobiana, a calêndula tem sido empregada na cicatrização do pós-operatório, queimaduras e feridas infectadas. A aplicação tópica de tinturas, em feridas tem promovido sua contração, reepitelização, diminuição na formação de granulomas e redução da área cruenta, além de restaurar a vitalidade dos tecidos (GURUMAVHVA et al., 1991).

Dessa forma, a pesquisa voltada para o desenvolvimento e aplicação de princípios ativos usados rotineiramente, justifica novas análises para avaliar os fatores que podem interferir no processo cicatricial clínico de feridas, especialmente considerando a frequência de lesões causadas por traumatismos que desencadeiam perdas de pele na rotina da clínica veterinária.

Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o processo de cicatrização de feridas cutâneas de cães tratadas topicamente com uma pomada teste composta de *Calendula officinalis* L. e vaselina, através de estudos clínicos, histopatológicos e histoquímicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O estudo da cicatrização da pele envolve eventos e situações especiais, como conhecimentos básicos de anatomia, histologia, bioquímica, imunologia, farmacologia, entre outras ciências. As tentativas de intervir no processo de cicatrização das feridas, acidentais ou experimentais, remontam à antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia à importância de protegê-las de forma a evitar complicações e danos locais ou gerais ao paciente (MANDELBAUM, DI SANTIS E MANDELBAUM, 2003).

A função primária da pele é servir como barreira protetora contra agressões que desencadeiam perdas da integridade, podendo levar a disfunção ou morte do paciente. A dinâmica da cicatrização de feridas é um processo interativo que envolve mediadores, células sanguíneas, matriz extracelular e células parenquimais. O processo envolve três fases: Inflamatória, formação de tecido ou fibroplasia e remodelação (SINGER e CLARK, 1999).

Representando a primeira fase, a inflamação é a reação biológica que ocorre logo após a injúria. Esta fase compreende a ruptura de vasos, ocasionando a hemorragia, afluxo de proteína sérica, plaquetas e fatores de coagulação (KOOPMANN Jr, 1995). Componentes bioquímicos e celulares são liberados para atuação nesta fase estimulando o desenvolvimento do processo inflamatório das subseqüentes fases da cicatrização (MODOLIN, 1992).

Durante a fase inflamatória há uma circulação de neutrófilos, monócitos e macrófagos que respondem a estímulos quimiotáticos e seletividade, migrando para o tecido inflamado. Os neutrófilos são constituintes do sangue e representam 60% do total de leucócitos e são característicos das lesões agudas (TURNER, 1992). São responsáveis pela remoção de corpos estranhos e sofrem rapidamente degeneração gordurosa e lise, conferindo ao exsudato inflamatório um aspecto purulento sem envolver contaminação bacteriana (MODOLIN, 1992). Os neutrófilos normalmente aparecem ativos no leito da ferida, dentro de minutos após a injúria, sendo também fonte de citocina pró-inflamatórias que provavelmente servem como sinalização precoce para ativação local de fibroblastos e queratinócitos (MARTIN, 1997, WITTE e BARBUL, 1997).

Os neutrófilos mortos nos tecidos, bem como os debris são removidos por macrófagos e tem-se sugerido que estas células podem atuar como estímulo para a resolução da resposta inflamatória (TURNER, 1992).

Os monócitos no tecido inflamatório apresentam modificações que caracterizam uma célula específica que é o macrófago, cuja arquitetura citoplasmática conta com um conjunto de organelas que lhe permitem modular o processo cicatricial (MODOLIN, 1992; TURNER, 1992). Os monócitos são recrutados da corrente sanguínea sendo responsáveis por mudanças moleculares na superfície das células endoteliais do epitélio capilar até o leito da ferida (MARTIN, 1997). Estas células predominam entre o 3º e 5º dia após a lesão e tem papel primordial na transição entre a fase inflamatória e a fase de fibroplasia (CORSI et al 1994). As células de linhagem monócito-macrófago têm função essencial de defesa, não apenas pela sua habilidade de fagocitose de material estranho, além de microrganismos patogênicos, mas também como suporte para proliferação de linfócitos e apresentação de antígenos (TURNER, 1992), produz ainda fatores de crescimento que estimulam fibroblastos, fibronectina e angiogênese (neovascularização) (KOOPMANN Jr., 1995), sintetizam protease que digere fibrina e colágeno desvitalizado e remove os neutrófilos para dar lugar a proliferação celular (CORSI et al., 1994).

A fase proliferativa ocorre três a quatro dias após a injúria e está caracterizada pelo rápido aumento do número de fibroblastos e mitose das células epiteliais, bem como o aumento da síntese de colágeno extracelular e proteoglicanos (KOOPMANN Jr, 1995). MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003, dividem em três subfases: reepitelização, fibroplasia e angiogênese. Na fase de fibroplasia e formação da matriz surgem os brotos endoteliais cujas células multiplicam-se com grande velocidade constituindo cordões sólidos que intermeiam com os fibroblastos formando o tecido de granulação caracterizado por uma coleção de elementos celulares, incluindo fibroblasto, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como fibronectina, os glicosaminoglicanos e colágeno (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003; TRAN, GRIFFITH e WELLS, 2004).

Os fibroblastos caracterizam-se por ser uma célula fusiforme com núcleos ovais e que proliferam intensamente, devido a grande capacidade mitótica. A sua origem está

relacionada à fase evolutiva de células mesenquimais, que circulam no interior dos vasos ou presente na adventícia dos vasos ou ainda originam de fibrócitos presentes no tecido conjuntivo circunjacente a lesão. Como a fibroplasia é acompanhada de proliferação vascular, as células endoteliais produzem um fator de ativação do plasminogênio que reduz a quantidade de fibrina, permitindo a deposição de fibroblastos que se multiplicam e passam a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial; a angiogênese é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (MODOLIN, 1992).

Ao estudar o tecido de granulação, constatou-se que ele tinha a capacidade de se contrair. Devido a esta propriedade, à modificação bioquímica e física, as feridas abertas diminuem a área da superfície cruenta, favorecendo nas lesões cutâneas a epitelização (MODOLIN, 1992). Tanto a contração das feridas, bem como a epitelização são eventos importantes na cicatrização, quando há perda de substância (MEDEIROS, 1992).

A fase de contração e remodelação ocorre relacionada ao colágeno e a matriz, sendo responsável pela tensão e diminuição do tamanho da cicatriz (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003). Durante esta fase a vascularização começa a sofrer involução e a celularidade é reorganizada. Tal fenômeno ocorre devido à inibição por contato sofrida pelas células quando as margens da lesão se justapõem (LORENA et al., 2002). Esta remodelação pode durar meses e até anos, com a diminuição da vascularização, e remodelação das fibras colágenas que aumentam a força tensão da cicatriz diminuindo sua espessura (MANDELBAUM, DI SANTIS e MANDELBAUM, 2003). Nessa fase também ocorre um equilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno e tardiamente a cicatriz é considerada avascular (DE NARDI et al., 2004).

A contração é a aproximação das bordas da ferida, enquanto a contratura é o encurtamento da própria cicatriz (BARBUL, 1997). A contração de feridas envolve uma interação entre células, matriz extracelular e citocina. Durante a segunda semana de cicatrização os fibroblatos assumem um fenótipo de miofibroblastos caracterizado por longos filamentos de ação de contato depositado ao longo da membrana plasmática e superfície citoplasmática das células e por ligações de célula-célula e célula-matriz (SINGER e CLARK, 1999; TRAN, GRIFFITH e WELLS, 2004).

Após quatro semanas se admite que as células sofrem apoptose transformando o tecido de granulação rico em vasos e fibroblastos em tecido cicatricial (BARBUL, 1997). No decorrer do processo de contração os miofibroblastos através da sua capacidade de contrair o músculo liso, tracionam as bordas periféricas da lesão em direção a seu centro, contraindo, assim, a ferida (ROSSI, 1991). A contração provavelmente requer estimulação pelos fatores de crescimento beta 1 e beta 2, fatores de crescimento derivados de plaquetas, ação fibroblástica na matriz colágena através de receptores e ligações individuais entre os colágenos. O seu mecanismo se inicia durante a colagenização e evolui durante a maturação da cicatriz (SINGER e CLARK, 1999). A fase de remodelação é lenta, levando tempo para se desenvolver a força tênsil da cicatriz, aumentando progressivamente e durando até anos para recuperação estrutural da área lesada onde se forma a cicatriz (CORSI et al., 1994).

As informações sobre o uso de plantas medicinais e suas virtudes terapêuticas foram acumuladas durante séculos e muito desses conhecimentos populares se encontram cientificamente disponível. (BUFFON et al., 2001).

A fitoterapia está sendo cada vez mais utilizada entre os povos de todo o mundo. Os medicamentos à base de plantas são usados para os mais diferentes fins: acalmar, cicatrizar, expectorar, engordar, emagrecer e muitos outros. É essa utilização das plantas para o tratamento de doenças que constitui, hoje, um ramo da medicina conhecido como fitoterapia. Apesar de ser considerada por muitos como uma terapia alternativa, não é uma especialidade médica, como a homeopatia ou a acupuntura, e se enquadra dentro da chamada medicina natural (CÂNDIDO, 2001).

Considera-se fitoterápico toda preparação farmacêutica (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) que utiliza como matéria-prima parte de plantas, como folhas, caules, raízes, flores e sementes, com conhecido efeito farmacológico. Associado às suas atividades terapêuticas está o seu baixo custo, a disponibilidade de matéria-prima, principalmente nos países tropicais e a cultura relacionada ao seu uso (CÂNDIDO, 2001).

A *Calendula officinalis* é uma das plantas mais versáteis e populares, apresentando indicação para uso fitoterápico e homeopático. Sua ação cicatrizante é uma das diversas atividades farmacológicas que lhe tem sido atribuída. É conhecida popularmente também por “malmequer, margarida dourada, maravilha”, entre outros nomes, sendo cultivada em

todo mundo. Tem como constituintes químicos ácidos orgânicos, calendina, pró-vitamina B, xantofilas, flavonóides, polissacarídeos e carotenóides. Propriedades terapêuticas lhe são atribuídas como atividade antiinflamatória, adstringente, antialérgica, antiespasmódica, bactericida, calmante, antifúngica e anti-séptica (PLANTAMED, 2006) sendo a atividade antiinflamatória da planta atribuída aos seus terpenos, que prevalecem nas flores (AKIHISA et al., 1996).



Figura 1 – *Calendula officinalis* L. conhecida popularmente conhecida como malmequer, maravilha e margarida dourada.

Aprovada pela comissão científica alemã como anti-septica e cicatrizante (BEDI e SHENFELT, 2002; MARTINS et al, 2003) o uso da calêndula no Brasil está regulamentado pela RE nº89/04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA- com as mesmas indicações supracitadas (BRASIL, 2004).

Apesar de ser amplamente cultivada e comercializada, quando se realiza um levantamento bibliográfico da utilização da calêndula em feridas se observa uma escassez de trabalhos.

Assim, JORGE NETO et al., (1996) realizando avaliações clínicas o gel e a tintura de calêndula para tratamento de queimaduras de diferentes origens e feridas de difícil

cicatrização observaram que ocorreu um incremento na cicatrização principalmente quando esta foi associada ao barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*).

MARTINS et al. (2003) estudando os aspectos macroscópicos e histológicos da cicatrização de pele por segunda intenção em equinos concluíram que o barbatimão revelou efeito benéfico no processo de cicatrização, seguido pela calêndula.

Utilizando como modelo experimental os ratos, RAO (1991) conclui que a aplicação externa do extrato de calêndula incrementou a reepitelização de feridas cirúrgicas. Resultados semelhantes obtidos com o mesmo modelo foram verificados por PATRICK et al., (1996) com a aplicação local da pomada associada a alantoína.

Em trabalho realizado por MONTEIRO et al., (1992) com aplicação tópica de calêndula, arnica e nitrofurazona em feridas incisiva e observações clínicas da evolução cicatricial, os autores concluíram que o padrão macroscópico não variou entre os grupos, porém as lesões tratadas com arnica apresentaram um menor espaço de tempo para cicatrizar.

CAMPOS et al., (2000) avaliando treze casos de feridas infectadas em cães, de diversas causas, e tratadas com solução de cloreto de sódio a 0,9%, desbridamento, aplicação tópica com pomada de *Calendula officinalis* e administração oral *Calendula officinalis* 12CH observaram que a associação da pomada e sua administração oral beneficiaram a cicatrização das feridas.

Com o objetivo avaliar a atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil, nas condições de extração etanólica à 50° C com partições sucessivas em solventes de polaridade crescente para as estirpes de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 e *Bacillus cereus*, VOLPANO et al. (2001) concluíram que os extratos de hexano, diclorometano e acetato de etila de *Calendula officinalis* demonstraram atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e foram inativos contra as bactérias Gram-negativas.

Devido às atividades e princípios ativos que lhe são atribuídas, a *Calendula officinalis* tem sido empregada em estudos nos processos de cicatrização em diversos ramos da Medicina Veterinária, visto que o tratamento de uma ferida é um procedimento

complexo e dinâmico, que requer uma avaliação detalhada e estruturada no que diz respeito ao tratamento imposto e ao processo cicatricial das feridas.

3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALISON, M. R. Repair and regenerative response. **Oxford Text Book of Pathology**. Oxford: Universed Press, 1992, v. 1, p. 365-388.
- AKIHISA, T., yasukawa, K., UMA, H. et al. Triterpene alcohols from the flowes of compositae and their anti-infamatry effects. **Phytochemistry**, v.43,n.6, p.1255-1260,1996.
- BANKS, W.J. **Histologia Veterinária aplicada** Sistema tegumentar 2ª Ed. São Paulo: Manole, 1992, p. 391-424.
- BARBOSA, H.; SOUZA, J. A. G. A ferida operatória. In: BARBOSA, H. **Controle Clínico do Paciente Cirúrgico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1986. Cap. 8, p.99-112.
- BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, v. 3, p. 571-582.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução RE nº 89, de 16 de março de 2004 – Dispõe sobre o registro de fitoterápicos simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 de março de 2004.
- BECKERT, S., HIERLEMANN, H., MÜSCHENBORN, N., WITTE, M., RANKE, M., COERPER, S. Experimental ischemic wounds: correlation of cell proliferation and insulin-like growth factor I expression and its modification by different local IGF-I release systems. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. 278-283, 2005.
- BEDI, M. K., SHENEFELT, P. D. Herbal therapy in dermatology. **Archive dermatology**. v. 138, p. 232-242, 2002.
- BELLO, Y. e PHILLIPS, T. J. Recent advances in wound healing. **The Journal of American Medical Association**. v. 283, n. 6, p. 716-718, 2000.
- BUFFON, M. C. M., et al. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle de crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. Revista Visão Acadêmica, Curitiba, v.2 , n. 1, p. 31-38, jan/jun, 2001.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds**, v.10, n. 1, p. 12-32, 1998.

CÂNDIDO, L.C. Nova abordagem no tratamento de feridas. São Paulo: SENAC, 2001. Disponível em:<<http://www.feridologo.com.br/acontecelivro.htm>> Acesso em: 17 jan. 2006.

CAMPOS, M.C., COELHO, M.C., SILVA, L.B. et al. Tratamento de feridas infectadas utilizando *Calendula officinalis*. **Homeopatia Brasileira**. V.6, n.1, p.22-28, 2000.

CORSI, R. C. C. et al. Cicatrização das feridas - Revisão da literatura. **Revista Brasileira de cirurgia**. v. 84, n.1, p.17-24, 1994.

DE NARDI, A. B.; et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lectina de soja e iodo polivilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.

DYCE, K.M.,SACK,W.O.,WENSING,C.J.G.,**Tratado de Anatomia Veterinária O** Tegumento comum Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 242-253.

GOGIA, P. P. The biology of wound healing. **Ostomy Wound Manage**, v. 38, n. 12, p.14-22, nov./dez. 1992.

GURUMAVHVA, S. R., LAXMINARAYANH, U., SARASWATHI, L. U., et al. Calêndula and Hypericum: two homeopathic drogs promoting wound healing in rats. **Fitoterapia**, v. 57, n. 6, p. 508-510, 1991.

HUNT, T. K.; HOPF, H. W. Cicatrização e infecção das feridas. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, v. 3, p. 583-602.

JORNAL DA UNICAMP. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/dez2000/pagina15-Ju157.html> Acesso em: 31 jan. 2006.

JORGE NETO, J., FRACASSO, J., NEVES, M.C. Tratamento da úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbadetinan*. **Revista Ciência Farmacológica**, v.7,p.181-186, 1996.

KILIÇ, S., et al. Comparison of the effects of some wound healing materials on full thikness skin wounds in rabbits. **Turk JournalVeterinary Animal Science**. v. 26, p. 263-272, 2002.

