

Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos*

*Effects of chronic use of dexamethasone on cutaneous wound healing in rats**

Fernando Pundek Tenius¹
Sérgio Ossamu Ioshii³

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões²

Resumo: FUNDAMENTOS - Acredita-se que os glicocorticóides prejudiquem a cicatrização, causando decréscimo da proliferação celular, da neovascularização e da produção de matriz. OBJETIVO - Investigar os efeitos do uso crônico dos corticoesteróides na cicatrização de feridas cutâneas. MÉTODOS - Após injeções de dexametasona (0,1mg/kg/dia) por 30 dias, fez-se incisão no dorso de ratos e estudou-se a cicatrização no terceiro, sétimo e 14º dias. A resistência da cicatriz, a densidade do colágeno e a reação inflamatória foram avaliadas pela histometria. RESULTADOS - As cicatrizes do grupo tratado com dexametasona eram menos resistentes à tração em todos os tempos ($p=0,008$) e apresentavam menor densidade de colágeno. A do colágeno tipo III foi menor em todos os tempos estudados ($p<0,0001$), e a do colágeno tipo I foi menor apenas no 14º dia ($p<0,0001$). A infiltração de células inflamatórias foi menor no grupo tratado com dexametasona nas duas primeiras avaliações ($p=0,001$ e $p=0,016$), não sendo significativa a diferença no 14º dia ($p=0,367$). CONCLUSÕES - Verificou-se diminuição da resistência da cicatriz e baixa densidade do colágeno total em todos os tempos estudados. No início do processo observou-se baixa densidade do colágeno tipo III e mais tarde também baixa densidade do colágeno tipo I. Nos tempos iniciais houve redução do número de células inflamatórias.

Palavras-chave: Cicatrização de feridas; Colágeno; Dexametasona

Abstract: BACKGROUND - Glucocorticoids are believed to hinder healing process, causing decreased cell proliferation, neovascularization and matrix production. OBJECTIVE - To investigate the effects of the chronic use of corticosteroids on skin wound healing. METHODS - After daily injections of dexamethasone (0.1 mg/Kg) for 30 days, an excision was made in the dorsum of rats. Wound healing was evaluated at postoperative days 3, 7 and 14. Scar resistance, collagen density and inflammatory reaction were assessed by histometry. RESULTS: The scars of the dexamethasone-treated group were less resistant to traction in all days ($p=0.008$) and presented lower collagen density. Collagen III density was affected at all times ($p<0.0001$) and collagen I density was lower only on day 14 ($p<0.0001$). The inflammatory cell infiltration was less intense in the dexamethasone-treated group in the first two evaluations ($p=0.001$ and $p=0.016$), but there was no significant difference on day 14, ($p=0.367$). CONCLUSIONS - We observed decreased scar resistance and lower total collagen density in all periods studied. In the beginning of the process, low collagen III density was observed and later collagen type I density was also decreased. Reduced number of inflammatory cells was found in the first two evaluations.

Keywords: Collagen; Dexamethasone; Wound healing

Recebido em 08.06.2005.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 23.03.2007.

*Trabalho realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) em parceria com a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Conflito de interesse declarado: Nenhum.

¹ Mestre em Princípios da Cirurgia pelo Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) Curitiba (PR) - Brasil. Membro titular da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica - Curitiba (PR), Brasil.

² Doutora em Cirurgia Experimental pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) Escola Paulista de Medicina (EPM), Professora de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Paraná (PR), Brasil, e de Metodologia da Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) - Paraná (PR), Brasil, Titular do Colégio Brasileiro de Cirurgiões (CBC) - São Paulo (SP), Brasil.

³ Doutor em Patologia Experimental e Professor de Patologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) - Paraná (PR), Brasil.

INTRODUÇÃO

A medicina é ciência conhecida por apresentar resultados nem sempre previsíveis. Muito se tem feito para a obtenção de resultados mais precisos, buscando condição mais exata dentro de seu enorme espectro de variáveis.

O uso terapêutico de glicocorticóides, com exceção da terapia de reposição, é de certa forma empírico, sendo a dose ajustada de acordo com as necessidades de cada paciente. O uso contínuo, além dos problemas acarretados pela supressão do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, pode levar a outras complicações, como anormalidades hidroeletrólíticas, hipertensão arterial, hiperglicemia, suscetibilidade aumentada a infecções, osteoporose e outras, a par do hábito peculiar da superdosagem de esteróides, que compreendem a redistribuição do tecido adiposo, estrias, equimoses, acne e hirsutismo.

