

Viabilidade do uso do gel de silicone na prevenção de cicatrizes hipertróficas em ratos Wistar

Viability of silicone gel use in the prevention of hypertrophic scars in rats Wistar

Isabella Maria Oliveira Miranzi^{1*}, José Maurício da Rocha Júnior^{1,2}, Dulcídio de Barros Moreira Junior¹, Benito André Silveira Miranzi^{3,4}, Almir José Silveira Miranzi^{4,5}, Michelle Oliveira Nina Rocha¹, Guilherme Nascimento Cunha^{1,6}

RESUMO

Introdução: a cicatrização de feridas é um processo dinâmico, sendo que alterações na fase de maturação podem determinar cicatrizes hipertróficas. **Objetivo:** analisar microscopicamente o processo cicatricial com uso diário do gel de silicone em ratos. **Métodos:** foram utilizados 15 ratos Wistar, machos, adultos jovens com peso médio de 250 ± 10 g, procedentes do Biotério do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), os quais foram distribuídos randômica e igualitariamente em três grupos, contendo cinco ratos/grupo avaliados em diferentes tempos de tratamento com gel de silicone: G1: biopsia após um mês; G2: biopsia após dois meses; G3, biopsia após três meses de tratamento. Todos os animais apresentavam duas incisões no dorso, sendo a incisão cranial a Ferida Teste (FT) a qual recebeu o gel de silicone, e a incisão caudal, Ferida Controle (FC), sem intervenção. As lâminas histológicas das biopsias foram coradas com hematoxilina e eosina e tricrômico de Masson. **Resultados:** ao cotejar as FT com as FC nos grupos G1, G2 e G3, foi possível observar para as FT o predomínio de fibras com aspecto delgado e entrelaçado, bem como redução significativa ($p < 0,05$) no número de fibras colágenas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) para formação neovascular entre FT e FC, porém, para as FT houve uma redução significativa entre os grupos. **Conclusão:** o uso do gel de silicone reduziu o número de fibras colágenas e organizou-as de forma delgada e entrelaçada nas feridas, proporcionando, desta maneira, um processo cicatricial mais controlado, diminuindo a formação de cicatrizes esteticamente desfavoráveis.

Palavras-chave: Ratos Wistar. Cicatriz Hipertrófica. Géis de silicone. Cicatrização.

¹ Centro Universitário de Patos de Minas.

² Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Faculdade São Leopoldo.

⁴ Universidade de Uberaba.

⁵ Universidade Camilo Castelo Branco (Unicastelo).

⁶ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP.

Instituição:

Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM).

* Autor Correspondente:

Isabella Maria Oliveira Miranzi

E-mail: isabellamiranzi@gmail.com

Recebido em: 22/08/2019.

Aprovado em: 10/05/2020.

ABSTRACT

Introduction: Wound healing is a dynamic process and changes in the maturation phase may determine hypertrophic scars. **Object:** analyze microscopically the cicatricial process with daily use of the silicone gel. **Methods:** Fifteen male rats Wistar line, young adults with a middle-weight of $250 \pm 10\text{g}$, were obtained from the University Center of Patos de Minas (UNIPAM). The animals were distributed randomly and equally in three groups, with five rats / group evaluated at different times of treatment with silicone gel: G1: biopsy after one month; G2: biopsy after two months; G3, biopsy after three months of treatment. All animals had two incisions on the back, the cranial incision being the Test Wound (FT), which received the silicone gel, and the caudal incision, Control Wound (FC), without intervention. Histological biopsy slides were stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome. **Results:** comparing Wounds Test with Wounds Control in the G1, G2 and G3 groups it was possible to observe for Wounds Tests, high proportion of fibers with thin and interlaced appearance, and a significant reduction ($p < 0.05$) in the number of collagen fibers. There was no significant difference ($p > 0.05$) for neovascular formation between Wounds Test and Wound Control, but for Wounds Test there was a significant reduction between groups. **Conclusion:** the use of silicone gel reduced the number of collagen fibers and organized in a thin and interlaced in the wounds, therefore providing a more controlled cicatricial process, consequently reducing the formation of unfavorable aesthetically scars.

Keywords: Rats, Wistar . Silicone Gels. Cicatrix, Hypertrophic. Wound Healing.