KOOPMANN, JR. Cutaneous wound healing. **Otolaryngologic clinics of North America**. Michigan: v. 28, n. 5, October, 1995.

LORENA, et al. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**. v. 10, n. 2, Mar/ Apr. 2002.

MADDEN, J.; AREM, A. A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: SABISTON, D. **Tratado de Cirurgia**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 10, v. 1, p. 156-168.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 78, n. 4, p. 75-81, jul/ago, 2003.

MARTIN, P. Wound healing- Aiming for perfect Skin Regeneration. **Science**. v. 276, n. 4 April, p. 75-81, 1997.

MARTINS, P., ALVES, a.l., HUSSNI, C.A. et al. Comparação entre fititerápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**. V.8, n.2, p.1-7, 2003.

MEDEIROS, A. C. Conceito atual da cicatrização das feridas cirúrgicas. **Revista saúde**. v. 7, n. 1/2, p.9-20, dez./jan. 1992.

MODOLIN, M. L. A. Biologia da cicatrização dos tecidos. In: MELEGA, J.; ZANINI, S.; PSILLAKIS, J. (eds.) **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**. 2 ed. São Paulo: MEDSI, 1992, Cap. 1, p. 9-25.

MONTEIRO, A.P., COELHO, M.C., JUNIOR, H.C., POTIER, G.M. Uso da calendula, arnica e nitrofurazona em feridas incisas. **Associação Médica Homeopática Brasileira. Anais do XXI Congresso Brasileiro de Homeopatia**, Belo Horizonte, s.n, set,1992, p.1

PARK, J. E., BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **The American Journal of Surgery**, v. 187, p. 11S-16S, 2004

PLANTAMED. Disponível em:<<http://www.plantamed.com.br>>Acesso em: 31 jan. 2006.

PRATHIBA, V. e GUPTA, P.D. Cutaneous wound healing: significance of proteoglycans in scar formation. **Current Science**. v. 78, n. 6, p. 1-5, 2000.

PATRICK, K., KUMAR, S., EDWARDSON, P. et al. Induction of vascularization by an aqueous extract of the flowers for *Calendula officinalis* L. the European Marigold. **Phytomedicine**, v.3, n.1, p.11-18,1996.

- PRYIA, K. S., ARUMUGAM, G., RATHINAM, B., WELLS, A., BABU, M. *Icelosia argentea* Linn. Leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 12, p. 618-625, 2004
- RAO, S. *Calendula* and *hypericum*: two homeopathic drugs promoting wound healing in rats. **Fitoterapia**. V.11, n.2/3, p.191-199, 1997.
- ROBSON, M. C. Infecção das feridas. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, v. 3, p. 633-645, 1997.
- SCHULTZ, G., MOZINGO, D., ROMANELLI, M., CLAXTON, K. Wound healing and TIME: new concepts and scientific applications. **Wound Repair and Regeneration**, v. 13, p. S1-S11, 2005
- SINGER, A. J., CLARK, R. A. F. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**. v. 10, n. 2, p. 738-746, 1999.
- SPENCE, R. J.; WONG, L. The enhancement of wound healing with human skin allograft. **Surgical Clinics of North America**. v. 77, n. 3, p. 741-775, 1997.
- STEED, D. L. Papel dos fatores de crescimento na cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, v. 3, p. 571-582.
- TRAN, K. T.; GRIFFITH, L.; WELLS, A. Extracellular matrix signaling through growth factor receptors during wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. v. 12, n. 3, p. 262-268, 2004.
- TOGNINI, J.R.F., GOLDENBERG, S., SIMÕES, M. J., et al. Efeito do diclofenaco de sódio na cicatrização da parede abdominal de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 13, n 3, p. 167-171, 1998.
- TURNER, N. C. Acute Inflammation. In: MEGEL, J., ISACSON, P. G., WHIGTH, N. A. **Oxford Text Book of Pathology**. Oxford: Universed Press, 1992, v. 1, p. 351-365.
- VOLPANO, A.M., RIOS, E.R., MIGUEL, M. et al. Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (ASTERACEA). **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, n. 1, p. 7-10, Jan./Jun. 2001.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. In: **BARBUL Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, v. 3, p. 509-527.

ZACHARIAS, D. P. M. et al. Efeito da desnutrição protéica sobre a resposta cicatricial ao trauma: aspectos histológicos, histoquímicos e contração cicatricial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 97-102, 1991.

**Avaliação da pomada de *Calendula officinalis* L. durante o processo cicatricial de
feridas cutâneas em cães**

Experimento 1

Trabalho formatado de acordo com as normas do
Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia – ISSN 0102-0935
Belo Horizonte, Minas Gerais.

Avaliação da pomada de *Calendula officinalis* L. durante o processo cicatricial de feridas cutâneas em cães.

Evaluation of the *Calendula officinalis* L. pomade during the cicatricial process of cutaneous wounds in dogs.

F. F. Menezes¹, M.C.O.C. Coelho², A. M A. Carneiro-Leão³, J. R. Pereira-Júnior⁴, Wanderley, A. G.⁵, G. A. S. Aleixo^{VI}

RESUMO

Para a avaliação da aplicação da pomada de calêndula em feridas cutâneas em cães três grupos foram formados com seis animais, sendo produzidas três falhas cutâneas na região torácica-lateral com 4 cm² cada. A seguir, foram tratadas com pomada de calêndula, vaselina e solução de cloreto de sódio 0,9%. As avaliações demonstraram que as feridas que receberam calêndula e vaselina aos setes dias apresentaram presença discreta de tecido de granulação na área central da lesão e tecido cicatricial nas bordas e ao 14º dia se observou presença de crosta, intensa granulação e tecido cicatricial. As lesões com solução de cloreto de sódio apresentaram uma maior quantidade de exsudato inflamatório e ausência de crostas. As avaliações macroscópicas percorreram até o 18º dia, pois a partir deste momento todas feridas encontravam-se cicatrizadas. Biopsias foram realizadas aos 7º, 14º e 28 dias. Nas avaliações histopatológicas aos setes dias se verificou que não ocorreu reepitelização e as tratadas com vaselina e solução fisiológica apresentaram infiltrado inflamatório intenso com produção de exsudato quando comparadas com as tratadas com calêndula. Aos 14 dias a síntese de colágeno e a presença de fibroblastos estavam mais expressivas em todas as feridas, porém, focos inflamatórios ao redor dos vasos foram visualizados principalmente nas feridas tratadas com solução fisiológica. Concluindo-se que a calêndula contribuiu com a cicatrização sendo indicada para o tratamento tópico de feridas cutâneas em cães.

Palavras-chave: calêndula, cicatrização, cão, ferida.

¹ Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). R. Valdemar Falcão, 215. Engº do Meio, 50730-020, Recife-PE. E-mail: flaviafmeneses@yahoo.com.br. Autor para correspondência

² Médica Veterinária. Doutora, Professora Adjunto, Departamento Medicina Veterinária, UFRPE.

³ Médica, Doutora, Professora Adjunto, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

⁴ Médico Veterinário, Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, UFRPE.

⁵ Farmacêutico-Bioquímico, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE.

^{VI} Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

ABSTRACT

For the evaluation of the application of the calendula pomade in cutaneous wounds in dogs three groups were formed with six animals, being produced three cutaneous flaws in the thoracic-lateral area with 4 cm² each. Afterwards, they were treated with calendula pomade, vaseline and sodium chloride solution 0,9%. The evaluations demonstrated that the wounds that received calendula and vaseline at the seventh day presented discreet presence of granulation tissue in the central area of the lesion and cicatricial tissue in the borders and to the 14th day was observed presence of crust, intense granulation and cicatricial tissue. The lesions with sodium chloride solution presented a larger amount of inflammatory exsudate and absence of crusts. The macroscopic evaluations were accomplished until the 18th day, because at that moment all wounds were scarred. Biopsies were made at the 7th, 14th and 28th days. In the histopathological evaluations at the seventh days it was verified that the reepithelization did not happen and the ones treated with vaseline and physiologic solution presented intense inflammatory infiltrated with exsudate production when compared with the ones treated with calendula. To the 14 day the synthesis of collagen and the presence of fibroblasts were more expressive in all the wounds, however, inflammatory focuses around of the vessels were visualized mainly in the wounds treated with physiologic solution. It was concluded that the calendula contributed with the cicatrization being indicated for the topical treatment of cutaneous wounds in dogs.

Key-words: Calendula, cicatrization, dog, wound.

INTRODUÇÃO

Várias pesquisas na área de medicamentos vêm sendo utilizadas com o objetivo de minimizar os custos e efeitos colaterais das drogas comumente empregadas na cicatrização de feridas. Dentre elas, os tratamentos alternativos têm sido uma opção por apresentarem facilidade de posologia terapêutica, poucos efeitos colaterais e ausência de resquício medicamentoso.

Apesar dos recentes avanços em modelos de drogas, a química sintética e a biotecnologia promoverem o desenvolvimento de drogas novas e potentes, os produtos naturais como plantas e minerais continuam sendo a maior fonte de obtenção de medicamentos para os mais diversos fins (Oliveira et al., 2000, Phillipson, 2000).

As plantas medicinais têm seu uso descrito por praticamente todos os povos desde os tempos mais remotos. A partir dos conhecimentos populares e tradicionais do uso das mesmas na busca de soluções ou cura das doenças, surgiram interesses medicinais e científicos.

Dentre os fitoterápicos destaca-se *Calendula officinalis* (Roslindo et al., 1999; Martins et al., 2003). Por sua ação anti-séptica, antiinflamatória e cicatrizante a Calêndula é empregada como coadjuvante na cicatrização do pós-operatório, queimaduras e feridas infectadas, tendo ação efetiva em feridas abertas e dilaceradas (Roslindo et al., 1999). Possui em sua composição ésteres de triterpenóides, carotenóides, flavonóides, carboidratos, polissacarídeos, tocoferol e ácidos graxos (Hamburger et al., 2003).

Diante de ferimentos cutâneos simples que sejam limpos e sem grandes perdas de pele, a cicatrização por primeira intenção, através da aproximação das bordas da ferida, deve ser primeiramente considerada. Feridas cutâneas extensas, que apresentem grandes danos teciduais e/ou estejam infectadas, constitui-se em ferimentos que são comumente deixados que cicatrizem por granulação e processos de contração e epitelização (Swaim, 1996).

Quando ocorrem agressões ou fatores irritantes, desencadeia-se nos tecidos a reação inflamatória (Prandi Filho et al., 1988). Nas lesões de pele essa fase inicia-se imediatamente após a injúria ocorrendo uma liberação de substâncias vasoativas (mediadores químicos), proteínas, fatores de crescimento, proteases, leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos (Singer e Clark, 1999; Mandelbaum et al., 2003).

Passadas 48 horas as plaquetas assumem papel determinante no processo de quimiotaxia para mediadores inflamatórios, entre eles: as prostaglandinas, histamina e leucotrienos, sendo ainda responsáveis pela ativação de complemento. Concomitantemente, os monócitos que se diferenciam em macrófagos quando migram para o espaço extravascular devido a presença de fibronectina insolúvel, baixa tensão de oxigênio e lipopolissacarídeos, atuam no debridamento da ferida, na proliferação de fibroblastos, neoangiogênese, estimulação da epitelização e fibrose (Calvin, 1998). Os macrófagos são primordiais para a transição da fase inflamatória para a proliferativa (Witte e Barbul 1997; Singer e Clark, 1999).

A segunda fase da cicatrização ocorre 3 a 4 dias após a injúria, e é caracterizada pela proliferação, fibroplasia e angiogênese (Mandelbaum et al., 2003). Esta é marcada pelo crescimento rápido no número de fibroblastos e células epiteliais, bem como síntese de colágeno e proteoglicanos (Montandon et al., 1977). Durante a formação do tecido de

granulação os macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados crescem no espaço da lesão sendo os macrófagos responsáveis por estimular os fibroblastos a sintetizar a matriz extracelular, que tem como componentes a fibronectina, glicosaminoglicanos e o colágeno (Badylak, 2002; Mandelbaum et al., 2003). A maioria das fibras colágenas nesta fase é do tipo III, que é um colágeno mais jovem e menos estável (Coelho, 1998), com o transcorrer do processo de cicatrização o colágeno tipo I será predominante (Standelmann et al., 1998). A fase de contração e remodelação, considerada a terceira fase, ocorre no colágeno e na matriz, sendo responsável pela tensão e diminuição do tamanho da cicatriz (Mandelbaum et al., 2003). Durante esta fase a vascularização começa a sofrer involução e a celularidade é reorganizada. Tal fenômeno ocorre devido à inibição por contato sofrida pelas células quando as margens da lesão se justapõem (Lorena et al., 2002). Esta remodelação dura meses e até anos, com a diminuição da vascularização. Tardamente a cicatriz é considerada avascular e a remodelação nas fibras colágenas aumenta a força da cicatriz diminuindo sua espessura (Mandelbaum et al., 2003). Nessa fase também ocorre um equilíbrio entre a síntese e degradação do colágeno (De Nardi et al., 2004).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a evolução do processo de cicatrização de feridas cutâneas em cães tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L. através de avaliações clínicas e histopatológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi encaminhada a Comissão de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) através do processo de nº 3963/2002 recebendo parecer favorável para sua execução. Após a realização do referido trabalho todos os animais foram doados para famílias de conhecida procedência.

O experimento foi desenvolvido no canil do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFRPE com 18 cães machos, adultos, peso médio de $10,9 \pm 2,8$ Kg, sem raça definida, provenientes do Centro de Vigilância Ambiental da Prefeitura da Cidade do Recife (CVA/PCR). Os animais foram mantidos em boxes contendo dois cães/box.

Quinze dias antes do experimento os animais foram desverminados, vacinados com vacina polivalente, avaliados clínico e laboratorialmente e mantidos nas mesmas condições de alojamento, manejo e regime alimentar durante todo o período de adaptação.

Após o exame clínico, amostras de sangue foram coletadas através de venopunção da cefálica do úmero, femoral ou jugular e acondicionadas em dois frascos contendo, o primeiro, solução anticoagulante de etileno-diamino-tetracetato de sódio (EDTA)¹ a 10% e o segundo sem EDTA para obtenção do soro e realização das provas bioquímicas.

Os exames complementares incluíram hemograma, pesquisa de hemoparasitas, perfil bioquímico com provas de função hepática e renal, coagulograma, parasitológico de fezes e urinálise. Os exames supracitados, com exceção de parasitológico de fezes, foram realizados em todos os animais em dois momentos distintos. O primeiro 15 dias antes do início do experimento, e o segundo, momentos antes da realização dos procedimentos cirúrgicos.

Os cães compuseram três grupos (A, B e C) com seis animais cada e diferindo apenas no tempo experimental, ou seja, no grupo A, a avaliação transcorreu durante sete dias, no do grupo B, em 14 dias e os do grupo C, em 28 dias.

Procedimento Cirúrgico

Após jejum hídrico de seis horas e alimentar de 12 horas, os cães foram encaminhados à sala de tricotomia, pesados e pré-anestesiados com sulfato de atropina² na dose de 0,044mg/kg por via subcutânea, recebendo, 15 minutos após, cloridrato de xilazina³ na dose de 2mg/kg por via intramuscular. Após tricotomia da região torácica lateral direita, os animais foram mantidos em venóclise com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%⁴ (solução fisiológica) e administrado cloridrato de quetamina⁵ na dose de 7,5mg/kg por via

¹ Hemstab. Labtest, MG

² Sulfato de atropina 0,25. Lafepe, PE

³ Virbaxyl 2%. Virbac, SP

⁴ Solução de cloreto de sódio. Lafepe, PE

⁵ Francotar. Virbac, SP

endovenosa. Os cães foram posicionados em decúbito esternal e submetidos à anti-sepsia do campo cirúrgico com clorexidina⁶ 2%.

Os campos operatórios foram posicionados de forma rotineira e moldes previamente autoclavados medindo 4cm² foram utilizados para demarcar a área a ser incidida. A tela subcutânea foi divulsionada e as falhas cutâneas foram obtidas.

Em cada animal foram produzidas três lesões separadas entre si por aproximadamente 5 cm, na região torácica lateral direita (Fig. 1A e 1B). Considerando o sentido crânio-caudal, as lesões craniais foram tratadas com pomada de calêndula⁷, as mediais com vaselina⁸ e as caudais receberam solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% (Fig. 1C). Após a produção das falhas cutâneas, estas foram novamente mensuradas no sentido crânio-caudal e dorso-ventral com auxílio de um paquímetro para obtenção de suas medidas finais. Ato contínuo, todas as falhas foram cobertas com curativos secundários de compressa de gaze e o tórax envolvido com atadura de crepom⁹ seguido de curativo em malha¹⁰.