A cicatrização cutânea é processo complexo envolvendo inflamação, reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de matriz intersticial, eventos realizados por grande número de diferentes tipos de células, como queratinócitos, fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais, influências célula a célula, interação entre células, matriz intersticial e fatores de crescimento de modo a reparar os tecidos danificados.¹

Acredita-se que os glicocorticóides prejudiquem a cicatrização, provavelmente causando decréscimo da proliferação celular, da neovascularização e da produção de matriz.^{2,3} Em animais foi relatado retardo do afluxo de macrófagos, neutrófilos e fibroblastos.⁴ Admite-se que os corticosteróides suprimam a fase inflamatória da cicatrização.⁵

Foi demonstrado que a transcrição do RNAm para o colágeno tipo I é diminuída pelos glicocorticóides. A expressão dos receptores para TGF- β 1, TGF- β 2 e para TGF- β tipo II é suprimida pelos glicocorticóides.⁶ Foi relatada importante diminuição da concentração de hidroxiprolina com o uso da hidrocortisona em ratos ($p < 0,01$). É possível que o uso crônico de corticóides possa influenciar a reepitelização, a neovascularização e a síntese do colágeno.⁷

Alguns autores descrevem que corticosteróides usados por longos períodos levam às alterações citadas acima, porém a administração feita de forma intermitente não teria influência na reparação tecidual.⁸ Afirma-se que o uso continuado atrasa o processo de cicatrização, o que não acontece com o uso de dose única no pós-operatório.⁹

Pacientes portadores de doenças crônicas fazem uso dessas substâncias por anos, quando não por toda a vida. Esse uso continuado poderia elevar o número de complicações pós-operatórias, como eventrações, deiscências de pele e mesmo de anastomoses.

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do uso crônico da dexametasona no processo de reparação de feridas cutâneas de ratos, especialmente quanto à reação inflamatória, resistência e densidade de colágeno.

MÉTODOS

A realização do estudo obedeceu à Lei Federal 6.638 e às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea).

Utilizaram-se 60 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, PUC-PR, com idade de 90 dias e peso médio de 250 gramas, devidamente identificados. Os ratos ficaram alojados em grupos de cinco animais em caixas de polipropileno de dimensões padronizadas para a espécie. O ciclo claro/escuro e a umidade do ar foram os próprios do ambiente, e a temperatura variou entre $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Todas as caixas ficaram a igual distância da fonte de luz, e os animais tiveram livre acesso à ração de padrão comercial e à água durante todo o experimento.

Dividiu-se a amostra em dois grupos de 30 animais. Ao primeiro grupo administrou-se, durante 30 dias, dexametasona 0,10mg/kg de peso corporal, por meio de injeções subcutâneas. Ao segundo grupo administrou-se solução salina 0,9% com iguais volume e via de administração do grupo anterior, sendo esse segundo o grupo controle. As injeções foram feitas diariamente e sempre no mesmo horário.

Após 30 dias, sob anestesia obtida por injeção intramuscular de 0,2 ml/kg de uma mistura de 1ml de quetamina e 1ml de xilazina, realizou-se a tricotomia da pele da região dorsal dos animais e anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodo. Fez-se uma incisão de 4cm de comprimento na região dorso-medial de cada animal, que se estendeu em profundidade até a fáscia muscular. Seguiu-se com a síntese da ferida com pontos simples de fio monofilamentar de náilon 4.0 separados entre si por 0,5cm. Recuperados da anestesia, devolveram-se os ratos a suas caixas de origem. No pós-operatório manteve-se a dexametasona ou a solução fisiológica em iguais dosagem e via de administração até o dia da avaliação.

Sortearam-se 10 ratos de cada grupo para eutanásia no terceiro, sétimo e 14º dias do pós-operatório, com dose letal do anestésico. Retirou-se um fragmento de pele com tela subcutânea que continha a cicatriz com margem de 2cm à direita, à esquerda, acima e abaixo, que foi dividido em quatro partes, cada uma de 1cm. O primeiro e o quarto segmentos, correspondentes às extremidades, foram desprezados, tendo-se utilizado os dois segmentos mediais para as avaliações.

Utilizou-se um dos segmentos para a medida da

resistência. Acondicionaram-se os retalhos em frascos com solução fisiológica para manter a umidade e imediatamente após realizaram-se os ensaios em máquina de tração EMIC, no Laboratório de Análises Destrutivas da PUC-PR. Considerou-se força máxima a maior força ou carga aplicada ao corpo de prova, até sua ruptura. Aplicaram-se as forças sempre perpendicularmente à cicatriz, tentando afastar suas bordas, sendo a força medida em newtons.

O outro segmento do retalho, fixado em formolina tamponada a 10%, serviu para o estudo histopatológico, sendo analisado quanto à presença de reação inflamatória e densidade de colágeno. Para isso incluiu-se o retalho em parafina e fizeram-se cortes com quatro micrômetros de espessura, preparando-se duas lâminas de cada peça, cada lâmina com três cortes, que foram submetidos à coloração pelas técnicas do Sirius-red (para avaliação do colágeno) e da hematoxilina-eosina (para avaliação geral do processo cicatricial).

Nos cortes corados pelo Sirius-red, analisados em microscópio de luz polarizada, reconheceu-se o colágeno tipo I, cujas fibras espessas adquirem tonalidades de laranja a vermelho, e o colágeno tipo III, cujas fibras finas e delicadas se coram de tons de verde.¹⁰ Leram-se quatro campos com ampliação de 200 vezes de cada corte e obteve-se uma média.

As imagens captadas por uma câmera Sony[®] CCD 101, transmitidas a um monitor colorido Trinitron Sony[®], congeladas e digitalizadas através de placas oculus TCX, permitiram a análise pelo aplicativo Imagem Plus, 4.0 para Windows em microcomputador da linha Pentium[®].

Nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina analisaram-se a reação inflamatória, sua qualidade e intensidade. A avaliação da qualidade da reação inflamatória se fez pelo tipo de células presentes nos campos examinados. Capturou-se a imagem dos campos escolhidos e neles se identificaram as células inflamatórias presentes. O predomínio de polimorfonucleares caracterizou a reação inflamatória aguda, de mononucleares a reação inflamatória crônica, e, quando não havia predomínio de nenhum desses tipos, caracterizou a reação inflamatória agudo-crônica. A contagem dessas células permitiu quantificar a intensidade da reação. Leram-se três campos em cada corte histológico e, neles, 100 pontos, com aumento de 400 vezes.

Os resultados descritivos do estudo foram expressos por médias e desvios padrões. Para a avaliação do efeito de grupo e do dia de avaliação sobre as variáveis do estudo, foi utilizada a análise de variância (Anova) com dois fatores (grupo e dia de avaliação). Para as comparações múltiplas foi usado o teste LSD, e para avaliação da homogeneidade das

variâncias, o teste de Lèvene. Variáveis que não atingiram os pressupostos necessários ao uso da Anova sofreram previamente uma transformação logarítmica. Nos casos em que houve interação significativa entre os fatores, a análise foi feita dentro de grupos e dentro de dia, considerando-se o teste t de *Student* para a comparação dos grupos e a Anova para a comparação dos dias de avaliação. O nível de significância adotado foi de 0,05.

RESULTADOS

Não houve óbitos durante o experimento.

Nos dados da tensiometria, a análise entre grupo e dia mostrou não haver interação significativa entre esses fatores ($p=0,207$), ou seja, os resultados não dependem de combinações particulares de grupo e dia e podem, portanto, ser analisados de forma conjunta. Observou-se menor resistência à tração nas cicatrizes do grupo experimento nos três momentos estudados ($p=0,008$) (Tabela 1 e Gráfico 1).

A leitura da densidade do colágeno total permitiu verificar que existe interação significativa entre os fatores grupo e dia de avaliação ($p=0,018$). Sendo assim, a análise foi feita considerando grupo e dia de avaliação separadamente. Nos três momentos avaliados a média dos percentuais das áreas ocupadas por colágeno foi maior no grupo controle (terceiro dia $p=0,017$, sétimo dia $p=0,010$ e 14^o dia $p<0,0001$) (Tabela 2).

A análise dos percentuais de área ocupados por colágeno do tipo III mostrou que os resultados não dependem de combinações particulares de grupo e dia ($p=0,126$), e, portanto, foi possível avaliá-los de forma conjunta. Demonstrou-se que existiu diferença significativa entre os grupos controle e experimento, nos três momentos de avaliação ($p<0,0001$), e, dessa forma, pôde-se verificar que havia mais colágeno III no grupo controle nos três tempos avaliados (Tabela 3).

Quando se analisou a densidade de colágeno tipo I, verificou-se que existia interação significativa entre os fatores grupo e dia de avaliação ($p<0,0001$), e, dessa forma, a análise foi feita dois a dois dentro de tempo igual. Verificou-se que não houve diferença entre os grupos no terceiro dia ($p=0,076$) e no sétimo dia ($p=0,200$). Entretanto, no 14^o dia a densidade era maior no grupo controle ($p<0,0001$) (Tabela 4). No gráfico 2 demonstra-se a densidade do colágeno nos três tempos estudados.

A média das células inflamatórias permitiu verificar que elas existiam em menor número no grupo experimento em todos os tempos, porém com significância no terceiro dia ($p=0,001$) e no sétimo dia ($p=0,016$) (Tabela 5 e Gráfico 3).

TABELA1: Tensiometria nos grupos controle e experimento em três tempos estudados (Newtons)

Nº	CONTROLE			EXPERIMENTO		
	3º dia	7º dia	14º dia	3º dia	7º dia	14º dia
1	1,289	5,580	9,990	0,760	4,608	5,765
2	8,600	4,330	4,732	4,001	1,445	3,417
3	2,031	6,078	9,440	1,545	3,488	4,616
4	6,928	5,147	5,602	3,520	5,732	1,339
5	1,457	6,550	6,626	4,370	4,011	5,580
6	2,000	6,002	6,930	4,440	4,278	2,093
7	0,990	3,139	6,708	4,183	3,662	4,267
8	2,134	4,011	7,396	3,305	3,987	5,236
9	2,631	3,836	7,662	1,112	3,093	6,626
10	6,243	3,313	4,110	1,228	5,554	5,754
Média	3,430	4,799	6,920	2,846	3,986	4,469
Desvio padrão	2,741	1,230	1,859	1,503	1,229	1,713
Mínimo	0,990	3,139	4,110	0,760	1,445	1,339
Máximo	8,600	6,550	9,990	4,440	5,732	6,626
Mediana	2,083	4,739	6,819	3,413	3,999	4,926
% desvio padrão	79,9	25,6	26,9	52,8	30,8	38,3

Interação entre grupo e dia: $p=0,207$ (os resultados não dependem de combinações particulares de grupo e dia, e podem ser analisados de forma conjunta).

Grupo $\rightarrow p=0,008$ (existe diferença significativa entre os grupos controle e experimento nos três momentos avaliados)

Momentos de avaliação: $p<0,0001$

3 dias x 7 dias: $p=0,031$

3 dias x 14 dias: $p<0,0001$

7 dias x 14 dias: $p=0,025$

DISCUSSÃO

Pacientes que fazem uso crônico de corticóides, quando submetidos a procedimento cirúrgico, apresentam pele com comportamento distinto dos demais doentes e respondem ao processo regenerativo de forma diferente.