INTRODUÇÃO

É crescente a utilização de substâncias com o intuito de acelerar e melhorar esteticamente a cicatrização de feridas cirúrgicas e, em razão disso, estas têm sido objeto de muitas pesquisas. O tipo ideal de cicatrização é a regeneração tecidual, que consiste na restauração da arquitetura pré-existente, com ausência de formação de cicatriz, no entanto, só é observado no desenvolvimento embrionário, em organismos inferiores ou em determinados tecidos, tais como ossos e fígado¹. Trata-se de um processo dinâmico que inclui vários níveis de organização temporal ou sequencial e funcional, envolvendo a interação entre células e sistemas mensageiros². Didaticamente, é dividida nas fases inflamatória, proliferativa e de maturação.

Ressalte-se que é nesta última etapa do processo de cicatrização, denominada maturação, que ocorre o fator determinante para a formação de alterações esteticamente desfavoráveis, tais como as cicatrizes hipertróficas e queloides. Estas se formam devido à resposta exacerbada do tecido conjuntivo cutâneo aos ferimentos na epiderme, com produção aumentada de todos os componentes da matriz extracelular e, geralmente, se apresentam na superfície

do corpo com maior tensão na pele. Este fenômeno se desenvolve entre a sexta e a oitava semana após o término da epitelização, incidindo com maior frequência nas etnias não brancas e nos jovens³.

Faveret e Cunha⁴ pesquisaram o silicone, demonstrando benefícios do seu uso em diversos ensaios clínicos quando comparado a um placebo, porém, estas análises foram altamente suscetíveis a vieses e apresentavam evidências fracas. Mesmo assim, de acordo com Metsavaht⁵, as últimas diretrizes para o tratamento de cicatrizes defendem o uso da terapia com silicone para prevenção e tratamento de primeira linha para queloides e cicatrizes hipertróficas.

Diante desse contexto, o presente estudo objetivou analisar microscopicamente o processo cicatricial com uso diário do gel de silicone, substância recomendada para prevenir e tratar cicatrizações disfuncionais.

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado no Biotério do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM), Patos de Minas, MG. Foram utilizados 15 (quinze) ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, machos, adultos jovens com

peso médio de 250 ± 10 g, os quais foram mantidos em mini isoladores de polisulfona, com capacidade máxima de até cinco animais/caixa, acoplados em racks ventilada alocadas em salas climatizadas, à temperatura de 21°C e um ciclo de luz-escuro de 12 horas, com sistema de exaustão e insuflação de ar com sistema de pressão positiva, tendo os animais livre acesso a ração industrial própria para ratos, cama de maravalha *pinus* e água potável *ad libitum*.

Foi feita a distribuição randômica e igualitária dos animais em três grupos, contendo cinco ratos/grupo conforme o tempo de tratamento com o gel de silicone: G1: biópsia após um mês; G2: biópsia após dois meses e G3: biópsia após três meses de tratamento.

Foram realizadas duas incisões no dorso dos animais, sendo que a mais cranial, denominada Ferida Teste, recebeu tratamento com o gel de silicone (FT), ao passo que a caudal, denominada Ferida Controle, não recebeu nenhuma intervenção (FC). Assim, os animais de cada grupo pertenceram tanto ao grupo teste quanto ao grupo controle.

Para a realização das incisões, os animais foram submetidos à anestesia dissociativa, utilizando a associação cetamina e xilazina na dose de 70 mg/kg e 10 mg/kg associados ao midazolam, na dose de 2 mg/kg, todos por via intraperitoneal. Após a anestesia, estes foram posicionados em decúbito ventral e submetidos à tricotomia na região dorsal, desde o espaço entre as escápulas até o final das costelas. Em seguida, foi feita a antisepsia de todo campo cirúrgico utilizando polivinilpirrolidona-iodo (PVP-I) a 10%.

As áreas das incisões circulares foram demarcadas na região dorsal dos animais utilizando um *punch* metálico de biópsia de 8 mm de diâmetro, o qual foi introduzido em dois locais na linha mediana torácica dorsal, sendo uma no terço proximal e outra no terço médio. Após a demarcação, foram realizadas duas incisões circulares nas áreas delimitadas, transpassando a pele e o subcutâneo, utilizando-se bisturi nº 3. A Ferida Teste (FT) foi realizada na incisão cranial, e a Ferida Controle (FC) na caudal (Figura 1).