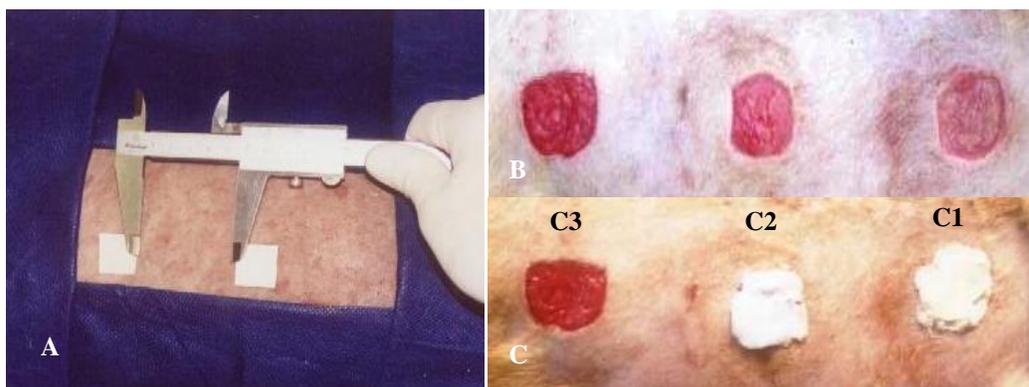


Figura 1-A, Observar a utilização do paquímetro para verificação da distância entre as falhas cutâneas; **B**, feridas cutâneas antes da aplicação dos tratamentos; **C** (aplicação dos tratamentos), C1-ferida recoberta com pomada de calêndula, C2-ferida recoberta com vaselina, C3-ferida umedecida com solução fisiológica.

⁶ Digluconato de clorexidina. Indústria Farmacêutica Rioquímica, SP

⁷ Pomada de Calêndula Concreta. Laboratório Simões, RJ.

⁸ Veículo da Pomada de Calêndula Concreta (q.s.p.) Laboratório Simões, RJ.

⁹ Atadura de crepom. Cremer, SC

¹⁰ Surgifix. Kors do Brasil, MG

A troca dos curativos das feridas e a avaliação clínica ocorreram diariamente até o dia estipulado para a biopsia conforme protocolo experimental previamente determinado, ou seja, ao 7º, 14º e ao 28º dia. O delineamento experimental foi considerado como processo de amostragem inteiramente aleatória.

Os parâmetros clínicos observados foram: estado geral do animal, eriçamento dos pêlos, edema, eritema, dor ao toque, secreção, crosta, tecido de granulação, tecido cicatricial, contração da ferida, reações de sensibilidade cutânea, facilidade de aplicação e aderência do curativo.

Exames Histopatológicos

Os fragmentos para biopsia foram fixados em formalina a 10%, neutra e tamponada, e posteriormente em Bouin. Em seguida processados pelas técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina; cortados em micrótomo a 5µ e as lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE) e Masson, segundo Michalany, (1991).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais do experimento não apresentaram desconforto, apatia ou outros sinais que merecessem atenção especial diante do tratamento proposto.

A troca diária dos curativos revelou que 6/6 das lesões do grupo “A” apresentaram aderência da compressa de gaze a área cruenta. Observou-se, também, que neste grupo, as bordas das feridas apresentavam-se mais ressecadas e espessas. Tal ocorrência, provavelmente, deve-se ao fato de que no momento da aplicação da solução fisiológica, esta umedece o curativo facilitando a sua aplicação, porém, devido as suas características, é absorvida, permitindo, desta forma, a aderência da gaze a área da ferida. Esta aderência dificulta a retirada do curativo, apesar da irrigação com solução fisiológica no momento da troca, e promove o aparecimento de sangramento. Tal achado pode ser explicado pelo trauma causado aos neovasos formados no tecido de granulação que ao atrito com a gaze facilmente se rompem provocando o sangramento. Vale ressaltar que além do trauma no

tecido de granulação, o epitélio, por sua localização anatômica, provavelmente, deve também sofrer danos, o que invariavelmente, deve contribuir com o retardo cicatricial.

Achados semelhantes foram citados por Rahal et al., (2001) em seu experimento durante avaliação de feridas em ratos tratadas com solução isotônica e por De Nardi et al., (2004) em feridas de cães tratadas com iodo polivinilpirrolidona quando estes foram os únicos tratamentos impostos. Resultados também descritos por Oliveira et al., (2000) em seus experimentos com feridas cutâneas em ratos com diferentes formulações de Confrei, relataram um melhor evento cicatricial nas feridas tratadas com Confrei em forma de gel em contraste com as formulações contendo água destilada.

Tais achados não foram observados nos grupos que receberam a pomada de calêndula e a vaselina. Acredita-se que isso ocorreu pelas características lubrificantes da vaselina, haja vista que a mesma foi aplicada nos dois grupos por ser o veículo da pomada em teste.

Considerando a coloração das feridas, um parâmetro importante da rotina clínica, observou-se que as falhas cutâneas que receberam solução fisiológica apresentaram uma cor vermelha escura e fosca enquanto que as dos demais grupos mostravam-se com uma intensidade de cor e brilho. Resultados também descritos por Rahal et al., (2001) em seus estudos com pomada orgânica e solução salina em feridas induzidas em ratos. Entretanto, em relação à coloração, os achados obtidos por Oliveira et al., (2000) mostram uma coloração menos rosada, com bordas mais avermelhadas e edemaciadas nas feridas tratadas com veículos líquidos quando comparadas com veículos em forma de gel. Apesar de considerarmos um dado subjetivo, a coloração das feridas é um parâmetro que orienta o clínico para os procedimentos a serem adotados no momento do tratamento. Feridas pálidas e sem brilho demonstram que a granulação, tecido importante na fase de fibroplasia do processo cicatricial, pode não estar sendo estimulada o suficiente para a sua evolução ou existe um fator que está interferindo no processo, provocando, conseqüentemente, uma neoangiogênese menos intensa. Neste trabalho, acreditamos que o curativo por não ser aderente foi determinante para o aparecimento de tais achados.

As feridas tratadas com pomada de calêndula e vaselina no grupo de sete dias apresentaram, presença discreta de tecido de granulação na área central da lesão e tecido cicatricial nas bordas, contudo, as que receberam a pomada teste foram as únicas que

apresentaram crosta delgada (Fig. 2) em 6/6 dos animais estudados, resultado também comentado por Martins et al., (2003) em seu experimento com feridas de eqüinos tratadas com calêndula, onde observaram crostas serosas, lisas e delgadas comparado aos demais grupos de tratamentos. A crosta pode ser considerada benéfica por ser uma barreira mecânica que protege a ferida, porém, quando esta se torna muita espessa pode dificultar a cicatrização, haja vista que para sua liberação é necessário que o epitélio, que se encontra sob ela, libere enzimas proteolíticas capazes de provocar o seu desprendimento. Outra ressalva se deve possivelmente pela ação antiinflamatória e cicatrizante atribuída a essa planta (Zitterl-Eglseer et al., 1997 e Martins et al., 2003). As feridas tratadas até o sétimo dia com vaselina e as tratadas com solução fisiológica de cloreto de sódio apresentaram crostas mais espessas e secreção serosa.



Figura 2-A-ferida tratada com pomada de calêndula. Observar presença de crosta delgada no leito da lesão (seta); B-ferida do grupo vaselina. Crosta delgada em toda a área cruenta (seta). C-Ferida tratada com solução de cloreto de sódio. Observar crosta escura e aderida no centro da lesão (seta).

Ao 14º dia as feridas que receberam aplicação tópica de calêndula e a vaselina caracterizavam-se pela presença de crosta, tecido de granulação preenchendo a área cruenta e tecido cicatricial evidente em suas margens demonstrando uma evolução cicatricial, já que as demais tratadas com solução fisiológica apresentavam uma maior quantidade de exsudato considerado inflamatório e ausência de crostas. A presença deste exudato foi observada ao 14º dia no grupo controle em trabalho realizado por Eurides et al., (1996), com feridas em camundongos, visto que, neste estudo também não houve presença de crosta nas feridas controle. A presença do tecido cicatricial e de granulação nas feridas durante este momento propiciou uma margem mais arredondadas nas bordas das lesões (Fig. 3), como

citado por Martin, (1997), devido à retração centrípeta exercida por estes tecidos no intuito de reparar e unir a falha cutânea. Fato este também observado por Martins et al., (2003) em seus estudos com fitoterápicos em feridas cutâneas de eqüinos. A contração, uma característica fundamental das feridas que cicatrizam por segunda intenção, é capaz de provocar a diminuição da área cruenta, devido a ação que alguns fibroblastos que por possuírem miosina, tracionam as bordas, provocando uma contração secundária.

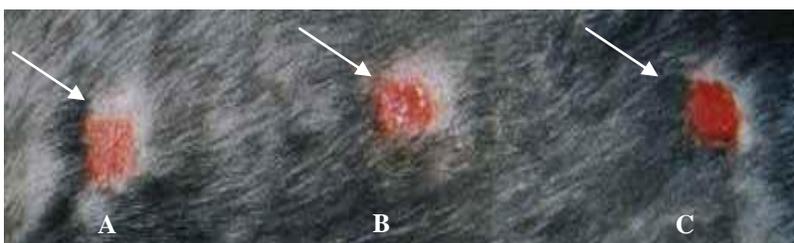


Figura 3-Aspecto macroscópico das feridas ao 14^o dia. **A**-ferida tratada com solução de cloreto de sódio. Observar coloração da área cruenta (seta) **B**-ferida do grupo vaselina. Observar margens arredondadas e granulação. **C**-ferida do grupo calêndula. Observar coloração do tecido de granulação (seta).

As avaliações clínicas das feridas estudadas no grupo 28^o dias ocorreram até o 18^o dia, pois a partir deste momento todas feridas encontravam-se cicatrizadas. Relatos semelhantes foram citados por Oliveira et al., (2000) em seus estudos com confrei em feridas cutâneas de ratos. Feridas tratadas com vaselina, confrei e calêndula apresentaram epitelização e cicatrização ao 17^o dia em camundongos como citados por Perri de Carvalho et al., (1991). Apesar de serem animais distintos e áreas cruentas diferentes ao nosso trabalho podemos considerar a proporcionalidade entre a ferida produzida e a evolução do processo cicatricial.

Considerando que um dos parâmetros utilizados para avaliar a evolução do processo de cicatrização é o tamanho da área cruenta inicial e a sua contração, foi possível mensurar a reparação através dos diâmetros das feridas. Assim, quando analisamos as áreas das feridas e a ação temporal observamos que os três grupos se apresentaram conforme as figuras 4,5, e 6.

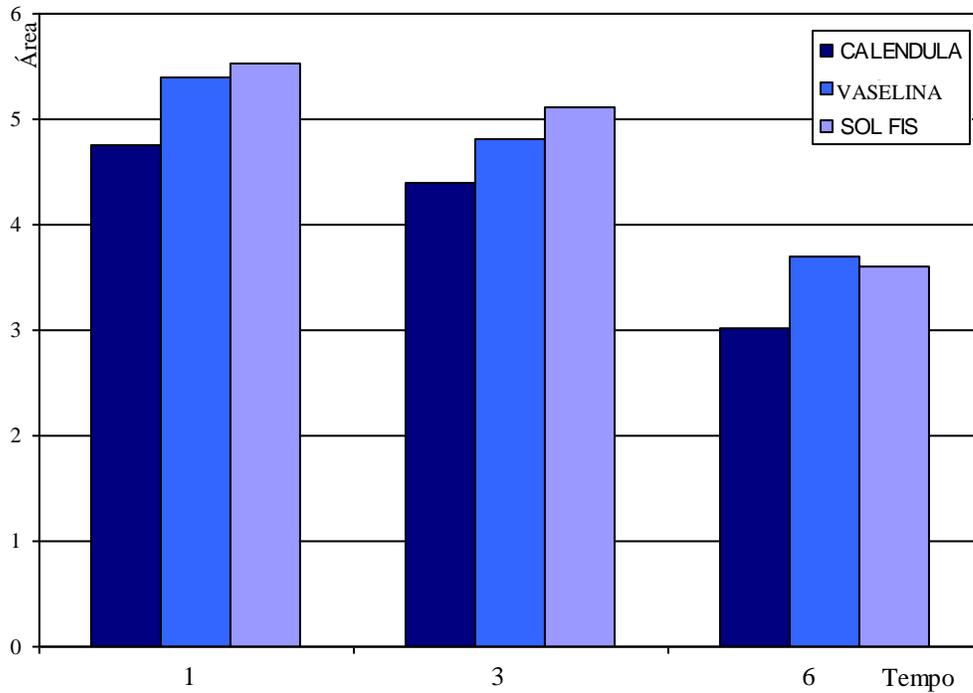


Figura 4-Média das áreas das feridas tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L., vaselina e solução de cloreto de sódio no dia inicial, ao terceiro e sexto dia de pós-operatório.

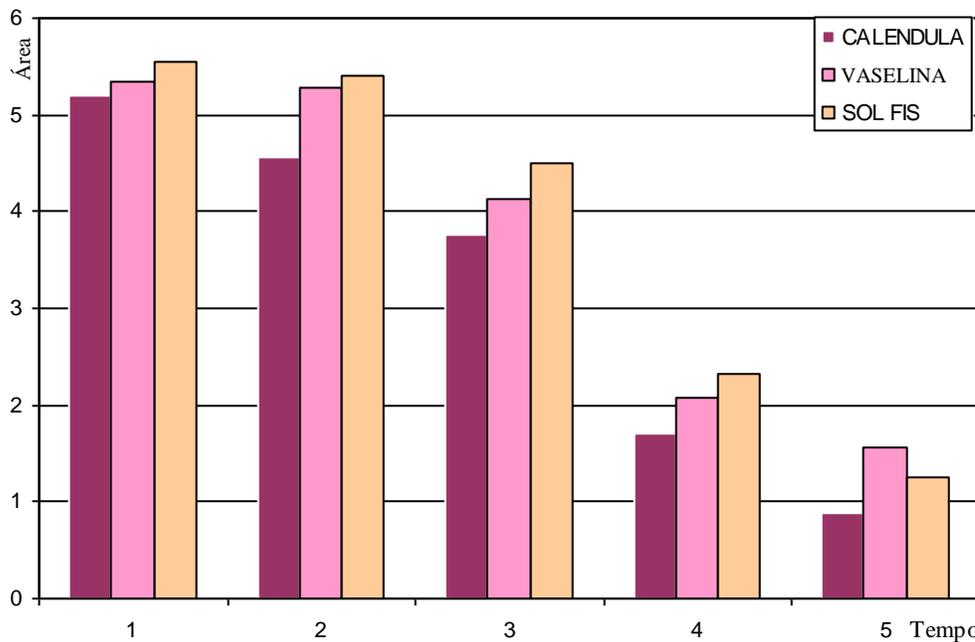


Figura 5-Média das áreas das feridas tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L., vaselina e solução de cloreto de sódio no dia inicial, ao 3^o, 6^o, 9^o e 12^o dia de pós-operatório.

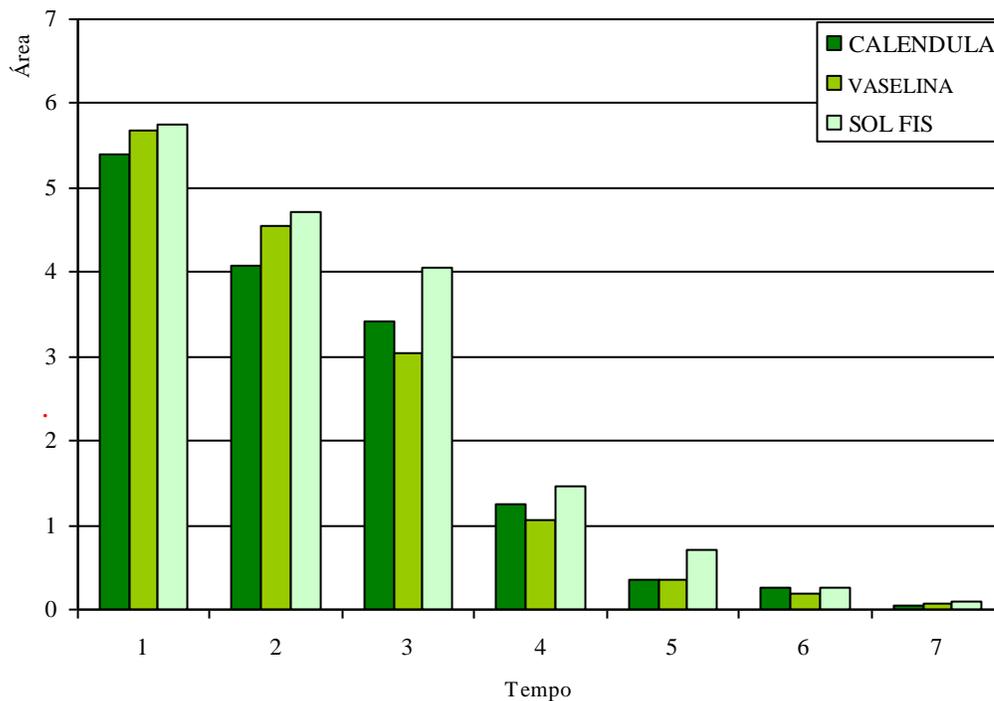


Figura 6-Média das áreas das feridas tratadas com pomada de *Calendula officinalis* L., vaselina e solução de cloreto de sódio no dia inicial, ao 3^o, 6^o, 9^o, 12^o, 15^o e 18^o dia de pós-operatório.

