

Influência do propionato de testosterona e do "Diffusing factor" sobre a cicatrização cutânea de lesões experimentais (*)

Fernando Ubatuba e Jorge Costa de Moraes

(Seção de Endocrinologia do Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, Distrito Federal

(Com três gráficos no texto)

O tegumento dos mamíferos regenera-se com grande rapidez após lesões cutâneas; iniciada pelo crescimento dos tecidos mesodérmicos que servem de suporte à invasão epitelial, a regeneração cutânea se completa, auto-regula-se, quando a superfície lesada fôr inteiramente recoberta pelas células epiteliais que avançam dos bordos para o centro da área lesada.

É evidente que grande número de fatores, tanto internos quanto externos, podem influir nesse mecanismo de regeneração do tegumento, condicionando, direta ou indiretamente, modificações na sua própria capacidade regenerativa. Não cabe aqui discutir detalhadamente tais fatores, bem estudados na revisão de Arey (1936).

Os hormônios, elementos trofogenéticos de integração em sua maioria, devem ocupar *a priori*, lugar de destaque nesses mecanismos de regeneração tissular. É interessante assinalar que os *evocadores* embriogenéticos conhecidos são esteróides (Needham, 1942), classe de substâncias a que também pertencem os hormônios gonadais, essencialmente morfogenéticos.

Procuramos investigar o papel do hormônio masculino quimicamente puro sobre os processos de cicatrização cutânea, uma vez os resultados encontrados na literatura serem contraditórios e não ter sido ainda utilizado o hormônio puro em pesquisas dessa natureza. Os resultados a que chegamos são o motivo dêste trabalho.

(*) Trabalho apresentado à 1ª Reunião Conjunta das Sociedades de Biologia do Brasil, realizada em São Paulo, de 2 a 6 de setembro de 1946.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta investigação foram utilizados ratos machos, albinos e malhados, com 250 gr. de peso médio. O hormônio masculino foi empregado sob a forma de propionato de testosterona dissolvido em óleo de sésamo (*). A preparação MC1 com atividade «diffusing» foi obtida do seguinte modo: 44 testículos de ratos adultos foram triturados a polpa fina em gral de porcelana e extraídos sucessivamente com 3 porções de 50 cm³ de solução de cloreto de sódio a 0.85%; o resíduo sólido foi separado por centrifugação e os sobrenadantes turvos reunidos e precipitados com 6 volumes de acetona. Após nova centrifugação o precipitado branco floconoso foi separado e lavado 3 vezes com acetona, com éter e seco no *vácuo*. O pó resultante mostrou-se parcialmente solúvel em água destilada e em solução fisiológica de cloreto de sódio. Foi preparado um extrato encerrando o material solúvel de 20 mgr. por cm³ (a parte insolúvel eliminada por centrifugação) que manteve atividade «spreading» constante por 1 mês de observação, conservado na geladeira a 3-5° C.

A lesão cutânea foi praticada na região lombo-sacra, lateralmente, em área previamente depilada com navalha; o animal foi anestesiado pelo éter para a retirada do retalho cutâneo. A primeira determinação da área foi feita 24 horas após a feitura da lesão, quando os bordos da ferida já se acham aderidos aos planos profundos, limitando áreas compreendidas entre 400 e 500 mm².

A determinação das áreas foi feita por desenho dos bordos epidermizados em papel celofane diretamente aplicado sobre a área lesada; os contornos foram a seguir passados por decalque para papel de desenho e as áreas resultantes determinadas por meio de planímetro de Amsler. Os animais foram isolados individualmente em gaiolas metálicas durante todo o período experimental. Não foram utilizados pênsois ou outros dispositivos de proteção à ferida, todos eles causas de interferência no processo de «retração» dos bordos epidermizados, processo êsse fundamental para o fenômeno da regeneração.