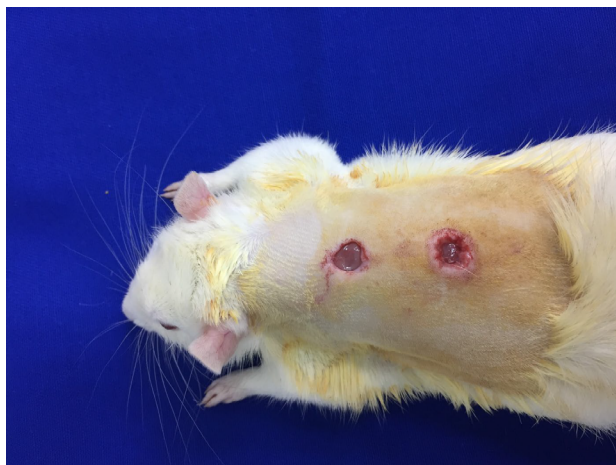


Figura 1. Incisão teste localizada mais cranial e controle sentida mais caudal em ratos Wistar. Fonte: autoria própria.

Referente ao pós-operatório, os animais foram tratados com dipirona sódica, na dose de 300 mg/kg, por via subcutânea (SC), a cada 12 horas nos três primeiros dias. Do primeiro ao sexto dia pós-cirúrgico foi realizado o curativo tópico somente com solução de cloreto de sódio à 0,9% em ambas as feridas de cada animal. No sétimo dia

do ato cirúrgico (após epitelização) a FT foi tratada com gel de silicone uma vez ao dia, enquanto na FC não foi feita nenhuma intervenção.

Para análise histológica, foi realizada a biópsia da área total das feridas, sendo que os fragmentos foram fixados em solução tamponada de formaldeído a 10%, devidamente identificada quanto ao grupo da ferida. Posteriormente, foram enviados ao laboratório de Patologia do Centro Clínico Veterinário do UNIPAM, onde foram confeccionadas as lâminas histológicas.

Na preparação das lâminas supra mencionadas, os fragmentos de pele biopsados foram preparados e submetidos a cortes histológicos de 5 μm . Em seguida, foram fixados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina-eosina (HE), para avaliação global dos cortes de tecido, e pelo tricrômico de Masson (TM), para avaliar as fibras colágenas.

Foi utilizada a microscopia de luz na objetiva de 100x para análise das lâminas coradas com HE e TM. Ressalte-se que as lâminas coradas com HE foram avaliadas quanto à presença de células inflamatórias e epitelização, sendo que a presença de células inflamatórias foi classificada conforme o Quadro 1⁶.

Quanto à classificação da epitelização, foi descrita como presente (+), quando a área de cicatriz apresentava formação de epitélio, e ausente (-), quando a área de cicatriz apresentava-se sem epitélio.

No tocante à avaliação das lâminas coradas em TM, foram analisadas em 10 campos selecionados aleatoriamente na área de cicatriz quanto aos seguintes aspectos do processo cicatricial: formação vascular, proliferação fibroblástica e colagenização tecidual. Para a formação vascular e para colagenização foram feitas as médias do número de vasos e do número de fibras colágenas contados em 10 campos, ao passo que a classificação quanto à organização das fibras colágenas foi feita conforme o Quadro 1⁶.

Para análise estatística das variáveis quantitativas (quantidade de fibras colágenas e neovascularização) foram aplicados os testes normalidade (Lilliefors) e homogeneidade (Bartlett) determinando distribuição homeocedástica, permitindo a aplicação o teste ANOVA dois critérios e *post hoc* Tukey para verificar a diferença entre as médias. Para as comparações qualitativas, por sua vez, foi aplicado o teste Exato de Fisher.

Ressalte-se que os softwares utilizados para análise estatística foram o Excel e o Action Stat.

Por fim, o nível de significância foi de $\alpha=5\%$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao avaliar histologicamente os tecidos biopsados, observou-se que o infiltrado inflamatório foi intenso em G1, sendo semelhante tanto nas FT como nas FC, sem diferença significativa ($p>0.05$). Em G2, denota-se diferença significativa ($p=0,0079$), verificando-se ausência de células inflamatórias para as FT, enquanto para as FC foi possível observar grau leve a moderado de inflamação. Em relação a G3, não houve diferença significativa ($p>0.05$), pois todas as FT apresentaram ausência de células inflamatórias, ao passo que as FC apresentaram padrão semelhante, diferindo apenas em um animal deste grupo, que apresentou grau leve de inflamação (Tabela 1). Estes resultados demonstram que a fase inflamatória do processo cicatricial das FT apresentou menor período de evolução em relação às FC, reduzindo o tempo de recrutamento de células inflamatórias, situação que, quando prolongada, pode corroborar para o retardo na formação de fibras colágenas⁷.