Avaliação Histopatológica

No 7^o dia de tratamento a avaliação histopatológica se constatou que nas feridas tratadas com pomada de calêndula não houve reepitelização total, o epitélio nas margens da ferida estava hiperplásico, com cristas epidérmicas profundas e início de proliferação epitelial (Fig. 7). Em seus achados, Perri de Carvalho et al., (1991) observaram proliferação epitelial mais intensa e reepitelização de todas as feridas tratadas ao 10^o dia com creme de calêndula em ratos. O revestimento epitelial tem papel importante no processo de cicatrização por apresentar células com finalidade proliferativa e reparadora principalmente nas feridas onde há perda de substância e ainda por participar na contração nas feridas por segunda intenção (Medeiros, 1992). O fato de o epitélio encontrar-se hiperplásico neste período sugere que a chalone, mediador bioquímico liberado no momento do trauma e

responsável pelo estímulo as células basais, provavelmente, encontrava-se em grande quantidade, comprovado pela proliferação do epitélio, como citado por Modolin, (1992).

No presente trabalho verificou-se delgada camada de crosta fibrino leucocitária, além de quantidade reduzida de secreção nas feridas tratadas com pomada de calêndula no 7º dia, coincidindo com as afirmações feitas por Perri de Carvalho et al., (1991) segundo o mesmo autor, a calêndula tem capacidade de reduzir exsudato purulento agindo efetivamente em feridas abertas e dilaceradas, favorecendo o processo cicatricial. Silva, (1992) observou a presença de crosta em feridas cutâneas de ratos tratados com calêndula apenas no 10º dia o que sugere diferenças entre as espécies quanto à reação cicatricial.

O tecido de granulação apresentou-se bem diferenciado com grande quantidade de fibroblastos ativos na síntese de colágeno, macrófagos e vasos neoformados, de acordo com as citações de Mandelbaum et al., (2003). Estes fibroblastos organizavam-se perpendicularmente próximos a superfície da ferida e longitudinalmente na camada mais profunda, formando os miofibroblastos. Este achado é importante para a evolução do processo cicatricial, pois estas células apresentam capacidade de contração (Witte e Barbul, 1997; Badylak, 2002 e Mandelbaum et al., 2003) o que determina uma participação essencial na contração da ferida, diminuindo assim, a área cruenta. Observações semelhantes foram relatadas por Perri de Carvalho et al., (1991). Entretanto, na área mais profunda estes autores notaram discreta proliferação fibroblástica ao lado de capilares neoformados, o que difere do nosso estudo onde se verificou grande quantidade dessas células. A área de tração foi bastante desenvolvida próxima à superfície da ferida, como também infiltrados inflamatórios constituídos basicamente por macrófagos e polimorfonucleares estavam presentes corroborando com citações de Tatarunas et al., (1998) e Rahal et al., (2001). Martins et al., (2003) também observaram material necrótico, debris celulares e infiltrados polimorfonucleares em grau acentuado, durante o tratamento de feridas em equinos com solução hidro-alcóolica de calêndula, o que também foi observado no grupo controle com solução salina ao 7º dia de análise histopatológica, conforme citações de Calvin, (1998) que descreve a importância dos polimorfonucleares como agentes quimiotáticos para continuidade das fases subseqüentes da cicatrização.

Neste mesmo período nas feridas tratadas com vaselina e solução de cloreto de sódio 0,9% não foram observadas reepitelização. Por outro lado, foi constatada a presença de crosta espessa, infiltrado inflamatório mais intenso, quando comparados às tratadas com pomada de calêndula (Fig. 8 e 9). A crosta composta basicamente por proteínas desnaturadas e células mortas é considerada uma barreira de proteção nas feridas (Madden e Arem, 1991), quando se encontra muito espessa, pode dificultar a migração das células epiteliais que ocorre abaixo desta cobertura, exigindo conseqüentemente, uma maior produção de colagenase para dissolvê-la. A área de tração nestas feridas foi discreta, entretanto, os fibroblastos estavam em grande atividade.

Os vasos de tecido de granulação ao 7º dia estavam evidentes e congestionados, o que propiciou algumas áreas de hemorragias no mesmo. Resultados semelhantes foram obtidos por Araújo et al., (1998) trabalhando com cicatrização de pele em ratos, contudo, nas feridas tratadas no referido estudo foi observado a reepitelização.

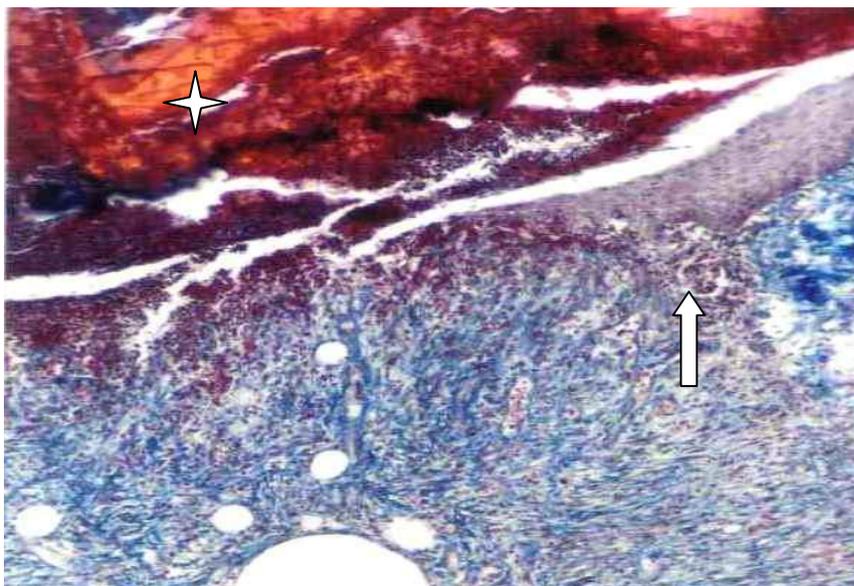


Figura 7-Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula aos sete dias. Observar crosta (estrela) e epitélio hiperplásico com cristas epidérmicas (seta). (Masson, Obj 10x).

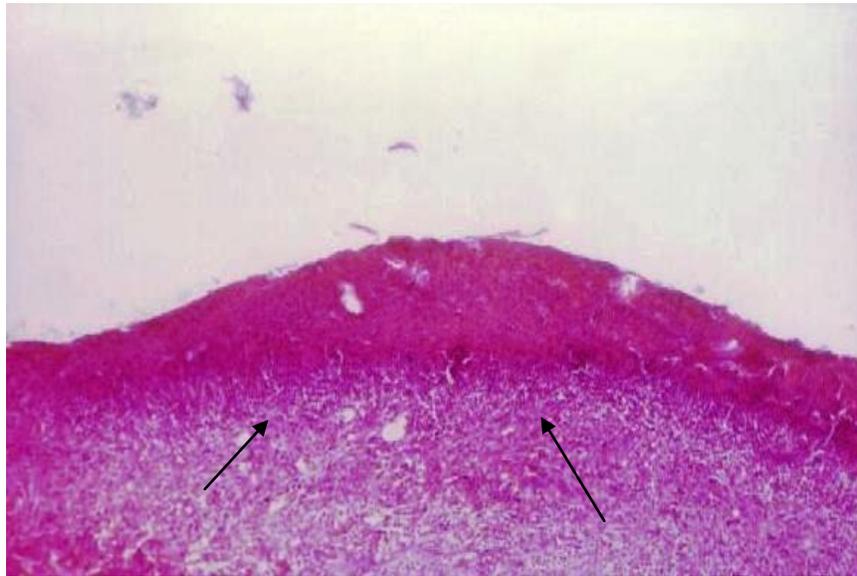


Figura 8-Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos sete dias. Observar processo inflamatório intenso (setas). (HE, Obj.10 x).

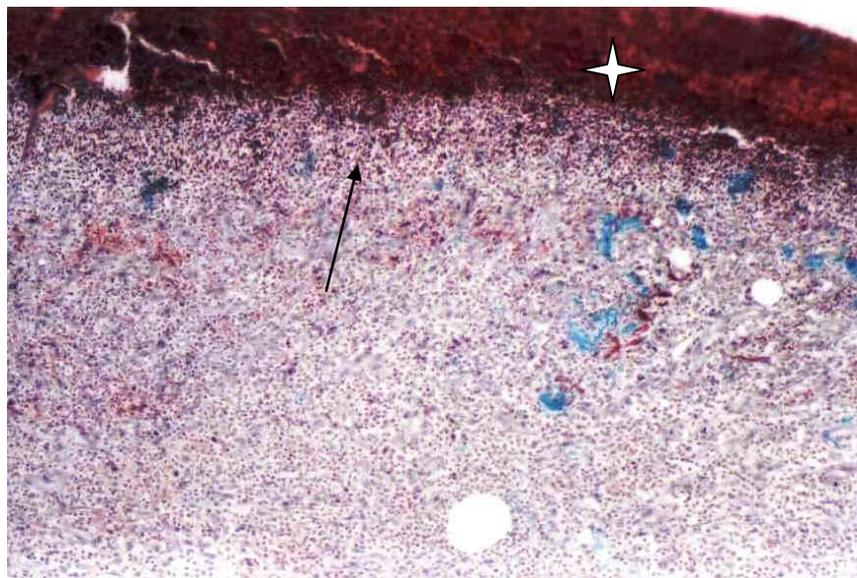


Figura 9-Fotomicrografia de ferida tratada com solução fisiológica aos sete dias. Observar presença de processo inflamatório intenso (seta) abaixo da crosta (estrela). (Masson, Obj.10 x).

No 14º dia as feridas, independente do tratamento instituído, apresentaram o epitélio bastante hiperplásico na borda da lesão e com formação de cristas epidérmicas, além da presença de crosta no leito da ferida. A síntese de colágeno foi mais intensa na área mais profunda (área de tração), reduzida na área superficial, contrastando com abundante substância fundamental nessa área. Notou-se ainda intensa atividade fibroblástica o que não condiz com os estudos de Modolin, (1992) que descreveu a diminuição da atividade fibroblástica no tecido de granulação a partir do 8º dia, desaparecendo por volta do 15º dia. Porém estes achados são respaldados por Tatarunas et al., (1998) em seus estudos com cicatrização cutânea em gatos domésticos, onde observaram neste período neovascularização, abundante matriz extracelular, predomínio de fibroblastos e fibras colágenas dispostos paralelamente ao epitélio. Um maior número de fibras colágenas e proliferação de fibroblastos foram relatados por Rahal et al., (2001) em seu trabalho com pomada orgânica natural em feridas induzidas em ratos. Tais elementos celulares são fundamentais nesta fase de cicatrização por segunda intenção, segundo Witte e Barbul, (1997).

Nas feridas tratadas com cloreto de sódio 0,9% no 14º dia observou-se a presença de vasos congestos no tecido de granulação e ainda exsudato inflamatório intenso determinando um retardo na evolução do processo cicatricial em relação às feridas tratadas com pomada de calêndula e vaselina (Fig.10,11 e 12), já que estes achados são mais marcantes no início do processo de cicatrização (Prandi Filho et al., 1988). Este resultado sugere que nas feridas tratadas com solução de cloreto de sódio 0,9% ainda encontrava-se em período de transição entre a fase inflamatória e fibroplasia do processo de cicatrização, já que neste momento os vasos estavam congestos. Entretanto, estes vasos são essenciais para o suprimento de oxigênio e nutrientes para o leito da lesão (Corsi et al., 1994 e Calvin, 1998). O fato dos vasos neoformados estarem congestos e a presença de secreção pode sugerir que o manejo diário utilizado nas feridas caudais com compressas de gaze influenciou no aparecimento destas características histopatológicas, desencadeando um maior afluxo sanguíneo e concomitantemente induzindo um carreamento de células do processo inflamatório, já que a solução fisiológica isotônica praticamente não é lesiva aos tecidos.

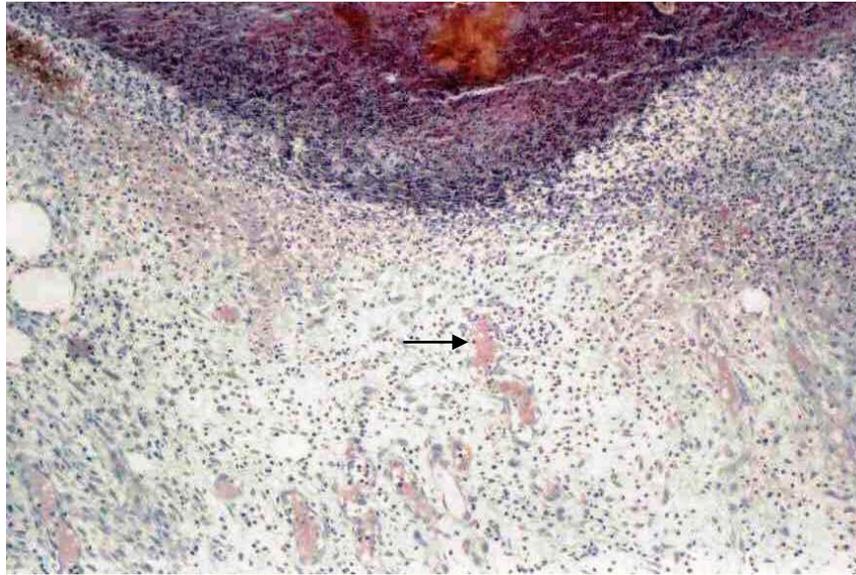


Figura 10-Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula após 14 dias. Observar presença de vasos congestionados (seta). (Masson, obj.10x).

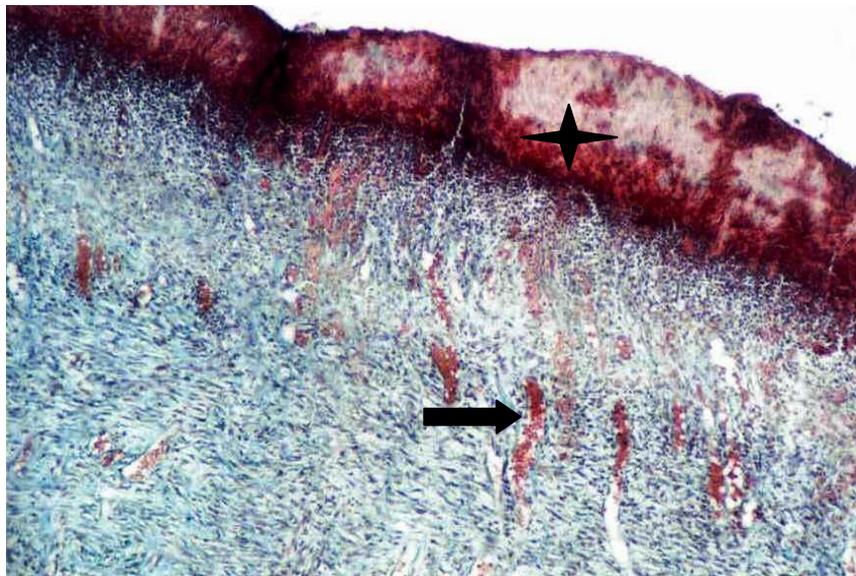


Figura 11-Ferida tratada com vaselina após 14 dias. Observar presença de crosta espessa (estrela), infiltrado inflamatório (seta fina) e presença de vasos congestionados (seta grossa). (Masson, obj.10x).

