

EFEITO DA CICLOSPORINA SOBRE O PROCESSO DE REPARO EM TECIDO CUTÂNEO DE RATO. ESTUDO MORFOLÓGICO E ESTEREOMÉTRICO

Luis Carlos SPOLIDÓRIO*
Mario Roberto VIZIOLI**
Oslei Paes de ALMEIDA**

- RESUMO: O processo de reparo de feridas, em tecido mole, pode ser modificado por fatores sistêmicos ou locais, que aceleram ou retardam o seu desenvolvimento. Deste ponto de vista, vários fármacos imunossupressores têm sido considerados como de mais alta importância, destacando-se entre eles a azatioprina e os esteróides, os quais inibem a cicatrização de feridas. A ciclosporina é um dos imunossupressores mais recentes e mais usados na clínica médica, particularmente em transplantes de órgãos. Nesse experimento estudou-se o efeito dessa droga sobre o processo de reparo, por meio do estudo morfológico e estereométrico. Ratos machos pesando em média 220 gramas, receberam por via subcutânea, 10 mg/kg de ciclosporina de peso corporal/dia, durante 30 dias, e o grupo controle recebeu solução salina em igual volume e período. Os resultados mostraram que a ciclosporina influenciou de maneira positiva o processo de reparo, acelerando a cicatrização.
- PALAVRAS-CHAVE: Ciclosporina; tecido de granulação; cicatrização de feridas.

Introdução

A ciclosporina é um polipeptídeo cíclico contendo 11 aminoácidos, de fórmula C₆₂H₁₁₁O₁₂, que começou a ser desenvolvida na década de 1970, a partir dos fungos *Trichoderma polysporum* e *cylindrocarpo lucidum*, possuindo peso molecular 1202.6.¹⁴ A ciclosporina é largamente utilizada na profilaxia e tratamento da rejeição de órgãos em transplantes alogênicos.^{6,8,18}

Atualmente, a ciclosporina é também utilizada no tratamento de doenças auto-imunes como o pênfigo vulgar e bolhoso,³ líquen plano oral,⁹ síndrome de Behcet,¹⁶ lupus eritematoso sistêmico,¹¹ diabete Tipo I,¹⁹ artrite reumatóide,¹⁵ psoríase,¹⁰ Alopecia areata,¹⁷ micoses fungoides,¹² doença de Crohn's,² esquistossomose,⁷ e malária,²⁰.

* Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

** Departamento de Patologia – Faculdade de Odontologia – UNICAMP – 13414-018 – Piracicaba – SP.

Entretanto, o papel da ciclosporina no processo de reparo ainda é controverso, sendo poucos os trabalhos relacionados a este aspecto.

O objetivo deste trabalho é estudar o efeito da ciclosporina sobre o processo de reparo de feridas experimentais em tecido mole de ratos, por meio da microscopia de luz transmitida comum e da estereometria.

Material e método

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar), adultos, machos, pesando em média 220 g, provenientes do Biotério Central da Unicamp, alimentados com ração e água *ad libitum*, distribuídos em 10 grupos, sendo 5 grupos de 5 animais tratados com ciclosporina e 5 grupos de 3 animais controle, injetados com NaCl a 0,9%. A ciclosporina, recebida em ampolas para infusão intravenosa, com concentração de 50 mg/ml (Sandoz), foi diluída, na proporção de 1:4 em solução salina a 0,9% obtendo-se uma concentração final de 10 mg/ml. Foi administrada na concentração de 10 mg/kg/dia via subcutânea.²⁵

Depois de 24 horas da primeira dose de ciclosporina, todos os animais foram anestesiados com éter etílico, tricotomizados na região dorsal e, com o auxílio de bisturi nº 15, pinça e tesoura de ponta reta, foi feita uma abertura na pele de aproximadamente 0,5 cm de comprimento por 0,5 cm de largura, preservando o tecido muscular subjacente. Durante todo o período experimental, os animais do grupo experimental receberam intraperitonealmente ciclosporina e os animais do grupo controle, NaCl a 0,9% em igual volume. Os animais foram sacrificados nos períodos de 4, 10, 17 e 30 dias após a incisão na pele. A área tecidual de reparação foi retirada e fixada em formol a 10% durante 48 horas. Os cortes histológicos (6 µm de espessura) foram corados com hematoxilina/eosina.