Quadro 1. Classificação microscópica quanto à presença de células inflamatórias e quanto à organização das fibras colágenas.

Células Inflamatórias	
Ausente (0/+++)	Não foram encontradas células inflamatórias na área da lesão.
Leve (+/+++)	As células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituíram menos de 10% da população na área da lesão.
Moderada (++/+++)	As células inflamatórias, independentemente do seu fenótipo, constituíram entre 10-50% da população celular na área da lesão.
Grave (+++/+++)	As células inflamatórias, independentemente de seu fenótipo, constituíram mais que 50% da população celular na área da lesão.
Fibras Colágenas	
Escassa (+1)	As fibras exibiam disposição entrelaçada de aparência delgada e delicada disposta em toda a extensão da ferida.
Moderada (+2)	As fibras exibiam disposição entrelaçada de aparência delgada e delicada na superfície da lesão, mas espessa e grosseira na região central.
Intensa (+3)	As fibras exibiam disposição entrelaçada e/ou paralela com aparência espessa e grosseira.

Fonte: Anjos (2010) (6).

Tabela 1. Frequências absoluta (n) e relativa (%) em relação à presença e ausência de inflamação para as Feridas Teste e Controle nos grupos G1 (após 1 mês), G2 (após 2 meses) e G3 (após 3 meses) em ratos Wistar, Patos de Minas, MG, 2018.

Grupos	G1				G2				G3			
	Teste		Controle		Teste		Controle		Teste		Controle	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Ausente	0	00	0	00	5	100	0	00	5	100	4	80
Leve	4	80	4	80	0	0	4	80	0	000	1	20
Moderada	1	20	1	20	0	0	1	20	0	000	0	00
Grave	0	00	0	00	0	0	0	00	0	000	0	00

Fonte: autoria própria.

Referente à epitelização, esta mostrou-se presente em todas as lâminas analisadas nos grupos G1, G2 e G3, de maneira semelhante nos grupos Teste e Controle. O resultado encontrado corrobora como processo cicatrização normal em que a epitelização deve ser observada desde o final da fase inflamatória, podendo se estender até três meses após a injúria, acompanhando a reorganização e maturação das fibras colágenas que podem conferir o retorno de até 80% da elasticidade da pele ao final deste processo^{8,9,10}.

Quanto à neovascularização (Tabela 2), foi possível observar que todos os grupos apresentaram redução da quantidade de novos vasos nos tecidos avaliados em G1, G2 e G3. Ao comparar a FT com a FC nos grupos G1, G2 e G3 (Tabela 2) não se

observou diferença significativa ($p>0,05$). Porém, houve uma redução significativa do número de formação neovascular ao longo do tempo para as FT em todos os grupos. Estes resultados refletem a mesma situação encontrada no processo fisiológico de cicatrização, com redução gradual e controlada da formação neovascular, que é de extrema importância para a produção das fibras colágenas, garantindo um bom processo cicatricial^{11,12}. Em relação às FC em G1 e G2, não demonstraram redução significativa na neoformação, porém, em G3 foi possível observar redução significativa ($p<0,05$). Estes resultados demonstram maior período de recrutamento de novos vasos, compatível com uma fase de crescimento tecidual, na qual é necessário aumento do número de vasos para nutrir e oxigenar os tecidos¹³.

Tabela 2. Resultados do teste ANOVA e post hoc Tukey, média e desvio padrão, para quantidade de neovascularização e fibras colágenas, teste e controle dos grupos G1, G2 e G3 em ratos Wistar, Patos de Minas, MG, 2018.

Neovascularização			
Ferida	G1	G4	G3
Teste	1.8 (1.37)Aa	1.14 (1.07)Ab	0.34 (0.66)Ac
Controle	1.26 (1.37)Aa	1.02 (0.96)Aa	0.50 (0.71)Ab
Fibras colágenas			
Ferida	G1	G4	G3
Teste	18.5 (3.9)Aa	21 (4.1)Aa	19.1 (4.2) Aa
Controle	27.1 (4.2)Ba	28.1 (5.1)Ba	25.4 (4.3)Bb

Fonte: autoria própria.