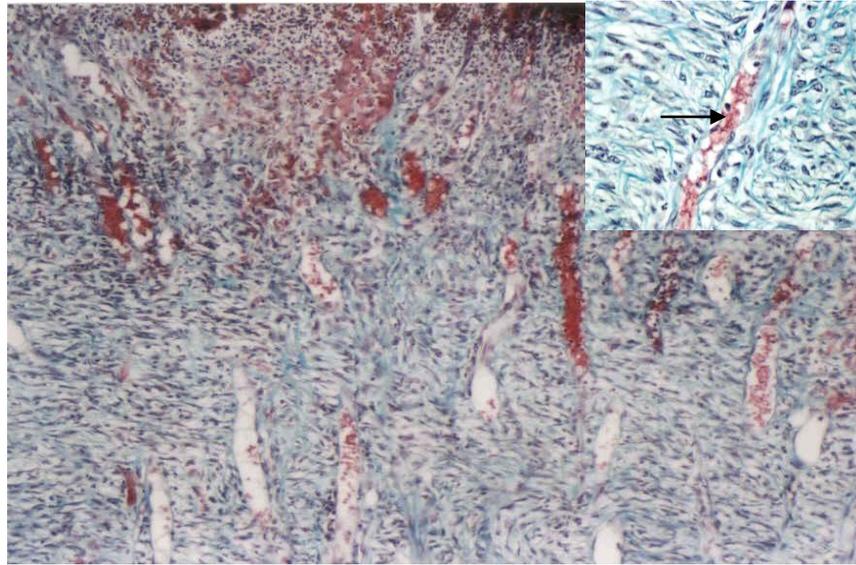


Figura 12-Fotomicrografia de ferida tratada com solução fisiológica após 14 dias. Observar presença de vasos congestionados e fibroblastos ativos (ampliação). Masson, obj.10x/(ampliação 40x).

Nos tratamentos acompanhados até o 28º dia observou-se reepitelização, caracterizada pela presença de epitélio, entretanto, as feridas tratadas com solução fisiológica este ainda encontrava-se espessado. Todas as feridas estavam em processo de remodelação e redução do infiltrado inflamatório, sendo observado pequenos focos inflamatórios em camadas mais profunda da derme e ao redor dos vasos. As feridas tratada com solução de cloreto de sódio 0,9% possuíam um infiltrado inflamatório mais evidente do que as feridas tratadas com a pomada de calêndula e vaselina, além da presença de vasos remanescentes do tecido de granulação. Nessas lesões os fibroblastos ainda apareciam em grande quantidade e em atividade, o que caracterizaria um retardo na evolução do processo de remodelação em comparação aos outros dois tratamentos (Fig. 13, 14 e 15). Os resultados referentes à aplicação da pomada de calêndula aos 28 dias em cães estão de acordo com os relatados por Perri de Carvalho et al., (1991), onde os autores constataram melhor definição do tecido conjuntivo e não observaram vasos remanescentes do tecido de granulação aos 25 dias em feridas cutâneas de camundongo tratadas com creme de calêndula. Corroborando ainda com as citações de Roslindo et al., (1999) que ressaltam o poder anti-séptico, cicatrizante e antiinflamatório da calêndula quando aplicada em feridas abertas.

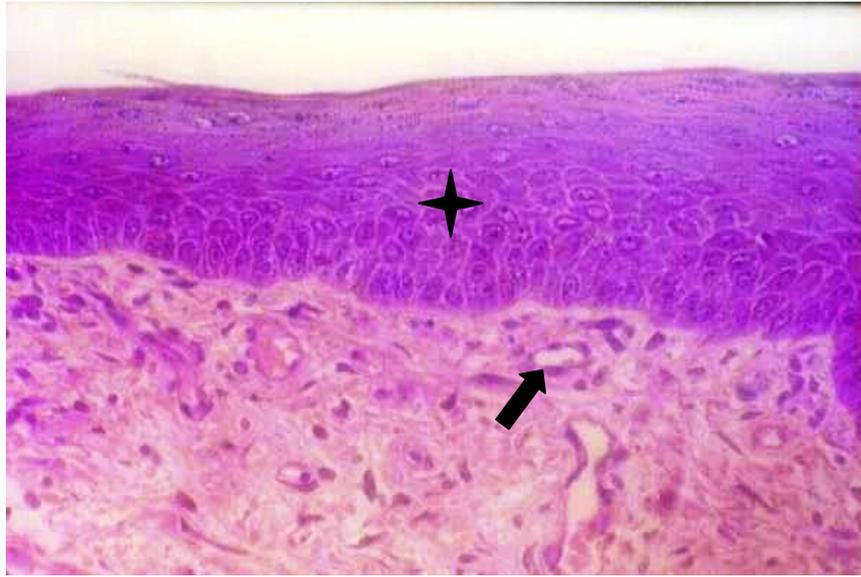


Figura 13-Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula, após 28 dias. Observar diferenciação das camadas epiteliais da pele (estrela). Presença de vasos neoformados (seta larga) e fibras colágenas na derme (seta). (HE, Obj. 40x).

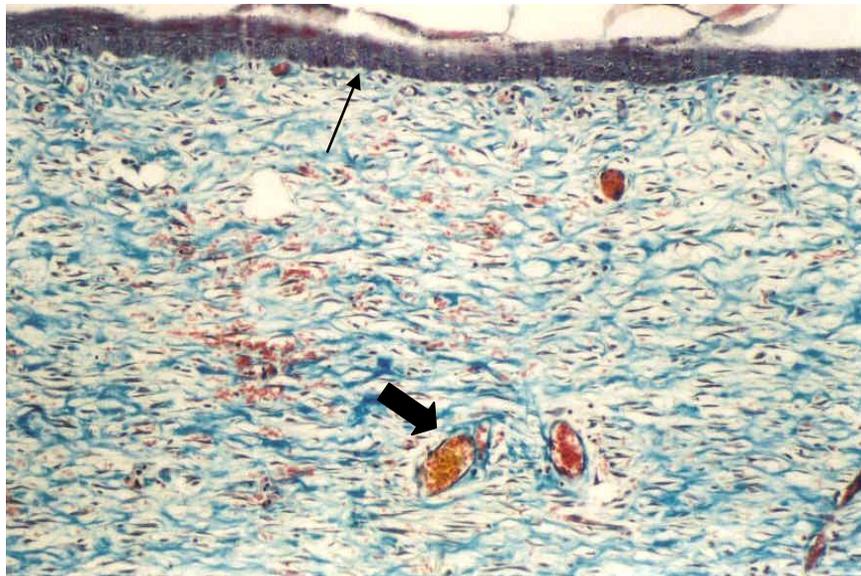


Figura 14-Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos 28 dias. Observar epitélio reconstituído com aspecto delgado (seta fina). Presença de vasos remanescentes do tecido de granulação (seta grossa), presença de fibras colágenas. (Masson, obj: 10x)

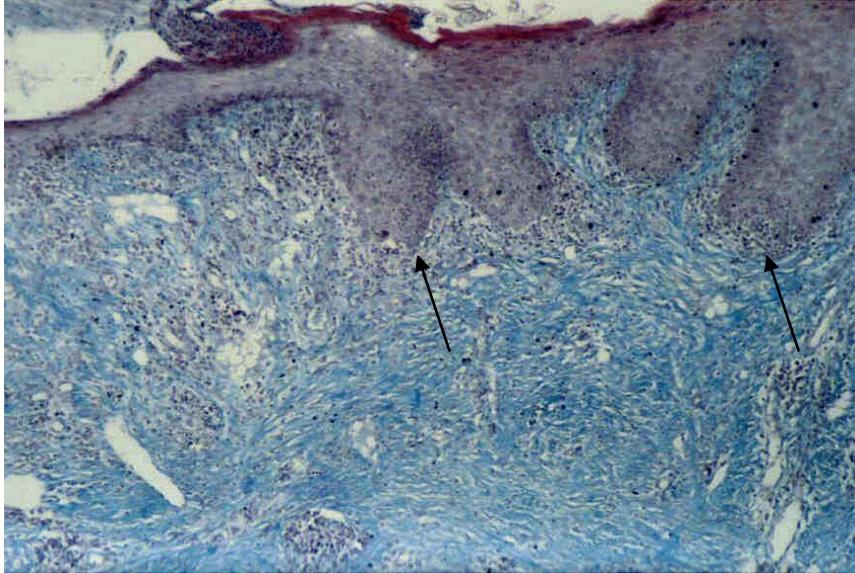


Figura 15-Fotomicrografia ferida tratada com solução fisiológica após 28 dias. Observa-se reepitelização com epitélio hiperplásico e com cristas epidérmicas (setas) (HE, Obj 10x).

CONCLUSÃO

O aspecto clínico e a organização das estruturas celulares se mostraram mais evidentes em feridas cutâneas tratadas com a pomada de *Calendula officinalis* L. o que torna o produto uma opção para aplicação tópica nos processos cicatriciais de pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, C. F. R. et al. Efeito do agarol e do trigliceril sobre a cicatrização de pele. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 232-237, out/nov/dez. 1998.
- BADYLAK, S. F. The extracellular matrix as a scaffold. **Cell & development biology**. v. 13, p. 377-383, 2002.
- CALVIN, M. Cutaneous wound repair. **Wounds**, v.10, n. 1, p. 12-32, 1998.
- COELHO, M. C. O. C. **Substitutos temporários de pele no processo cicatricial de falhas cutâneas: estudo experimental em cães (*Canis familiaris*)**, 1998. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1998.

CORSI, R. C. C. et al. Cicatrização das feridas - Revisão da literatura. **Revista Brasileira de cirurgia**. v. 84, n.1, p.17-24, 1994.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lectina de soja e iodo polivilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.

EURIDES, D.; MAZZANI, A.; BELLETI, M.E.; et al. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman martius*). **Revista Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaina**. v. 2/3, n. 1, p. 37-42 jan/dez. 1995/1996.

HAMBURGER, M.; ADLER, S.; BAUMANN, D.; et al. Preparative purification of major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**. v.74, p. 328-338, 2003.

LORENA, et al. Normal scarring: importance of myofibroblasts. **Wound Repair and Regeneration**. v. 10, n. 2, Mar/ Apr. 2002.

MADDEN, J.; AREM, A. A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: SABISTON, D. **Tratado de Cirurgia**. 14 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. Cap. 10, v. 1, p. 156-168.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: Conceitos atuais-Parte I. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 78, n. 4, jul/ago, p. 75-81, 2003.

MARTIN, P. Wound healing- Aiming for perfect Skin Regeneration. **Science**. v. 276, n. 4 April, p. 75-81, 1997.

MARTINS, P. S.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; et al. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**. v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MEDEIROS, A. C. Conceito atual da cicatrização das feridas cirúrgicas. **Revista saúde**. v. 7, n. 1/2, p.9-20, dez./jan. 1992.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1991.

- MODOLIN, M. L. A. Biologia da cicatrização dos tecidos. In: MELEGA, J.; ZANINI, S.; PSILLAKIS, J. (eds.) **Cirurgia Plástica Reparadora e Estética**. 2 ed. São Paulo: MEDSI, 1992, Cap. 1, p. 9-25.
- MONTADON, D., D'ANDIRAN, G., GABBIANI, G. The mechanism of wound contraction and epithelialization. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 4, n. 3, p. 325-375, 1977.
- OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; et al. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaina**. v. 7, n. 1, p. 61-65, 2000.
- PERRI DE CARVALHO, P. S.; TAGLIAVINI, D. G.; TAGLIAVINI, R. L. Cicatrização cutânea após aplicação tópica de creme de calêndula e da associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas – Estudo clínico e histológico em ratos. **Rev. Ciência Biomédicas**. v. 12, p. 29-50, 1991.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**. v. 56, p. 237-243, 2001.
- PRANDI FILHO et al. Aspectos morfológicos e morfométricos do processo inflamatório provocado por fio de algodão no subcutâneo de ratos tratados com diclofenaco sódico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 32-37 1988.
- RAHAL, S. C., et al. Pomada orgânica natural ou solução salina isotônica no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Ciência Rural** .v. 31, n. 6, p. 1007-1011, 2001
- ROSLINDO, E. B.; SILVERIO, K. G.; MALAGOLI, D. M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale e Calendula officinallis*. **Revista de odontologia da univ de São Paulo**. v. 13, n 2, p. 181-187 abr/jun, 1999.
- SILVA, M. F. A. Avaliação dos efeitos da *Calendula officinalis* sobre a cicatrização. Estudo experimental em ratos (*Rattus norvegicus*). 1992. 41 Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 1992.
- SINGER, A. J., CLARK, RICHARD. A. F. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**. v. 341 (10), n. 2, p. 738-746, 1999.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R.; et al. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **American Journal Surgery**. v.176, suplemento, 2A, p. 26S-38S, 1998.

SWAIM, S. F. Use of vet biosist[®] in wound management. In: The North American Veterinary Conference, 2001, Orlando. **Annals...** Florida: v. 15, p. 696, 2001.

TATARUNAS, A.C.; MATERA, J. M.; DAGLI, M. L. Z. Estudo clínico e anatomopatológico da cicatrização cutânea no gato doméstico. Utilização do laser de baixa potência GAAS (904 NM). **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 12, n 3, p. 169-172, 1998.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. In: **BARBUL Clínica Cirúrgica da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997, v. 3, p. 509-527.

ZITTER-EGLESEER, K.; SOSA, S.; JURENITSCH, J.; et al. Anti-oedematous activitis of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 57, p. 139-144, 1997.

As Referências bibliográficas deste trabalho estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT-NBR-6023 – fevereiro de 2000.

Efeito da *Calendula officinalis* L. sobre a colagenogênese e diferenciação do colágeno na cicatrização cutânea de cães

Experimento 2

Trabalho formatado de acordo com as normas da

Revista Ciência Rural

ISSN 0103-8478

Santa Maria – Rio Grande do Sul.

Efeito da *Calendula officinalis* L. sobre a collagenogênese e diferenciação do colágeno na cicatrização cutânea de cães.

Effect of *Calendula officinalis* L. in collagenogenesis and collagen differentiation in wound healing in dogs

Flávia Ferreira de Menezes¹, Maria Cristina de Oliveira Cardoso Coelho², Ana Maria dos Anjos Carneiro-Leão³, Júlio Rodrigues Pereira-Júnior⁴, Almir Gonçalves Wanderley,⁵ Wanderley,⁵, José Lamartine Aguiar⁶ Grazielle Anahy Souza Aleixo⁷

RESUMO

Devido às propriedades anisotrópicas ópticas que o colágeno possui, a avaliação da birrefringência através da microscopia de polarização permitiu a diferenciação dos tipos de colágenos em feridas tratadas com pomada de calêndula, vaselina e solução de cloreto de sódio 0,9% (SF), através de avaliações qualitativas, após sete, 14 e 28 dias de análises histopatológicas. Observou-se nas feridas tratadas com calêndula aos sete dias de avaliação presença de fibras colágenas com coloração esverdeada, caracterizadas como colágeno tipo III e em menor quantidade fibras coradas em vermelho, caracterizadas como colágeno tipo I; quando comparadas com as tratadas com vaselina e SF, estas apresentaram uma maior quantidade de fibras tipo III. coradas em verde. Aos 14 dias, as feridas com calêndula apresentaram um padrão de organização mais definido e maior quantidade de fibras avermelhadas. As tratadas com vaselina apresentaram fibras com coloração avermelhada, entretanto, com um padrão de organização menos evidente. As tratadas com SF demonstraram uma menor quantidade de fibras avermelhadas e desorganizadas, caracterizando um processo cicatricial menos evoluído. Aos 28 dias todas as feridas apresentavam coloração avermelhada, sugerindo colágeno tipo I e um padrão de orientação das fibras mais nítido. O método de coloração por picrossírius demonstrou ser viável para identificação dos tipos de colágeno durante evolução do processo cicatricial em feridas cutâneas de cães.

Palavras-chave: colágeno, picrossírius, ferida, cão.

¹ Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). R. Valdemar Falcão, 215. Engº do Meio, 50730-020, Recife-PE. E-mail: flaviafmenezes@yahoo.com.br. Autor para correspondência.

² Médica Veterinária. Doutora, Professora Adjunto, Departamento Medicina Veterinária, UFRPE.

³ Médica, Doutora, Professora Adjunto, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

⁴ Médico Veterinário, Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, UFRPE.

⁵ Farmacêutico-Bioquímico, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Ciências Farmacológicas, UFPE.

⁶ Médico, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Cirurgia, UFPE.

⁷ Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

ABSTRACT

Due to the optical anisotropic properties that the collagen has, the evaluation of the birefringence through the polarization microscopy allowed the differentiation of the types of collagens in wounds treated with calendula pomade, vaseline and sodium chloride solution 0,9% (SF), through qualitative evaluations, after seven, 14 and 28 days of histopathologic analyses. It was observed in the wounds treated with calendula in the seventh day of evaluation presence of collagens fibers with greenish coloration, characterized as type III collagen and in smaller amount fibers staining in red, characterized as type I collagen; when compared with the ones treated with vaseline and SF, these, presented a larger amount of type III fibers staining in green. To the 14 days, the wounds with calendula presented a more defined organization pattern and larger amount of red fibers. The ones treated with vaseline presented fibers with red coloration, however, with a pattern of less evident organization. The ones treated with SF demonstrated a smaller amount of red and disorganized fibers, characterizing a less developed cicatricial process. To the 28 days all the wounds presented red coloration, suggesting type I collagen and a pattern of orientation of clearest fibers. The picrosirius coloration method demonstrated to be viable for identification of the collagen types during evolution of the cicatricial process in cutaneous wounds of dogs.

Key-words: collagen, picrosirius, wound, dog.

