

CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO

**EFEITOS DO USO TÓPICO DO METRONIDAZOL EM
FERIDAS COM CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA
INTENÇÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

CURITIBA

2009

CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO

**EFEITOS DO USO TÓPICO DO METRONIDAZOL EM
FERIDAS COM CICATRIZAÇÃO POR SEGUNDA
INTENÇÃO EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões
Coordenador: Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

CURITIBA

2009

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas- SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

Sampaio. Cláudia Paraguaçu Pupo
S192e Efeitos do uso tópico do metronidazol em feridas com cicatrização
2009 por segunda intenção em ratos/ Cláudia Paraguaçu Pupo Sampaio;
orientadora, Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões.-2009.
60f. : Il.; 30cm

Dissertação (mestrado)- Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, Curitiba, 2009.
Bibliografia: f. 48-62

1. Metronidazol. 2. Cicatrização de feridas. 3. Colágeno. 4. Rato.
I. Biondo-Simões, Maria de Lourdes Pessole. II. Pontifícia
Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em
Cirurgia. III. Título.

CDD 20.ed.-617

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cláudia Paraguaçu Pupo Sampaio

Efeitos do uso tópico do metronidazol em feridas com cicatrização por segunda intenção em ratos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de mestre em cirurgia.

Aprovado em de de 2009

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Ao Departamento de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

À Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões, pela orientação.

João Antonio Sampaio e Maria Cecília Pupo Sampaio, meus pais, pelo exemplo.

Catharine Paraguaçu Sampaio Palma, minha filha, pela inspiração.

João A. Palma, meu marido, e seus pais, Irene Edite Eland Palma e Dirceu Siqueira Palma, pelo apoio.

Carlos Roberto Ballin, Professor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo apoio.

Luiz Carlos Sava, Professor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo apoio.

Maristela Palma de Oliveira, minha prima, pelo apoio.

Emir Toktar, amigo da família, pelo apoio técnico.

RESUMO

INTRODUÇÃO: os prejuízos decorrentes da presença de úlceras crônicas, na população, indicam a necessidade de um recurso que promova a cicatrização precoce das feridas, evitando sua cronificação. O metronidazol, segundo a literatura, promove a precocidade do processo de cicatrização de feridas.

OBJETIVO: avaliar os efeitos do metronidazol na cicatrização de feridas por segunda intenção. **MÉTODOS:** utilizou-se 80 ratos machos, nos quais se produziu uma ferida no dorso, distribuídos em dois grupos de 40 animais. Os que pertenceram ao grupo controle tiveram suas feridas tratadas com soro fisiológico 0,9% e os que pertenceram ao grupo experimento com metronidazol 4%. No 3.º, 7.º, 14.º e 21.º dias avaliou-se o processo cicatricial por parâmetros macroscópicos e microscópicos (histologia geral e imunoistoquímica).

RESULTADOS: a macroscopia demonstrou que a epitelização e a granulação ocorreram em menor tempo, no grupo experimento. Houve predomínio do estado inflamatório agudo, no grupo experimento, apenas no terceiro dia ($p=0,023$). O colágeno I apresentou maior concentração, no grupo experimento, no sétimo dia ($p=0,020$) e no vigésimo primeiro dia ($p=0,016$). O colágeno III apresentou maior concentração no vigésimo primeiro dia ($p=0,005$). A angiogênese foi avaliada pelo anti-CD34, o qual demonstrou maior número de vasos, no grupo experimento, no terceiro dia ($p<0,001$); e no décimo quarto dia ($p=0,003$).

CONCLUSÃO: o metronidazol contribui para a cicatrização de feridas por segunda intenção acelerando a epitelização e a granulação; uma maior concentração de colágeno e maior angiogênese.

DESCRITORES: Cicatrização de feridas. Metronidazol. Neovascularização fisiológica. Colágeno. Ratos.

ABSTRACT

Introduction: the decurrent damages of the presence of chronic ulcers, in the population, indicate a need of a resource that promotes the earliness cicatrization, preventing that chronicles become. The metronidazole, according to literature, promotes a precocious of the wound healing process. **Objective:** to evaluate the effects of metronidazol on ulcers cicatrization by second intention. **Methods:** eighty male rats were worked with, on whose dorsum a wound was made, being all of them distributed in two groups of 40 animals. Those belonging to the control group had their wounds treated 0,9% NaCl and those that belonged to the experience group received 4% metronidazol. Evaluations of the cicatrization process were made on the days 3, 7, 14 and 21 of the beginning of the experience, through macroscopical e microscopical (histological generality and imunohistochemical) criterions. **Results:** macroscopic has shown that the epithelization and granulation occurred in less time, in the group experiment. It was predominance of acute inflammatory state only on the third day ($p=0,023$). The type I collagen showed larger concentration in the group experiment, on the 7th ($p=0,020$) and 21^{sh} ($p=0,016$) days. The type III collagen showed a larger concentration on the 21^{sh} day ($p=0,005$). The angiogenesis, as evaluated by the anti-CD34, demonstrated a larger concentration of vessels, in the experimental group, with a significant difference on the third ($p<0,001$) and fourteenth ($p=0,003$) days. **Conclusion:** metronidazol contributes for the cicatrization of wounds at second intention, promotes earliness epithelization and granulation; a larger production of collagen and a larger angiogenesis.

Key words: Wounds cicatrization. Metronidazol. Physiological neovascularization. Collagen. Rats.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO	IV
ABSTRACT	V
SUMÁRIO	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE QUADROS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO.....	3
2 LITERATURA	4
2.1 CICATRIZAÇÃO.....	4
2.1.1 Coagulação	5
2.1.2 Inflamação.....	5
2.1.3 Proliferação	6
2.1.4 Contração.....	9
2.1.5 Remodelação	10
2.2 TIPOS DE FERIDAS	11
2.3 PRODUTOS UTILIZADOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	11
2.4 METRONIDAZOL	12
2.4.1 Uso terapêutico	12
2.4.2 Mecanismo de ação	13
2.4.3 Absorção	14
2.4.4 Metronidazol oral e metronidazol gel.....	15
2.4.5 Metronidazol e cicatrização.....	16
3 MÉTODOS	21
3.1 AMOSTRA.....	21

3.2	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	21
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	23
3.4	APLICAÇÃO DO METRONIDAZOL	23
3.5	ANÁLISE MACROSCÓPICA	24
3.6	ANÁLISE MICROSCÓPICA MICROBIOLÓGICA	24
3.7	ANÁLISE MICROSCÓPICA HISTOLÓGICA GERAL E IMUNOISTOQUÍMICA	24
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
4	RESULTADOS	28
4.1	AVALIAÇÃO HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA	28
4.2	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	28
4.2.1	Grupos Controle	28
4.2.2	Grupos Experimento	29
4.3	AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	29
4.3.1	Avaliação microbiológica.....	29
4.3.2	Reação Inflamatória Aguda.....	31
4.3.3	Colágeno.....	35
4.3.4	Angiogênese	39
4.4	AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS RESULTADOS	42
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	NORMAS ADOTADAS	53
	APÊNDICE I.....	54
	ANEXO I.....	56
	ANEXO II.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Avaliação percentual das células polimorfonucleares.....	31
Tabela 2 -	Avaliação percentual das células monomorfonucleares	32
Tabela 3 -	Avaliação do estado inflamatório nos grupos controle e experimento	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Divisão dos grupos	23
Quadro 2 -	Contagem celular do processo inflamatório	26
Quadro 3 -	Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com o escore final de cada grupo.....	26
Quadro 4 -	Comparação da média da variável peso entre grupos controle e experimento	28
Quadro 5 -	Resultado das culturas dos grupos controle e experimento em d0	30
Quadro 6 -	Resultado das culturas dos grupos controle e experimento em d14	30
Quadro 7 -	Comparação dos grupos em relação à presença de bactérias em d0.....	30
Quadro 8 -	Comparação dos grupos em relação à presença de bactérias em d14.....	31
Quadro 9 -	Comparação dos grupos em relação à presença de bactérias em d14.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Localização da lesão.....	22
Figura 2 -	Áreas de leitura histológica	25
Figura 3 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão do animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com três dias (d3) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.....	33
Figura 4 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com sete dias (d7) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.....	33
Figura 5 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com quatorze dias (d14) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.....	34
Figura 6 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com vinte e um dias (d21) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.....	34
Figura 7 -	Percentual de colágeno total nos grupos controle e experimento	35
Figura 8 -	Média dos percentuais de colágeno I nos cortes histológicos dos grupos controle e experimento.....	36
Figura 9 -	Média dos percentuais das áreas ocupadas por colágeno III nos cortes histológicos dos grupos controle e experimento	37
Figura 10 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com três dias (d3) de evolução. <i>Sirius Red</i> 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.....	37
Figura 11 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com sete dias (d7)	

	de evolução. <i>Sirius Red</i> 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.....	38
Figura 12 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com quatorze dias (d14) de evolução. <i>Sirius Red</i> 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.	38
Figura 13 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com vinte e um dias (d21) de evolução. <i>Sirius Red</i> 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.	39
Figura 14 -	Média do número de vasos nos cortes histológicos dos grupos controle e experimento.....	40
Figura 15 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com três dias (d3) de evolução. Anti-CD34 400X.....	40
Figura 16 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com sete dias (d7) de evolução. Anti-CD34 400X.....	41
Figura 17 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com quatorze dias (d14) de evolução. Anti-CD34 400X.....	41
Figura 18 -	Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com vinte e um dias (d21) de evolução. Anti-CD34 400X.....	42

1 INTRODUÇÃO

Até o final da Segunda Guerra, a teoria vigente era a de que as lesões deveriam permanecer secas para propiciar melhor cicatrização. Em 1945, Bloom utilizou um filme transparente, permeável ao vapor. Em 1950, Schiling utilizou o mesmo tipo de filme envolto em moldura adesiva de polivinil. Em 1962, Winter e Roove referiram o benefício do ambiente úmido para a cicatrização e em 1982, surgiram as coberturas à base de hidrocolóides, para feridas de espessura parcial, nos Estados Unidos e Europa, disponibilizadas no mercado brasileiro a partir de 1990¹.

No início dos anos 90 foram lançados os hidropolímeros, que mantêm o meio úmido, além de promover a evaporação do exsudato, favorecendo a granulação e diminuindo a maceração de tecidos neoformados¹.

Atualmente, os novos recursos visam acelerar o processo de cicatrização e reduzir as complicações. Entre estes recursos encontram-se: ácidos graxos essenciais, colágenos biológicos, hidropolímeros, hidrogéis, hidrocolóides e enzimas proteolíticas. Porém, o custo, de muitos destes, impede sua maior utilização².

As estatísticas da América do Norte e da Europa, com relação às úlceras de pressão, indicam, em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI), uma prevalência superior a 14,8% e incidência de 0,4 a 38%. Em hospitais para idosos, com problemas crônicos de saúde, a taxa de prevalência se localiza entre 2,3 a 28% e a incidência entre 2,2 a 23,9%. Para pacientes sob cuidados domiciliares a prevalência é registrada até 29%, sendo a incidência de 6,3%. Pessoas com lesão medular apresentam uma taxa de prevalência entre 20 e 60%³.

Estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, com pacientes internados em unidades cirúrgicas, cuidados semi-intensivos e unidades de terapia intensiva, indicou a incidência de úlceras de pressão entre 29,63 e 42,64%. Outro estudo, na mesma cidade, em uma unidade de terapia intensiva de um hospital privado, revelou a incidência de 10,62%⁴.

A equipe da Divisão de Cirurgia Plástica e Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo avaliou 45 pacientes com 77 úlceras. Na maioria, pacientes jovens (média de 34,78 anos), sendo que 100% dos pacientes com lesão medular, 60% das vítimas de lesões por arma de fogo e 93,3% dos pacientes com enfermidades crônicas desenvolveram úlceras. A taxa de recorrência foi de 25%⁵.

Isik *et al.*⁶ referem que nos Estados Unidos da América, o tempo médio de internação de um serviço de referência é de 20 dias e o gasto é de 21.675 dólares/ úlcera.

Cerca de 2,7% da população tem úlceras crônicas nos pés e pernas, porcentagem que chega a 10% nos diabéticos e que representa a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil⁷.

Ereno⁷ refere a importância do desenvolvimento de curativos, com preços razoáveis, para atender 4,5 milhões de pessoas, no Brasil, que, provavelmente, não possam pagar os altos valores dos medicamentos importados.

Apesar dos resultados de pesquisas isoladas, é provável que os dados estatísticos não retratem de forma fidedigna o sério problema de saúde pública que as feridas representam, em função dos escassos registros⁸.

É considerada aguda a ferida que completa o ciclo de cicatrização em período inferior a oito semanas e crônica a ferida cujo tempo de cicatrização excede a oito semanas⁹, refletindo no enfoque temporal qualquer alteração nas fases da cicatrização, é importante que todos os recursos que viabilizam um menor tempo de cicatrização sejam aplicados às feridas agudas com o intuito de evitar que as mesmas tornem-se crônicas, culminando com os prejuízos que estas acarretam.

Há pesquisas que indicam que o metronidazol possui propriedades relacionadas com a cicatrização, promovendo aceleração da contração e da epitelização, culminando com a precocidade do processo de reparação¹⁰⁻¹². Rao¹¹ após realização de experimento, sugeriu uma relação entre o fim dos produtos oxidativos e a epitelização. Girish e Patil¹³ conferiram ao metronidazol a propriedade pró-cicatricial em função da promoção da epitelização e da queratinização.

Poletti *et al.*¹⁴ indicaram a aplicação de metronidazol, gel ou solução, para o controle do odor. Kalinski *et al.*¹⁵ referiram que o efeito da desodorização do metronidazol poderia estar relacionado com a erradicação da infecção anaeróbia.

Considerando que o metronidazol encontra-se disponível na rede pública e apresenta um baixo custo, sua utilização, em feridas crônicas, poderá representar o acesso de milhões de pessoas a um tratamento de melhor qualidade, visando não apenas o benefício particular, do paciente que irá utilizá-lo, mas a redução dos gastos públicos. Há que se considerar que o gasto público não se limita ao valor do tratamento da úlcera, apenas, mas inclui o tempo de afastamento do trabalho e o custo diário de um leito, quando o paciente requer internamento.

O metronidazol pode significar um passo importante no controle de feridas, por meio da precocidade do reparo tecidual evitando o alto número de complicações que oneram os gastos públicos e alteram a qualidade de vida de uma população sofrida física e psicologicamente.

1.1 OBJETIVO

Avaliar os efeitos provocados pelo antibiótico metronidazol a 4%, comparados aos efeitos com solução fisiológica, de forma tópica, em feridas com cicatrização por segunda intenção, em ratos.

2 LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização da pele se faz por uma seqüência de eventos, que ocorrem após uma lesão que pode acometer a epiderme, parte da derme, toda a derme e a tela subcutânea, ocasionando lesões superficiais, de espessura parcial ou espessura total, respectivamente. Esta seqüência de eventos depende, entre outros fatores, da profundidade da lesão. A cicatrização das feridas superficiais ocorre por migração das células epidérmicas em direção à superfície e regeneração das células epiteliais em decorrência da perda da inibição de contato. As estruturas acessórias encontram-se preservadas. As feridas de espessura parcial, também, cicatrizam por migração das células epidérmicas e das células epiteliais. Mesmo ocorrendo dano à derme, as estruturas acessórias encontram-se preservadas. As feridas de espessura total e as feridas com comprometimento da tela subcutânea podem ser fechadas de forma primária se as bordas forem limpas e regulares, do contrário ter-se-á que lançar mão do fechamento por segunda intenção ou por terceira intenção (também conhecido como primeira intenção adiada). A segunda intenção é indicada para feridas com perda de tecido, bordas irregulares, necrose tecidual, contaminação ou presença de tecidos desvitalizados. O fechamento por terceira intenção, onde as bordas são aproximadas, é indicado quando existe contaminação, perda de tecido ou risco de infecção¹⁶.

As fases da cicatrização não possuem marcos específicos que indiquem, exatamente, onde começa ou termina uma fase. As fases possuem acontecimentos que as caracterizam, ocorrendo várias divisões do processo de cicatrização de acordo com o entendimento do autor, procurando todos, invariavelmente, a apresentação mais didática. A cicatrização de uma ferida passa por vários processos como: coagulação, inflamação, síntese e deposição de matriz, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelação¹⁷. De acordo com Mandelbaum *et al.*¹ pode-se dividir o processo em cinco fases

principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração e remodelação. Sendo que a proliferação é dividida em três subfases: reepitelização, fibroplasia e angiogênese.

2.1.1 Coagulação

Inicia-se, imediatamente, após o surgimento da ferida. No momento da lesão a formação do coágulo protege a ferida e forma uma matriz, por meio da qual migram as células durante o processo de reparo. O coágulo consiste de plaquetas embebidas em uma rede de fibras de fibrina, derivadas da trombina, associadas à fibronectina plasmática, vitronectina e trombospondina. O coágulo serve como reserva de citocinas e fatores de crescimento. Os fatores de crescimento providenciam sinais quimiotáticos que recrutam células inflamatórias para o local das feridas, iniciam os movimentos celulares de reepitelização e a contração do tecido conjuntivo¹⁸.

2.1.2 Inflamação

O processo inflamatório caracteriza-se por apresentar as fases de hemostasia, deposição de matriz provisória e migração celular¹⁹. A inflamação é manifestada por eritema, calor, edema e dor, sendo estes causados pela vasodilatação capilar e aumento da permeabilidade. Estas alterações vasculares permitem o extravasamento de proteínas plasmáticas no local da ferida. O sistema nervoso promove a vasodilatação e o aumento da permeabilidade. As plaquetas secretam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que ativa os macrófagos e os fibroblastos. Os polimorfonucleares são as primeiras células inflamatórias a chegarem ao local, em conjunto com fatores de crescimento e citocinas, com PDGF e interleucinas 1, 6, 8 (IL-1, IL-6, IL-8). Os polimorfonucleares servem para realizar a limpeza da ferida, removendo os restos celulares, sendo, também, uma fonte importante de pró-citocinas e de TNF¹⁷. A infiltração dos monócitos se dá pela influência do fator de crescimento transformador (TGF). O PDGF e o fator de crescimento endotelial vascular

(VEGF) induzem à formação do tecido de granulação. Aderidos à matriz extracelular os monócitos transformam-se em macrófagos, os quais secretam as citocinas pró-inflamatórias, entre elas: fator de necrose tumoral ácido (TNF- α), fator de crescimento insulina similar 1 (IGF-1) e as interleucinas¹⁹.

2.1.3 Proliferação

A fase de proliferação é dividida em: reepitelização, fibroplasia e angiogênese¹.

2.1.3.1 Reepitelização

Um ou dois dias após a lesão, as células epidermais começam a proliferar e migrar²⁰. Os macrófagos produzem fator de crescimento transformador básico (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2) e IGF-1, os quais influenciam o processo de reepitelização¹⁸. A reepitelização é máxima entre 48 e 72h após a lesão¹⁶. A mesma cobre, protegendo, a área de falha tecidual que é preenchida pela granulação e sofre processo de contração¹. A alteração do fenótipo promove: retração dos tonofilamentos, dissolução dos desmossomos e formação dos filamentos de actina e miosina que são responsáveis pela mobilização. O estímulo para a proliferação e a migração ocorre em função da ausência de células vizinhas, da ação dos fatores de crescimento e do aumento de seus receptores. As células epidermais readquirem seu fenótipo, quando cessa a migração²⁰.

2.1.3.2 Fibroplasia

Refere-se ao processo de produção de colágeno e aumento da força tensil da cicatriz. A síntese de colágeno aumenta durante os primeiros dias e continua durante duas a quatro semanas, começando a declinar depois de um mês¹².

A formação do tecido de granulação (a granulação e a contração promovem o preenchimento da falta de tecido) começa próximo ao terceiro dia¹⁶.

As moléculas estruturais que formam a nova matriz extracelular contribuem para a formação do tecido de granulação, o qual vai servir de base para a migração celular. As moléculas incluem: fibrina, fibronectina ácido hialurônico. Os fibroblastos são os responsáveis pela síntese, remodelação e deposição da matriz e interagem com a mesma^{20,21}.

O tecido de granulação é um tecido brilhante, vermelho vivo, com ondulações, composto por uma mescla de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias, componentes neovasculares e da matriz, como fibronectina, glicosaminoglicanas e o colágeno¹.

Entre dois e quatro dias depois do trauma, tem-se a migração e a multiplicação de células mesenquimatosas. A migração dos fibroblastos é dirigida pela fibronectina, depositada durante as fases iniciais, sendo que o movimento é facilitado pela presença de grandes quantidades de ácido hialurônico, na matriz extracelular. Os fibroblastos liberam citocinas que atraem outros fibroblastos. Para que ocorra a migração é necessária a presença de algumas enzimas proteolíticas que ajudam a abrir o caminho através da rede de fibrina: a metaloproteinase matricial 1 (MMP-1), a gelatinase (MMP-2) e a estromelina (MMP-3). A concentração de células mesenquimatosas na ferida aumenta graças à multiplicação dos fibroblastos locais. As mitoses são estimuladas por TGF- β , TNF, IL-1, fator de crescimento epidérmico (EGF), PDGF, linfocinas e insulina¹².

O fibroblasto excreta um monômero denominado pró-colágeno. A enzima pró-colágeno peptidase cliva os pró-peptídeos, originando o tropocolágeno. As moléculas de tropocolágeno se reúnem formando as fibrilas com as características bandas de 67 nanômetros. As fibras reticulares do colágeno do tipo III, são mais delgadas que o colágeno tipo I; possuem maior quantidade de carboidratos. A cicatrização das feridas cirúrgicas é realizada, de início, com o colágeno tipo III, que mais tarde será substituído pelo colágeno tipo I, que é mais resistente. Simões e Cabral²¹ registraram a presença de colágeno do tipo I e do tipo III ao mesmo tempo, sintetizados por fibroblastos. A deposição dos mesmos apresentava-se sem orientação. Verificaram que a maioria das fibrilas colágenas tipo III era substituída por fibrilas colágenas tipo I.