Esteriométrica

Foram utilizados para a análise estereométrica cortes histológicos do tecido de reparo de 5 animais por grupo experimental e 3 animais por grupo tratado. Os cortes de 6 µm dos tecidos de reparo, corados com H/E foram submetidos a uma análise estereométrica para a determinação da densidade volumétrica ($\mu\text{m}^3 \times \mu\text{m}^3$) dos fibroblastos, fibras colágenas. Foi utilizada uma ocular KpL 10x com retículo de integração Zeiss de 25 pontos e objetiva de imersão. A contagem dos pontos coincidentes sobre cada figura histológica a serem contadas foi realizada, analisando cinco cortes do tecido de reparo de cada animal em todos os grupos estudados, em quatro diferentes campos por corte (100 pontos), contando-se um total de 500 pontos por animal. Os dados registrados foram totalizados para posteriormente se obter a densidade volumétrica, a qual foi calculada dividindo-se o número total de pontos coincidentes sobre cada estrutura a ser avaliada (Pi) pelo número total de pontos contados (P = 400)

e multiplicando-se por 25.000, que é a medida do volume correspondente ao ponto da ocular reticulada,¹³ como ilustrado na fórmula abaixo:

$$Vv = \frac{P_i}{P = 400} \times 25.000$$

Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, cujo nível de significância adotado foi o de 5%.

Resultado

Processo de reparo do tecido cutâneo de ratos normais tratados com ciclossporina

4 dias

Controle

A ferida cirúrgica apresenta-se recoberta por tecido necrótico e, subjacente à zona necrótica, observa-se tecido de granulação incipiente, composto principalmente por células fibroblásticas dispostas desordenadamente, vasos sanguíneos neoformados e áreas hemorrágicas (Figura 1).

Experimental

A ferida cirúrgica apresenta-se recoberta por tecido necrótico, em menor volume que o grupo controle e, subjacente a este, observa-se tecido de granulação incipiente, formado por fibroblastos dispostos desordenadamente, capilares sanguíneos neoformados (Figura 2).

10 dias

Controle

O tecido de reparo está recoberto por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, o tecido de granulação apresenta-se com grande quantidade de fibroblastos, capilares sanguíneos neoformados e fibras colágenas que se dispõem paralelamente à superfície (Figura 3).

Experimental

A área da ferida é menor do que a do controle; anexos da pele já começaram a invadir o tecido de granulação, que está intensamente fibrosado, denotando o amadurecimento do tecido (Figura 4).

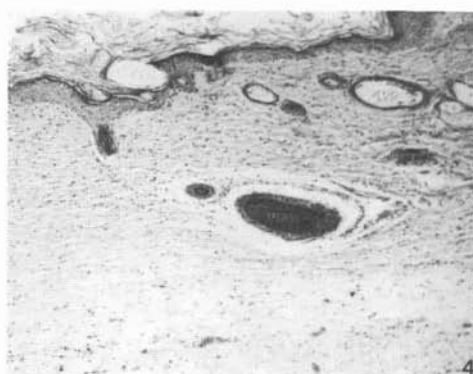


FIGURA 1 - Grupo controle - 4 dias. Notar tecido de granulação incipiente, recoberto por tecido necrótico. H/E 25x.

FIGURA 2 - Grupo tratado - 4 dias. Notar tecido de granulação mais evoluído, com diminuição evidente da zona necrótica. H/E 25x.

FIGURA 3 - Grupo controle - 10 dias. Notar área do tecido de granulação bastante celularizado, recoberto por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. H/E 25x.

FIGURA 4 - Grupo tratado - 10 dias. Notar a diminuição da celularidade do tecido de granulação e maior concentração de fibras colágenas na formação de anexos da pele. H/E 25x.

17 dias

Controle

A área da ferida cirúrgica é recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao epitélio observa-se acentuado fibrosamento do tecido de granulação, com os feixes de colágeno ordenados paralelamente ao epitélio, mas a população fibroblástica continua grande (Figura 5).

Experimental

A área da ferida cirúrgica é recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. O tecido de granulação está mais fibrosado que o do grupo controle, ainda com grande número de fibroblastos, e apresentando anexos da pele é mais contraído que o controle (Figura 6).

30 dias

Controle

A ferida apresenta-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao tecido epitelial, apresentam-se fibras colágenas densas e compactas e reduzida população fibroblástica (Figura 7).

Experimental

A ferida apresenta-se recoberta por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. Subjacente ao tecido epitelial, não há distinção entre o local da formação do tecido de granulação e o tecido normal, denotando um amadurecimento maior que o do grupo controle (Figura 8).

Esteriométria

A análise estereométrica dos tecidos de granulação (Tabela 1) mostrou que a população de fibroblastos do grupo controle foi mais acentuada nos períodos de 4 a 10 dias, decrescendo progressivamente nos períodos subsequentes. Comportamento semelhante tiveram os animais do grupo experimental, porém, a densidade volumétrica das fibras colágenas, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental, foi menor nos primeiros períodos analisados (4 e 10 dias), aumentando progressivamente até o 30º dia.

