

EFEITO DA SOMATOTROPINA SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS, EM RATOS¹

Luciana de Oliveira Marques dos Santos²
Maria de Lourdes Pessole Biondo Simões³
Ana Paula Bächtold Machado⁴
Gladyston Roberto Matoski Filho⁴
Patrícia Cristina Endo⁴
Giselle Rauen Gruen⁵
Vanessa Rejane Cipriani⁵
Lismary Deforville Mesquita⁶

Santos LOM, Biondo-Simões MLP, Machado APB, Matoski Filho GR, Endo PC, Gruen GR, Cipriani VR, Mesquita LD. Efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas, em ratos. *Acta Cir Bras* [serial online] 2002 Jul-Ago;17(4). Disponível em URL: <http://www.scielo.br/acb>.

RESUMO - A somatotropina, além do efeito anabolizante, age no processo de cicatrização acelerando a formação local de tecido de granulação, síntese e deposição de colágeno, quando administrada por via subcutânea. **Objetivo:** Avaliar o efeito da somatotropina sobre a cicatrização de feridas cutâneas, em ratos. **Métodos:** Utilizaram-se 53 ratos Wistar, machos, com idade média de 145,19 dias e peso inicial médio de 287,72 g, divididos em dois grupos: controle (n=26) que recebeu 1,2 ml/dia de água destilada pela via subcutânea e experimento (n=27) que recebeu 0,2 UI/kg/dia de somatotropina humana pela mesma via. Fez-se uma ferida cutânea no dorso do animal, que diariamente era medida, procedendo-se ao final do experimento o cálculo de contração da ferida. Os tempos de aferição foram 3, 7 e 14 dias, quando de 9 animais de cada grupo, coletou-se sangue para dosagem bioquímica de proteínas plasmáticas e ressecou-se a ferida para estudo histológico. À microscopia avaliou-se: epitelização, reação inflamatória local, tecido de granulação, neovascularização e fibrose. **Resultados:** O cálculo de contração da ferida, nos 3 tempos de aferição, não demonstrou diferenças entre os grupos controle e experimento. Na dosagem bioquímica encontrou-se diminuição das proteínas totais (p=0,007) e aumento da relação albumina/globulina (p=0,03) no 14º dia no grupo controle, enquanto o grupo experimento manteve-as constantes. Na avaliação histológica observou-se significativo aumento da fibrose no 7º dia no grupo experimento (p<0,0001). **Conclusões:** A somatotropina mantém constantes a relação albumina/globulina e as proteínas totais plasmáticas no 14º dia, além de intensificar a fibrose cicatricial quando utilizada durante 7 dias.

DESCRITORES - Somatotropina. Cicatrização de feridas.

INTRODUÇÃO

A somatotropina é um hormônio anabólico secretado pela hipófise anterior, que atua na maioria dos processos metabólicos do organismo, exercendo

efeitos diversos ¹ quando administrada via subcutânea^{1,2}. Esse hormônio atua diretamente estimulando a diferenciação de precursores celulares em células mais maduras e promove o crescimento por estimular a secreção de IGF-I no fígado, o qual atua como um

-
- 1- Trabalho realizado na Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná.
 - 2- Professora Adjunta da Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná.
 - 3- Professora Titular da Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná.
 - 4- Monitores da Disciplina de Experimentação em Clínica e Cirurgia do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná.
 - 5- Alunas do quinto ano do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná.
 - 6- Professora Auxiliar da Disciplina de Anatomia e Fisiologia Patológica do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná.

agente endócrino causando o crescimento de tecidos periféricos^{1,3}.

O processo de cicatrização envolve a migração de células inflamatórias, a síntese de tecido de granulação, a deposição de colágeno e de proteoglicanos e a maturação da cicatriz, estando associada à intensa remodelação³.

Os fibroblastos da pele apresentam receptores de somatotropina, a qual induz a produção e a secreção de IGF I estimulando a replicação dos fibroblastos por meio de mecanismos autócrinos e parácrinos.¹

Durante a cicatrização, a somatotropina pode acelerar a formação local de tecido de granulação, o depósito de colágeno² e influir no metabolismo dos fibroblastos aumentando a síntese da matriz, o que inclui os colágenos tipos I e II³. Ainda, aumenta a síntese e diminui a degradação de proteínas, aumenta a mobilização de lipídeos, diminui a oxidação de glicose e aumenta o armazenamento de glicogênio.³