A síntese de colágeno soma-se a outros componentes da matriz extracelular, entre eles fibronectina, elastina e mucopolissacarídeos ou proteoglicanos. Os fibroblastos produzem condroitina sulfato, dermatano sulfato,

heparina, queratano sulfato e ácido hialurônico, substâncias que potencializam a ação das citocinas²². Os componentes da matriz extracelular e os fatores de crescimento interagem de forma complexa atuando na regulação da formação dos vasos sanguíneos. Algumas proteínas da matriz podem inibir a angiogênese, como exemplo a fibronectina²³⁻⁵.

A fibronectina é parte da fibrina e está associada à deposição de fibras colágenas, fibrilas que são compostas por colágeno tipo III. A produção de fibronectina aumenta o crescimento do tecido de granulação o que permite a mobilização dos fibroblastos. A fibronectina servirá como a matriz que unirá os fibroblastos, formando uma rede²⁶. Assim como a fibronectina pode inibir a angiogênese, outras, como exemplo o colágeno tipo I, podem estimular a formação de vasos durante o reparo da ferida²⁷.

2.1.3.3 Angiogênese

Thakral *et al.*²⁶ propõem a hipótese da existência de uma célula que traduz os múltiplos estímulos da lesão para sinais químicos os quais promovem regeneração celular, formação de colágeno e fibrose. Todos os sinais que levam à cicatrização, envolvem o crescimento vascular. O perfil da função desta célula tradutora é do macrófago, sendo ele indicado como importante célula envolvida na angiogênese. Stashak *et al.* citados por Souza *et al.*²⁸ referem que a angiogênese favorece o tempo de cicatrização por aumentar o aporte de nutrientes e o ingresso celular na região afetada, diminuindo, desta forma, o tempo de retração da ferida.

A angiogênese é estimulada por macrófagos por meio da liberação de FGF-2 e VEGF-a. É a responsável pela produção do tecido de granulação, tendo como precedente a ação dos macrófagos que depositam a matriz do tecido conjuntivo promovendo a presença do substrato da ferida para onde vão migrar macrófagos, angioblastos e fibroblastos. As células endoteliais, por ação química e dos fatores de crescimento, liberam enzimas que destroem a membrana basal dos vasos sanguíneos existentes. Rudolph e Ballantyne citados por Balbino *et al.*²⁹ referem que ocorre a migração das células endoteliais, que atravessam a parede do vaso e através da matriz extracelular seguem em direção ao sítio da lesão. Uma vez na região externa do vaso, passam por um processo de

diferenciação e adquirem a capacidade de formar novos tubos capilares. As células endoteliais migratórias formam, na parte externa do vaso, um broto capilar que se une ao capilar de origem restabelecendo o fluxo sanguíneo.

A formação do neovaso começa com a agressão tecidual, com a ativação dos macrófagos e as substâncias que estes produzem. As proteases (plasmina e collagenases) digerem a membrana basal e permitem que as células endoteliais estimuladas pelas citocinas angiogênicas formem o novo novelo vascular que invade a ferida. A angiogênese cessa por apoptose^{19,20}.

O movimento dos pseudópodos é favorecido pela fibronectina, pelas collagenases e pela integrina. Os altos níveis de lactato, o pH ácido e a diminuição da tensão de oxigênio na área lesionada estimulam a recanalização dos plexos capilares. Os macrófagos estimulados por altas concentrações de ácido láctico, diminuição da pressão parcial de oxigênio e algumas aminas biogênicas liberam citocinas que facilitam a migração e a proliferação endotelial. As citocinas encontradas são: TGF-a e TGF-b, EGF, TNF-a, PDGF, angiogenina, IL-8 e FGF-b; podendo, ainda, apresentar algum grau de atuação as prostaglandinas e os lipídios provenientes dos adipócitos²².

2.1.4 Contração

Denomina-se contração ao deslocamento tecidual centrípeto, das margens ao centro da ferida, que ocorre entre 3 e 5 dias após a lesão²².

Para Mandelbaum *et al.*¹ a contração da ferida, em processos de cicatrização por segunda intenção, poderá ser responsável por uma taxa de redução de até 62% da superfície de lesão cutânea. O fenômeno se observa quando os tecidos próximos são móveis. A pele avança com uma velocidade entre 0,6 e 0,75 mm diários e cessa por inibição de contato, quando a ferida está fechada, ou quando a tensão excede a força centrípeta.

Uma semana após o aparecimento da ferida, o coágulo será preenchido e invadido por fibroblastos que são estimulados pelo TGF-b e outros fatores de crescimento que sintetizam e remodelam uma nova matriz rica em colágeno. Nesta fase, tem-se a transformação de fibroblastos em miofibroblastos, os quais assemelham-se à células musculares lisas, em sua capacidade contrátil^{29,30}.

A diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos pode ser induzida por uma baixa densidade de fibras. Dois fatores interagem para a transformação de fibroblastos em miofibroblastos: a perda de contato celular e a ação do TGF- β ³¹.

O mecanismo responsável pela contração, especificamente, pode se dever ao movimento dos miofibroblastos através da matriz extracelular. Estes possuem em seu citoplasma fibras contráteis de actina e miosina, que se originam de células mesenquimatosas, de mononucleares circulantes ou de fibrócitos situados ao redor da adventícia de vasos sanguíneos locais, processo facilitado pelo TGF- β . Os fibroblastos das margens da ferida apresentam mudança de fenótipo para miofibroblastos, com características funcionais similares ao músculo liso. Estes miofibroblastos encontram-se alinhados ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula à célula e gerando a força de tensão²⁹.

2.1.5 Remodelação

A modelagem do colágeno ocorre pelo equilíbrio entre a síntese e a degradação deste. Este processo é mediado pelas enzimas proteolíticas (metaloproteinases), células epidérmicas, células endoteliais e fibroblastos¹⁹. No remodelamento ocorrem etapas sucessivas de produção, digestão e orientação das fibras de colágeno. As fibras são digeridas pela colagenase, ressintetizadas, rearranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e ligadas, lateralmente, por ligações covalentes. A quantidade de colágeno aumenta durante as primeiras semanas e por volta de 21 dias ocorre um equilíbrio entre a produção e a degradação. A resistência da cicatriz é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma com que as fibras estão organizadas, sendo o aumento da resistência maior do que poder-se-ia esperar apenas pela deposição do colágeno. Este processo tem início por volta da terceira semana após o trauma e persiste por meses ou anos^{18,29}.

2.2 TIPOS DE FERIDAS

Para o manejo adequado das feridas é importante sua classificação.

As feridas, freqüentemente, são classificadas em agudas e crônicas. Feridas agudas completam o ciclo de cicatrização em tempo inferior a oito semanas. Feridas crônicas apresentam falhas na seqüência ou no tempo das fases da cicatrização⁹.

Segundo a *Agency for Healthcare Research Quality (AHRQ)*³² as feridas de pele são classificadas em feridas de pressão, feridas inflamatórias, feridas por insuficiência vascular, feridas malignas e miscelânea, que envolve outros tipos de feridas que não se enquadram nas anteriores. As feridas de pressão dividem-se em úlceras de decúbito e úlceras neuropáticas; as inflamatórias em desordens auto-imunes e desordens cutâneas primárias; as feridas por insuficiência vascular dividem-se em feridas por insuficiência arterial e insuficiência venosa; as malignas em feridas cutâneas malignas primárias e cutâneas malignas secundárias e a divisão miscelânea inclui queimaduras, lesões por radiação, lesões por frio, úlceras por vasculites e picadas de aranha.

As úlceras de decúbito são classificadas de acordo com as definições da *National Pressure Ulcer Advisory Panel (NPUAP)*³, que avalia a profundidade, sendo úlcera do estágio I, a alteração relacionada à área de eritema; úlcera do estágio II, as com perda cutânea de espessura parcial, sem estender-se por toda a espessura da derme; úlcera do estágio III, as com comprometimento da tela subcutânea, porém sem comprometer a fáscia e úlcera do estágio IV, aquelas que se estendem além da fáscia.

2.3 PRODUTOS UTILIZADOS PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS

Os produtos utilizados para a cicatrização de feridas estão, didaticamente, agrupados, segundo Mandelbaum *et al.*², em: recursos destinados à proteção da pele contra agressões mecânicas ou químicas e prevenção de infecções; produtos para higienização e antisepsia; produtos para desbridamento químico, enzimático, autolítico e mecânico; coberturas primárias (entram em contato direto com o leito da ferida) ou secundárias (fixam as coberturas primárias); produtos para fixação de coberturas e complementos (faixas e ataduras) e agentes tópicos.

Os principais recursos disponíveis, no Brasil, são: ácidos graxos essenciais; produtos à base de alginato de cálcio; antissépticos e degermantes; bandagens para compressão; carvão ativado e prata; filmes semipermeáveis; colágenos biológicos; produtos que utilizam fatores de crescimento; hidropolímeros; hidrogéis; hidrocolóides; enzimas proteolíticas, isoladas e combinadas; sulfadiazinas de prata; acetatos de celulose permeáveis ao calor; protetores cutâneos; membranas permeáveis ao vapor; curativos de gaze simples; curativos de gaze não aderentes; matrizes de regeneração dérmica; biopolímeros do látex da seringueira⁶ e outros recursos auxiliares e tecnologias em uso ou em fase de pesquisa como cultura de tecidos e transplante de fibroblastos, modulações e terapias genéticas, ácidos hialurônicos, agentes fitoterápicos, *laser* de baixa potência, terapias larvais, terapias alternativas, oxigenoterapias hiperbáricas, silicones (em gel, placas e tiras), moldes de contato total, tratamentos fisioterápicos e derivados do intestino de porco².

2.4 METRONIDAZOL

2.4.1 Uso terapêutico

O metronidazol (1-beta-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol) é um antibiótico ativo contra anaeróbios obrigatórios, não tendo atividade significativa contra anaeróbios facultativos ou aeróbios obrigatórios³³⁻³⁵.

O uso terapêutico se faz para protozoários, apresentando alta taxa de resposta no tratamento para *Trichomonas vaginalis*³⁶ em homens e mulheres, tratamento eficaz contra amebíase, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*. Apresenta eficácia contra bactérias anaeróbias susceptíveis incluindo *Bacteróides fragilis*³⁷, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Eubacterium*, *Helicobacter*, *Campilobacter fetus*, *Espiroquetas* e *Gardnerella vaginalis*. É indicado para infecções causadas pelo *Bacteróide fragilis*³⁸ e pelo *Clostridium perfringens*. É, ainda, eficaz no tratamento da colite pseudomembranosa causada pelo *Clostridium difficile*³³. Também indicado para infecções dentárias agudas e gengivoperiodontais, como a estomatite de Vicent³³. *Actinomyces* possui a maior parte das cepas resistentes^{35,39}. Útil ao combate do crescimento bacteriano associado à doença de Crohn. Devido à penetração tecidual pode atingir níveis, clinicamente, eficazes em ossos, articulações e

cérebro. Infecções intra-abdominais, ginecológicas, dérmicas, abscesso cerebral^{35,37,40,41}, septicemia bacteriana e endocardite por anaeróbios susceptíveis respondem a esse fármaco. O metronidazol penetra no cérebro e no líquido cefalorraquidiano^{37,38,42,43}.

Segundo Jokipii *et al.*³⁸ e O'Grady *et al.*⁴³ o metronidazol apresenta nível no líquido cerebrospinal, sendo efetivo agente nas infecções anaeróbias do sistema nervoso central.