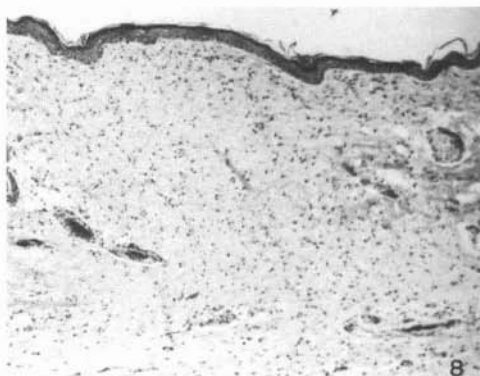
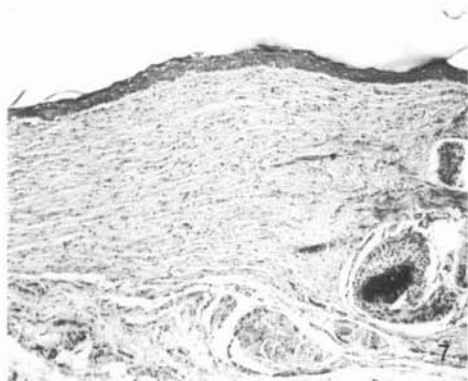
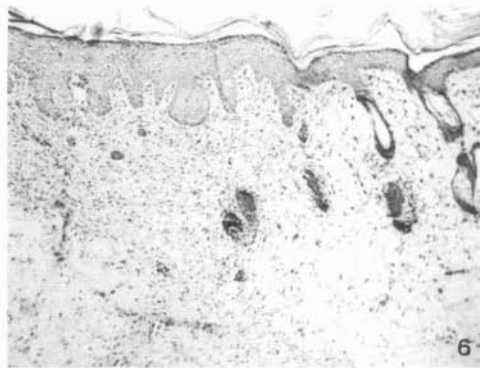
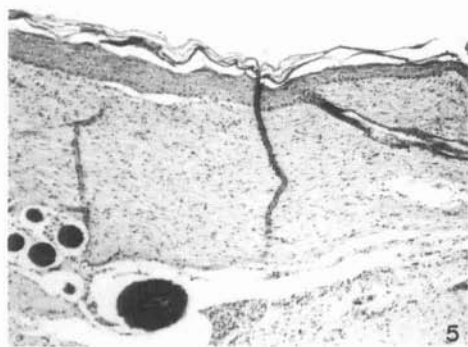


FIGURA 5 – Grupo controle – 17 dias. Notar que o tecido de granulação está mais fibrosado e compacto que o período anterior. H/E 25x.

FIGURA 6 – Grupo tratado – 17 dias. Notar que o tecido de granulação está mais contraído que o controle, e a invasão de anexos da pele. H/E 25x.

FIGURA 7 – Grupo controle – 30 dias. Amadurecimento do tecido de granulação altamente fibrosado. H/E 25x.

FIGURA 8 – Grupo tratado – 30 dias. Notar a semelhança entre o local da formação do tecido de granulação e o tecido normal, e a formação de anexos da pele. H/E 25x.

A análise de variância das médias de fibroblastos e fibras colágenas ao nível de 5%, entre os grupos controle e experimental, revelaram diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 17 e 30 dias; onde a população de fibroblastos decresceu mais intensamente no grupo experimental em relação ao grupo controle, a densidade de fibras colágenas foi maior nos períodos de 17 e 30 dias no grupo experimental em relação ao grupo controle no mesmo período, denotando um amadurecimento maior do tecido de granulação dos ratos tratados com ciclosporina.

Tabela 1 – Médias da densidade volumétrica ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$) de fibroblastos (F), fibras colágenas (FC) de ratos controles e experimental em diversos períodos de tempo (dias)

Dias	Controle		Experimental	
	F	FC	F	FC
4 (N = 5)	6109 ± 1673	3891 ± 810	6321 ± 1300	3679 ± 815
10 (N = 5)	4900 ± 586	5100 ± 1900	4720 ± 1100	5280 ± 1100
17 (N = 5)	3800 ± 914	6200 ± 1850*	2700 ± 945	7300 ± 1900*
30 (N = 5)	1900 ± 418	8100 ± 1800°	1280 ± 310	8720 ± 1105°

*, °. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle no mesmo período (P < 0,05).