INTRODUÇÃO

A derme, localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sangüíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Na derme encontramos ainda: músculo eretor de pêlo, fibras elásticas (elasticidade), fibras colágenas (resistência), vasos sangüíneos e nervos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

O fibroblasto é o tipo de célula mais comum e mais numerosa de todas as variedades dos tecidos conjuntivos propriamente ditos, cabendo-lhe o papel de sintetizar a maioria dos componentes extracelulares; as fibras colágenas, reticulares e provavelmente as elásticas. Em linhas gerais, os fibroblastos formam os precursores das fibras colágenas, as moléculas de tropocolágeno, cuja polimerização irá dar origem ao colágeno propriamente dito (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

As proteínas colagênicas são os constituintes mais abundantes da matriz extracelular da maioria dos tecidos. Existem 24 tipos de colágenos, e cada um deles apresenta características próprias, tanto em sua natureza química como na organização estrutural. As moléculas do colágeno estão envolvidas direta e indiretamente, na adesão e diferenciação celulares, quimiotaxia e outras funções importantes para o desenvolvimento e funcionamento do organismo. Outra função importante do colágeno é a sua atuação na agregação, aderência e ativação das plaquetas, ou seja, tem ação na primeira etapa da formação do coágulo, agindo ainda como fator do mecanismo intrínseco para o sangue coagular (PIMENTEL, 2001).

A cicatrização de feridas está representada por uma série de eventos celulares e bioquímicos direcionados para o processo cicatricial, objetivando o reparo tecidual. Decorre de uma seqüência complexa e organizada de eventos celulares, envolvendo uma modificação consecutiva nas proteínas da matriz extracelular (MEC) designados para restaurar a função e a integridade dos tecidos. Os principais componentes do tecido conjuntivo propriamente dito são os colágenos, as proteínas não colágenas, entre elas (fibronectina, e fibras elástica), glicosaminoglicanas e proteoglicanas (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; TAS et al., 2003).

A reação inflamatória é um fenômeno ainda não totalmente elucidado, constituído por vários processos encadeados (bioquímicos, celulares, vasculares) que se situam dentro de um objetivo comum de reparar a agressão e o dano produzido. Entretanto, a reação inflamatória inclui outros fenômenos que não são considerados elementos de resposta inflamatória, como agregação plaquetária, ativação do complemento e ativação das prostaglandinas (SINGER & CLARK, 1999; NATHAN, 2002).

Os fibroblastos do tecido conjuntivo das margens da lesão tornam-se ativos e iniciam a síntese dos componentes da MEC, que é uma rede complexa de macromoléculas que secretam colágeno, elastina, glicoproteínas e proteoglicanos. Tais elementos localizados no espaço extracelular desempenham papel central no controle dos processos celulares básicos, como proliferação, diferenciação, migração e interação celular. Durante este processo, no caso da cicatrização da pele, a migração de queratinócitos ocorre de tal forma que uma nova camada e um leito provisório são construídos, por meio de síntese de

proteínas da matriz extracelular (BELLO & PHILLIPS, 2000; DIEGELMANN & EVANS, 2004).

A matriz inicial da ferida é provisória, sendo composta de fibrina e ácido hialurônico, que é um glicosaminoglicano (GAG). Em virtude de sua camada aquosa ou de hidratação, o ácido hialurônico fornece uma matriz que estimula a migração celular. Os proteoglicanos (PGs) compreendem uma parte da matriz extracelular (MEC) onde participam desses eventos moléculas que regulam a proliferação, migração e adesão celular. As glicoproteínas de aderência, como a fibronectina, laminina e tenascina estão presentes por toda a matriz inicial, facilitando a união e a migração celular. À medida que os fibroblastos chegam e se difundem na ferida promovem a deposição de colágenos, numa base de fibronectina e GAGs de maneira desorganizada. O termo colágeno refere-se a uma família de macromoléculas geneticamente distintas, composta por aminoácidos estruturalmente semelhantes, cuja distribuição e frequência são características: glicina (33,5%), prolina (12%) e hidroxiprolina (10%), segundo BARRCO et al. (1998). Os colágenos tipo I e III são os principais colágenos fibrilares comprometidos na matriz cutânea extracelular. O colágeno tipo III é predominante nas feridas, em comparação com a pele normal, mas à medida que o ferimento amadurece o colágeno tipo I é depositado em quantidades crescentes. A maior parte do colágeno é do tipo I, tanto na pele normal quanto nos ferimentos (SABISTON & LYERLY, 1996; PRATHIBA & GUPTA, 2000).

Sendo o principal componente do tecido cicatricial é o colágeno que se substitui o tecido após o dano cutâneo, sua síntese inicia-se logo no terceiro dia e atinge seu pico máximo entre três e seis semanas seguindo-se para um período de remodelação. Esses colágenos podem ser classificados em dois tipos, os colágenos formadores de fibrilas e os não formadores. A derme é constituída por fibrilas colagenosas, sendo o colágeno tipo I o mais abundante, fornecendo resistência à pele. Durante o processo cicatricial a quantidade de colágeno aumenta com o tempo e em média após duas semanas passam a predominar na MEC. O colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, sendo substituído por tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial (CARNEIRO et al., 2005).

O método da picrossírius-polarização tem sido contribuído significativamente para a identificação e compreensão do colágeno e de suas funções. A especificidade do método é

baseada na presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante ácido (Sírius-red). Essa reação aumenta a birrefringência do colágeno, composto por moléculas agregadas. A diferenciação dos tipos do colágeno também é possível, sendo o tipo I fortemente birrefringente, fibras espessas amarelas ou vermelhas e o tipo III pouco refringente (CARNEIRO et al., 2005).

A microscopia polarizada é um método especialmente aplicado para investigar a síntese de colágeno, no aspecto qualitativo e quantitativo, permitindo a observação da birrefringência exibida por essas fibras (VIZIOLI et al; 2003). Na polimerização do colágeno, os PGs estão envolvidos na formação da fibra colágena, sendo a condroitina sulfato-4 responsável por acelerar a polimerização do colágeno tipo I (PRATHIBA & GUPTA, 2000).

Embora os efeitos dos fitoterápicos na cicatrização cutânea ainda não tenham sido investigados completamente, segundo MOGHBEL et al. (2005), as flores de *Calendula officinalis* têm sido usadas em formas terapêuticas e em cosmética, as quais apresentam principalmente: saponinas, triterpenos, triterpenos alcóois e ésteres de ácidos graxos, carotenóides, flavonóides, cumarinas, óleos essenciais, hidrocarbonetos e ácidos graxos (HAMBURGER et al., 2003). Tendo origem de área do Mediterrâneo, sua adaptação ao Brasil pode ter afetado de diferentes formas a qualidade e quantidade dos princípios ativos (PARENTE et al., 2004).

O extrato da calêndula tem sido usado topicamente para promover a cicatrização de feridas, sendo reportado em vários estudos com efeitos mensuráveis em experimentos laboratoriais com pomada contendo 5% de fração extraída da flor de calêndula, onde foi descrito estimulação no processo de regeneração no leito da ferida, suportado por metabolismo mais intenso de glicoproteínas, nucleoproteínas e proteínas do colágeno durante o período de regeneração dos tecidos (BROWN & DATNER, 1998).

Seu efeito antiinflamatório está associado a uma porção lipofílica em um de seus constituintes, os triterpenóides, sendo demonstrado em estudos com animais que a calêndula estimula o tecido de granulação e incrementa a síntese de glicoproteínas e colágeno no leito da ferida (BEDI & SHENEFELT, 2002; HAMBURGER et al., 2003).

Possui ainda em sua composição carotenóides, flavonóides, carboidratos, ácidos graxos e polissacarídeos, que lhe conferem ação epitelizante e imunoestimulante, segundo BEDI & SHENEFELT (2002).

Em vista dos efeitos cicatrizantes atribuídos a calêndula, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o efeito da aplicação da pomada de *Calendula officinalis* L. em feridas cutâneas de cães sobre a diferenciação do colágeno através da observação da sua birrefringência.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi encaminhada a Comissão de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) através do processo de nº 3963/2002 recebendo parecer favorável para sua execução. Após a realização do referido trabalho todos os animais foram doados para famílias de conhecida procedência.

Para realização do estudo 18 cães machos, adultos, sem raça definida e peso médio de $10,9 \pm 2,8$ Kg, compuseram três grupos com seis animais. Considerando o tempo, cada grupo recebeu um protocolo diferenciado para o estudo do colágeno, ou seja, sete, 14 e 28 dias de pós-operatório.

Para avaliação da higidez todos os cães foram avaliados clínica e laboratorialmente através do hemograma, pesquisa de hemoparasitas, perfil bioquímico com função renal (uréia e creatinina) e hepática (ALT e AST), coagulograma (TS e TC), urinálise e parasitológico de fezes. Foram mantidos em canis com dois animais cada recebendo ração comercial e água *ad libitum*.

Para o delineamento experimental, após jejum hídrico e alimentar de 12 horas, os cães foram encaminhados à sala de tricotomia, pesados e pré-anestesiados com sulfato de atropina¹ na dose de 0,044mg/kg por via subcutânea, recebendo, 15 minutos após,

¹ Sulfato de atropina 0,25. Lafepe, PE

² Virbaxyl 2%. Virbac, SP

cloridrato de xilazina² na dose de 2mg/kg por via intramuscular. Após tricotomia da região torácica lateral direita, os animais foram mantidos em venoclise com solução fisiológica de cloreto de sódio³ 0,9% e administrado cloridrato de quetamina⁴ na dose de 7,5mg/kg por via endovenosa. Os cães foram posicionados em decúbito esternal e submetidos à anti-sepsia do campo cirúrgico com clorexidina⁵ 2% .

Para delimitar a área a ser incidida moldes previamente autoclavados medindo 4cm² foram utilizados e separados entre si por 5cm. A tela subcutânea foi divulsionada em cada área demarcada na região torácica lateral direita e as falhas cutâneas foram produzidas. Ato contínuo e considerando o sentido crânio-caudal, as feridas localizadas cranialmente foram recobertas com pomada de *Calendula officinalis*⁶, as mediais com vaselina⁷ e as lesões caudais foram irrigadas com solução fisiológica de cloreto de sódio¹ 0,9%⁸. Todas as falhas foram recobertas com curativos secundários de compressa de gaze e o tórax envolvido com atadura de crepom⁹ seguido de curativo em malha¹⁰.

Diariamente os tratamentos terapêuticos supracitados foram realizados até o momento da biopsia que ocorreu ao 7^o, 14^o e 28^o dia de pós-operatório nas mesmas condições anestésicas descritas.

Os fragmentos para biopsia foram fixados em formalina a 10%, neutra e tamponada, e posteriormente em Bouin. Em seguida processados pelas técnicas rotineiras de desidratação, diafanização e inclusão em parafina; cortados em micrótomo a 5µ e as lâminas coradas pelo método de Picrosírius-red, segundo (BANCROFT & COOK, 1994).

³ Solução de cloreto de sódio. Lafepe, PE

⁴ Francotar. Virbac, SP

⁵ Digluconato de clorexidina. Indústria Farmacêutica Rioquímica, SP

⁶ Pomada de Calêndula Concreta. Laboratório Simões, RJ

⁷ Veículo da Pomada de Calêndula Concreta (q.s.p.) Laboratório Simões, RJ

⁸ Solução de cloreto de sódio. Lafepe, PE

⁹ Atadura de crepom. Cremer, SC

¹⁰ Surgifix. Kors do Brasil, MG

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de colágeno foi realizada utilizando para isso uma de suas propriedades anisotrópicas ópticas, a birrefringência através da microscopia de polarização, e área estabelecida como região de investigação correspondeu à área circunjacente (tecido íntegro) e área lesada onde foi possível observar, através da análise qualitativa, o brilho de birrefringência e organização das fibras colágenas.

As feridas avaliadas aos sete dias de pós-operatório dos grupos vaselina e solução de cloreto de sódio apresentavam fibras mais desorganizadas e maior evidência do colágeno tipo III, caracterizado histologicamente por sua propriedade de birrefringência como fibras que se coram em verde. Essas fibras, caracterizadas como fibras colágenas imaturas, traduzem um processo de reorganização para preenchimento da área lesada, com colágeno imaturo e sem organização definida. Nestes grupos poucas fibras colágenas do tipo I, caracterizada pela coloração vermelha, apresentavam-se visíveis (Fig. 1, 2 e 3).

Vale ressaltar que segundo CARNEIRO et al., (2005) o colágeno tipo III é inicialmente sintetizado e depositado, sendo substituído por tipo I à medida que ocorre maturação do tecido cicatricial. Considerando o tempo da biopsia (sete dias) esses achados podem ser considerados esperados, porém, quando analisamos os fragmentos de pele dos animais que foram tratados com a pomada de calêndula verificamos a presença de fibras colágenas mais maduras, tipo I, no centro da lesão e periferia das feridas, demonstrando uma evolução da cicatrização em relação aos demais grupos.

Conforme descrições de BARRCO et al. (1998) a diferença de coloração observada neste estudo do colágeno tipo III, considerado mais imaturo e instável, e apresentar coloração verde e o tipo I, mais estável e resistente, e apresentar coloração vermelha se deve, provavelmente, ao fato das fibras colágenas do tipo I serem fibras grossas e densamente agrupadas e, conseqüentemente, apresentarem intensa birrefringência corando-se em vermelho; já o colágeno tipo III forma fibras finas (fibras reticulares) que se dispõem frouxamente mostrando dessa forma fraca birrefringência.

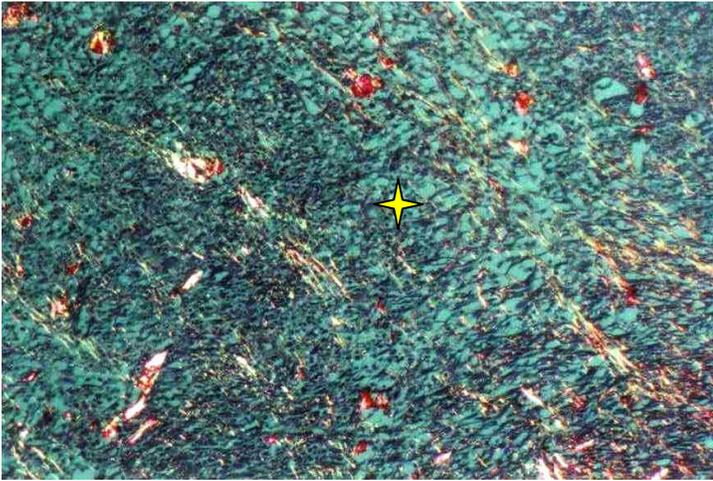


Figura 1-Fotomicrografia de ferida tratada com solução de cloreto de sódio aos sete dias de pós-operatório. Observar presença de fibras colágenas tipo III, coradas em verde. Picrosírius, obj. 40x.

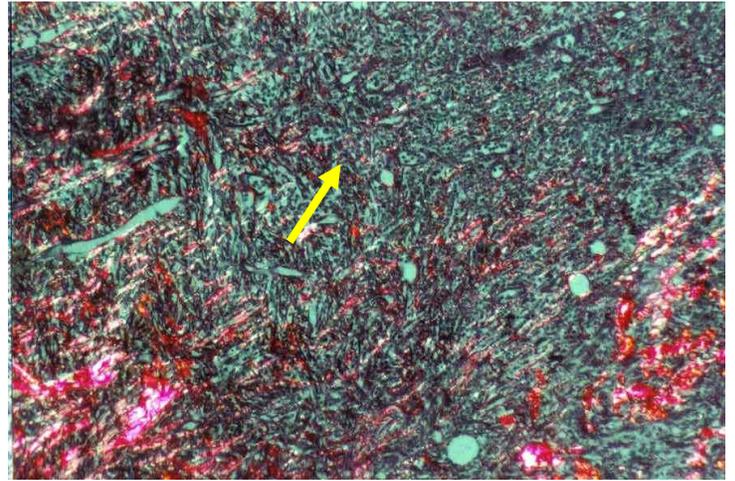


Figura 2-Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos sete dias de pós-operatório. Observar fibras colágenas tipo III coradas em verde (seta). Picrosírius, obj. 40x.