2.4.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação inicia-se com a penetração da droga na célula bacteriana, na seqüência ocorre uma atividade redutora, gerando um efeito tóxico do derivado reduzido, finalizando com a ocorrência da liberação de produtos finais inativos.

A reação redox se faz em proteínas, em *Trichomonas* e em ferredoxinas, em *Clostridia*⁴⁴. Essas proteínas reduzem o grupo nitro do metronidazol mediante reação química não enzimática⁴⁴⁻⁴⁶. A transferência única de elétrons forma um ânion do radical nitro, reativo, que mata os microorganismos susceptíveis por mecanismos mediados pelos radicais livres ou compostos intermediários de vida curta que têm como alvo o DNA e outras biomoléculas vitais^{47,48}. Os produtos tóxicos que se ligam ao DNA inibem sua síntese, resultando na morte celular⁴⁷⁻⁴⁹. A ação específica contra anaeróbios estritos ocorre em função destas bactérias obterem a sua energia pela oxidação de uma enzima complexa (tiamina pirofosfatase) que utiliza ferredoxinas ou proteínas como seus transferidores elétricos. Toda a atividade biológica é devida à redução do seu grupo nitro^{44,48-51}.

Edwards *et al.*⁴⁴ indicaram que o mecanismo de ação de uma droga interfere com o mecanismo peculiar dos diferentes grupos taxonômicos. Referiram que o espectro de atividade de uma droga reflete seu desenvolvimento biológico. Nos microorganismos, o hidrogênio está ligado ao mecanismo de transferência de elétrons, o que ocasiona a redução do grupo nitro. A seletiva toxicidade é explicada pelo fato de que somente anaeróbios possuem o sistema de redução de elétrons de potencial negativo. Com a redução dos elétrons, ocorre a formação de substâncias letais dentro da célula.

2.4.3 Absorção

Elewski⁵² realizou estudo da cinética da absorção percutânea de formulações tópicas de metronidazol em pele de cadáver humano *in vitro*. Foi avaliada a farmacocinética da absorção percutânea do metronidazol em diferentes veículos e concentrações, com o agente ativo em seis formulações tópicas. A pele humana foi conectada a um difusor celular denominado *Franz cells* que permite que a mesma seja mantida em temperatura e umidade que simulam as condições *in vivo*. O estudo revelou que o fator mais importante para a penetração do metronidazol através da pele é o veículo, sobrepujando a concentração do mesmo. Neste estudo o *ranking* das concentrações foi de maior absorção para o creme, seguido da loção e tendo como padrão de menor absorção o gel.

Stolze e Stellfeld⁵³ avaliaram a absorção sistêmica do metronidazol com sua aplicação tópica em gel a 25%, em bolsas periodontais inflamadas, a uma profundidade maior ou igual a cinco milímetros, sendo aplicado em, no mínimo, dez dentes. O sangue foi colhido antes e após a aplicação do gel, para avaliar a biodisponibilidade da medicação. Após sete dias os mesmos pacientes receberam metronidazol na dose de 100mg EV; foi colhido sangue após 48h da aplicação EV. Após 30h da aplicação do gel, o metronidazol foi encontrado em 100% dos pacientes; após 36h em 93% dos pacientes; após 48h em 33% dos pacientes e após 72h, foi encontrado em 9% dos pacientes. A média de eliminação da meia vida foi idêntica, após as duas formas de 410 minutos. O pico sérico do metronidazol após aplicação EV foi de, aproximadamente, cinco e dez microgramas/mililitro, após doses de 250 e 500mg, respectivamente. O tempo para o pico de concentração, sendo utilizado como forma de avaliar a taxa de absorção do metronidazol, 25 minutos a quatro horas, mas a média foi de, aproximadamente, uma hora. O pico de concentração plasmática após aplicação do gel foi de seis décimos de micrômetro/mililitro, após quatro horas; tal fato demonstrou que a principal concentração do metronidazol no fluido gengival após quatro horas, foi alto, 461 µg/ml. O estudo demonstrou que se pode obter altas concentrações de metronidazol, nas bolsas periodontais, com metronidazol a 25%, sem induzir à altas concentrações plasmáticas.

2.4.4 Metronidazol oral e metronidazol gel

Rao *et al.*⁵⁴ compararam o metronidazol oral com o metronidazol gel, em queimados, nas feridas de espessura parcial, apresentando que o uso oral acelerou o processo de epitelização, enquanto o uso tópico o deprimiu, o retardou. O texto reportou que ele é citotóxico em células de mamíferos em crescimento *in vitro*, dando suporte ao efeito depressivo do metronidazol em cicatrização de feridas. Apresentaram como resultado sinais avançados de cicatrização (restauração completa da epiderme, alta quantidade de feixes de colágeno na derme e ausência de células inflamatórias na mesma) nas feridas dos animais tratados com metronidazol oral. Seu uso sistêmico elimina radicais livres e previne a peroxidação lipídica, reduzindo a perda de área tecidual em queimados, promovendo a cicatrização. As feridas dos animais tratados com metronidazol local não apresentaram os mesmos resultados do grupo tratado com via oral. Na opinião dos autores a alta concentração da forma tópica promoveu o efeito de citotoxicidade o que retardou a cicatrização, mesmo o metronidazol tendo um efeito antioxidante. Os autores, ainda, registraram que as formulações da base em que o mesmo foi colocado eram diferentes. A formulação MGEL-1, com a qual o resultado não apresentou cicatrização significativa era composta por carbonatos, metil parabenzeno, propil parabenzeno, di-sódio, propileno-glicol e água para injeção. A formulação MGEL-2, a qual demonstrou efeitos pró cicatrizantes, era composta por carbopol, álcool isopropílico, di-etanolamina e alantoína. Os autores acreditam que a alantoína contida na formulação do MGEL-2 poderia ser a responsável pela reversão do efeito adverso do metronidazol.

Noyan *et al.*⁵⁵ realizaram estudo com o produto Elysol® (metronidazol 25% para uso local), fazendo avaliação clínica e microbiológica de seis grupos de pacientes com periodontite, durante 42 dias. Para avaliação do estado clínico foi observado estado gengival, profundidade alveolar e nível de fixação. O primeiro grupo foi tratado apenas com desbridamento subgengival, o segundo grupo recebeu metronidazol local, o terceiro grupo metronidazol sistêmico, o quarto grupo metronidazol local associado a desbridamento subgengival, o quinto grupo metronidazol sistêmico associado a desbridamento subgengival e o sexto grupo não recebeu tratamento. A cultura inicial colhida da bolsa gengival apresentou

crescimento de bactérias anaeróbias obrigatórias gram negativas: *Prevotella intermédia*, *Porphyromonas gengivalis*, *Fusobacterium spp* e *Campylobacter rectus*. Na cultura, verificou-se, ainda, bactérias anaeróbias facultativas gram negativas: *Capnocytophaga spp*, *Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Concluíram que todos os grupos resultaram em melhora clínica (estado gengival/ profundidade alveolar/ nível de fixação) e todos os tratamentos reduziram o número de microorganismos anaeróbios, exceto o grupo não tratado. As combinações funcionaram melhor que apenas o desbridamento subgengival ou apenas o metronidazol. Metronidazol local em combinação com o desbridamento subgengival pareceu ser mais efetivo, produzindo melhora clínica e microbiológica.

2.4.5 Metronidazol e cicatrização

2.4.5.1 Metronidazol enteral

Borden *et al.*⁵⁷ determinaram, por meio de estudo comparando 25 ratos Sprague Dawley tratados com injeção intraperitoneal de metronidazol e 25 ratos Sprague Dawley tratados com injeção de soro fisiológico, após confecção de defeito circular, com um centímetro de diâmetro, de espessura total na pele e incisão *standard* de laparotomia em linha média, concluíram que não houve diferença significativa na contração da ferida e na força de resistência da pele; houve diminuição da força de resistência da aponeurose dos animais tratados com metronidazol, na segunda e na terceira semana de cicatrização, desaparecendo após este período e vindo a apresentar a mesma força de resistência tensional máxima na quinta semana. Concluindo, os autores, referiram atraso na cicatrização da fáscia da parede abdominal, com efeito revertido no transcorrer da cicatrização.

Para Prasad e Rao¹⁰ o metronidazol acelera a contração e a epitelização. Em estudo experimental avaliaram o efeito do cetorolaco, do metronidazol e do tinidazol na cicatrização pós-operatória, utilizando 4mg/kg para o cetorolaco; 160mg/kg para o metronidazol e 180mg/kg para o tinidazol; todos por via oral. Os animais foram divididos em dois grupos: ferida aberta e espaço morto, sendo este

avaliado pela introdução de um tubo de polietileno. Registraram que a quantidade de hidroxiprolina das feridas dos animais, em uso de cetorolaco, metronidazol e tinidazol, foi, significativamente, menor que no grupo controle. O metronidazol e o tinidazol aumentaram a taxa de contração da ferida e aceleraram a epitelização, principalmente entre o 12.º e 16.º dias; efeito este não percebido no grupo em uso do cetorolaco.

Rao *et al.*¹¹ realizaram experimento, pretendendo avaliar a propriedade antioxidante do metronidazol e se o mesmo promovia a cicatrização em ratos queimados, comparando o mesmo com dois antioxidantes conhecidos, a vitamina C e a vitamina E. O experimento foi realizado com cinco grupos de animais; o primeiro grupo foi usado para determinar os níveis séricos de malonaldeído, não apresentando queimaduras; o malonaldeído é um aldeído de cadeia curta, sendo sua formação decorrente da decomposição dos hidroperóxidos lipídicos e sua concentração utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, em células e em tecidos⁵⁶. O segundo grupo apresentou queimadura de espessura parcial, sendo usado como controle dos queimados; o terceiro grupo recebeu metronidazol 180mg/kg V.O; o quarto recebeu vitamina C 180mg/kg V.O. e o quinto grupo recebeu vitamina E 180mg/kg V.O. Referiram que radicais livres de oxigênio (ânion superóxido e radicais hidroxil) são produzidos pela peroxidação lipídica pós queimadura e que estes radicais estão implicados no desenvolvimento do choque. Malonaldeído, pode ser medido no soro; a peroxidação lipídica próxima ao local da queimadura causa destruição tecidual excessiva. Referiram, ainda, que qualquer fator que reduzisse a peroxidação lipídica ajudaria a promover a cicatrização de lesões por queimaduras. Os grupos metronidazol, vitamina C e vitamina E apresentaram epitelização precoce, em mais de dois dias de diferença em relação ao grupo controle. O metronidazol apresentou propriedade antioxidante equivalente à vitamina E. O mesmo reduziu, significativamente, a quantidade do malonaldeído, no soro, em 48h pós queimadura; ofereceu proteção contra infecções anaeróbias, também protegendo contra alguns aspectos do estresse oxidativo induzido por queimaduras. O resultado do trabalho sugere uma linha entre o fim dos produtos oxidativos e a epitelização.

Girish e Patil¹³ realizaram avaliação do uso oral de metronidazol com dose de 108mg, tinidazol com dose de 180mg, cetoconazol com dose de 18mg e

fluconazol com dose de 18mg, na cicatrização de incisão cirúrgica de abdômen, excisão de pele e ferida com espaço morto. Referiram que o efeito antioxidante do metronidazol aumentou o processo de cicatrização em queimados; o aumento que o mesmo promove da epitelização e da queratinização, conferem a esse a propriedade pró cicatricial.