No tocante à organização das fibras colágenas, notou-se predomínio da disposição entrelaçada, aparência delgada e delicada (escassa) nas FT dos grupos G1 e G2, Figura 2 e Figura 3. Semelhante à pele e a cicatriz sem anormalidades que apresentam conformação entrelaçada, conferindo maior resistência à ferida, diferente da cicatriz hipertrófica que apresenta fibras com disposição em paralelo¹⁴. Para o grupo G3, as fibras apresentaram-se com aparência delgada e entrelaçada na superfície, mas espessas e grosseiras na região central da lesão (moderada), Figura 4. Este tipo de organização é favorável à formação de cicatriz de menor diâmetro, pois na fase de maturação ocorre maior contração da ferida quando as fibras colágenas apresentam maior diâmetro¹².

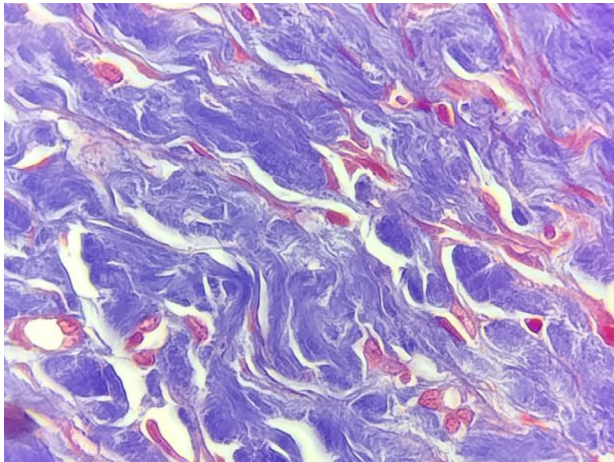


Figura 2. Fotomicrografias da ferida (G1-Ferida Teste) na objetiva de 100x, coradas com Tricrômico de Masson com fibras colágenas (bandas transversais) entrelaçadas e delgadas, classificação escassa. Fonte: autoria própria.

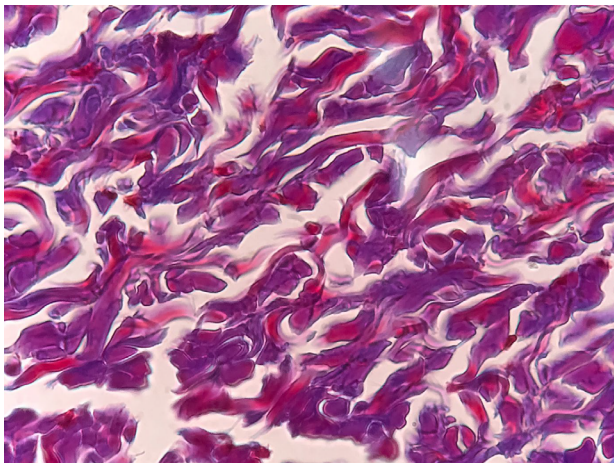


Figura 3. Fotomicrografias da ferida (G2-Ferida Teste) na objetiva de 100x, coradas com Tricrômico de Masson fibras colágenas (bandas transversais) mais espessas na região central da ferida, classificação moderada.

Desta maneira é possível inferir que as FT apresentaram, ao longo do tempo, um aumento da espessura das suas fibras e alteração da conformidade de paralelas para entrelaçadas. Apenas ao comparar as FT e FC do grupo G3, nota-se diferença significativa ($p=0,0472$), determinando maior organização das fibras nas FT. Neste sentido, constata-se que os grupos G1 e G2 seguiram ao mesmo padrão de organização

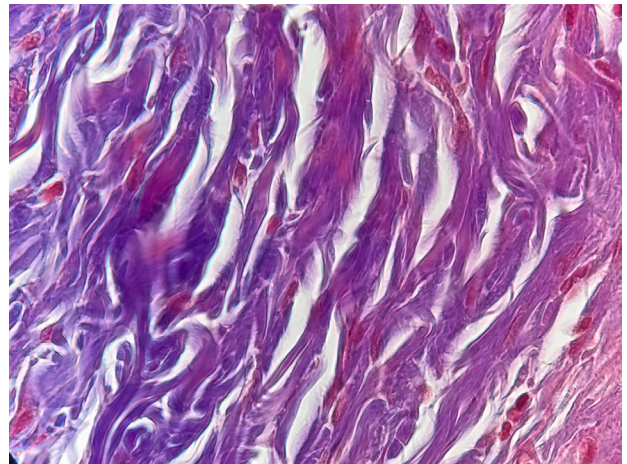


Figura 4. Fotomicrografias da ferida (G3-Ferida Teste) na objetiva de 100x, coradas com Tricrômico de Masson fibras colágenas (bandas transversais) mais espessas na região central da ferida, classificação moderada. Fonte: autoria própria.