As injeções de propionato de testosterona e de óleo de sésamo, para os animais contrôles, foram feitas subcutâneamente na pele do abdome. O efeito local foi verificado pela aplicação do hormônio diretamente sobre a área lesada. Os contrôles do grupo tratado com a preparação MC1 ativa, direta-

(*) Perandren (Ciba) e Testoviron (Schering).

mente sobre a ferida, foram igualmente tratados com fração do mesmo extrato inativado pelo aquecimento a 100° C. durante 30 minutos.

A castração foi feita por via escrotal, os animais anestesiados pela avertina (intraperitonal).

A atividade «diffusing» do extrato MC1 foi testada pela técnica de MADINAVEITIA modificada por HUMPHREY (1943); empregamos bolhas intradérmicas de 0.2 cm³ do extrato diluído em partes iguais com solução de hemoglobina de cavalo; os 6 «spots» de doses diferentes e os 2 controles foram alojados bilateralmente na pele do dorso depilado de cobaios machos albinos (cêrca de 350 gr.) e a leitura feita de modo habitual pela face interna da pele.

RESULTADOS

Os resultados experimentais obtidos com os diferentes tratamentos estão condensados nos gráficos 1, 2 e 3. As curvas representam a cicatrização em função do tempo; em ordenadas estão expressos os valores percentuais das áreas lesadas em relação às áreas medidas 24 horas após a feitura do retalho cutâneo.

No caso da primeira série de animais (fig. 1) pode observar-se que o tratamento local com propionato de testosterona foi absolutamente sem efeito retardador ou acelerador do processo de recomposição do tegumento. A análise de variância não revela diferenças significativas ao fim de 13 dias de experiência (segurança de 80%). As determinações das primeiras áreas (medidas com 24 horas), mostram diferenças atribuídas ao acaso, tendo-se aqui verificado um erro experimental relativamente pequeno (C. V. = 14.7%).

A análise de variância dos dados da 2ª série (fig. 2) também não revela diferenças significativas entre os lotes de animais normais, castrados (baixo nível hormonal) e tratados com propionato de testosterona (alto nível hormonal). Se bem que ao fim de 12 dias de observação a heterogeneidade dos dados tenha sido muito grande (C. V. = 34,6%) as diferenças não são significativas (probabilidade de 20%).

Resultado interessante foi obtido na 3ª série experimental, na qual o planejamento foi procurar qualquer efeito de inteiração entre o propionato de testosterona e o *fator de difusão*. A análise dos resultados ao fim do 14º dia, se bem que houvesse um erro experimental elevado (C. V. = 28,6%) revela ser significativa a diferença observada entre os grupos de animais castrados (tratados com extrato MC1 ativo e inativado) e os normais (tra-

tados com MC1 ativo, inativado e com propionato de testosterona + MC1 ativo). Todavia, dentro desses grupos as diferenças não são absolutamente significativas.