Em estudos recentes, a somatotropina aumentou a resistência das feridas cutâneas quando administrada no tempo do trauma^{5,6}. Porém, tem-se discutido se a somatotropina tem papel fisiológico na reparação tecidual, uma vez que as feridas de pessoas com deficiência de somatotropina cicatrizaram normalmente⁶. Percebeu-se que o fator liberador da somatotropina não estimula a deposição de colágeno no tecido de granulação, contudo, acelera a maturação deste colágeno.⁶

Outros estudos observando o efeito da somatotropina em ratos queimados mostraram que a sua administração não tinha qualquer efeito.⁷

Sabendo-se das ações da somatotropina no processo de cicatrização primária da pele, questionou-se sua ação na cicatrização por segunda intenção e definiu-se o objetivo do presente estudo: estudar a ação da somatotropina sobre a cicatrização, por segunda intenção, de feridas cutâneas de ratos.

MÉTODOS

Para a realização deste estudo obedeceu-se à Lei Federal 6.638 e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Utilizaram-se 53 ratos convencionais (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) Wistar, machos, com idade de 144 a 147 dias e peso inicial médio de 287,72 gramas, provenientes do biotério da FEPAR.

Os animais foram alojados no Biotério da Faculdade Evangélica do Paraná, onde o macro-ambiente era semicontrolado, com foto-período de 12 horas, temperatura ambiental média de 21,6° C (DP ± 1,06).

A luminosidade, a intensidade de ruído e a umidade relativa do ar eram as do ambiente geral. As gaiolas foram colocadas todas à mesma distância do solo (80cm). Os ratos recebiam cuidados diários, água potável e ração padrão para a espécie à vontade.

Todos os animais foram marcados e pesados no primeiro dia do experimento e no dia da aferição, para posterior análise da variação ponderal.

Procedeu-se à anestesia inalatória com éter etílico a 98% para pesagem, bem como para todos os procedimentos dolorosos e/ou situações de estresse.

Dividiu-se a amostra, aleatoriamente, em dois grupos, conforme o tratamento proposto:

- grupo controle: com 26 animais que receberam 1,2ml/dia de água destilada (AD) e
- grupo experimento: com 27 animais que receberam 0,2 U/kg/dia de somatotropina humana (Somatotropin SIGMA) diluída em 1,2ml de AD.

A medicação de cada grupo foi administrada por via subcutânea, na região posterior do tórax, sempre no mesmo horário do dia (18 horas).

No primeiro dia do experimento demarcou-se a área da ferida com molde metálico circular de 2 cm de diâmetro, e produziu-se a ferida cutânea retirando-se a pele e a tela subcutânea, expondo-se a fáscia dorsal.

Diariamente as feridas eram limpas com soro fisiológico a 0,9% (SF), impressas em papel fino e ocluídas com curativo. A partir das impressões das feridas, ao final do experimento realizou-se o cálculo matemático de contração da ferida, convertendo-se o valor absoluto em porcentagem.

Para aferição, foram submetidos à eutanásia, 9 animais de cada grupo no 3.º, 7.º e 14.º dia do experimento. Previamente à eutanásia, procedeu-se punção cardíaca destinada à coleta de sangue. As dosagens bioquímicas de albumina e proteínas totais séricas foram realizadas por método colorimétrico, e após calculou-se a relação albumina/globulina (A/G).

A seguir ressecava-se a ferida, com 0,5 cm da margem, distendia-se o tecido em papel filtro e fixava-se em formalina tamponada. As peças retiradas eram enviadas para análise histológica corando-se os cortes pela Hematoxilina e Eosina.

Na microscopia avaliou-se o grau de epitelização, a intensidade da reação inflamatória local, o tipo de reação inflamatória conforme a célula predominante, a presença de tecido de granulação, a neovascularização e a fibrose. Os dados eram coletados em ficha própria e avaliados conforme se descreve no Quadro 1.

Quadro 1 – Protocolo de análise microscópica das feridas cutâneas.

<p>1- GRAU DE EPITELIZAÇÃO: (tabulação em cruces)</p> <p>+ = sem epitelação ++ = epitelação de 1/3 da ferida +++ = epitelação de 2/3 da ferida ++++ = epitelação completa</p> <p>2- INTENSIDADE DE REAÇÃO INFLAMATÓRIA LOCAL: (subjetivamente)</p> <p>- discreta - moderada - intensa</p> <p>3- TIPO DE REAÇÃO INFLAMATÓRIA CONFORME O TIPO DE CÉLULA PREDOMINANTE:</p> <p>- aguda (predomínio de neutrófilos) - crônica (predomínio de linfócitos) - agudo-crônica (sem predomínio de neutrófilos ou de linfócitos)</p> <p>4- PRESENÇA DE TECIDO DE GRANULAÇÃO, NEOVASCULARIZAÇÃO E FIBROSE: (tabulação em cruces)</p> <p>0 = sem tecido de granulação e/ou neovascularização + = escassa quantidade de tecido de granulação e/ou neovascularização ++ = discreta quantidade de tecido de granulação e/ou neovascularização +++ = moderada quantidade de tecido de granulação e/ou neovascularização ++++ = acentuada quantidade de tecido de granulação e / ou neovascularização.</p>