para as FT e FC, enquanto que as FT em G3 apresentaram fibras colágenas com aspecto e organização mais próximo da cicatriz sem anormalidade e com maior resistência^{14,15}.

Portanto, para as FC, apesar da alteração da organização das fibras em G1, G2 e G3, não houve diferença significativa em relação à organização das fibras ($p=0,1423$), ou seja, estas seguiram um padrão ao longo do tempo. O aspecto microscópico dos achados para as FC em G1, G2 e G3 podem ser observados na Figura 5, Figura 6 e Figura 7, respectivamente.

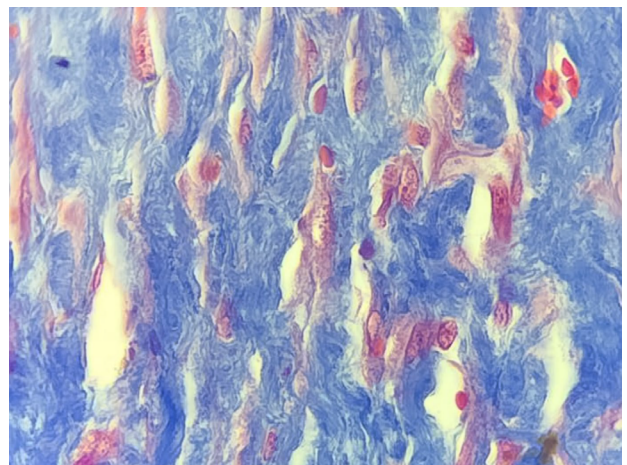


Figura 5. Fotomicrografias da ferida (G1-Ferida Controle) na objetiva de 100x, coradas com Tricrômico de Masson Fibras colágenas (bandas transversais) delgadas, classificação escassa. Fonte: autoria própria.

Por fim, com relação à determinação da quantidade de fibras colágenas, percebe-se diferença significativa ($p<0,05$) (Tabela 2), haja vista que houve redução no número de fibras ao longo do tempo, porém, não houve diferença significativa ($p>0,05$). Este achado é compatível com o processo fisiológico de remodelamento das fibras colágenas, no qual ocorre um equilíbrio entre a produção e destruição destas¹. Para as FC dos grupos G1, G2 e G3 identifica-se redução significativa ($p<0,05$) da contagem das fibras em G3, enquanto em G1 e G2 não apresentam diferença significativa ($p>0,05$). Esta redução após três meses do início da cicatrização reflete a

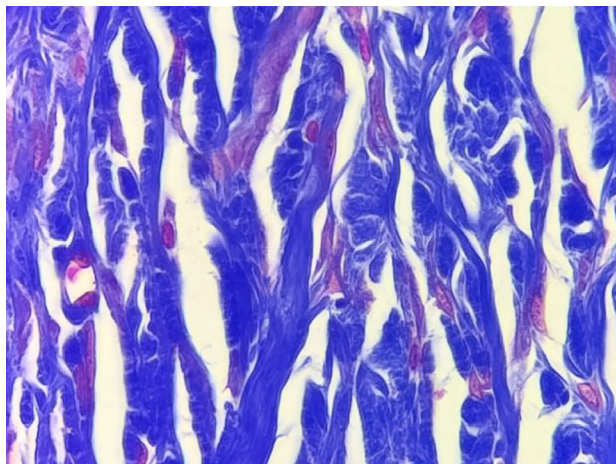


Figura 6. Fotomicrografias da ferida (G2-Ferida Controle) na objetiva de 100x, coradas com Tricrômico de Masson. Fibras colágenas (bandas transversais) delgadas, classificação escassa. Fonte: autoria própria.

