

Morfometria de fibroblastos e fibrócitos durante o processo cicatricial na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco tratados com calêndula

Morphometry of fibroblasts and fibrocytes during wound healing in the skin of rabbits of the New Zeland White breed treated with marigold

Leonardo de Oliveira Pagnano^I Silvana Martínez Baraldi-Artoni^{II} Maria Rita Pacheco^{II}
Edanir dos Santos^{III} Daniela Oliveira^{III} Jeffrey Frederico Lui^{IV}

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade cicatrizante da calêndula (*Calendula officinalis* L.) sobre feridas cutâneas experimentais, em 15 coelhos, distribuídos em três grupos denominados: excipiente, calêndula e controle. Cada animal foi submetido à uma incisão cirúrgica de 6cm de comprimento, lateral à coluna vertebral e suturada no padrão U. Os produtos avaliados foram colocados sobre as incisões durante sete dias na quantidade de 0,1ml (loção cremosa não-iônica – grupo excipiente; tintura de calêndula a 5% - grupo calêndula) e nos animais do grupo controle não se utilizou nenhum produto. A biópsia de pele foi realizada no 1º, 3º, 5º e 7º dia após a incisão cirúrgica para avaliação morfológica do processo cicatricial, analisando-se o número de fibroblastos e fibrócitos. A morfometria foi realizada por meio de microscópio óptico adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens. De acordo com os resultados, a calêndula propiciou obtenção dos maiores valores médios das células envolvidas no processo cicatricial, os fibroblastos, deduzindo que a mesma, inferiu uma resposta mais satisfatória na cicatrização em relação aos demais tratamentos.

Palavras-chave: calêndula, cicatrização, coelhos, fibroblastos, fibrócitos, morfometria.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the scarring capability of marigold (*Calendula officinalis* L.) on experimental skin wounds in 15 rabbits, distributed in three groups: excipient, marigold and control. Each animal was subjected to a surgical incision measuring 6cm in length, laterally to the spinal column and sutured in U-shape. Products evaluated were placed on the incisions for 7 days, at a rate of 0.1ml (nontonic creamy

lotion – excipient group; 5% marigold extract) and no treatment was provided to control animals. Skin biopsy was performed on 1, 3, 5, and 7 days after wounding, for morphometric and cicatricial process evaluations. The morphometry was performed with an optical microscope adapted to a computerized picture analysis system. The results showed that marigold allowed the highest growth rate in cells directly involved in the cicatricial process, the fibroblasts and fibrocytes and can therefore be considered the most satisfactory on the wound healing in comparison to the other treatments.

Key words: marigold, wound healing, rabbits, fibroblasts, fibrocytes, morphometry.

INTRODUÇÃO

A cicatrização é um fenômeno complexo que visa restabelecer a integridade morfológica e funcional de qualquer tecido ou órgão lesado. Ela consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido (MARTIN & LEIBOVICH, 2005).

A cicatrização depende de fatores como tipo de pele, localização anatômica, idade (JULÍA et al., 1992), estados de saúde e nutricional do paciente, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, uso de fármacos sistêmicos e ressecamento do leito da ferida durante a cicatrização (MANDELBAUN et al., 2003). O processo cicatricial é dividido em fases (coagulação, inflamatória,

^IPrograma de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: leopagnano@yahoo.com. Autor para correspondência.

^{II}Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

^{III}FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

^{IV}Departamento de Zootecnia, FCAV, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

proliferativa, epitelização, contração e remodelagem) devido à extrema complexidade e interação de seus eventos. Essas fases são interdependentes e ocorrem simultaneamente (HUNT, 1990).

Os fibroblastos são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese dos componentes da matriz extracelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Os fibroblastos são estimulados a produzir e a depositar componentes da matriz extracelular e, na pele, esses eventos são necessários para permitir e promover a reepitelização (AMADEU et al., 2003). Eles estão sujeitos a mudanças devido às forças mecânicas as quais são submetidos durante situações patológicas ou fisiológicas e, assim, organizam as fibras colágenas e estão diretamente relacionados à formação do tecido de granulação. Além de produzirem colágeno, os fibroblastos produzem elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológicos da célula (HILDEBRAND et al., 2005).