Para análise estatística da contração da ferida utilizou-se o teste não-paramétrico Mann-Whitney (*software* “Primer of Biostatistics”) e o teste paramétrico t de Student. Para avaliação das proteínas séricas realizou-se Análise de Variância (ANOVA), os testes t de Student e Mann-Whitney. Na microscopia empregou-se o teste Exato de Fisher (*software* “Epi-Info”) para amostras independentes. Adotou-se $p = 0,05$ ou 5% como nível para rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

1- Alterações ponderais

Na correlação entre peso inicial e final observou-se perda de peso nos dois grupos em todos os tempos de aferição; contudo a maior perda de peso foi encontrada no grupo experimento, no 3º dia ($p < 0,0001$).

2- Avaliação de contração da ferida cutânea

Comparando-se os grupos controle e experimento em cada tempo de aferição, não se observou diferenças com relação à contração média e nem percentual ($p_{3^\circ \text{ dia}} = 0,40$, $p_{7^\circ \text{ dia}} = 0,376$ e $p_{14^\circ \text{ dia}} = 0,145$). Através do gráfico de evolução da contração da ferida (Figura 1) observa-se que a área da ferida diminuiu com o passar do tempo de lesão.

3- Dosagem de proteínas séricas

Constatou-se diferença significativa entre os grupos controle e o experimento no 14º dia. No grupo

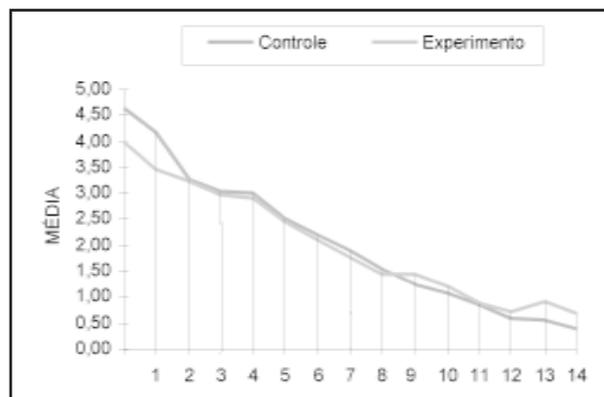


Figura 1 - Demonstração gráfica da evolução da contração da ferida nos grupos controle e experimento.

controle houve diminuição das proteínas totais e aumento da relação A/G, enquanto que no grupo experimento os valores mantiveram-se constantes (proteínas totais $p = 0,007$ e relação A/G $p = 0,030$).

4. Avaliação microscópica da ferida cutânea

a) Grau de epitelação:

No 3º e 7º dia nenhum dos grupos apresentava ferida epitelação. No 14º dia constatou-se epitelação de 1/3 da ferida, em 25% do grupo controle e em 22,2% do experimento, porém sem diferença significativa ($p = 0,58$).

b) Intensidade de reação inflamatória:

No 3º dia a reação inflamatória nas feridas era de intensidade moderada nos dois grupos. No 7º dia era intensa em 100% nas do grupo controle e em 77,8% nas do grupo experimento. No 14º dia eram moderadas em 87,5% das feridas do grupo controle e em 77,8% nas do grupo experimento, mas sem diferenças significantes ($p_{7^\circ \text{ dia}} = 0,235$ e $p_{14^\circ \text{ dia}} = 0,529$).

c) Tipo de reação inflamatória

No 3º dia a reação inflamatória mostrava-se agudo-crônica em 77,8% das feridas do grupo controle e em 88,9% das do experimento. No 7º dia era agudo-crônica em 100% das feridas dos dois grupos, modificando-se no 14º dia, quando a porcentagem das feridas com reação inflamatória do tipo crônica aumentou para 33,5% no grupo controle e para 33,3% no experimento. Contudo as diferenças entre os grupos, não foram significantes ($p_{3^\circ \text{ dia}} = 0,50$ e $p_{14^\circ \text{ dia}} = 0,626$).

d) Avaliação do tecido de granulação e neovascularização:

As porcentagens de tecido de granulação e neovascularização foram às mesmas em cada grupo. No 3º dia, ambas foram de intensidade moderada em 77,8% do grupo controle e 55,6% do grupo experimento. No 7º dia, ambas evoluíram para acentuadas em 44,4% do controle e 66,7% das do experimento. Contudo, regrediram no 14º dia quando ambas mostravam-se em quantidades moderadas em 75% do grupo controle e escassas em 55,6% do experimento. Apesar das diferentes porcentagens observadas, estas não foram significantes ($p_{3^\circ \text{ dia}} = 0,31$, $p_{7^\circ \text{ dia}} = 0,318$ e $p_{14^\circ \text{ dia}} = 0,217$).

e) Avaliação de fibrose:

Todas as feridas dos animais de ambos os grupos apresentaram grau discreto de fibrose no 3º dia de aferição. No 7º dia, 100% das feridas do grupo controle mostraram grau discreto enquanto que em 88,9% das do grupo experimento exibiam grau intenso (Figura 2), sendo esta diferença significativa ($p < 0,0001$).

No 14º dia a fibrose foi semelhante nos dois grupos, e graduada como moderada em 75% dos animais do grupo controle e 77,8% do experimento ($p = 0,45$).

DISCUSSÃO

Segundo alguns autores a administração de somatotropina provoca, em ratos, ganho de peso por ter efeito anabólico^{1,2}. A cirurgia gera um estado catabólico que leva à perda de peso no pós-operatório¹. Para outros, a somatotropina tem atividade anabólica limitada, em ratos, com pituitária funcionalmente normal⁷, não provocando ganho de peso^{6,7}. O presente estudo mostrou perda de peso no terceiro dia de uso de somatotro-

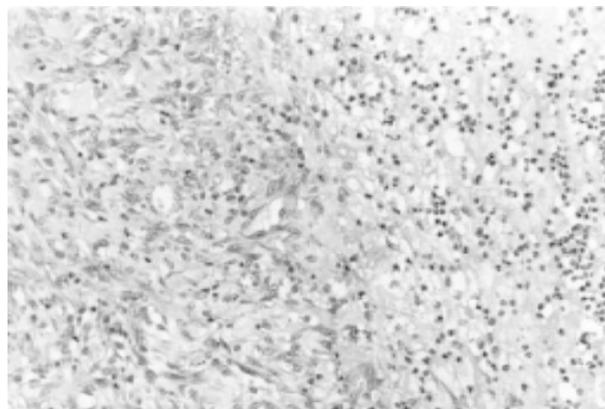


Figura 2 - Fotomicrografia de corte histológico de ferida obtida do grupo experimento mostrando, no 7.º dia do estudo, intenso grau de fibrose representado por fibras colágenas desorganizadas e núcleos de fibroblastos. Vê-se neste corte infiltrado inflamatório rico em linfócitos.

pina, que pode ter sido ocasionada pelo estado catabólico pós-operatório.

Relata-se que a aceleração do processo de reparação de feridas seria devido ao efeito direto da somatotropina sobre os fibroblastos ou pela estimulação do IGF-1 que está presente no tecido de cicatrização⁶. Neste estudo não se observou diferença relacionada à contração da ferida cutânea quando se utilizou somatotropina.

Alguns autores afirmam que a somatotropina aumenta a síntese e diminui a degradação de proteínas³, porém outros autores não encontraram evidências de que a somatotropina tivesse algum efeito sobre o nível de albumina sérica⁷. Nesse estudo constatou-se que o uso de somatotropina durante 14 dias, em comparação ao controle, gerou menor variação das proteínas totais e manteve constante a relação A/G, indicando maior quantidade de globulina sérica, proteína plástica envolvida no processo de cicatrização e na formação de colágeno. Quando as proteínas nos tecidos diminuem, as proteínas séricas podem atuar como fonte para rápida reposição.

As doses ideais de somatotropina para estimular a formação de tecido de granulação variam entre 0,2 e 0,7 UI, uma vez que com doses superiores não se observam tais efeitos². Ainda, sua potência seria maior por administração local do que por sistêmica². Certos estudos mostram que a somatotropina produz tecido de granulação com maior concentração de hidroxiprolina⁶; contudo em nosso estudo o tecido de granulação e a neovascularização foram maiores no sétimo dia de cicatrização independente da administração de somatotropina.

Utilizando-se altas doses de somatotropina ocorreria diminuição da síntese de colágeno e da cicatrização, porém em menores doses o efeito seria inverso, isto devido à presença de receptores de somatotropina nos fibroblastos². Nesse experimento encontrou-se intenso

grau de fibrose no sétimo dia, indicando que nesta etapa da cicatrização, a somatotropina, na dose utilizada, poderia aumentar a síntese e deposição de colágeno.