Discussão

O desenvolvimento do tecido de granulação, em condições normais, inicia-se ao redor do quarto dia após a abertura da ferida, por meio da substituição do coágulo primitivo pela proliferação e diferenciação dos fibroblastos e células endoteliais, situação essa que permanece até ao redor do 20º dia. A partir de então, a fase proliferativa propriamente dita chega ao final, estabelecendo-se a organização e maturação do tecido. Por volta do 21º dia, a população celular, principalmente os fibroblastos, sofre marcada redução, enquanto as fibras colágenas aumentam em número.^{22,23}

Com relação ao efeito da ciclosporina, a análise morfológica do tecido de granulação indicou que a formação desse tecido iniciou-se ao redor do quarto dia após a abertura da ferida.

É importante salientar que, desde os primeiros períodos estudados, o desenvolvimento do tecido de granulação dos animais do grupo tratado com ciclosporina mostrou-se mais acentuado, traduzido pela menor área de tecido necrótico nas feridas dos animais no período de 4 dias, em comparação aos aspectos exibidos pelos animais do grupo controle.

Por volta do décimo dia, o tecido de granulação do grupo tratado mostrou maior retração que o correspondente do grupo controle, o que denota maior maturação.

A análise estereométrica ressaltou as observações morfológicas, uma vez que o tecido de granulação do grupo experimental mostrou maior densidade de fibras colágenas, principalmente nos períodos de 17 e 30 dias, denotando maior fibrosamento do tecido e, conseqüentemente, maior maturação, resultados esses semelhantes aos achados de Bartold et al.⁵

Esses resultados podem estar relacionados diretamente com o mecanismo de ação da ciclosporina, apesar deste não estar ainda completamente esclarecido. Parece que a ciclosporina bloqueia a produção de interleucina 2 e interleucina 1 e interferon.^{6,21} A inibição dessas linfocinas levaria a uma supressão das células T e, indiretamente, explica a probabilidade de inibição de outras células inflamatórias como as células B e macrófagos.

A seqüência de eventos inflamatórios mediados pelas linfocinas pode ser interrompida pela ciclosporina, abreviando a resposta inflamatória crônica,⁵ aumentando-se o interesse em relação ao papel da ativação de células T no desenvolvimento das lesões inflamatórias, por essas células estarem direta ou indiretamente estimulando a proliferação de fibroblastos e/ou estimulando a biossíntese de colágeno.¹

Nos períodos de 17 e 30 dias, os tecidos dos grupos tratados com ciclosporina tiveram maturação no tecido de granulação mais rápida, devido à maior deposição de fibras colágenas, em relação ao grupo controle.

Essas alterações podem ser reflexo do possível desequilíbrio ou perda do controle do delicado balanço entre deposição e degradação de colágeno ou, ainda, a ciclosporina pode também influenciar de maneira direta a síntese de colágeno pelos fibroblastos.^{4, 24}

A metodologia utilizada não esclareceu detalhadamente o mecanismo do estímulo cicatricial dado pela ciclosporina, certamente que outras avaliações poderão ser feitas para melhor compreensão desses resultados, como: estudo em cultura de fibroblastos e mesmo análise bioquímica da colagenase e gelatinase nesses processos.

Conclusão

Baseados nos resultados de nossas observações, parece-nos lícito concluir que:

- o processo de reparo em tecidos moles dos ratos Wistar responde ao tratamento com 10 mg/kg/dia de ciclosporina;
- o processo de reparo em tecidos moles sofre remodelação progressiva acelerando o processo de cicatrização.

Agradecimentos

Aos funcionários Artur Mendonça e Maria da Glória Vieira Celli, que auxiliaram na obtenção das biópsias e confecção das lâminas, e a Herminia Bassi Maio, pelo auxílio no preparo do manuscrito.

SPOLIDÓRIO, L. C., VIZIOLI, M. R., ALMEIDA, O. P. de. Effect of cyclosporin-A on wound healing of the skin the rats. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.25, n.2, p.309-318, 1996.