Durante a formação do tecido de granulação, fibroblastos e células endoteliais proliferam e se movem para o interior da ferida, produzindo matriz extracelular e angiogênese (SINGER & CLARK, 1999). Muitos fibroblastos adquirem alguns aspectos morfológicos e bioquímicos de células musculares lisas, onde essas modificações darão origem aos miofibroblastos (DESMOULIÈRE & GABBIANI, 1996). Os miofibroblastos participam na síntese da matriz extracelular e na produção de força mecânica, com influência na reorganização da matriz e na contração da ferida (TOMASEK et al., 2002) e, segundo GABBIANI (2003), sua atividade contrátil é responsável pelo fechamento das feridas após as lesões, processo conhecido como contração da ferida.

Os fibrócitos são fibroblastos inativos cuja atividade celular é a fibrose (BANKS, 1992). Eles são considerados importantes no processo cicatricial por contribuírem no mecanismo de formação do granuloma, na atividade antigênica, na produção de colágeno e na matriz protéica, participação na remodelagem e na inflamação como fonte rica de citocinas (ABE et al., 2001; QUAN, 2004), na produção de fatores de crescimento, na produção de fatores angiogênicos, na contribuição na formação de novos vasos sanguíneos e em algumas desordens fibróticas (METZ, 2002; QUAN, 2004).

Durante a cicatrização, os fibrócitos podem ser recrutados do tecido adjacente não-lesado revertendo-se para o estado de fibroblasto e reativando sua capacidade de síntese (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Os fibrócitos podem ser encontrados em vários tecidos, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (BUCALA et al., 1994).

Eles são derivados de precursores da medula óssea e contribuem para a presença de miofibroblastos no tecido cicatricial (MORI et al., 2005).

A fitoterapia consiste no conjunto de técnicas pela utilização de vegetais no tratamento de doenças, com vantagem de ser de fácil manipulação e baixo custo (MARTINS et al., 1998).

As flores liguladas da *Calendula officinalis* L. são utilizadas em fórmulas terapêuticas e em cosméticos na forma de tintura de calêndula. Essas flores apresentam principalmente saponinas, triterpenos álcoois e ésteres de ácidos graxos, carotenóides, flavonóides, cumarinas, hidrocarbonetos e ácidos graxos (HAMBURGUER et al., 2003). Propriedades medicinais vêm sendo atribuídas às flores da planta, entre as quais, as ações colerética, antiinflamatória, analgésica, antitumoral, bactericida, diurética, cicatrizante, sedativa e imunomoduladora (BROWN & DATTNER, 1998).

Com base na complexidade do processo cicatricial, e tendo em vista as propriedades cicatrizantes de muitas plantas que compõem a biota do território brasileiro, este trabalho foi realizado para avaliar a capacidade da calêndula (*Calendula officinalis* L.) em atrair fibroblastos e fibrócitos para feridas cutâneas experimentais em coelhos da raça Nova Zelândia Branco.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 15 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, machos, com 120 dias de idade e pesos individuais de aproximadamente dois quilogramas, distribuídos em três grupos de cinco animais, denominados: excipiente, calêndula e controle. Eles foram mantidos em gaiolas separadas, situadas em galpão semi-fechado, com ração e água *ad libitum*. Para a produção das feridas cirúrgicas os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60mg kg⁻¹) e cloridrato de xilazinab (5mg kg⁻¹), via intramuscular. Posteriormente procedeu-se à tricotomia e anti-sepsia com álcool iodado a 10% na região dorso-cervical, onde efetuou-se uma incisão cirúrgica longitudinal de 6cm de comprimento em cada animal, lateral à coluna vertebral. A sutura foi feita por meio de dois pontos interrompidos no padrão U (colchoeiro), em cada incisão, espaçando-se um centímetro para cada ponto, com fio de náilon 2-0.

Os produtos a serem testados foram topicamente administrados sobre as incisões, diariamente no período vespertino de sete dias, na quantidade de 0,1ml para cada incisão (loção cremosa não iônica – grupo excipiente; tintura de calêndula a

5% - grupo calêndula) e nos animais do grupo controle não se aplicou nenhum produto. Os produtos foram manipulados no Laboratório de Farmacologia da FCAV – UNESP – Jaboticabal a partir de flores de calêndula (tintura de calêndula a 5% + loção cremosa não iônica q.s.p. 100gr) e loção cremosa não iônica.

A biópsia de pele foi realizada no 1º, 3º, 5º e 7º dia após a incisão, com os animais submetidos à tranqüilização com acepromazinac (0,1mg kg⁻¹) via intramuscular e o material foi obtido distante do fio de sutura, por meio de *punch* de seis milímetros de diâmetro sobre a ferida cirúrgica para avaliação morfométrica mediante a contagem de fibroblastos e fibrócitos e estudo do processo cicatricial.