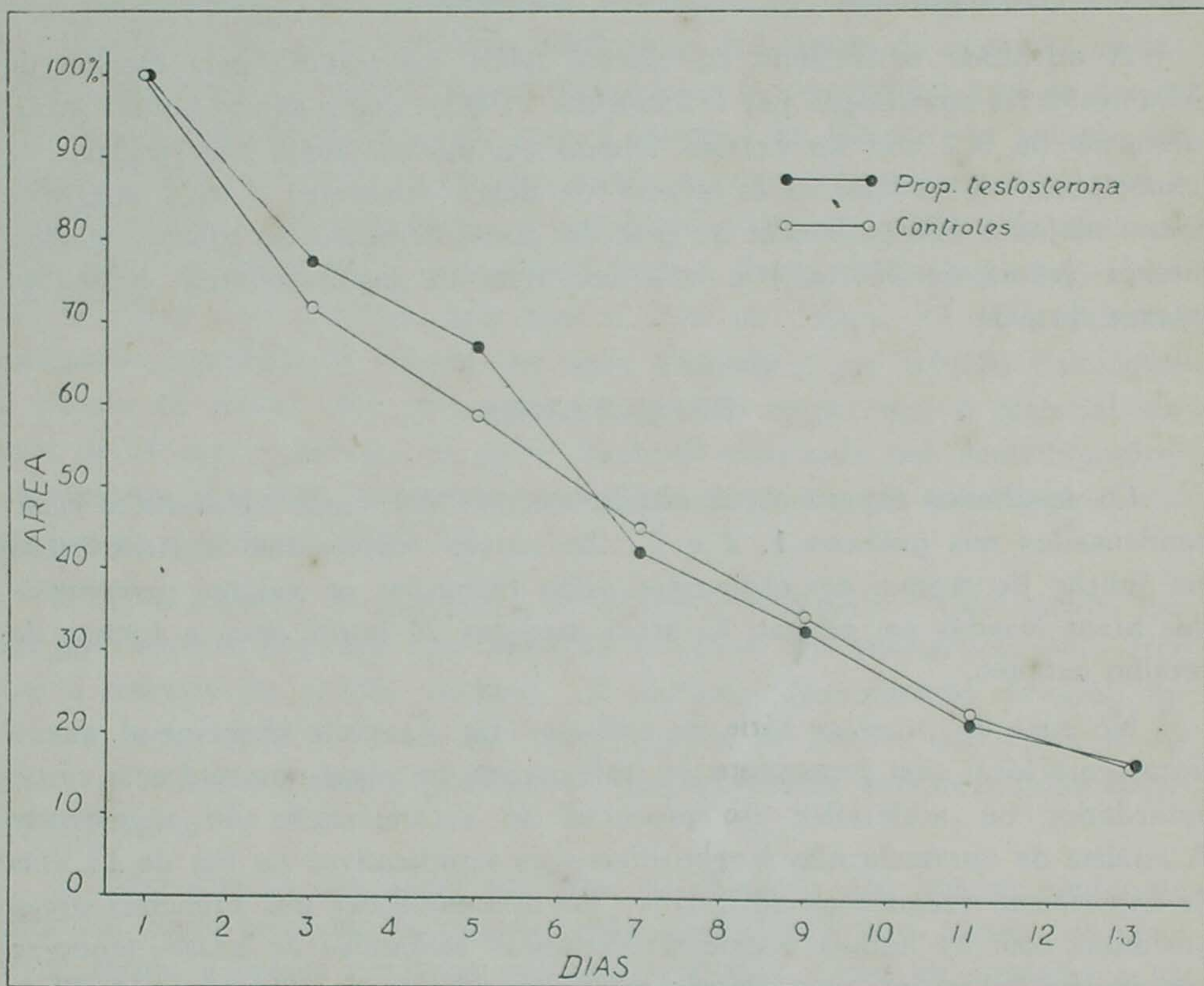


Gráfico 1. Cicatrização cutânea em ratos castrados e tratados localmente com propionato de testosterona. Cada ponto representa a média dos lotes.

4 ratos normais recebendo óleo de sésamo puro diariamente sobre a área lesada.

5 ratos normais tratados diariamente com 1-2 mgr de propionato de testosterona em solução oleosa

DISCUSSÃO

A análise dos resultados experimentais obtidos revela que somente se pode concluir seguramente, considerando-se os dados do último dia de observação, isto é, no final de todo o período de cicatrização. Os resultados parciais apontam a possibilidade da regeneração ter sido influenciada em diferentes fases do processo; assim, na 2.^a série as médias calculadas para o 2º dia são: normais = 83,4%; castrados = 92,1%; tratados com hormônio = 76%. A análise mostra que estas diferenças são seguramente (20%)

significativas. Em outros termos, ao fim do 2º dia os animais castrados apresentavam-se com áreas maiores (cicatrização mais lenta) do que os normais, enquanto que os tratados com propionato de testosterona apresentavam sen-