Girish e Patil¹³, em estudo publicado em 2005, referiram aumento na contração; os mesmos acreditaram que o resultado desfavorável obtido por Borden *et al.*⁵⁷ foi devido a baixa dose utilizada, pois os mesmos utilizaram a dosagem de 108mg/kg. E demonstraram, também, aumento da força tensional do tecido, do tecido de granulação e do conteúdo de hidroxiprolina. O estudo referiu, na análise histológica, aumento do número de fibroblastos e colágeno nas feridas dos grupos de tratamento em relação ao grupo controle. Os mesmos utilizaram a dosagem de 108mg/kg durante dez dias. O resultado discordante de Prasad¹⁰, para Girish e Patil¹³ se deveu ao fato do mesmo utilizar altas doses de metronidazol (160mg/kg).

2.4.5.2 Metronidazol tópico

Mandelbaum *et al.*¹ referiram que vários agentes tópicos atrapalham a migração epidérmica, quando comparados a grupos de não tratamento. Citaram que o acetato de triancinolona 0,1% diminuiu 34% a taxa relativa de cura; nitrofurazona diminuiu 39%; ao contrário peróxido de benzoíla e coberturas com permeabilidade seletiva melhoraram em 14%; a sulfadiazina de prata e pomada de neosporina melhoraram em 28%.

O que altera o equilíbrio hospedeiro bactéria é a proliferação bacteriana, com sua produção de endotoxinas e metaloproteínas, que vão interferir no processo de cicatrização⁵⁸.

Robson *et al.*¹⁷ referiu que, nas feridas crônicas, já existe uma flora bacteriana local, sendo a característica destas feridas a presença de tecido de granulação, que ocorre na presença de bactérias. As feridas crônicas estão, freqüentemente, em desequilíbrio bacteriano e os antibióticos sistêmicos têm demonstrado que não alcançam níveis adequados em tecido de granulação crônico, não tendo efeito adequado no nível bacteriano desta ferida. Ao contrário,

os antibióticos tópicos em forma de creme penetram a profundidade destas feridas e têm efeito direto no crescimento bacteriano.

Segundo Trindade Neto *et al.*⁵⁹ o gel de metronidazol, em tratamento concomitante à tetraciclina e seus derivados, é usado para o tratamento de rosácea leve a moderada com bons resultados, mantendo o paciente em remissão. Descreveram um caso de rosácea granulomatosa tratada com limeciclina oral 300 mg/dia e metronidazol gel 0,5% tópico, por 15 dias, na seqüência limeciclina oral 150mg/dia e metronidazol gel 0,5% por 30 dias, sendo instituída manutenção da medicação tópica com mais 30 dias, com regressão completa do quadro.

Poi⁵¹ realizou estudo experimental em ratos, induzindo alveolite e avaliando o uso tópico da pasta de metronidazol a 10%, aromatizada com menta, carboximetilcelulose ou lanolina como veículo, comparando com limpeza cirúrgica e irrigação com soro fisiológico. A composição metronidazol 10%, lidocaína 2%, menta e carboximetilcelulose ou lanolina, apresentou resultados que indicaram que a sua aplicação em alvéolos acometidos por alveolite, constitui-se numa segura opção para o controle da alveolite. Não houve diferença significativa entre os veículos lanolina e carboximetilcelulose. O composto com carboximetilcelulose apresentou ossificação mais intensa nos terços médio e apical. Dados referentes a estudos com carboximetilcelulose evidenciaram a utilidade deste material como veículo para medicações tópicas e proteção mecânica da cavidade bucal, por um maior espaço de tempo. A carboximetilcelulose é obtida pela ação do derivado sódico do ácido cloroacético sobre a celulose alcalina, pulverenta, branca, usada na indústria de tintas, de adesivos, em análise química, como antiácido e laxativo. O material apresentou-se efetivo por manter altas concentrações do agente sobre a lesão; diminuir a quantidade de material a ser aplicado; aumentar a duração dos efeitos locais; diminuir a quantidade de material disperso na água e promover proteção mecânica sobre a lesão. A lanolina, que é uma mistura de colesterol e seus ésteres, obtida da gordura da lã e usada como base de pomadas e cosméticos, já foi utilizada como veículo em associações medicamentosas destinadas em aplicações intra-alveolares.

Pedrazzoli *et al.*⁶⁰ compararam o uso tópico do metronidazol a 25% e o desbridamento mecânico subgengival, em casos de periodontite, em adultos. Ambos os tratamentos foram efetivos, no tocante à redução da profundidade da

bolsa e do sangramento. O metronidazol induziu a uma mudança importante da flora subgingival. Ambos os tratamentos reduziram as proporções de espiroquetas e *Prevotella intermedia*, com aumento de estreptococos. O desbridamento aumentou a proporção de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, o que foi evitado com o uso do metronidazol. Para o autor o uso tópico do metronidazol pareceu ser mais efetivo que a terapia mecânica convencional no tratamento da periodontite.

Mitchell⁶¹ referiu que o metronidazol elimina anaeróbios patogênicos e não causa distúrbio na flora aeróbia colonizadora.

Walwaikar *et al.*⁶² realizaram estudo avaliando a eficácia e a segurança da combinação, para uso tópico, metronidazol e iodopovidine (grupo I) em pré e pós-operatórios de pacientes em comparação com iodopovidine usado sozinho (grupo II). O estudo apontou melhores resultados para a combinação metronidazol e iodopovidine; sendo que as culturas das feridas cirúrgicas foram 60% negativas no grupo do metronidazol associado ao PVPI; no grupo do PVPI isolado as culturas foram 28% negativas. Ocorreu infecção cirúrgica em 12,3% do grupo I e 24% do grupo II. Os pacientes que fizeram uso da associação metronidazol e PVPI deixaram o hospital, em média dois dias antes que os pacientes que utilizaram o PVPI isolado. Os resultados deveram-se ao fato do metronidazol quebrar o sinergismo bacteriano entre anaeróbios e aeróbios, promovendo a inibição da fagocitose dos aeróbios por parte dos leucócitos, em função de substâncias produzidas pelos anaeróbios. Somado à quebra do sinergismo bacteriano pelo metronidazol temos que o mesmo apresenta ação antiinflamatória, sendo esta propriedade responsável pela redução e abrandamento dos parâmetros relacionados à dor, em pacientes tratados com essa combinação.

Nicholson e Armstrong¹² referiram que o metronidazol tópico a 10% promoveu diminuição da dor pós hemorroidectomia e melhorou a cicatrização. O veículo do creme utilizado foi petrolato, mesma substância utilizada como controle. Concluíram que, no grupo do metronidazol, a dor da ferida incisional foi minimizada em 7 e 14 dias, significativamente, e houve menos edema e melhor cicatrização total. O uso do metronidazol oral não mostrou diferença entre os grupos estudados.

3 MÉTODOS

O projeto que deu origem a este estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e aprovado sob n.º 231 (anexo I), tendo obedecido as orientações da Lei 6638 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1 AMOSTRA

O estudo foi experimental, no qual foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, adultos jovens com idade de 90 dias e com peso entre 184,28g e 255,56g. Alocados em grupos controle e experimento.

Os animais provenientes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, foram mantidos em gaiolas apropriadas para a espécie, em condições ambientais controladas (temperatura e luminosidade: 12h de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e à ração-padrão para a espécie. Foram colocados cinco ratos em cada gaiola.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico foi realizado no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Os animais foram anestesiados sendo utilizada a dosagem de 0,1ml, para 100g de peso do animal, de uma mistura de um mililitro de ketamina (50mg) com um mililitro de xilazina 2% (20 mg), via intramuscular na porção posterior da coxa direita⁶³. Os animais foram marcados e em seguida foram posicionados em decúbito ventral, num suporte de madeira, tendo sido fixados os membros anteriores e os posteriores.

Foi realizada tricotomia, na região dorsal, de cada animal, em área de 24cm² (seis centímetros de comprimento X quatro centímetros de largura),

localizada a partir de uma linha imaginária traçada entre os membros anteriores, estendendo-se por seis centímetros, em direção caudal.

Na seqüência foi realizada antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo e delimitação da área operatória com campo esterilizado fenestrado.

No centro da área tricotomizada foi feita uma demarcação na pele de cada rato por rotação da borda cortante de um *punch* metálico, com dois centímetros de diâmetro. Foi ressecado o segmento de pele circular, de acordo com a demarcação, tendo sido aprofundada a incisão até expor a fáscia muscular dorsal (figura 1).

Após o término do ato operatório os animais receberam diclofenaco de potássio na dose de 10mg/Kg, por via intramuscular com finalidade analgésica e anti-inflamatória⁶³.

As feridas cirúrgicas dos animais foram fotografadas por câmera digital (modelo Cyber-Shot® P71, Sony, resolução de 3.2 Mpixels), mantida em tripé a uma distância constante de 34 cm.

Houve perda de um animal, pertencente a um grupo controle, tendo como provável causa a sedação.

Após a recuperação anestésica estes animais foram levados para o Biotério da Instituição e devidamente marcados, foram mantidos em gaiolas separadas as quais foram colocadas em prateleiras à igual distância da fonte de luz e receberam água e ração balanceada *ad libitum*.



Figura 1 - Localização da lesão

3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A amostra de 80 animais foi, aleatoriamente, dividida em 8 grupos de 10 animais (quadro 1). Os mesmos foram submetidos a aplicação de soro fisiológico 0,9% para o grupo controle e metronidazol 4% para o grupo experimento, com frequência de uma vez ao dia, sendo que cada grupo foi avaliado com 3 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias, após a lesão.

Quadro 1 - Divisão dos grupos

GRUPOS		DIAS DE AVALIAÇÃO
GC3	n-10	3 dias
GC7	n-09*	7 dias
GC14	n-10	14 dias
GC21	n-10	21 dias
GE3	n-10	3 dias
GE7	n-10	7 dias
GE14	n-10	14 dias
GE21	n-10	21 dias

*Óbito de um animal durante sedação

3.4 APLICAÇÃO DO METRONIDAZOL

Os animais dos grupos controle foram tratados com lavagem da ferida com solução de NaCl 0,9%⁶⁴. As feridas cirúrgicas foram limpas com gaze umedecida em solução de NaCl 0,9%, para a retirada de crostas e em seguida aplicado 0,3ml da mesma solução, com frequência de uma vez ao dia.

As feridas cirúrgicas dos animais dos grupos experimento foram limpas com gaze umedecida em solução de NaCl 0,9%, para a retirada de crostas e em seguida foi aplicado metronidazol, suspensão oral (benzoilmtronidazol) 40 mg/ml (4%) em veículo q.s.p., com frequência de uma vez ao dia. A dose utilizada foi de 0,3 ml de metronidazol, correspondendo a 12,5mg/dia. Dose obtida a partir da indicação da dose padrão do metronidazol de 50mg/kg/dia⁶⁵.

Foram avaliados 4 grupos experimento em comparação com os 4 grupos controle, de acordo com os dias de eutanásia.