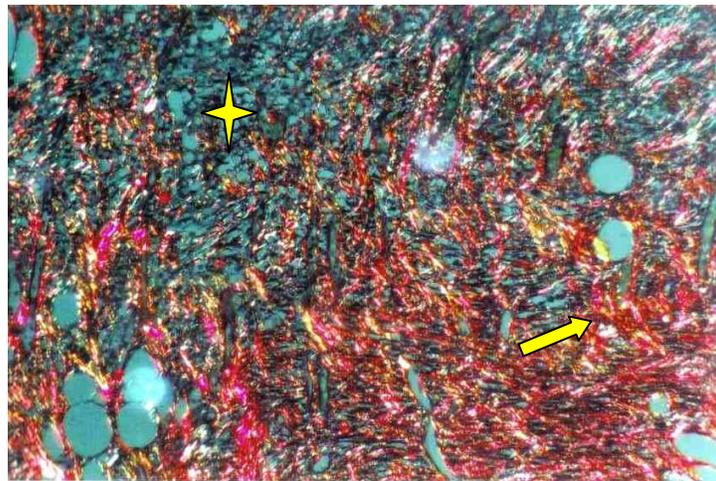


Figura 3-Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula aos sete dias de pós-operatório. Observar fibras colágenas tipo III coradas em verde e tipo I coradas em verde. Picrosírius, obj.40x

Nas lesões avaliadas aos 14 dias de pós-operatório, o padrão de organização das fibras colágenas se mostrava mais evidente em todos os grupos (Fig. 4,5 e 6). Como o processo cicatricial é dinâmico e o colágeno se encontra em processo de polarização, os resultados nesse nosso trabalho são de cunho comparativo entre os tratamentos. Como

ressaltado por CARNEIRO et al., (2005) o principal componente do tecido cicatricial é o colágeno que substitui o tecido após a perda cutâneo, sua síntese inicia-se logo no terceiro dia e atinge seu pico máximo entre três e seis semanas seguindo-se para um período de remodelação. Como descrito na literatura, esta pode ser considerada como a segunda fase da cicatrização e é caracterizada pela proliferação, fibroplasia e angiogênese (MANDELBAUM et al., 2003), marcada pelo crescimento rápido no número de fibroblastos e células epiteliais, bem como síntese de colágeno e proteoglicanos (MONTANDON et al., 1977).

Os achados histopatológicos de todas as feridas estudadas aos 28 dias demonstraram um padrão de organização e uma maior concentração de fibras com coloração avermelhada (Fig 7, 8 e 9), caracterizando colágeno tipo I, tais achados estão de acordo com SABISTON & LYERLY, (1996); PRATHIBA & GUPTA, (2000) e RICH & WHITTAKER, (2005), onde descrevem que feridas imaturas normalmente coram-se de verde e com o amadurecimento coram-se de vermelho, sendo o colágeno tipo III o mais predominante no início da cicatrização, e o tipo I depositado em quantidades crescentes de acordo com a evolução cicatricial. Achados semelhantes foram descritos por PEREIRA et al., (1998), em seus experimentos com miocárdio de ratos hipertensos, onde relatam no endomísio e perimísio aos 40 dias no grupo controle um aumento na concentração de fibras colágenas desencadeando coloração vermelho alaranjada, sendo categorizada como provável colágeno do tipo I e em menor quantidade fibras colágenas de cor verde, sendo provavelmente colágeno tipo III.

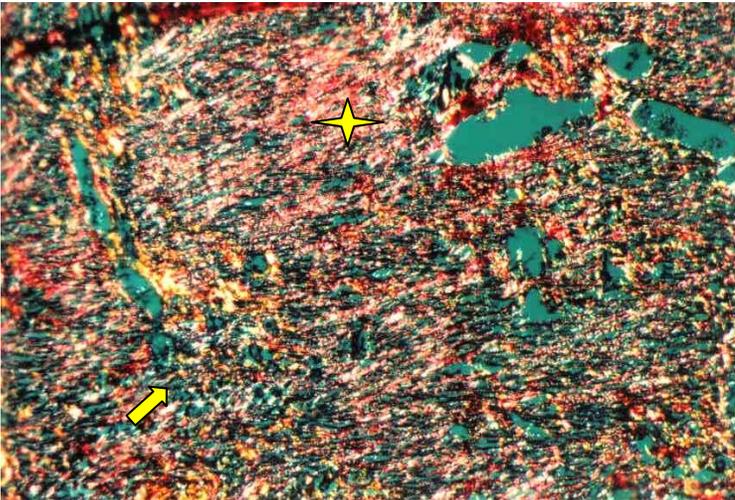


Figura 4-Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula aos 14 dias. Observar organização de feixes de fibras colágenas tipo III com coloração esverdeada (seta grossa) e presença de fibras colágenas tipo I com coloração avermelhada (estrela). Picrosírius, obj. 40x.

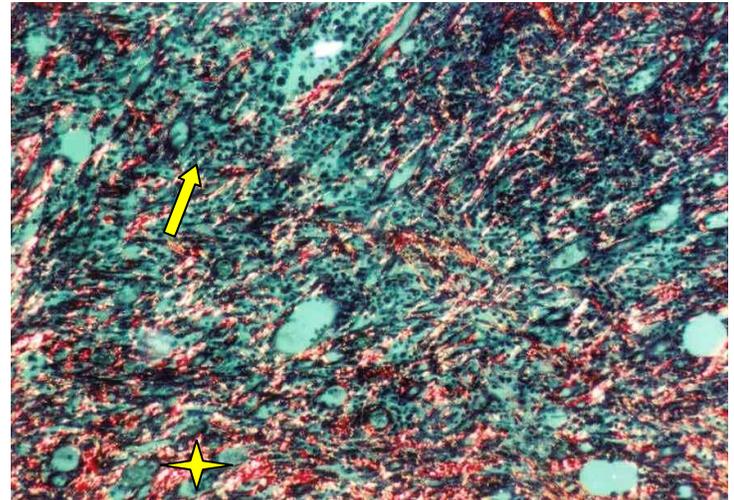


Figura 5-Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos 14 dias. Observar organização de feixes de fibras colágenas tipo III com coloração esverdeada (seta grossa) e presença de fibras colágenas tipo I com coloração avermelhada (estrela). Picrosírius, obj. 40x.

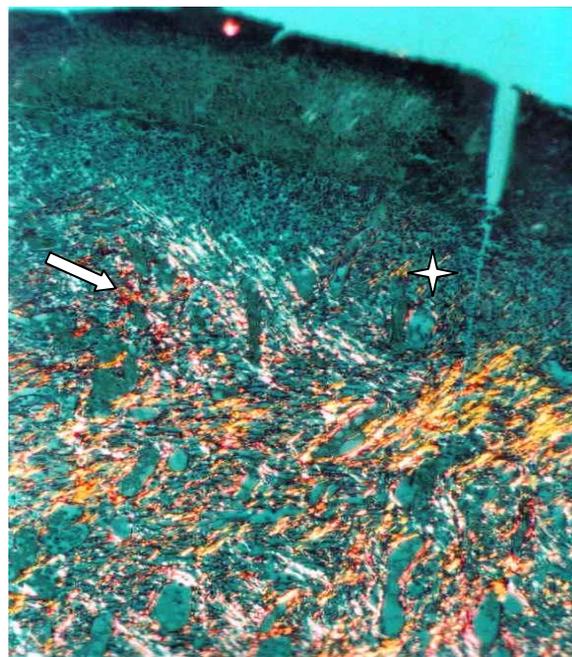


Figura 6-Fotomicrografia de ferida tratada com SF aos 14 dias. Observar presença de fibras colágenas tipo III com coloração esverdeada (estrela) e fibras colágenas tipo I com coloração avermelhada (seta). Picrosírius, obj. 10x.

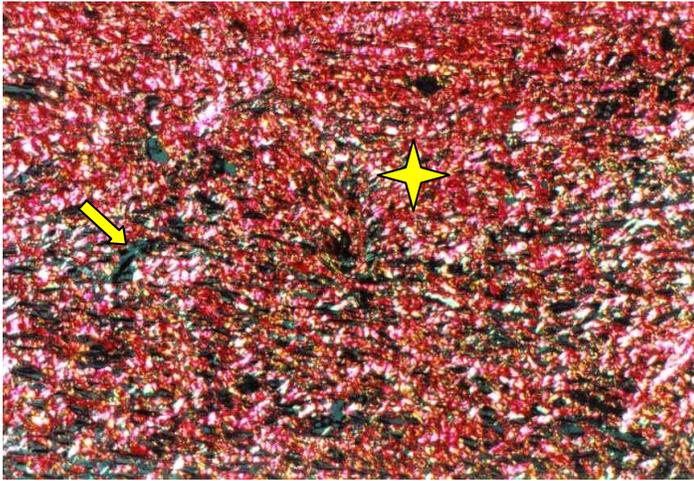


Figura 7-Fotomicrografia de ferida tratada com vaselina aos 28 dias. Notar presença de fibras colágenas tipo I de coloração avermelhada (estrela) e fibras esverdeadas (seta). Picrosírius, obj. 40x.



Figura 8-Fotomicrografia de ferida tratada com calêndula aos 28 dias. Observar fibras colágenas tipo I de coloração avermelhada (estrela). Picrosírius, obj. 40x.

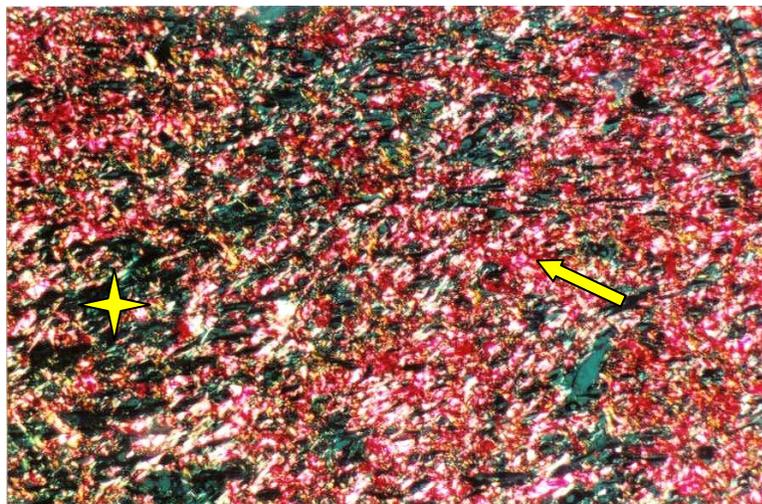


Figura 9-Fotomicrografia de ferida tratada com SF aos 28 dias. Notar presença de fibras colágenas do tipo I com coloração avermelhada (seta) e colágeno tipo III (estrela). Picrosírius, obj. 40x

CONCLUSÕES

O método de coloração por picosírius demonstrou ser viável para avaliar comparativamente a quantidade de colágenos em feridas submetidas a diferentes tratamentos e permite a identificação dos tipos de colágeno durante evolução do processo cicatricial em feridas cutâneas de cães.

A pomada de *Calendula officinalis* L. pode ser utilizada no arsenal terapêutico para feridas cutâneas em cães por contribuir com a cicatrização e promover uma estrutura organizacional das fibras colágenas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BANCROFT, J., COOK, H. **Manual of histological techniques and their diagnostic application**. New York, Churchill-Linvinstone, 1994.

BARRCO, R. S., LEMOS, M., NERY, C. A. S. Pé plano adquirido do adulto por disfunção do tendão do tibial posterior: avaliação clínica, imagenológica e morfométrica. *Revista Brasileira de Ortopedia*. Disponível em: <http://www.rbo.org.br.br/materia.asp?mt=451&idIdioma=1> Acesso em: 22 de fevereiro de 2006.

BEDI, M. K., SHENEFELT, P. D. Herbal therapy in dermatology. **Archive dermatology**. v. 138, p. 232-242, 2002.

BELLO, Y. e PHILLIPS, T. J. Recent advances in wound healing. **The Journal of American Medical Association**. v. 283, n. 6, p. 716-718, 2000.

BROWN, D. J. e DATNER, A. Phytoterapeutic approaches to common dermatologic conditions. **Archive of dermatologic**. v. 134, p. 1401-1404, 1998.

CARNEIRO, C. G., SENNES, L. U., SALDIVA, H. N., et al. Avaliação da deposição de colágeno após implante de fáschia lata e de gordura na prega vocal de coelho: estudo histomorfométrico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v. 71, n. 6, p. 798-802, 2005.

DIEGELMANN, R. F., EVANS, M. C. Wound healing an overview of acute, fibrotic and dealeyed healing. **Frontiers in Bioscience**, v.9, p. 283-289, 2004.

HAMBURGER, M.; ADLER, S.; BAUMANN, D.; et al. Preparative purification of major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**. v.74, p. 328-338, 2003.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

PARENTE, I. M. I., MATOS, I. G., CUNHA, L. C., et al. Análise farmacognóstica do pó e avaliação do efeito do extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* L. cultivadas no Brasil no sistema imunológico. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 1, n. 1, p. 9-16, 2004.

PEREIRA, L. M. M., VIANNA, G. M. M., MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Morfologia e estereologia do miocárdio em ratos hipertensos. Correlação com o tempo de inibição da síntese do óxido nítrico. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**. v. 70, n. 6, p. 397-402, 1998.

PIMENTEL, E. R. **A célula**. In: CARVALHO, H. F., RECCO-PIMENTEL, F. M. Matriz extracelular. São Paulo: Guanabara Koogan, cap. 19, p. 217-234. 2001.

MOGHBEL, A., HEMMATI, A-A., AGHELI, H., et al. The effect of tragacanth mucilage on the healing of full-thickness wound in rabbit. **Archives of Iranian Medicine**. v. 8, n. 4, p. 257-262, 2005.

MONTADON, D., D'ANDIRAN, G., GABBIANI, G. The mechanism of wound contraction and epithelialization. **Clinics in Plastic Surgery**. v. 4, n. 3, p. 325-375, 1977.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**. v. 420, 2002.

PRATHIBA, V. e GUPTA, P.D. Cutaneous wound healing: significance of proteoglycans in scar formation. **Current Science**. v. 78, n. 6, p. 1-5, 2000.

RICH, L.; WHITTAKER, P. Collagen and picrosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue spatial distribution. **Brazilian Journal Morphology Science**. v. 22, n. 2, p. 97-104, 2005.

SABISTON Jr., D. C. e, LYERLY, H. K., **Sabiston fundamentos de cirurgia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 658p.

SINGER, A. J., CLARK, R. A. F. Mechanisms of disease: cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**. v. 10, n. 2, p. 738-746, 1999.

SIQUEIRA JR., J. F., DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, cap. 16, p. 173-196, 2000.

TAŞ, A., ATASOY, H., ÖZEBEK, L., et al. The effects of sildenafil citrate (Viagra) in the early phase of healing process in open wounds in dogs. **Acta Veterinary BRNO**. v. 72, p. 273-277, 2003.

VIZIOLI, P. M. U., VIZIOLI, M. R., BOSCOLO, F. N., et al. Effect of vitamina A administration in gamma-irradiated repair tissue as revealed by polarizing microscopy. **Brazilian Journal Oral Science**. v. 2, n. 6, p. 272-276, 2003.

Avaliação da contração primária após produção de falhas cutâneas na pele de cães.

Experimento 3

Trabalho formatado de acordo com as normas do

Archives of Veterinary Science

ISSN 1517-784X

Universidade Federal do Paraná-PR

Avaliação da contração primária após produção de falhas cutâneas na pele de cães.

Evaluation of the primary contraction after production of cutaneous flaws in the skin of dogs.

MENEZES, F. F.¹, COELHO, M.C.O.C², CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.³, PEREIRA-JÚNIOR, J.R.⁴, WANDERLEY, A. G.⁵, ALEIXO, G.A.S⁶

RESUMO-Foram avaliadas 54 feridas cutâneas induzidas experimentalmente em cães, adultos, sem raça definida, machos com o objetivo de avaliar a contração primária da pele após a produção de uma área cruenta resultante de um molde de 4cm². A região torácica lateral direita foi padronizada como campo operatório, sendo mensurada a área das lesões com paquímetro imediatamente após a ressecção da pele. Houve um aumento na área de 5,4 cm² ± 0,3 estimado percentualmente em de 35% da área inicial proposta. Dessa forma podemos concluir que o tamanho dos moldes utilizados para produção de falhas cutâneas não correspondem ao tamanho real da área da lesão, visto que, as fibras elásticas quando incididas determinam um aumento da área devido sua retração e capacidade de elasticidade

Palavras-chave: Tecido conjuntivo, fibras elásticas, ferida, cão.

ABSTRACT-Were evaluated 54 cutaneous wounds induced experimentally in adults, males dogs without defined breed, with the objective of evaluating the primary contraction of the skin after the production of an wound area resulting from a mold of 4cm². The right lateral thoracic area was standardized as the surgery field, being the area of the lesions measured with a pachymeter immediately after the resection of the skin. There was an

¹ Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). R. Valdemar Falcão, 215. Engº do Meio, 50730-020, Recife-PE. E-mail: flaviafmenezes@yahoo.com.br. Autor para correspondência

² Médica Veterinária. Doutora, Professora Adjunto, Departamento Medicina Veterinária, UFRPE.

³ Médica, Doutora, Professora Adjunto, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

⁴ Médico Veterinário, Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, UFRPE.

⁵ Farmacêutico-Bioquímico, Doutor, Professor Adjunto, Departamento de Ciências Farmacológicas, UFPE.