Não é a quantidade de colágeno, mas sua organização espacial, que proporciona resistência à ferida, e após o estabelecimento da cicatriz apenas 80%

da resistência original da pele é recuperada. Em um estudo feito em cicatrizes de dorso de ratos, aos quais foi administrado dexametasona em doses crescentes (0,8, 5, 8 e 16mg/kg/dia) foi demonstrada menor resistência na avaliação feita do 10º dia e dose dependente.¹¹ Em outro, quando administrado 0,5mg/kg/dia de dexametasona a ratos, por período de sete dias, após o qual se fez um ferimento com síntese no dorso desses animais e se avaliou após 14 dias, encontrou-se significativa diminuição da capacidade de suportar tração.¹² Quando utilizada a hidrocortisona, em dose equivalente a 1,5mg/kg de dexametasona, duas doses no pré-operatório com quatro horas e um dia de antecedência, e avaliação com sete e 14 dias, relatou-se perda de 11% da resistência em relação ao grupo controle no sétimo dia ($p<0,01$) e de 29% no 14º dia ($p<0,01$).⁷

Embora os resultados deste estudo não possam ser comparáveis aos dos autores acima citados, uma vez que a administração da dexametasona foi iniciada 30 dias antes de se induzir o processo de cicatrização, pôde-se verificar que a resistência das feridas do grupo controle foi, em todos os momentos, superior à do grupo experimento ($p=0,008$). Entretanto tanto o grupo controle quanto o grupo que recebeu dexametasona mostraram ganho gradativo de resistência. É interessante observar que, no 14º dia, a média de resistência obtida no grupo experimento foi de 4,469N, semelhante à encontrada no

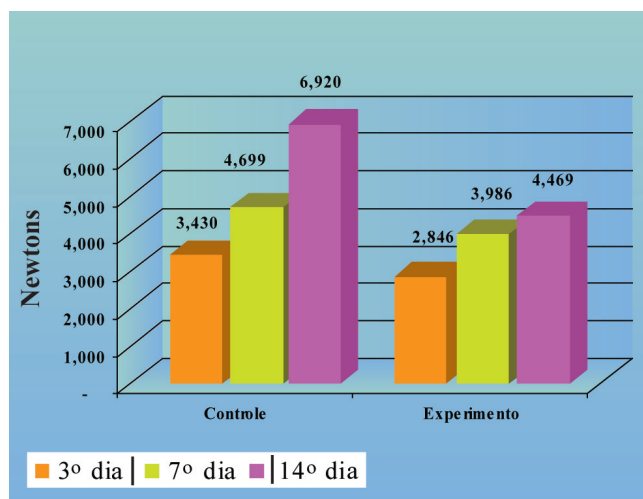


Gráfico 1: Tensiometria em diferentes momentos, nos dois grupos

TABELA 2: Percentuais de colágeno total, obtidos nas leituras de densidade pela coloração do Sirius Red nos dois grupos e em três tempos avaliados

		3° dia		7° dia		14° dia	
		Controle	Experimento	Controle	Experimento	Controle	Experimento
COLÁGENO TOTAL	1	41,26	59,58	68,66	55,26	52,52	55,48
	2	60,91	50,03	67,96	51,06	73,84	48,32
	3	45,05	46,43	59,89	54,42	54,28	41,45
	4	52,23	45,72	55,87	53,95	67,82	40,47
	5	58,64	50,5	55,62	51,19	50,37	43,1
	6	66,71	43,5	59,13	53,9	56,82	39,52
	7	58,63	46,02	60,28	59,53	70,87	42,65
	8	60,95	48,82	63,86	47,71	70,68	49,9
	9	64,61	52,89	53,13	57,85	56,37	47,05
	10	56,51	41,84	65,36	62,26	68,7	40,86
Média	56,55	48,53	60,97	54,71	62,23	44,88	
Desvio padrão	8,16	5,12	5,34	4,3	8,92	5,15	
Mínimo	41,26	41,84	53,13	47,71	50,37	39,52	
Máximo	66,71	59,58	68,66	62,26	73,84	55,48	
Mediana	58,64	47,62	60,08	54,18	62,32	42,87	
% desvio padrão	14,4	10,6	8,8	7,9	14,3	11,5	

Interação entre grupo e dia $p=0,018$ (existe interação entre os grupos e o dia de avaliação – a avaliação deve ser feita dois a dois, em cada um dos momentos)

Controle x experimento no 3° dia $\rightarrow p=0,017$

Controle x experimento no 7° dia $\rightarrow p=0,010$

Controle x experimento no 14° dia $\rightarrow p<0,0001$

Avaliação nos tempos para o grupo controle: $p=0,235$

Avaliação nos tempos para o grupo experimento: $p=0,0004$

- 3 dias x 7 dias: $p=0,009$

- 7 dias x 14 dias: $p=0,105$

- 7 dias x 14 dias: $p=0,0001$ (Esta assim no original)

TABELA 3: Percentuais de colágeno III, obtidos das leituras de densidade pela coloração Sirius Red, nos dois grupos e em três tempos avaliados