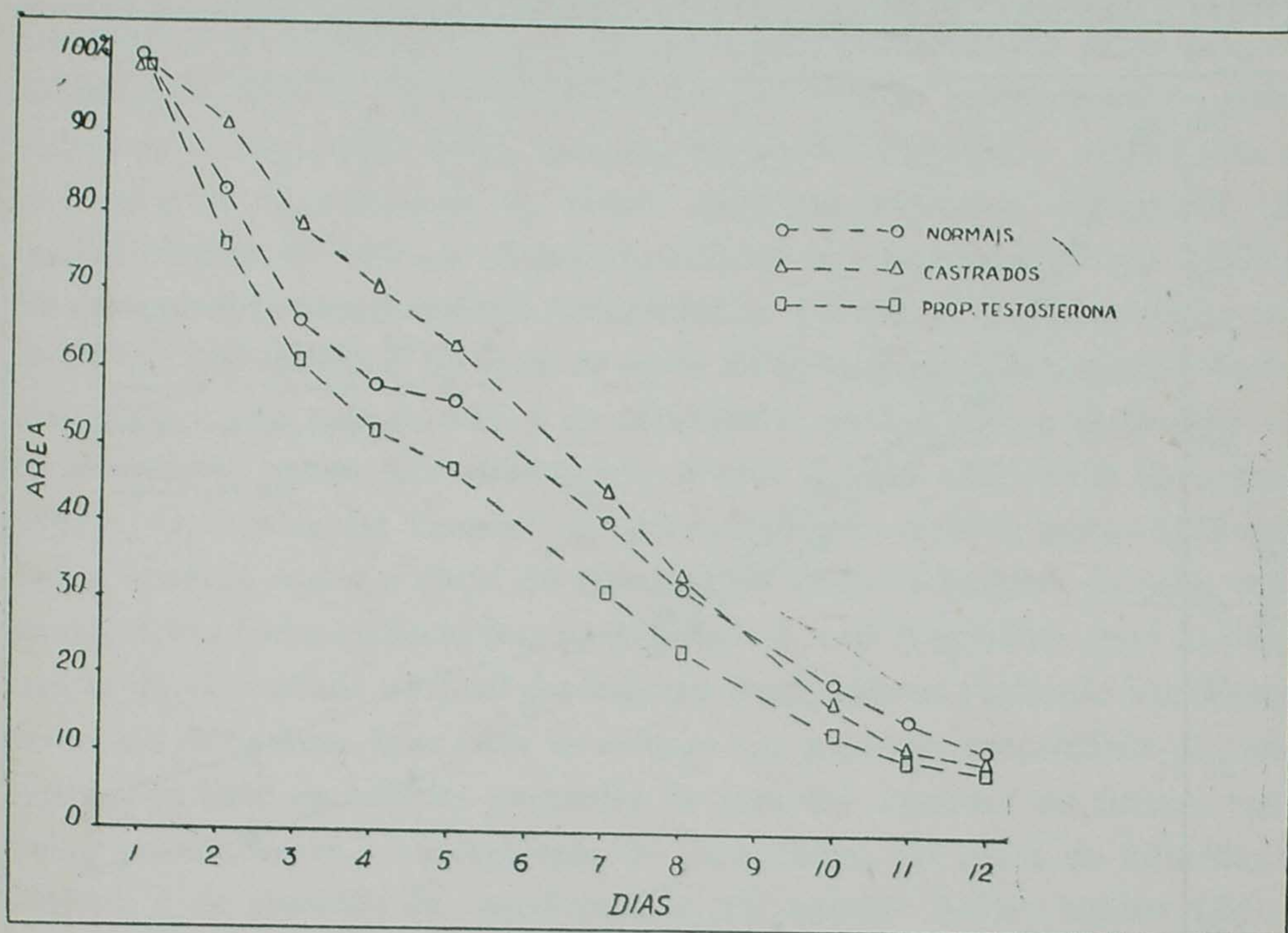


Gráfico 2. Cicatrização cutânea em ratos normais, castrados e tratados com propionato de testosterona subcutaneamente.

Cada ponto representa a média dos lotes.