Os resultados deste estudo parecem promissores em relação à formação de colágeno e ao suporte protéico plasmático. Contudo, sabendo-se que o mesmo utilizou ratos saudáveis e que as maiores dificuldades de cicatrização por segunda intenção ocorrem em organismo com carências nutricionais, sugerindo-se novos estudos para avaliar os efeitos da somatotropina em condições nutricionais adversas.

Apesar do modelo de estudo em ratos ser considerado adequado para entender o processo de cicatrização em humanos, deve-se lembrar que completo entendimento da cicatrização cutânea humana somente será obtido a partir de estudos na mesma espécie.

CONCLUSÃO

A somatotropina mantém constante a relação albumina/globulina e proteínas totais plasmáticas no 14º dia, além de intensificar a fibrose cicatricial quando utilizada durante 7 dias.

REFERÊNCIAS

- 1- Jorgensen PH. Growth hormone, skin and wound healing: experimental studies in the rat. *APMIS* 1997; 105(supl.72): 1-494.
- 2- Rasmussen LH, Garbarsch C, Schuppan D, Moe D, Horslev-Pedersen K, Gottrup F, Steenfos H. Dose response profiles of human growth hormone in subcutaneous wound chambers in rats. *Eur J Surg* 1995; 161:157-62.
- 3- Biondo-Simões MLP, Pante ML, Macedo VL, Garcia RF, Boell P, Moraes THC. O hormônio de crescimento e a concentração de colágeno na cicatriz de feridas cutâneas de ratos. *Acta Cir Bras* 2000; 15(supl.3):78-82.
- 4- Skottner A, Arrhenius-Nyberg V, Kanje M, Fryklund L. Anabolic and tissue repair functions of recombinant insulin-like growth factor I. *Acta Paediatr Scand* 1990; 367(supl.):63-6.
- 5- Jorgensen PH, Bang C, Andreassen T, Flyvbjerg A, Orskov H. Dose-response study of the effect of growth hormone on mechanical properties of skin graft wounds. *J Surg Res* 1995; 58:295-301.
- 6- Garrel DR, Gaudreau P, Zhang L, Reeves I, Brazeau P. Chronic administration of growth hormone-releasing factor increases wound strength and collagen maturation in granulation tissue. *J Surg Res* 1991; 51:297-302.
- 7- Belcher HJCR e Ellis H. Somatropin and wound healing after injury. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(4):939-43.

Santos LOM, Biondo-Simões MLP, Machado APB, Matoski Filho GR, Endo PC, Gruen GR, Cipriani VR, Mesquita LD. Effect of somatotropin on skin wound healing in rats. *Acta Cir Bras* [serial online] 2002 Jul-Aug;17(4). Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

ABSTRACT - Somatotropin, in addition to having an anabolizing effect, also acts on the healing process by accelerating the local formation of granulation tissue and collagen synthesis and deposition when administered subcutaneously (SC). **Objective:** To evaluate the effect of somatotropin on skin wound healing in rats. **Methods:** Fifty-three male Wistar rats aged on average 145.19 days and weighing 287.27 g at the beginning of the study were divided into two groups: control (n=26) receiving 1.2 ml/day distilled water (SC), and experimental (n=27) receiving 0.2 IU/kg/day human somatotropin (SC). A skin wound was produced in the dorsum of the animal and measured daily, and wound contraction was calculated at the end of the experiment. At 3, 7 and 14 days, blood was collected from 9 animals in each group for biochemical determination of plasma proteins and the wound was resected for histological study. Epithelialization, local inflammatory reaction, granulation tissue, neovascularization and fibrosis were evaluated microscopically. **Results:** The calculation of wound contraction at the 3 checking times did not show significant differences between the control and experimental groups. The biochemical determinations showed a decrease in total proteins (p=0.007) and an increase in the albumin/globulin ratio (p=0.03) in the control group on the 14th day of the study, whereas remain stable in the experimental group. Histological evaluation showed a significant increase in fibrosis in the experimental group on the 7th day (p<0.0001). **Conclusion:** Somatotropin remain stable the albumin/globulin ratio and total plasma proteins on the 14th day, and also intensified cicatricial fibrosis when used for 7 days.

KEY WORDS - Somatotropin. Wound healing.

Endereço para correspondência:

Luciana de Oliveira Marques dos Santos
Rua Gastão Câmara, 694/1202
80730-300 Curitiba – PR

Conflito de interesse: nenhum
Fonte de financiamento: nenhuma

Data do recebimento: 03/05/2002
Data da revisão: 18/06/2002
Data da aprovação: 01/07/2002