Após o terceiro dia de tratamento os animais do GC3 e do GE3 sofreram eutanásia por dose letal de tiopental sódico intra-peritonial (120mg/Kg), sendo este um dos métodos indicados pela literatura. O mesmo processo ocorreu com o GC7 e GE7 no sétimo dia, com o GC14 e GE14 no décimo quarto dia e com o GC21 e GE21 no vigésimo primeiro dia.

3.5 ANÁLISE MACROSCÓPICA

Para a avaliação macroscópica das feridas foi verificada a ocorrência de hemorragia, presença de crostas, de secreção, de reepitelização⁶⁶ e de granulação.

A presença de reepitelização foi avaliada pelo espessamento das margens da lesão e existência de camada epitelial fina e contínua, abaixo da crosta⁶⁶.

O tecido de granulação foi identificado pela presença de tecido brilhante, vermelho vivo e com ondulações¹.

3.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA MICROBIOLÓGICA

Foi realizada coleta de material para cultura das feridas dos animais dos grupos 14, controle e experimento, por meio de *swab*. A coleta foi realizada após limpeza da ferida cirúrgica, com solução de NaCl 0,9% em d0 (momento da realização da ferida cirúrgica) e em d14 (antes da eutanásia).

3.7 ANÁLISE MICROSCÓPICA HISTOLÓGICA GERAL E IMUNOISTOQUÍMICA

Imediatamente, após a eutanásia, as feridas cirúrgicas dos animais foram fotografadas.

Foi realizada a retirada de cada ferida cirúrgica, com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato.

Os segmentos destinados à histologia foram estendidos sobre papel cartão identificado. Na seqüência, mergulhados em recipiente com formol a 10%

por 24 horas. Após este período, foram inclusos em blocos de parafina e submetidos a cortes de cinco micrômetros.

Os cortes histológicos foram corados por Hematoxilina Eosina e *Sirius Red*. Para cada corte histológico, foi realizada a leitura de três campos, para ambas as colorações, com ampliação de 400X, sobre a área da lesão, para a coloração Hematoxilina Eosina e 200X para a coloração *Sirius Red*. Os campos foram marcados nas lâminas com caneta de retroprojeção; foram definidas áreas superficiais, sendo as áreas de transição entre o processo cicatricial e os tecidos antigos dos extremos da ferida e área superficial central da mesma (figura 2).

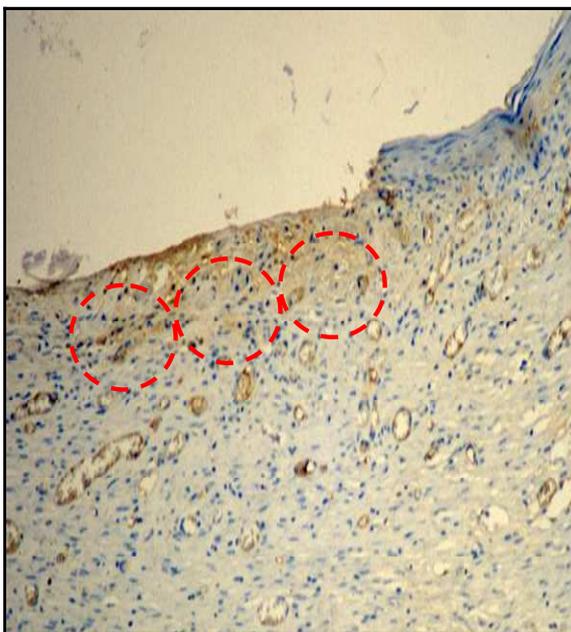


Figura 2 - Áreas de leitura histológica

Na coloração Hematoxilina Eosina avaliou-se o processo inflamatório com contagem das células monomorfonucleares e polimorfonucleares.

Para os polimorfonucleares foi atribuído o valor “-1” para campos com até 50 células; o valor “-2” para campos contendo entre 51 e 100 células; o valor “-3” para campos contendo mais de 100 células.

Para os monomorfonucleares foi atribuído o valor “1” para campos com até 50 células; o valor “2” para campos contendo entre 51 e 100 células; o valor “3” para campos contendo mais de 100 células (quadro 1).

Foi realizada a média celular entre os três campos avaliados e o estado inflamatório da ferida do animal classificado em agudo, subagudo e crônico⁶⁷ (quadro 3).

Quadro 2 - Contagem celular do processo inflamatório

NÚMERO DE CÉLULAS	POLIMORFONUCLEARES	MONONUCLEARES
até 50	-1	1
entre 50 e 100	-2	2
maior que 100	-3	3

Quadro 3 - Caracterização da fase do processo inflamatório de acordo com o escore final de cada grupo

FASE DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	ESCORE FINAL DE CLASSIFICAÇÃO
AGUDO	-9 a -3
SUBAGUDO	-2,9 a 3
CRÔNICO	3,1 a 9

A coloração *Picrossírius* foi usada para avaliar o colágeno por meio da birrefringência específica do mesmo, identificando o direcionamento das fibras, com o uso de um microscópio de luz polarizada.

As fibras mais espessas e com maior birrefringência, apresentaram-se coradas em tons laranja a vermelho identificando o colágeno tipo I e as fibras mais finas, e com menor birrefringência, apresentaram-se coradas em verde identificando o colágeno tipo III⁶⁸.

O microscópio utilizado foi da marca Olympus BX50 com câmeras de captura 3CCD pró-séries, e o programa de captura de imagens foi o Pró-plus versão 4.5 da Cybermetics. As imagens foram captadas por uma câmera Sony[®] CCD 101, enviadas a um monitor Sony Trinitron[®] colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa Oculus TCX[®] (coreco), que foram analisadas pelo aplicativo *Image Plus 4.5* para *Windows* em computador Pentium III. Em cada um dos campos foi calculado o percentual de área ocupada pelas fibras vermelhas e amarelas (colágeno I) e verdes (colágeno III)⁶⁸. Considerando que os demais tipos de colágeno constituem frações muito pequenas, para fins práticos, considerou-se a somatória dos colágenos I e III como sendo o colágeno total da cicatriz.

Para a imunistoquímica foi utilizado o método *tissue array* ou *mycro array*. Foram retiradas amostras do bloco de parafina utilizado para a confecção do HE e *Picrossírius*. A área escolhida para a retirada da amostra foi a área superficial central da ferida, tendo sido a mesma localizada na lâmina corada por

Hematoxilina Eosina, já demarcada com caneta para retroprojektor, utilizada como espelho para a realização do *punch*. O *punch* utilizado foi o número 3. As amostras foram retiradas e depositadas em um cassete, conforme determinação do mapa previamente elaborado (apêndice I).

O material foi encaminhado, na seqüência, para processamento imunistoquímico (anexo II), tendo sido utilizado o anti-CD34^{69,70}. A técnica imunistoquímica se baseia numa reação antígeno-anticorpo. O anticorpo liga-se ao antígeno específico, que por sua vez é reconhecido por um anticorpo secundário ao qual se liga um complexo enzimático streptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase transforma uma substância cromogênica, em geral a diaminobenzidina, que confere à reação positiva uma coloração acastanhada.

O anti-CD34 é um marcador de endotélio, porém não apresenta resultados satisfatórios para vasos maiores, sendo, conforme sua indicação, para marcação de microvasculatura. Foi realizada a leitura de dez campos, para cada corte histológico, complementando a avaliação do processo inflamatório, com enfoque na avaliação quantitativa da neovascularização. Foi utilizado, para leitura, microscópio Olympus BX500. A leitura das lâminas (dez campos por lâmina) foi realizada por patologista que não conhecia a que animal pertencia, isto é leitura cega.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação dos grupos controle e estudo avaliados em cada momento de sacrifício, foi usado o teste t de Student para amostras independentes e para avaliação da homogeneidade da amostra. Para a comparação dos momentos de sacrifício restritos a cada um dos grupos controle e estudo, foi usado a análise de variância com um fator. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilks. Variáveis que não apresentaram essa condição foram submetidas a uma transformação (raiz quadrada). Para a comparação de dois grupos em relação a variáveis nominais dicotômicas foi usado o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os cálculos foram realizados usando-se o programa computacional Statistica v.7.

4 RESULTADOS

No procedimento cirúrgico ocorreu o óbito de um rato do grupo controle II, após indução anestésica. Não houve mais complicações, com boa recuperação dos demais ratos no pós-anestésico. Na avaliação clínica diária constatou-se boa recuperação, bom estado geral, presença de atividade física e disposição para alimentação.

4.1 AVALIAÇÃO HOMOGENEIDADE DA AMOSTRA

A avaliação da variável peso dos animais do grupo controle e do grupo experimento, demonstrou a distribuição homogênea dos animais, com relação ao peso (quadro 3).

Quadro 4 - Comparação da média da variável peso entre grupos controle e experimento

Dia da Eutanásia	Grupo	Media	Desvio Padrão	Valor de p*
3	GC3	216,98	19,87	0,93
	GE3	219,37	14,18	
7	GC7	209,4	12,12	0,877
	GE7	210,57	18,96	
14	GC14	209,87	10,77	0,832
	GE14	208,44	17,92	
21	GC21	212,83	17,99	0,671
	GE21	215,15	9,97	

(*) Teste t Student para amostras independentes, $p < 0,05$

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

4.2.1 Grupos Controle

Nenhum rato apresentou hemorragia. Com 24h todas as feridas apresentaram crostas. Não houve presença de secreção em nenhuma ferida. A identificação da reepitelização foi possível a partir de 72h. O tecido de granulação começou a aparecer a partir de 72h.

4.2.2 Grupos Experimento

Não houve presença de hemorragia em nenhum rato. Com 48h todas as feridas apresentaram crostas. Não houve presença de secreção em nenhuma ferida. A identificação da reepitelização foi possível a partir de 24h. O tecido de granulação começou a aparecer a partir de 24h.

4.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

4.3.1 Avaliação microbiológica

A avaliação microbiológica realizada no momento da realização da ferida cirúrgica (d0) e no décimo-quarto dia demonstrou semelhança entre os grupos controle e experimento (quadros 5, 6, 7 e 8).

Quadro 5 - Resultado das culturas dos grupos controle e experimento em d0

Dia 0	CONTROLE	EXPERIMENTO
RATO 31	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 32	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 33	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 34	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 35	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 36	pseudomonas aeruginosa	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 37	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 38	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas
RATO 39	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	pseudomonas aeruginosa
RATO 40	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas

Quadro 6 - Resultado das culturas dos grupos controle e experimento em d14

Dia 14	CONTROLE	EXPERIMENTO
RATO 31	enterococcus sp/ estafilococos não produtor de coagulase	diversas espécies bacterianas
RATO 32	não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas	diversas espécies bacterianas
RATO 33	diversas espécies bacterianas	serratia marcescens
RATO 34	escherichia coli	diversas espécies bacterianas
RATO 35	diversas espécies bacterianas	diversas espécies bacterianas
RATO 36	klebsiela ozaenae/ estafilococo não produtor de coagulase	diversas espécies bacterianas
RATO 37	diversas espécies bacterianas	diversas espécies bacterianas
RATO 38	diversas espécies bacterianas	diversas espécies bacterianas
RATO 39	diversas espécies bacterianas	diversas espécies bacterianas
RATO 40	diversas espécies bacterianas	estafilococos não produtor de coagulase

Quadro 7 - Comparação dos grupos em relação à presença de bactérias em d0

Bactéria	GRUPO	
	GC	GE
Ausente	9 90,00%	9 90,00%
Presente	1 10,00%	1 10,00%
Total	10	10

Valor de p:1 (Teste exato de Fisher, $p < 0,05$)

Quadro 8 - Comparação dos grupos em relação à presença de bactérias em d14

Bactéria	GRUPO	
	GC	GE
Ausente	1 10,00%	0 0%
Presente	9 90,00%	10 100%
Total	10	10

Valor de p:1 (Teste exato de Fisher, $p < 0,05$)

4.3.2 Reação Inflamatória Aguda

No terceiro dia houve maior presença de polimorfonucleares no grupo experimento. No sétimo dia o maior afluxo foi registrado no grupo controle. No décimo-quarto dia o afluxo de polimorfonucleares equivaleu-se entre controle e experimento. No vigésimo-primeiro dia houve maior afluxo de polimorfonucleares no grupo experimento (tabela 1).