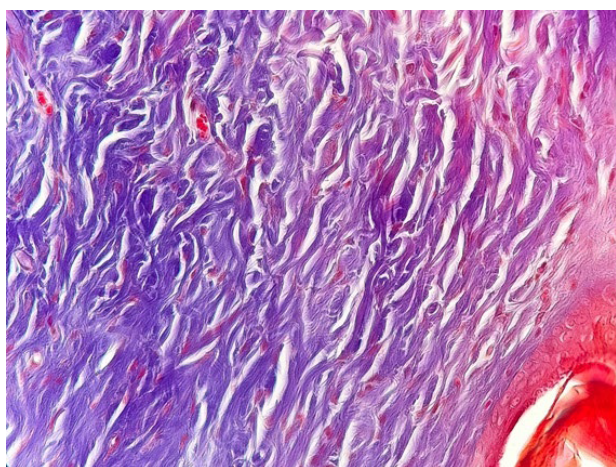


Figura 7. Fotomicrografias da ferida (G3-Ferida Controle) na objetiva de 100x, coradas com Tricrômico de Masson. Fibras colágenas (bandas transversais) paralelas e grosseiras, classificação intensa. Fonte: autoria própria.

fase de remodelamento, que ocorre diminuição da produção de fibras colágenas e aumento da resistência da ferida¹². Ao comparar as FT e FC em G1, G2 e G3, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na redução do número de fibras colágenas nas feridas que receberam tratamento com gel de silicone. Assim sendo, é possível afirmar que há diminuição dos riscos de hiperproliferação fibroblástica e de falhas na fase de remodelamento, proporcionando a formação de uma cicatriz mais estética^{16,17}.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso do gel de silicone reduziu o número de fibras colágenas e organizou-as de forma delgada e entrelaçada nas feridas proporcionando assim, um processo cicatricial mais controlado, e consequentemente, diminuindo a formação de cicatrizes esteticamente desfavoráveis.

REFERÊNCIAS

1. Tazima MFGS, Vicente YAMVA, Moriya T. Biologia da ferida e cicatrização. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2008; 41(3): 259-264.
2. Laureano A, Rodrigues AM. Cicatrização de feridas. Revista da Sociedade Portuguesa de dermatologia e Venoreologia. 2011; 69 (3):355-365.
3. Hochman B, Ishizuka CK, Ferreira LM, Oliveira LQR, Locali RF. Disfunções cicatriciais hiperproliferativas: cicatriz hipertrófica. UNIFESP-EPM. 2004. 2(4): 33-39.
4. Faveret PLS, Cunha KSG. Condutas atuais na prevenção da hipertrofia cicatricial pós-operatória. Revista Brasileira de Cirurgia Plástica. 2015; 30(4): 638-648.
5. Metsavaht LD. Abordagem cirúrgica de cicatrizes. Revista Surgical And Cosmetic Dermatology. 2016; 1: 11-20.
6. Anjos DCS. Efeito do laser, $\lambda 904$ nm, na cicatrização por 1ª intenção no modelo experimental em ratos. 2010. [dissertação]. Núcleo de Pós-Graduação em Medicina, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2010.
7. Dealey C. Cuidando de feridas: um guia para enfermeiras. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
8. Beldon P. Basic science of wound healing. Surgery. 2010; 28(9): 409-12. Irion GL. Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
9. Santos JS. Estudo morfológico e morfométrico do processo de cicatrização em ratos Wistar adultos tratados com creme de óleo de rosa mosqueta. 2016. 61 f. [dissertação]. Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
10. Williamson D, Harding K. Wound healing. Medicine. 2004; 32(12): 4-7.
11. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas 2005; 1: 27-51.
12. Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. Revista medica de São Paulo. 2010; 69(¾):125-131.
13. Xue M, Jackson CJ. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. Advances in Wound Care, New Rochelle. 2015; 4(3).
14. Hollinsky C, Sandberg S. Measurement of the tensile strength of the ventral abdominal wall in comparison with scar tissue. Clin. Biomech. 2007; 22: 88-92.
15. Rosin NL, Agabalyan N, Olsen K, Martufi G, Gabriel V, Biernaskie J, Di martino ES. Collagen structural alterations contribute to stiffening of tissue after split-thickness skin grafting. Wound Repair Regen. 2016; 24:263-274.
16. Irion G. Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005; 390 p.
17. Ferreira CM, D'assumpção EA. Cicatrizes hipertróficas e queloides. Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica. 2006; 21(1): 40-48.