		3° dia		7° dia		14° dia	
		Controle	Experimento	Controle	Experimento	Controle	Experimento
COLÁGENO TIPO III	1	23,15	29,00	35,59	26,41	16,76	28,53
	2	44,87	26,88	29,98	25,19	26,87	21,45
	3	29,78	30,21	29,56	21,41	21,96	18,35
	4	27,29	25,33	23,62	18,82	28,27	19,98
	5	40,62	29,03	21,07	20,18	20,23	18,59
	6	43,65	26,09	24,66	20,37	22,54	18,02
	7	44,07	29,86	28,71	28,93	23,83	19,21
	8	46,00	26,62	29,92	20,78	23,04	21,80
	9	48,59	33,07	27,12	25,22	23,16	23,49
	10	39,70	21,19	29,57	29,35	21,24	17,67
Média	38,77	27,73	27,98	23,67	22,79	20,71	
Desvio padrão	8,81	3,26	4,08	3,83	3,23	3,33	
Mínimo	23,15	21,19	21,07	18,82	16,76	17,67	
Máximo	48,59	33,07	35,59	29,35	28,27	28,53	
Mediana	42,13	27,94	29,13	23,3	22,79	19,6	
% desvio padrão	22,7	11,8	14,6	16,2	14,2	16,1	

Interação entre grupo e dia $p=0,126$

Grupo: $p<0,0001$ (existe diferença significativa entre os grupos, nos três tempos de avaliação)

Momentos de avaliação: $p<0,0001$)

3 dias x 7 dias: $p<0,0001$

3 dias x 14 dias: $p<0,0001$

7 dias x 14 dias: $p=0,003$

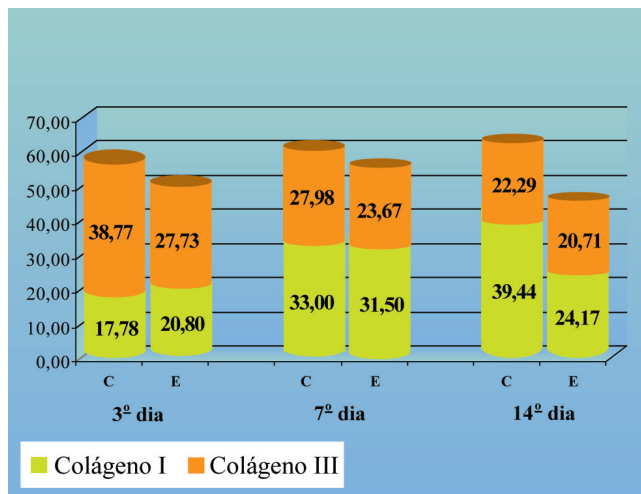


Gráfico 2: Densidade do colágeno em três momentos nos grupos controle (C) e experimento (E)

grupo controle no sétimo dia (4,799N) enquanto no grupo controle no 14º dia foi de 6,920N, ou seja, o grupo experimento precisou do dobro do tempo para alcançar a resistência do grupo controle.

Na literatura constata-se que esse efeito não é

exclusivo na pele, tendo-se relatado perda de resistência em cicatrizes de traquéia de ratos,^{7,13} em anastomoses intestinais de ratos, de coelhos e de cães.¹⁴⁻¹⁶

Sabe-se que os esteróides e os retinóides exercem efeitos antagonísticos sobre os fatores de crescimento e o depósito de colágeno na cicatrização de feridas.¹⁷ Estudo experimental, feito em ratos, demonstrou que os glicocorticóides influenciavam a síntese dos pró-colágenos tipo I e III de maneira semelhante, tanto na pele quanto nos pulmões.¹⁸ Van Story-Lewis e Tenenbaum¹⁹ observaram 43% de redução do gel de colágeno, em culturas de fibroblastos humanos, quando adicionaram a dexametasona às culturas e 80% quando adicionaram o cortisol.

Estudos demonstraram que os corticosteróides, entre eles a dexametasona, diminuíam a síntese do colágeno por redução do DNA e do RNA²⁰ e que fibroblastos, tanto da pele como do pulmão, diminuíam a síntese de RNAm para pro- α 1(I) e pro- α 2(I) α 21-24.

Autio et al.²⁵ observaram a abolição da síntese de colágeno na pele de pacientes tratados com prednisolona. Para eles o uso sistêmico de glicocorticóide

TABELA 4: Percentuais de colágeno I, obtidos das leituras de densidade pela coloração Sirius Red, nos dois grupos e em três tempos avaliados

	3º dia		7º dia		14º dia		
	Controle	Experimento	Controle	Experimento	Controle	Experimento	
COLÁGENO TIPO I	1	18,11	30,58	33,07	28,86	35,77	26,95
	2	16,04	23,15	37,99	25,87	46,97	26,88
	3	15,27	16,22	30,33	33,01	32,32	23,1
	4	24,94	20,39	32,25	35,13	39,56	20,49
	5	18,03	21,47	34,55	31,01	30,14	24,51
	6	23,06	17,41	34,47	33,53	34,29	21,5
	7	14,57	16,16	31,57	30,6	47,05	23,44
	8	14,95	22,2	33,94	26,93	47,64	28,11
	9	16,02	19,82	26,02	32,63	33,22	23,56
	10	16,81	20,65	35,8	32,92	47,46	23,19
Média	17,78	20,8	33	31,05	39,44	24,17	
Desvio padrão	3,51	4,2	3,28	3,01	7,17	2,46	
Mínimo	14,57	16,16	26,02	25,87	30,14	20,49	
Máximo	24,94	30,58	37,99	35,13	47,64	28,11	
Mediana	16,42	20,52	33,5	31,82	37,66	23,5	
% desvio padrão	19,8	20,2	9,9	9,7	18,2	10,2	