Para a avaliação morfométrica, os fragmentos da biópsia foram fixados em solução de Bouin por 24 horas e processados, rotineiramente, para a inclusão em paraplast. Após a microtomia semi-seriada (à intervalos de 55µm), os cortes histológicos com espessura de 5µm foram corados pela técnica da Hematoxilina-eosina (BEHMER et al., 1976). Foram colocados dez cortes histológicos por lâmina de cada tratamento, que, por meio de um microscópio óptico adaptado a um sistema computadorizado de análise de imagens, obtidas através do analisador de imagens Image Pró-Plusd, obteve-se uma imagem por cada corte, aleatoriamente, com área de 2.342.016µm². Posteriormente, foram identificados e quantificados os fibroblastos e os fibrócitos de cada tratamento.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos (controle, calêndula e excipiente) e cinco repetições, com medidas repetidas no mesmo animal ao 1º, 3º, 5º e 7º dia após tratamento. O efeito de dias foi comparado no geral (*split-plot in time*) e por tratamento.

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade realizados com o programa estatístico Statistical Analysis of Systems “SAS” (1999).

Tabela 1 - Valores médios do número de fibroblastos presentes na derme de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, em função do dia de tratamento e do fitoterápico.

Dia	Excipiente	Calêndula	Controle
1º	11,02±0,79 c	10,96±0,63 c	10,08±5,16 c
3º	24,4±7,89 b	19,5±4,75 c	20,56±4,54 c
5º	34,6±5,85 ab	50,7±10,98 b	40,08±10,0 b
7º	37,28±5,62 a C	74,46±10,45 a A	60,3±9,23 a B

Letras maiúsculas indicam diferença entre os tratamentos (P<0,05).

Letras minúsculas indicam diferença entre os dias de tratamento (P<0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos neste estudo para os fibroblastos e os fibrócitos, quando do uso de *Calêndula officinalis L.*, na pele de coelhos da raça Nova Zelândia Branco, demonstraram, no 7º dia, valores médios significativamente maiores para fibroblastos (74,46), enquanto que para os fibrócitos os valores médios obtidos foram maiores para os animais tratados com calêndula (14,46), porém, não significativos (Tabelas 1 e 2 e Figuras 1 e 2). Analisando os efeitos de cada tratamento, nos diferentes dias de experimento (Tabelas 1 e 2), observou-se que a calêndula e o grupo controle demonstraram valores médios maiores a partir do 5º dia (P<0,05) em relação ao 1º e 3º dia, todavia menores que o 7º dia (P<0,05).

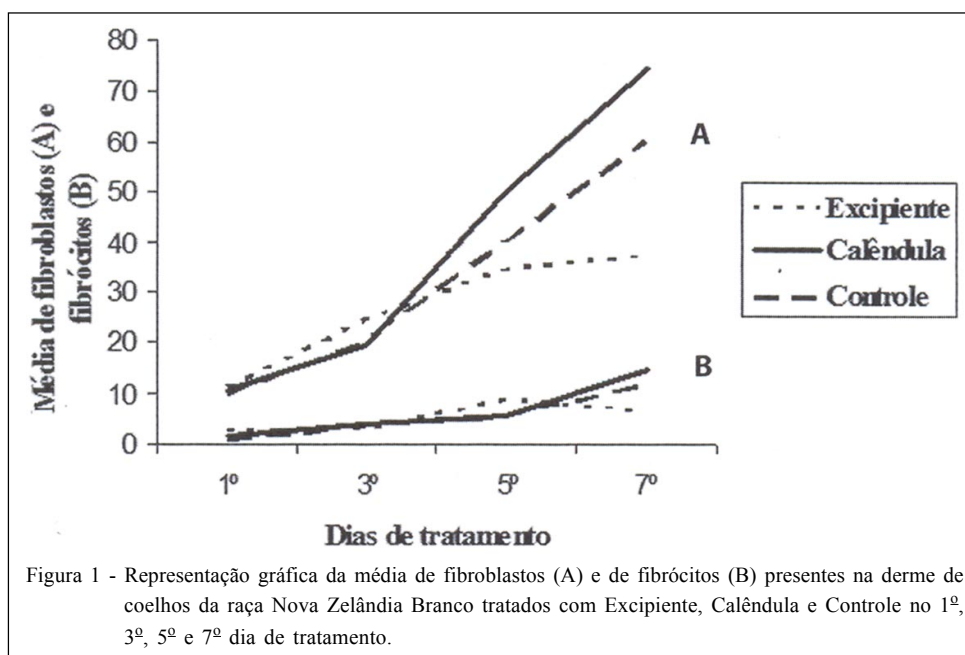
Os valores médios obtidos neste estudo para fibroblastos, células que, segundo YOUNG & HEATH (2000) e JUNQUEIRA & CARNEIRO (2004), têm por principal função a manutenção da integridade dos tecidos conjuntivos, pela síntese de componentes da matriz extracelular, e, conforme HILDEBRAND et al. (2005), participam da composição do tecido de granulação, os resultados aqui observados demonstraram, no 7º dia, os maiores valores médios para estas células (Tabela 1). Este achado se assemelha aos relatos de KLOUCHEK-POPOVA et al. (1982), ao concluírem, mediante biópsias no 10º dia, que a associação de *Calêndula officinalis L.* e a alantoína estimularam a epitelização e a regeneração fisiológica da pele de ratos. Outrossim, corrobora as evidências de NETO et al. (1996), ao comprovarem uma cicatrização mais rápida com o uso de *Calêndula officinalis L.* e *Stryphnodendron barbatiman* (barbatimão), nas lesões ulcerativas e por queimaduras da pele de humanos.