Houve semelhança na distribuição das células monomorfonucleares entre grupos controle e experimento (tabela 2).

Tabela 1 - Avaliação percentual das células polimorfonucleares

CÉLULAS POLIMORFO- NUCLEARES		GRUPO							
		GC3	GE3	GC7	GE7	GC14	GE14	GC21	GE21
Nenhuma	n								1
	%								10,00
Até 50	n	6	2	4	7	9	10	10	7
	%	60,00	20,00	44,44	70,00	90,00	100,00	100,00	70,00
De 51 a 100	n	2	4	3	2				1
	%	20,00	40,00	33,33	20,00				10,00
Acima de 100	n	2	4	2	1	1			1
	%	20,00	40,00	22,22	10,00	10,00			10,00

Tabela 2 - Avaliação percentual das células monomorfonucleares

CÉLULAS POLIMORFO- NUCLEARES		GRUPO							
		GC3	GE3	GC7	GE7	GC14	GE14	GC21	GE21
Nenhuma	n		1						
	%		10,00						
Até 50	n	10	9	4	4	6	8	6	8
	%	100,00	90,00	44,44	40,00	60,00	80,00	60,00	80,00
De 51 a 100	n			5	6	4	2	3	2
	%			55,56	60,00	40,00	20,00	30,00	20,00
Acima de 100	n							1	
	%							10,00	

Houve predomínio do estado inflamatório agudo apenas no terceiro dia, no grupo experimento ($p=0,023$). No sétimo dia, a reação inflamatória foi semelhante entre os grupos ($p=0,458$), o mesmo ocorrendo no décimo-quarto dia ($p=1$) e no vigésimo-primeiro dia ($p=1$) (tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação do estado inflamatório nos grupos controle e experimento

DIA DA EUTANÁSIA	GRUPO		SUBAGUDO	AGUDO	TOTAL	VALOR DE p*
3	GC3	n	8	2	10	0,023
		%	80,00	20,00		
	GE3	n	2	8	10	
		%	20,00	80,00		
7	GC7	n	7	2	9	0,458
		%	77,78	22,22		
	GE7	n	9	1	10	
		%	90,00	10,00		
14	GC14	n	9	1	10	1
		%	90,00	10,00		
	GE14	n	10	0	10	
		%	100,00	0,00		
21	GC21	n	10	0	10	1
		%	100,00	0,00		
	GE21	n	9	1	10	
		%	90,00	10,00		

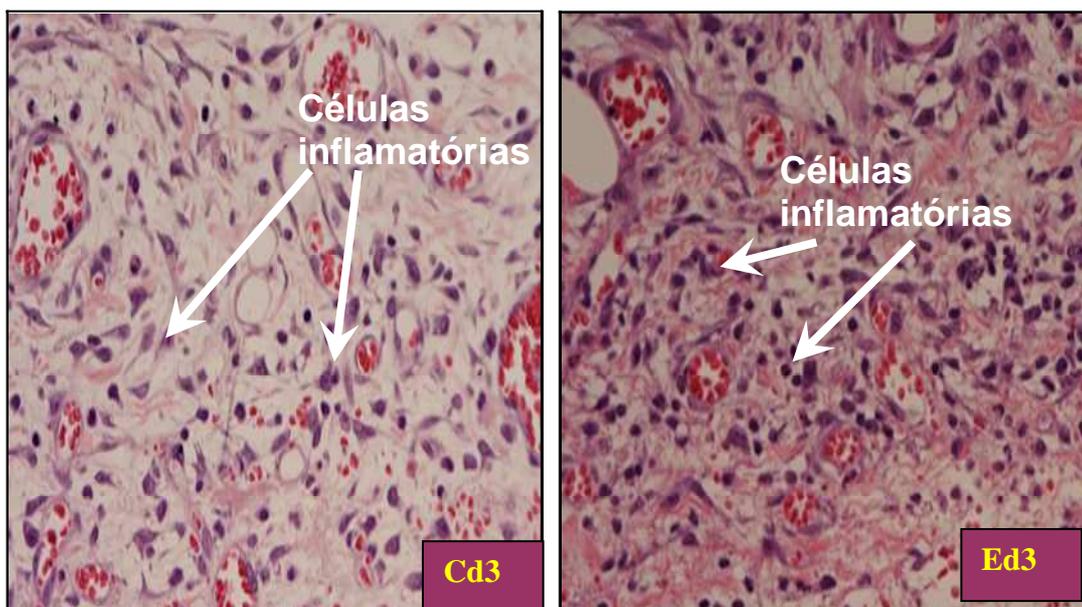


Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão do animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com três dias (d3) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.

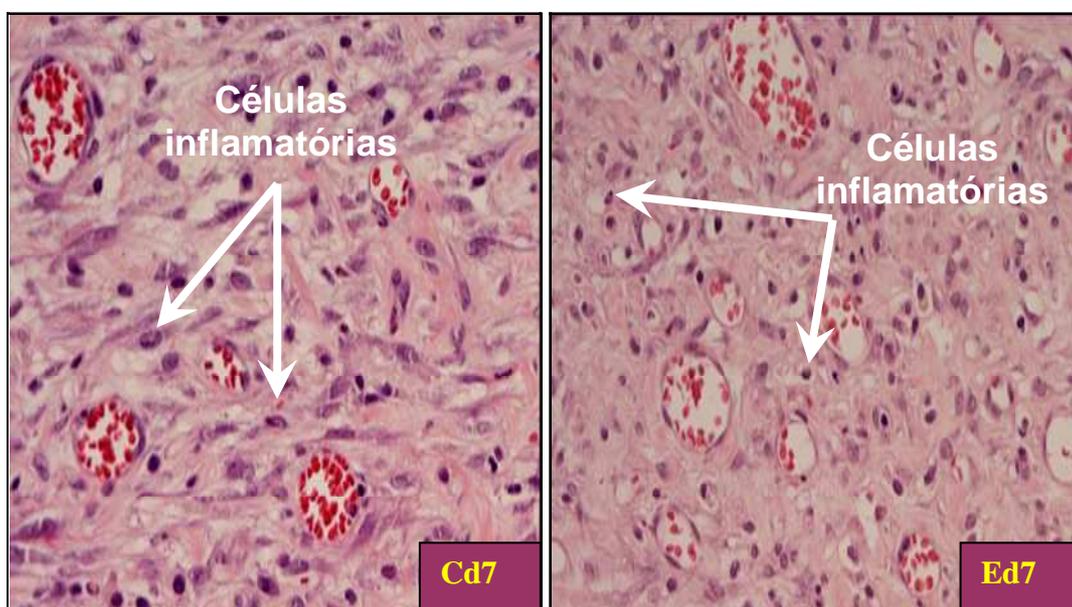


Figura 4 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com sete dias (d7) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.

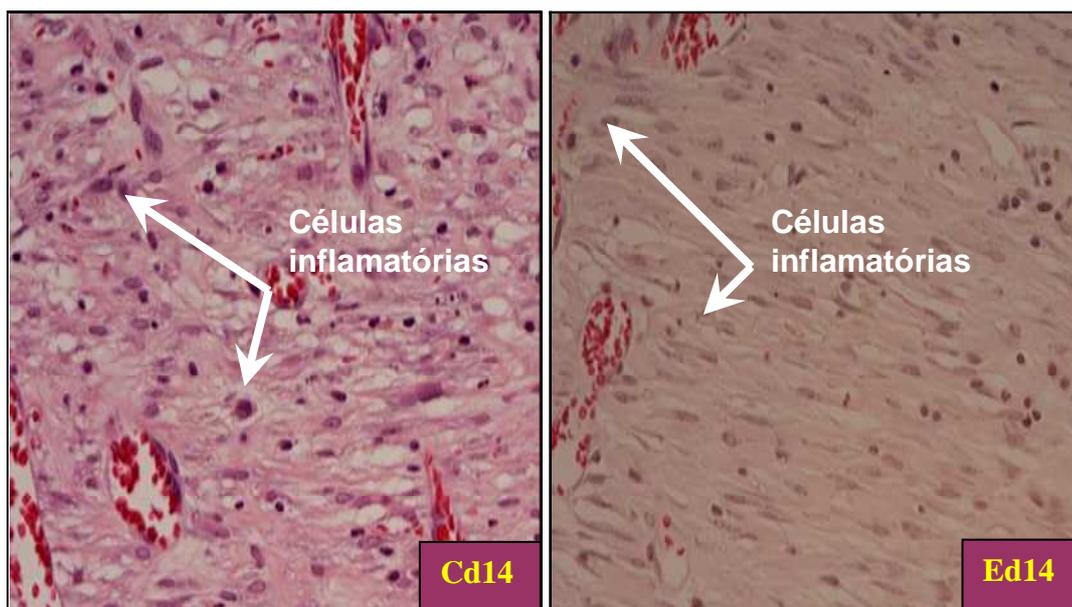


Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com quatorze dias (d14) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.

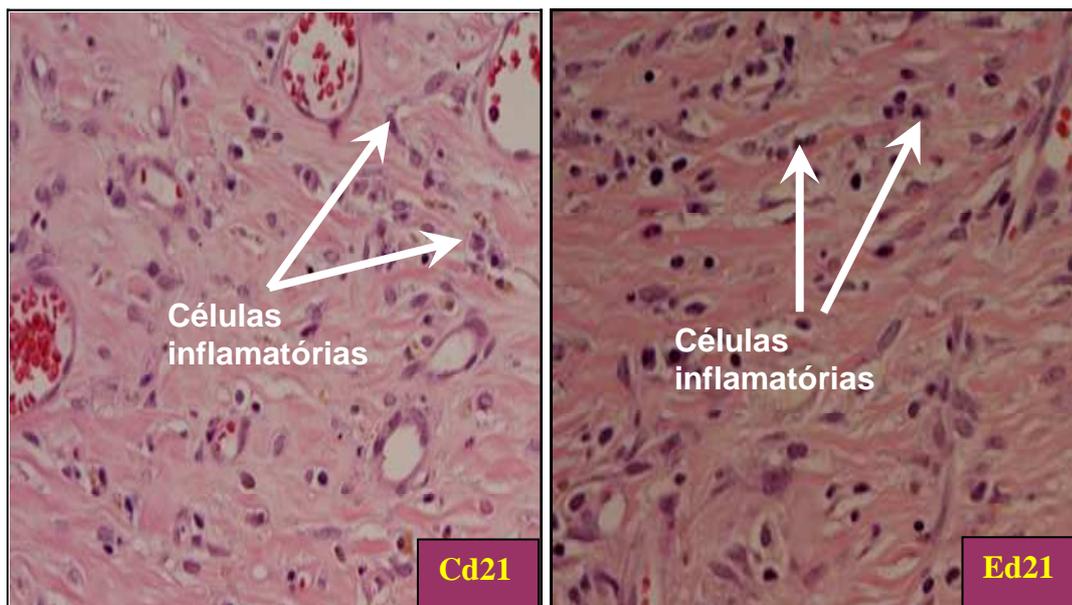


Figura 6 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com vinte e um dias (d21) de evolução. Hematoxilina-eosina 400X.