Interação entre grupo e dia $p < 0,0001$ (existe interação entre os grupos e o dia de avaliação – a avaliação deve ser feita dois a dois, em cada um dos momentos)

Controle x experimento no 3º dia $\rightarrow p = 0,076$

Controle x experimento no 7º dia $\rightarrow p = 0,200$

Controle x experimento no 14º dia $\rightarrow p < 0,0001$

Momentos de avaliação no grupo controle: $p < 0,0001$ - 3 dias x 7 dias: $p < 0,0001$

- 3 dias x 14 dias: $p < 0,0001$

- 7 dias x 14 dias: $p = 0,027$

Momentos de avaliação no grupo experimento: $p < 0,0001$

- 3 dias x 7 dias: $p < 0,0001$

- 3 dias x 14 dias: $p < 0,013$

- 7 dias x 14 dias: $p = 0,0003$

TABELA 5: Células inflamatórias nas cicatrizes nos grupos controle e experimento, em três tempos estudados

N.	CONTROLE			EXPERIMENTO		
	3º dia	7º dia	14º dia	3º dia	7º dia	14º dia
1	80,67	12	11,67	15,67	8,67	5
2	78,00	15,67	14,33	16,67	16,33	4,33
3	44,67	15,67	5	12	7,67	3,33
4	57,33	6,33	5,00	36,67	6,00	3,33
5	54,67	10,67	3,67	24,00	10,33	8,33
6	14	19	4	9	5	9,33
7	32,33	22	9	13	6	5,33
8	55	10,33	5,67	28	9	4,33
9	41,67	17	3,67	14	9,33	6,33
10	65,33	15,33	9,50	39,33	15,33	6,67
Média	52,4	14,4	7,2	20,8	9,4	5,6
Desvio padrão	20,3	4,6	3,8	10,7	3,8	2
Mínimo	14	6,3	3,7	9	5	3,3
Máximo	80,7	22	14,3	39,3	16,3	9,3
Mediana	54,8	15,5	5,3	16,2	8,8	5,2
% desvio padrão	38,8	32	52,5	51,2	40,6	36

Anova com dois fatores

Interação entre grupo e dia: $p=0,028$ (existe interação entre os grupos e o dia de avaliação – a avaliação deve ser feita dois a dois, em cada um dos momentos)

Controle x experimento no 3º dia $\rightarrow p=0,001$

Controle x experimento no 7º dia $\rightarrow p=0,016$

Controle x experimento no 14º dia $\rightarrow p=0,367$

Momentos de avaliação no grupo controle: $p<0,0001$

- 3 dias x 7 dias: $p<0,0001$

- 3 dias x 14 dias: $p<0,0001$

- 7 dias x 14 dias: $p=0,001$

Momentos de avaliação no grupo experimento: $p<0,0001$

- 3 dias x 7 dias: $p<0,0004$

- 3 dias x 14 dias: $p<0,0001$

- 7 dias x 14 dias: $p=0,013$

des suprimia a síntese dos colágenos tipo I e III na derme, e, assim, sugeriram que isso fosse a causa da atrofia da pele.

A terapia com dexametasona levou à diminui-

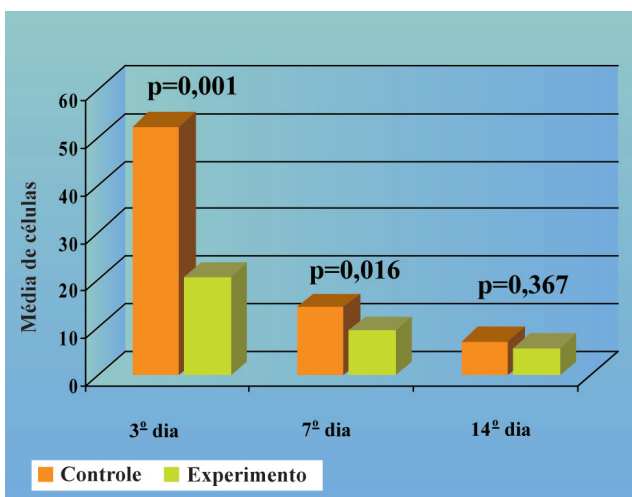


Gráfico 3: Média de células inflamatórias nas cicatrizes, em diferentes momentos, nos grupos controle e experimento

ção do RNAm para $\alpha 1(I)$ e $\alpha 1(III)$ colágenos na pele dos ratos. Essa diminuição baixou os níveis de tropocolágeno para ambos os tipos de colágeno, mais importante sobre o tipo III, sendo os níveis de metaloproteinasas (Timp) e das collagenases também afetados.²⁶ Além disso, a dexametasona inibiu a migração de células durante a cicatrização de feridas, devido à diminuição da expressão do gene alfa-SM actina.²⁷