- **ABSTRACT:** *The cellular immune response plays an important role in inflammatory reaction in the wound healing process. Cyclosporin is a new immunosuppressive agent used in organ transplantation. In this work it was studied its effects on the wound healing process, by the use of light microscopy and estereometric analysis. Male rats weighting 220 g in average received intraperitoneally a dose of 10 mg/kg cyclosporin/day during 30 days. The control group received saline solution in equal volume and period. The results showed that cyclosporin caused an acceleration in the healing process in the treated animals.*
- **KEYWORDS:** *Cyclosporine; granulation tissue; wound healing.*

Referências bibliográficas

- 1 ALLEN, J. B. et al. The role of the thymus in Streptococcal cell wall – induced arthritis and hepatic granuloma formation: comparative studies of pathology and cell wall distribution in athymic and euthymic rats. *J. Clin. Invest.*, v.76, p.1042-56, 1985.
- 2 ALLISON, M. C., POWNDER, R. E. Cyclosporin for Crohn's disease. *Lancet*, v.1, p.902-3, 1984.
- 3 BARTHELEMY, H. et al. Treatment of nine cases of penphigus vulgaris with cyclosporine. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.18, p. 851-4, 1983.
- 4 ARTOLD, P. M. Cyclosporine and gingival overgrowth. *J. Oral Pathol.*, v.16, p.463-8, 1987.
- 5 BARTOLD, P. M., HAY, S., VERNON ROBERTS, B. Effect of cyclosporine A on connective tissue deposition in experimental inflammatory lesions. *Matrix*, v.9, p.293-300,1989.
- 6 BOREL, J. P. Basic science summary. In: KAHAN, B. *Cyclosporine: nature of the agent and its immunologic actions*. New York: Grune & Stratton, 1988. p.722-30.
- 7 BUEDING, E., HAWKINS, J., CHA, Y. N. Antischistosomal effect of cyclosporin A. *Agents Action*, v.11, p. 380-3, 1981.
- 8 CALNE, R. Y. et al. Cyclosporin-A in clinical organ grafting. *Transplant. Proc.*, v.13, p.349-58, 1984.
- 9 EISEN, D. et al. Effect of topical cyclosporine rinse on oral liquen planus – a double blind analysis. *N. Engl. J. Med.*, v.2, p. 290-4, 1990.
- 10 ELLIS, C. N. et al. Cyclosporine improves psoriasis in a double – blind study. *J. Am. Med. Assoc.*, v.256, p.3110-6, 1986.
- 11 FEUTREN, G. et al. The effects of cyclosporine in patients with systemic lupus. *Transplant Proc.*, v.18, p. 643-4, 1986.
- 12 JENSEN, J. H. et al. Cyclosporin a therapy for mycosis fungoides. *Arch. Dermatol.*, v.123, p. 160-3, 1987.
- 13 MANDARIN-DE-LACERDA, C. A. *Manual de quantificação morfológica: morfometria, alometria, esterilogia*. 2.ed. Rio de Janeiro: CEBIO, 1994. 83p.

- 14 MILPIED, B. La cyclosporine in dermatologie. *Ann. Dermatol. Venereol.*, v.115, p.391-7, 1988.
- 15 MULLER, W., HERRMANN, B. Cyclosporin A for psoriasis. *N. Engl. J. Med.*, v.301, p.555, 1979.
- 16 NUSSENBLATT, R. B. et al. Effectiveness of cyclosporin therapy for Behcet's disease. *Arthritis Rheum.*, v.28, p.671-9, 1985.
- 17 PARODI, A., REBORA, A. Topical cyclosporin in Alopecia areata. *Arch. Dermatol.*, v.123, p.165-6, 1987.
- 18 STARZL, T. E. et al. The use of cyclosporin A and prednisone in cadaver Kidney transplantation. *Surg. Gynecol. Obstet.*, v.151, p.17-26, 1980.
- 19 STILLER, C. R. et al. Cyclosporine for treatment of early type I diabetes: preliminary results. *N. Engl. J. Med.*, v.308, p.1226-7, 1983.
- 20 THOMMEN, S. K. Antimalarial activity of cyclosporin A. *Agents Actions*, v.11, p.770-3, 1981.
- 21 TOWPIK, E., KUPIEC-WEGLINSKI, J. W., TILNEY, N. L. The potential use of cyclosporine in reconstructive surgery. *Reconstr. J.*, v.76, p.312-8, 1985.
- 22 VIZIOLI, M. R. Dynamics of fibrillar components in rat sponge induced granulation tissue. *Acta Anat.*, v.85, p.368-77, 1973.
- 23 VIZIOLI, M. R. *Relação entre fosfomono esterases e a síntese de colágeno e mucopolissacarídeo ácido no tecido de granulação*. Piracicaba, 1975. 64p. Tese (Livre-Docência em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas.
- 24 ZEBROWSKI, E. J., SINGER, D. L., BRUNKA, J. R. Cyclosporin-A, nifedipine and phenytoin: Comparative effects on gingival fibroblasts metabolism. *J. Dent. Res.*, v.65. p.331, 1986. (Abstract 1456).
- 25 WASSEF, R., COHEN, Z., LANGER, B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation*, v.40, p. 489-93, 1985.