6 ratos normais recebendo óleo de sésamo puro.

6 ratos castrados 26 dias antes da retirada do retalho cutâneo, também recebendo óleo puro.

6 normais tratados com 30 mgr. de propionato de testosterona (5 mgr. duas vezes por semana), inclusive durante o período experimental.

sível redução da área em relação aos normais. Tal resultado parcial deverá ser investigado com maior detalhe posteriormente, com experiências melhor planejadas; aqui o resultado pode apenas ser considerado sugestivo e por várias razões. Dada a dificuldade em obter-se áreas iniciais uniformes para os diferentes animais, surge uma questão importante: a velocidade de cicatrização é proporcional à área inicial. Nessa série as áreas lesadas oscilaram entre 692 e 376 mm². É bem possível que a desuniformidade obtida nos primeiros dias para os animais dessa série corra a conta dos valores dispares das áreas iniciais. Também é possível que o número de animais tenha sido muito pequeno (poucas repetições).

Considerando-se porém o tempo total de cicatrização, os resultados são bem claros e concordantes. A castração não altera o processo total de cicatrização, confirmando-se assim os dados de MERLINI (1928), MARINO (1931) e DINATALE & MIDANA (1931). Do mesmo modo porém, os animais

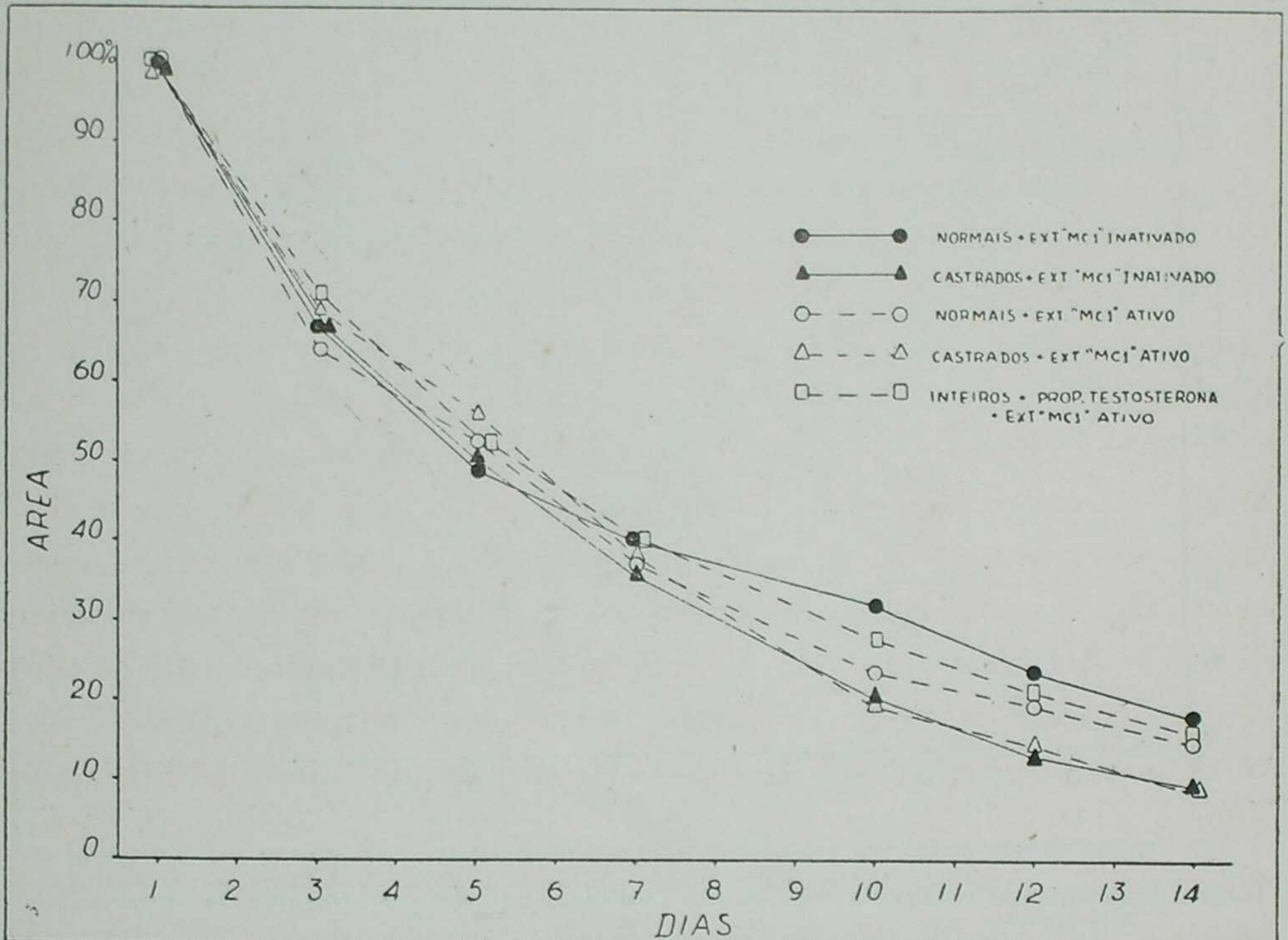


Gráfico 3. Cicatrização cutânea em ratos normais, castrados e tratados com propionato de testosterona. Efeito do «diffusing factor» aplicado localmente.

Cada ponto representa a média dos lotes.

5 ratos normais tratados diariamente com 2 gotas de MCI ativo.

5 ratos normais tratados diariamente com 2 gotas de MCI inativado.

5 ratos castrados 20 dias antes da lesão; tratamento diário com 2 gotas de MCI ativo.

5 ratos castrados nas mesmas condições, recebendo MCI inativado.

5 ratos normais tratados com 30 mgr. de propionato de testosterona (3 x 10 mgr. subcut.) durante o período de experimentação; recebendo diariamente 2 gotas de MCI ativo.

Todos os animais que não receberam testosterona foram injetados com óleo de sésamo puro nas mesmas doses.