Ao utilizarem calêndula no tratamento de pacientes que apresentavam úlceras venosas, DURAN et al. (2005) comprovaram uma aceleração na cicatrização das mesmas, assemelhando-se aos resultados obtidos no presente experimento em que se observou maior fibroplasia nos animais tratados com calêndula.

Tabela 2 - Valores médios do número de fibrócitos presentes na derme de coelhos Nova Zelândia Branco em função do dia de tratamento e do fitoterápico.

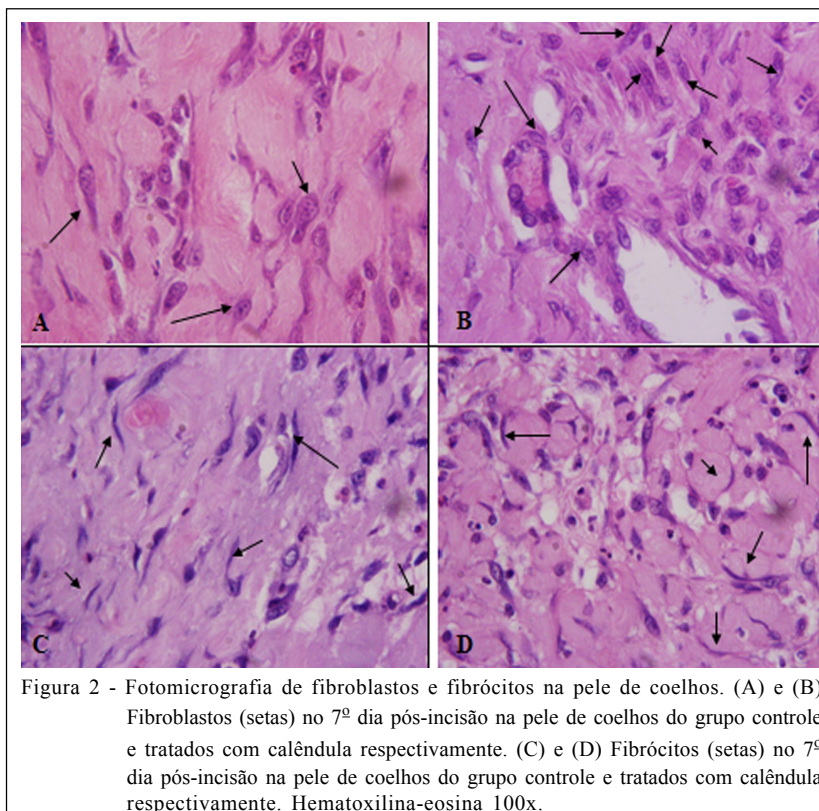
Dia	Excipiente	Calêndula	Controle
1º	2,64±1,22 b	1,82±0,75 b	0,88±0,6 c
3º	2,96±0,49 b	4,16±0,97 b	3,6±1,39 bc
5º	8,76±2,81 a	5,76 ±1,19b	5,6±1,75 b
7º	6,26±2,98 ab	14,46±7,63 a	11,86±3,47 a

Letras minúsculas indicam diferença entre os dias de tratamento (P<0,05).