Como na literatura, no estudo ora apresentado constatou-se significativa redução do colágeno tipo III no grupo experimento. O colágeno tipo I no grupo tratado com dexametasona revelou, nos dois primeiros tempos de avaliação, crescimento de densidade semelhante. No 14º dia, enquanto o grupo controle continuava a aumentar a densidade desse tipo de colágeno, no grupo experimento observou-se diminuição do colágeno tipo I e, em consequência, do colágeno total. Quando avaliados os grupos separadamente, verificou-se que o colágeno tipo III (por ser o colágeno que surge precocemente e, portanto, o tipo mais comum nas cicatrizes imaturas) aparece aumentado no início da avaliação, tanto no grupo

controle quanto no grupo experimento, e vai sofrendo redução, que é estatisticamente significativa. Já o colágeno do tipo I aparece com baixa concentração e vai aumentando gradativamente até o 14º dia. Porém no grupo experimento ocorre queda da concentração, o que não acontece no grupo controle. Isso resulta em alteração no colágeno total, no final do experimento.

A maioria dos autores afirma que a dexametasona diminui a estabilidade dos RNAs mensageiros para pro- α 1(1) e pro- α 2(1), e com isso deveria esperar-se uma curva de queda do colágeno tipo I. Isso foi verificado neste estudo, pois as cicatrizes do grupo controle apresentaram aumento gradativo do colágeno tipo I, e observou-se queda no grupo que recebeu dexametasona. Fassler et al.³ demonstraram que os glicocorticóides influenciavam negativamente a expressão do RNAm para o colágeno tipo I, o que explicaria a queda desse tipo de colágeno neste estudo.

O processo de cicatrização é controlado por uma extensa gama de fatores de crescimento, cujo entendimento não está bem elucidado. Segundo Centrella et al.,²⁸ os glicocorticóides afetam a expressão para os receptores dos TGF- β do tipo I e do tipo II, podendo alterar as respostas celulares a eles ligadas. Há registros de que sob o efeito da dexametasona existe forte baixa no RNAm para o TGF- β 1 e para o TGF- β 2, com diminuição da infiltração de células inflamatórias, da atividade dos neutrófilos e dos macrófagos.⁶ Descreveu-se, ainda, que a dexametasona tem efeito inibidor sobre a secreção de FDGF, fator de crescimento que estimula a proliferação de fibroblastos, e que induz o aparecimento de miofibroblastos.²⁹

Neste estudo verificou-se que a densidade de colágeno total, embora tenha sido sempre maior no grupo controle, foi maior nos tempos iniciais de avaliação devido às altas densidades do colágeno III. Apenas no 14º dia a maior densidade deveu-se ao colágeno tipo I. Esse tipo de colágeno oferece resistência à cicatriz; por isso, nesse tempo, a resistência das cicatrizes foi significativamente maior no grupo

controle.

A redução da reação inflamatória é efeito já classicamente descrito na literatura; tanto, que os corticóides são também conhecidos como antiinflamatórios hormonais. Nguyen e Lim³⁰ mostraram o efeito dos corticóides sobre a função inflamatória em feridas cirúrgicas de ratos, com redução de pelo menos 50% da circulação de células inflamatórias no sítio pós-operatório no primeiro dia, seguido de queda da redução no terceiro e quinto dias. No presente estudo a medida das células inflamatórias esteve diminuída no grupo experimento em todos os momentos da avaliação e significativamente no terceiro e sétimo dias, caracterizando a ação da dexametasona na fase inflamatória da cicatrização. Convertido o número absoluto em percentual, é possível perceber que no terceiro dia, o número de células inflamatórias presentes no grupo experimento corresponde à diminuição de 60,31% em relação ao encontrado nos cortes histológicos do grupo controle. Neste estudo também se observou queda dessa redução no sétimo dia, correspondendo a 34,7% menos no grupo experimento em relação ao grupo controle.

CONCLUSÃO

A análise dos resultados permite concluir que, no rato, o uso prolongado de dexametasona sobre o processo de cicatrização leva: 1) à diminuição da resistência da cicatriz; 2) à baixa densidade do colágeno total em todos os tempos estudados, sendo no início do processo pela baixa densidade do colágeno tipo III e mais tarde pela baixa densidade do colágeno tipo I; e 3) à redução do número de células inflamatórias nos tempos iniciais. □

AGRADECIMENTOS

Aos médicos residentes Gustavo Nogueira e Carlos Alberto Maeda, pela ativa participação na execução prática do estudo e à professora Márcia Olandoski, pelo inestimável trabalho de avaliação estatística.

REFERÊNCIAS

1. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276:75-81.
2. Ehrlich HP, Hunt TK. The effects of cortisone and anabolic steroids on the tensile strength of healing wounds. *Ann Surg*. 1968;167:324-8.
3. Fässler R, Sasaki T, Timpl R, Chu ML, Werner S. Differential regulation of fibulin, tenascin-C, and nidogen expression during wound healing normal and glucocorticoid-treated mice. *Exp Cell Res*. 1996;222:111-6.
4. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR,

- Gramates P, Deuel TF. Transforming growth factor beta reverses the glucocorticoid-induced wound-healing deficit in rats: possible regulation in macrophages by platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86:2229-33.
5. Leibovich SJ, Ross R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*. 1975;78:71-100.
6. Frank S, Madlener M, Werner S. Transforming growth factors beta1, beta2, and beta3 and their receptors are differentially regulated during normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1996;271:10188-93.