tratados com propionato de testosterona não diferem dos normais, contrário ao que afirmam AIEVOLI (1927) e LAUBER (1933). Estes pesquisadores trabalharam em época anterior ao isolamento e síntese do hormônio masculino, empregando extratos testiculares bovinos (androgênicos). Seria então bem possível que o efeito acelerador por eles assinalado corresse à conta de outras substâncias presentes em seus extratos. Uma vez que a

castração é ineficaz, os resultados por nós obtidos com a testosterona seriam de esperar.

Com a finalidade de investigar um outro fator, presente seguramente nas lâminas de testículo frêsko e pólpa testicular, empregadas pelos pesquisadores que notaram efeitos positivos no processo de regeneração da pele, obtivemos a preparação MC1, rica em atividade «diffusing». Atendendo a uma possível especificidade de efeito, extraímos testículos de animais da mesma espécie. O fator de difusão descoberto por DURAN-REYNALS (1929) foi recentemente identificado às *hialuronidases* (CHAIN & DUTHIE, 1940), enzimas que determinam a clivagem do ácido hialurônico em glucosamina e ácido glucurônico; êste polisacarídeo é de importância para o caso pois também já foi isolado e parece ser constituinte normal da pele (MEYER & CHAFFEE, 1941). O espetacular aumento da permeabilidade cutânea pelo "diffusing factor" poderá correr a conta da clivagem do ácido hialurônico da pele, com modificações físico-químicas locais, das quais a mais importante seria a diminuição da viscosidade ao nível dos espaços intercelulares. Aplicado localmente no tecido subcutâneo, êsse fator de difusão tem a curiosa propriedade de concentrar no local da infecção, partículas de corantes injetados no sistema vascular; possivelmente a concentração de estrogênicos nas áreas de inflamação cutânea e de aumento da vascularização por agentes farmacológicos (BRUNELLI, 1935), corre a conta de mecanismo semelhante. Dada a semelhança química entre os estrógenos e a testosterona, seria razoável supor-se uma concentração de hormônio masculino em áreas lesadas, com alta taxa de fator de difusão. Se bem que o extrato MC1 fôsse altamente ativo, não houve qualquer modificação no tempo de cicatrização das áreas de animais tratados com ambos os elementos. Em vista dos outros resultados, é possível que a falta de efeito decorresse da ineficácia do propionato, se bem que não temos provas diretas de que o ester da testosterona tivesse sido concentrado na ferida.