Os fibroblastos exercem profundos efeitos na proliferação e na diferenciação dos queratinócitos (essenciais na reepitelização) e também na deposição de proteínas. Somente na presença dos fibroblastos é que a diferenciação epidermal e a deposição de laminina

5, colágeno tipo IV e VII, ocorrem e, por isso, tem um papel fundamental no processo cicatricial (EL GHALBZOURI et al., 2002), levando a entender que a utilização da calêndula no atual experimento contribuiu no processo cicatricial.



CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e com os resultados obtidos, é lícito concluir que os valores médios das células envolvidas diretamente no processo cicatricial, nos fibroblastos e fibrócitos dos animais tratados com calêndula são significativamente maiores em relação aos demais grupos, podendo-se deduzir que a calêndula infere uma resposta mais satisfatória na fibroplasia e, por conseqüentemente, na cicatrização da pele de coelhos em relação aos demais.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^aKetamin-S (+) – Cristália, bRompun® - Bayer, cAcepran 1% - Univet, dImage Propuls – Cybernetics – CA-USA

COMITÊ DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

Os procedimentos adotados neste experimento estavam de acordo às normas exigidas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV – UNESP – Jaboticabal.

REFERÊNCIAS

- ABE, R. et al. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. **J Immunol**, v.166, n.12, p.7556-7562, 2001.
- AMADEU, T.P. et al. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. **Int J Low Extrem Wounds**, v.2, n.2, p.60-68, 2003.
- BANKS, W.J. **Histologia veterinária aplicada**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. 629p.
- BEHMER, O.A. et al. **Manual de técnicas para histologia: normal e patológica**. São Paulo: Edart/Edusp, 1976. 240p.
- BROWN, D.J.; DATTNER, A. Phytoterapeutic approaches to common dermatologic conditions. **Arch Dermatol**, v.134, n.11, p.1401-1404, 1998.
- BUCALA, R. et al. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. **Mol Med**, v.1, n.1, p.71-81, 1994.
- DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. In: CLARK, R.A.F. (Editor). **The molecular and cellular biology of wound repair**. New York: Plenum, 1996. p.391-423.
- DURAN, V. et al. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. **Int J Tissue React**, v.27, n.3, p.101-106, 2005.
- EL-GHALBZOURI, A. et al. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. **Cell Tissue Res**, v.310, n.2, p.189-199, 2002.
- GABBIANI, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. **J Pathol**, v.200, n.4, p.500-503, 2003.
- HAMBURGER, M. et al. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). **Fitoterapia**, Milano, v.74, n.4, p.328-338, 2003.
- HILDEBRAND, K.A. et al. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. **Sports Med Arthrosc**, v.13, n.3, p.136-144, 2005.
- HUNT, T.K. Basics principles of wound healing. **J Trauma**, Baltimore, v.30, suppl.12, p.122-128, 1990.
- JULÍA, V. et al. Características de la cicatrización de las heridas en el período fetal. **Cir Pediatr**, v.5, n.3, p.117-121, 1992.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica – texto/atlas**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- KLOUCHEK-POPOVA, E. et al. Influence of the physiological regeneration and epithelialization using fractions from *Calendula officinalis*. **Acta Physiol Pharmacol Bulg**, Sofia, v.8, n.4, p.63-67, 1982.
- MANDELBAUM, S.H. et al. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte I. **An Bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410, 2003.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v.20, n.20, p.599-607, 2005.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 220p.
- METZ, C.N. Fibrocytes: a unique cell population implicated in wound healing. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.7, p.1342-1350, 2002.
- MORI, L. et al. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. **Exp Cell Res**, v.304, n.1, p.81-90, 2005.
- NETO, J. et al. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbatiman* (VELLOZO) Martius. **Rev Ciênc Farm**, v.17, p.181-186, 1996.
- QUAN, T.E. et al. Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood. **Int J Biochem Cell Biol**, v.36, n.4, p.598-606, 2004.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**, v.341, n.10, p.738-746, 1999.
- STATISTIC ANALYSIS SYSTEM. **SAS STAT. version 8.8**: SAS System. Cary, 1999. 1 CD-Rom
- TOMASEK, J.J. et al. Myofibroblast and mechano-regulation of connective tissue remodeling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.3, n.5, p.349-363, 2002.
- YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Wheater histologia funcional**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 415p.