7. Gupta A, Jain GK, Raghubir R. A time course study for the development of an immunocompromised wound model, using hydrocortisone. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1999;41:183-7.
8. Cohen IK, Diegelmann RF, Johnson ML. Effect of corticosteroids on collagen synthesis. *Surgery*. 1977;82:15-20.
9. Talas DU, Nayci A, Atis S, Polat A, Comelekoglu U, Bagdatoglu C, et al. The effects of corticosteroids on the healing of tracheal anastomoses in a rat model. *Pharmacol Res*. 2002;45:299-304.
10. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*. 1979;11:447-55.
11. Dostal GH, Gamelli RL. The differential effect of corticosteroids on wound disruption strength in mice. *Arch Surg*. 1990;125:636-40.
12. Haws M, Brown RE, Suchy H, Roth A. Vitamin A-soaked gelfoam sponges and wound healing in ster-oid-treated animals. *Ann Plast Surg*. 1994;32:418-22.
13. Talas DU, Nayci A, Atis S, Comelekoglu U, Polat A, Bagdatoglu C, et al. The effects of corticosteroids and vitamin A on the healing of tracheal anastomoses. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2003;67:109-16.
14. Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW, Zeng H, Dindar H. Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am J Surg*. 1992;163:71-7.
15. Kim CS, Buchmiller TL, Fonkalsrud EW, Phillips JD. The effect of anabolic steroids on ameliorating the adverse effects of chronic corticosteroids on intestinal anastomotic healing in rabbits. *Surg Gynecol Obstet*. 1993;176:73-9.
16. Arantes VN, Okawa RY, da Silva AA, Barbosa AJ, Petroianu A. Effect of methylprednisolone on jejunal anastomotic tension. *Arq Gastroenterol*. 1994;31:97-102.
17. Wicke C, Halliday B, Allen D, Roche NS, Scheuenstuhl H, Spencer MM, et al. Effects of steroids and retinoids on wound healing. *Arch Surg*. 2000;135:1265-70.
18. Shull S, Cutroneo KR. Glucocorticoids coordinately regulate procollagens type I and type III synthesis. *J Biol Chem*. 1983;258:3364-9.
19. Van Story-Lewis PE, Tenenbaum HC. Glucocorticoid inhibition of fibroblast contraction of collagen gels. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:1283-6.
20. Salmela K. Comparison of the effects of methylprednisolone and hydrocortisone on granulation tissue development: a experimental study in rat. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1981;15:87-91.
21. Sterling KM, Harris M, Mitchell J, Dipetrillo T, Delaney G, Cutroneo K. Dexamethasone decreases the amounts of type I procollagen mRNAs in vivo and in fibroblast cell cultures. *J Biol Chem*. 1983;258:7644-7.
22. Igotz RA, Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem*. 1986;261:4337-45.
23. Cockayne D, Sterling KM, Shull S, Mintz KP, Illeyne S, Cutroneo KR. Glucocorticoids decrease the synthesis of type I procollagen mRNAs. *Biochemistry*. 1986;25:3202-9.
24. Cockayne D, Cutroneo KR. Glucocorticoid coordinate regulation of type I procollagen gene expression and procollagen DNA-binding proteins in chick skin fibroblasts. *Biochemistry*. 1988;27:2736-45.
25. Autio P, Oikarinen A, Melkko J, Risteli J, Risteli L. Systemic glucocorticoids decrease the synthesis of type I and typeIII collagen in human skin in vivo, whereas isotretinoin treatment has little effect. *Br J Dermatol*. 1994;131:660-3.
26. Oishi Y, Fu ZW, Ohnuki Y, Kato H, Noguchi T. Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Br J Dermatol*. 2002;147:859-68.
27. Tsai WC, Tang FT, Wong MK, Pang JH. Inhibition of tendon cell migration by dexamethasone is correlated with reduced alpha-smooth muscle actin gene expression: a potential mechanism of delayed tendon healing. *J Orthop Res*. 2003;21:265-71.
28. Centrella M, Casinighino S, Kim J, Pham T, Rosen V, Wozney J, et al. Independent changes in type I and type II receptors for transforming growth factor beta induced by bone morphogenetic protein 2 parallel expression of the osteoblast phenotype. *Mol Cell Biol*. 1995;15:3273-81.
29. Beer HD, Longaker MT, Werner S. Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J Invest Dermatol*. 1997;109:132-8.
30. Nguyen H, Lim J, Dresner ML, Nixon B. Effect of local corticosteroids on early inflammatory function in surgical wound of rats. *J Foot Ankle Surg*. 1998;37:313-8.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões
Rua Ari José Valle, 1987, Santa Felicidade,
82030 000 Curitiba – PR
Telefones: 0XX 41 223.46.37 ou 0XX 41 9991 55.66
E-mail: biondo@avalon.sul.com.br

Como citar este artigo: Tenius FP, Biondo-Simões MLP, Ioshii SO. Efeitos do uso crônico da dexametasona na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *An Bras Dermatol*. 2007;82(2):141-9.