É interessante assinalar que tanto o extrato MC1 ativo como o inativado, aceleraram o processo de cicatrização dos animais castrados. A falta de animais normais nesse grupo torna difícil a conclusão. De qualquer modo parece que há uma substância ativa no extrato, termo-estável, diferente das *trefonas* e do fator de difusão. Êste ponto deverá ser investigado posteriormente.

Do exposto podemos concluir que, pelo menos no caso particular da regeneração do tegumento do rato, o hormônio testicular puro (propionato de testosterona) não representa papel decisivo indispensável nesse mecanismo de recomposição tissular.

Agradecemos ao Engenheiro Edgar Kahlkman do Departamento de Pesquisas Agronômicas do Ministério da Agricultura, pela análise estatística dos nossos resultados experimentais.

SUMMARY

The effect of testosterone propionate in different treatments was tested in adult male rats (250 g.) with mechanical skin experimental lesions. The whole period of cicatrization was investigated in normals, castrated and testosterone treated animals.

We could not detect any alteration in the regeneration process in both treated and untreated rats (normals and castrated). Diffusing factor obtained from homologous testis, directly applied upon the lesions also do not change the healing period.

Related to the course of the healing process, little evidence is presented by variance analysis that significative differences could be detected in the first periods, in both castrated and testosterone treated groups; however new well planed experiments should be carried to test this point.

BIBLIOGRAFIA

AIEVOLI, E.

1931. Ormoni o trefoni acceleratori del processo cicatriziale. Gazz. internaz. Med.-chir., 39 : 513.

AREY, L. B.

1936. Wound healing. Physiol. Rev., 16 : 327.

BRUNELLI, B.

1935. Sulla possibilità di provocare la fissazione locale di ormoni circolanti. Arch. Intern. Pharm. Therap., 49 : 295.

CHAIN, E. — E. S. DUTHIE.

1940. Identity of hyaluronidase and spreading factor. Brit. J. Exp. Path., 21 : 324.

DINATALE, L. — A. MIDANA

1931. Ricerche sperimentali sulla influenza della tiroide, del testicolo e dell'ovario nel processo di cicatrizzazione delle ferite. Il Policlinico (Sez. chir.), 38 : 21.

DURAN-REYNALS, F.

1929. Effect of extracts of certain organs from normal and immunized animals on infecting power of vaccine virus. J. Exp. Med., 50 : 327.

HUMPHREY, J. H.

1943. Studies on diffusing factors. 3. A new biological assay of diffusing factor in guinea-pigs. *Biochem. J.*, 37 : 177.

LAUBER, H. J.

1933. Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen der innersekretorischen Drüsen zur Wundheilung. *Beitr. z. Klin. Chir.*, 157 : 244.

MARINO, V.

1931. Dell'influenza del parenchima testicolare nell processo di cicatrizzazione. *Arch. ital. chir.*, 28 : 139.

MEYER, K. — E. CHAFFEE.

1941. Mucopolysaccharides of skin. *J. Biol. Chem.*, 138 : 491.

MERLINI, A.

1928. Sulla influenza della tiroide e delle ghiandole sessuali nell processo de cicatrizzazione delle ferite. *Endocrinol. e patol. costit.*, 3 : 174.

NEEDHAM, J.

1942. *Biochemistry and morphogenesis*. Cambridge Univ. Press. 786 pp.