⁶ Médica Veterinária, Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

increase in the area of $5,4 \text{ cm}^2 + 0,3$ percentually estimated in 35% of the initial proposed area. In that way we can conclude that the size of the molds used for production of cutaneous flaws do not correspond to the real size of the area of the lesion, because, the elastic fibers, when incided, determine an increase of the area because of it's retraction and elastic capacity.

Key-words: Conjunctive tissue, elastic fibers, wound, dog.

INTRODUÇÃO

O tecido conjuntivo propriamente dito caracteriza-se por possuir vários tipos celulares e uma abundante matriz extracelular (MEC) composta por glicosaminoglicanas e proteínas, além dos constituintes vasculares. Esta matriz não constitui apenas um suporte estrutural, mas também, uma fonte de sistema capaz de influenciar o crescimento e diferenciação de diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, entre outras células. Dentre os grupos de proteínas que constituem a MEC, ressaltam-se as proteínas glicoproteicas estruturais fibrosas que são o colágeno e a elastina. Esta é representada pelas fibras elásticas, oxitalâmicas e elásticas formando assim o sistema elástico, sendo este o principal componente estrutural dos tecidos encontrado em todo corpo (ALTER, 1999; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; SIQUEIRA JR. e DANTAS, 2000).

A elastina é a proteína do tecido conjuntivo responsável pelas propriedades de extensibilidade e elasticidade dos tecidos. Está presente em grande quantidade particularmente nos tecidos que requerem propriedades físicas como: artérias e ligamentos. Em menor quantidade encontra-se também na pele, cartilagem auricular e em outros tecidos. (MURRAY e KEELEY, 1996; SANTOS et al., 2004). É constituída por dois aminoácidos (desmosina e isodesmosina) que formam correntes de tropoelastina (precursor), a qual confere propriedade elástica. O mecanismo exato de suas extensibilidade ainda não foi claramente compreendido, mas a quantidade de elastina no tecido reflete sua força mecânica e o grau de necessidade para reverter à deformação (CULAV et al., 1999).

A formação das fibras elásticas está relacionada à deposição da elastina nas microfibrilas onde estas formam arcabouços, entretanto, parece também haver um controle

celular sobre a estrutura final da fibra elástica, já que são observados prolongamentos celulares que contornam essas fibras definindo a sua forma e provavelmente a sua espessura (PIMENTEL, 2001). São sempre encontradas em associação com os tecidos colágenos e são responsáveis pelo que pode ser chamado de elasticidade reversa. Em associação com a rede de colágeno as forças rígidas que limitam as deformações dos elementos elásticos e que são largamente responsáveis pelas propriedades finais (força de tração e inextensibilidade relativa) ALTER, (1999).

A dificuldade mais comum quando se trata do processo de cicatrização é o aspecto final da cicatriz, visto que, há necessidade de apreciação das linhas de tensão ou linhas de Langerhans existentes na pele (ANDERSON, 1997). Para que o processo cicatricial ocorra sem complicações de ordem anatômica e funcional, as incisões devem respeitar as linhas de tensão (Fig. 1), no cão estas linhas já foram mapeadas de acordo com SWAIM, (1980).



Figura 1: Diagrama das linhas de tensão no cão. (Anderson, 1997).

Em consideração as propriedades de elasticidade e inextensibilidade das fibras elástica, este trabalho teve por objetivo avaliar a contração primária após produção de falhas cutâneas na pele de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco de acordo com as normas éticas através do processo nº 3963/2002 recebendo parecer favorável para sua execução. Todos os animais ao fim do trabalho foram adotados por famílias de reconhecida procedência.

Para a realização do estudo moldes de papel autocolante medindo 4cm² foram previamente confeccionados, autoclavados e aplicados na região torácica-lateral direita em 18 cães adultos, machos e sem raça definida para produção de 54 falhas cutâneas.

Após jejum hídrico e alimentar de seis e 12 horas, respectivamente, os animais foram submetidos a um protocolo anestésico com sulfato de atropina¹ (0,044mg/kg, via subcutânea), cloridrato de xilazina² (2mg/kg, via intramuscular) seguido de cloridrato de quetamina³ (7,5mg/kg, via endovenosa). Os cães foram posicionados em decúbito esternal e submetidos à anti-sepsia do campo cirúrgico com clorexidina⁴ 2%.

Após estes procedimentos os moldes foram posicionados na região torácica lateral direita para a demarcação da área a ser incidida, (Fig. 2A) as falhas cutâneas foram obtidas incidindo a pele com lâmina de bisturi número 15, seguida de divulsionamento da tela subcutânea com auxílio de pinça de dissecação e tesoura romba (Fig. 2B). Ato contínuo, após a confecção das falhas cutâneas, estas foram mensuradas no sentido crânio-caudal e dorso-ventral (Fig. 2C e 2D) com auxílio de um paquímetro⁵ para obtenção de suas medidas. Para a produção das falhas cutâneas se considerou uma distância de 5cm entre cada (Fig.3).

Para o estudo da contração primária inicial a fórmula utilizada para o delineamento dos cálculos da área final foi $A = b \times h$.

¹ Sulfato de atropina 0,25. Lafepe, PE

² Virbaxyl 2%. Virbac, SP

³ Francotar. Virbac, SP

⁴ Digluconato de clorexidina. Indústria Farmacêutica Rioquímica, SP

⁵ Paquímetro: 0,05mm. N. 505.633-50, Japão

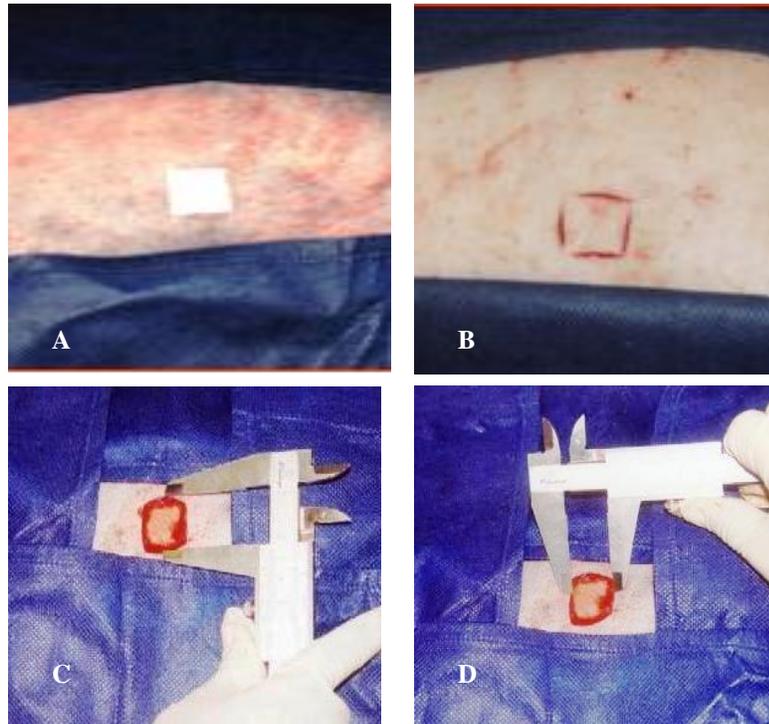


Figura 2-Demarcação da área a ser incidida com o molde pré-confeccionado (A); pele incidida demonstrando a área a ser divulsionada (B); medição da bordas da ferida no sentido dorso-ventral (C); medição da bordas da ferida no sentido crânio-caudal (D).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo optou-se pela realização de feridas cutâneas com forma geometricamente quadrada obtida a partir de um molde medindo 2x2cm, entretanto, após a incisão da pele as feridas apresentaram forma retangular, e isto se deve, provavelmente, porque a região torácica lateral apresenta linhas de tensão (linhas de Langerhans) modificando a forma original das lesões cutâneas. A área geométrica obtida após a ressecção da pele mostrou em 64,8% das lesões uma base menor em relação à altura, resultado explicado novamente através das linhas de Langerhans, haja vista serem mais evidentes no sentido dorso-ventral do que no crânio-caudal (Fig. 4) como citado por

SWAIN, (1980) e ANDERSON, (1997) e observado por COELHO (1998) em seu experimento com feridas cutâneas de cães.



Figura 3-Aplicação dos moldes adesivos e medição da distância para produção das falhas cutâneas.



Figura 4-Visualização das bordas da falha cutânea onde se observa diferença na altura em relação à largura.

A opção pela produção de feridas geometricamente quadradas também foi escolhida por OLIVEIRA et al., (2000) em seus estudos com feridas cutâneas em ratos, entretanto, RAHAL et al., (2001), RAHAL et al., (2003) e De NARDI et al., (2004), empregaram moldes retangulares para confecção de falhas cutâneas. Uma outra metodologia foi adotada por EURIDES et al., (1996), BARBUDO et al., (2001), VILLA et al., (2003) e MARTINS et al., (2003), onde descreveram a utilização de “punch” para realização de feridas com formas circulares em seus experimentos com lesões de pele produzidas cirurgicamente. Em nosso estudo a escolha por feridas quadradas nos permitiu avaliar o mecanismo de retração das linhas de tensão sobre a área proposta e a área obtida após a incisão. Contudo, a escolha da forma geométrica para as feridas de pele realizadas experimentalmente está de acordo com o que se quer avaliar e qual o modelo experimental a ser estudado.

A fórmula utilizada para o delineamento dos cálculos da área final foi $A = b \times h$ (área do retângulo), mesmo que o molde inicial tenha apresentando 2x2 cm (quadrado), isto se deve a conformação observada após a incisão da pele e a formação da área cruenta. PRATA et al., (1988), EURIDES et al., (1996), BARBUDO et al., (2001) em seus estudos sugerem o emprego da fórmula matemática: $A = \pi.R.r$, visto que a forma geométrica empregada foi circular. Entretanto, FALCÃO et al., (2001) e MARTINS et al., (2003) relataram em seus trabalhos o uso da planimetria para obtenção da área. Uma outra descrição para mensuração

da área de feridas foi sugerida por SCHULTZ et al., (2005), onde as fórmulas $A= l \times w$ (A =comprimento x largura) foi proposta para feridas retangulares e $A=l \times w \times \pi/4$ (A =comprimento x largura x $\pi/4$) para feridas elípticas, ou seja, vários modelos têm sido utilizados para o estudo da área cruenta e suas avaliações dependeram do desenho geométrico obtido.

No presente estudo obteve-se uma média da área de $5,4 \text{ cm}^2$ após a produção da falha cutânea, estimada inicialmente em 4 cm^2 (Fig. 5), considerando em valores percentuais um aumento de 35 % da área proposta. Achados semelhantes foram descritos por OLIVEIRA et al., (2000), onde obtiveram um aumento médio de 39% da área das feridas imediatamente após a cirurgia. Tais resultados devem-se provavelmente a retração das fibras elásticas desencadeado pela incisão da pele no sentido transversal das linhas de tensão, acarretando um aumento na área total da ferida.

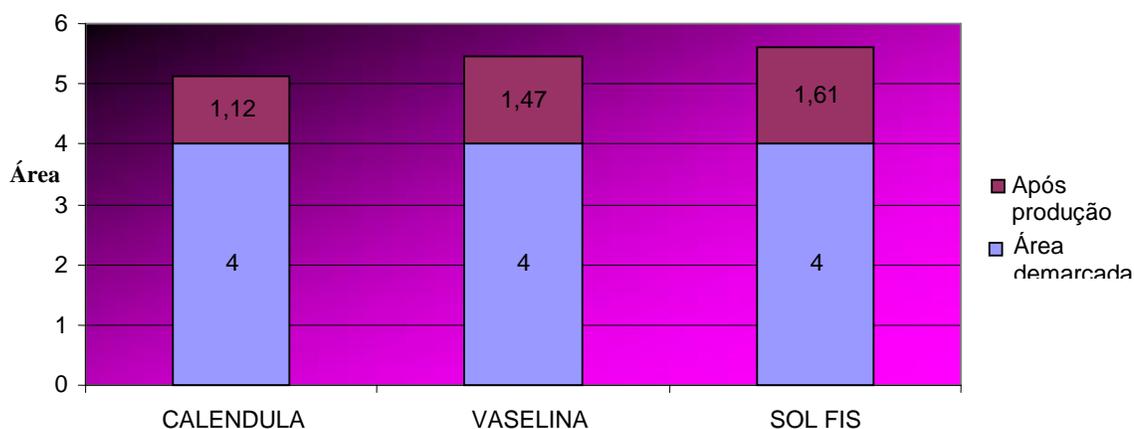


Figura 5-Aumento médio das áreas das feridas após confecção das falhas cutâneas a partir de molde de 4 cm^2 .

CONCLUSÃO

A elasticidade da pele em decorrência da presença das fibras elásticas promove o aumento da área cruenta quando a pele é incidida, ocasionando um aumento na ordem de 35% em feridas localizadas na região torácica lateral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTER, M. J. **Ciência de flexibilidade**. 2 ed. São Paulo:Artmed, 1999.
- ANDERSON, D. Practical approach to reconstruction of wounds in small animal practice. Part 1. **In Practice**. v. 19, n. 9, p. 463-471, 1997.
- BARBUDO, G. R., et al. Reparação de feridas cutâneas de roedores da espécie *Calomys callosus*, tratadas com hidrocarboneto alifático: aspectos morfométricos, morfológicos e histológicos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**. v.38, n. 2, p. 62-68, 2001.
- COELHO, M. C. O. C. **Substitutos temporários de pele no processo cicatricial de falhas cutâneas: estudo experimental em cães (*Canis familiaris*)**, 1998. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais – Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1998.
- CULAV, E. M., CLARK, C. H., MERRILEES, M. J. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. **Physical therapy**. v. 79, n. 3, p. 308-319, 1999.
- DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; et al. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lectina de soja e iodo polivilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 1-16, 2004.
- EURIDES, D.; MAZZANI, A.; BELLETI, M.E.; et al. Morfologia e morfometria da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com solução aquosa de Barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman martius*). **Revista Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaina**. v. 2/3, n. 1, p. 37-42 jan/dez. 1995/1996.
- FALCÃO, S. C., COELHO, A R. B., ALMEIDA, E. L. et al. Modified process of image reproduction and amplification for measurement of area by planimetry: Application in plain wounds produced in dogs treated by occlusive skin frog dressings. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. vol.38, no.4, p.165-169, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

MARTINS, P. S.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; et al. Comparação entre fitoterápicos de uso tópico na cicatrização de pele em eqüinos. **Archives of Veterinary Science**. v. 8, n. 2, p. 1-7, 2003.

MURRAY, R. K., KEELEY, F. W. The extracellular matrix. In: MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., et al. (eds.) **Harper's Biochemistry**. 24 ed. Stamford: Lange Medical Books, 1996, Cap. 57, p. 667-685.

OLIVEIRA, S. T.; LEME, M. C.; PIPPI, N. L.; et al. Formulações de confrei (*Symphytum officinale* L.) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. **Revista Faculdade Zootecnia, Veterinária e Agronomia Uruguaina**. v. 7, n. 1, p. 61-65, 2000.

PIMENTEL, E. R. **A célula**. In: CARVALHO, H. F., RECCO-PIMENTEL, F. M. Matriz extracelular. São Paulo: Guanabara Koogan, cap. 19, p. 217-234. 2001.

PRATA, M.; HADDAD, C.; GOLDENBERG, S., et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, n. 2, p. 43-48, 1988.

RAHAL, S. C., ROCHA, N. S., BLESSA, E. P., et al. Pomada orgânica natural ou solução salina isotônica no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Ciência Rural** .v. 31, n. 6, p. 1007-1011, 2001

RAHAL, S. C., BRACARENSE, A. P. F. R. L., TANAKA, C. Y., et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science** .v. 8, n. 1, p. 61-67, 2003.

SANTOS, F. C. A., CORRADI, L. S., LEITE, R. P., et al. A modified method for the selective staining of elastic sistem fibers in methacrylate tissue sections. **Brazilian Journal Morphology Science**. v. 21, n.3, p. 135-138, 2004.

SIQUEIRA JR., J. F., DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, cap. 17, p. 197-225, 2000.

SCHULTZ, G., MOZINGO, D., ROMANELLI, M., et al. Wound healing and time; new concepts and scientific applications. **Wound Repair and Regeneration**. v. 13, n. 4, p. S1-S11, 2005.

SWAIM, S. F. **Surgery or traumatized skin: management and reconstruction in the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders company. cap. 7, p. 297- 320, 1980.

VILLA, L. M. R., MILANEZI, L. A., MELHADO, R. M., et al., Avaliação do processo de cicatrização de feridas cirúrgicas submetidas à ação de diferentes medicamentos: Estudo histológico em ratos. **Revista Odontológica de Araçatuba**. v. 24, n. 1, p. 45-53, 2003.