4.3.3 Colágeno

4.3.3.1 Avaliação do colágeno dos grupos controle e experimento

A concentração de colágeno total foi semelhante nos grupos controle e experimento, em todos os dias avaliados (figura7).

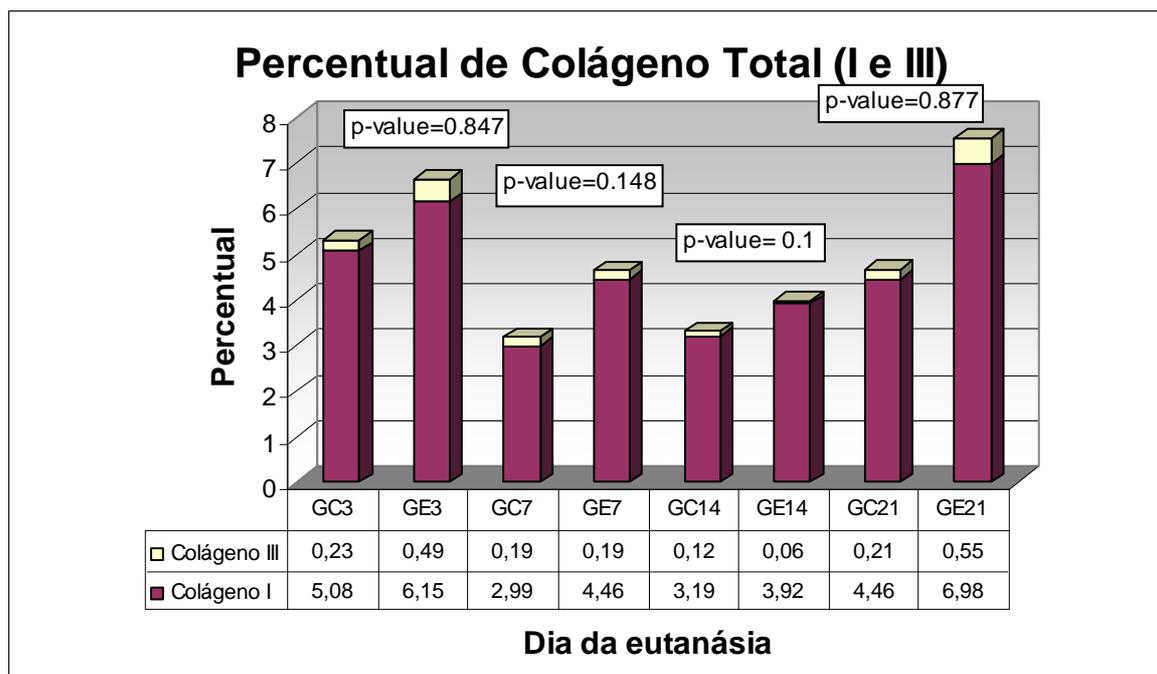


Figura 7 - Percentual de colágeno total nos grupos controle e experimento

4.3.3.2 Colágeno tipo I

A concentração de colágeno I, avaliada no terceiro dia, foi semelhante nos dois grupos ($p=0,383$). No sétimo dia foi maior no grupo experimento ($p=0,020$), no décimo-quarto dia foi semelhante ($p=0,354$) e voltou a ser maior no grupo experimento no vigésimo-primeiro dia ($p=0,016$) (figura 8).

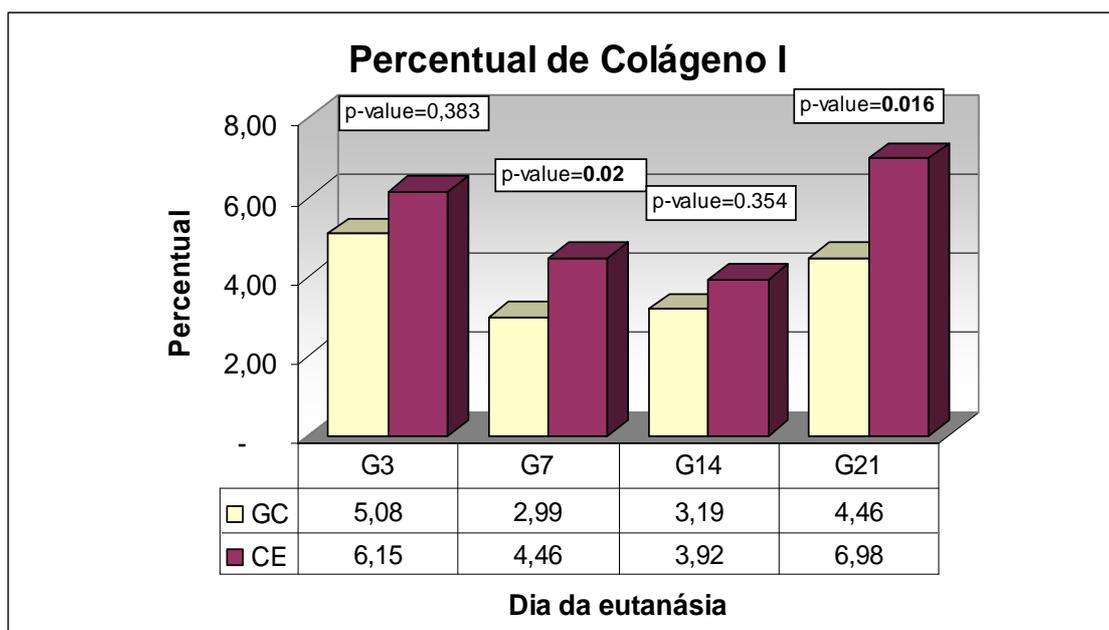


Figura 8 - Média dos percentuais de colágeno I nos cortes histológicos dos grupos controle e experimento

4.3.3.3 Colágeno tipo III

A concentração de colágeno III, avaliada no terceiro dia, foi semelhante entre os dois grupos ($p=0,095$). O mesmo ocorreu no sétimo e no décimo-quarto dia. No vigésimo-primeiro dia foi constatada uma maior concentração do colágeno III, no grupo experimento ($p=0,005$) (figura 9).

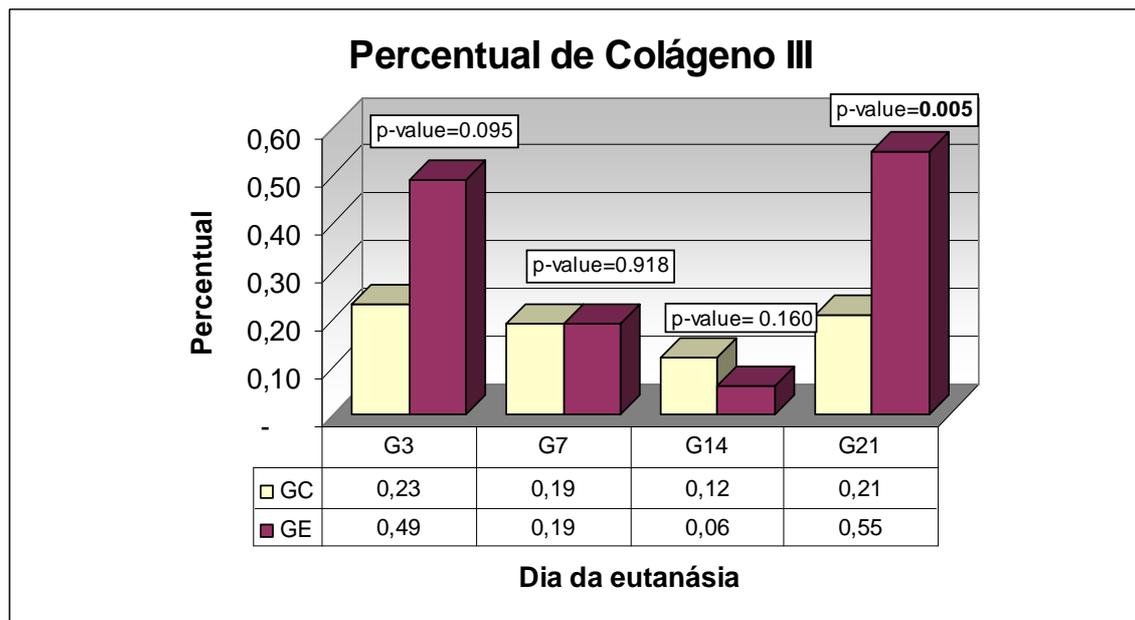


Figura 9 - Média dos percentuais das áreas ocupadas por colágeno III nos cortes histológicos dos grupos controle e experimento

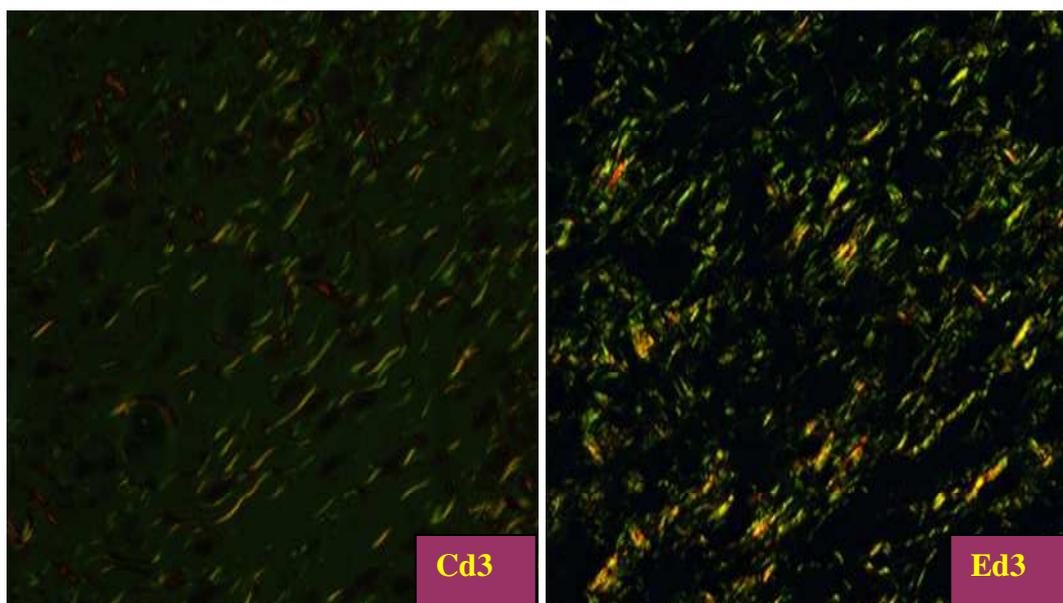


Figura 10 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com três dias (d3) de evolução. *Sirius Red* 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.

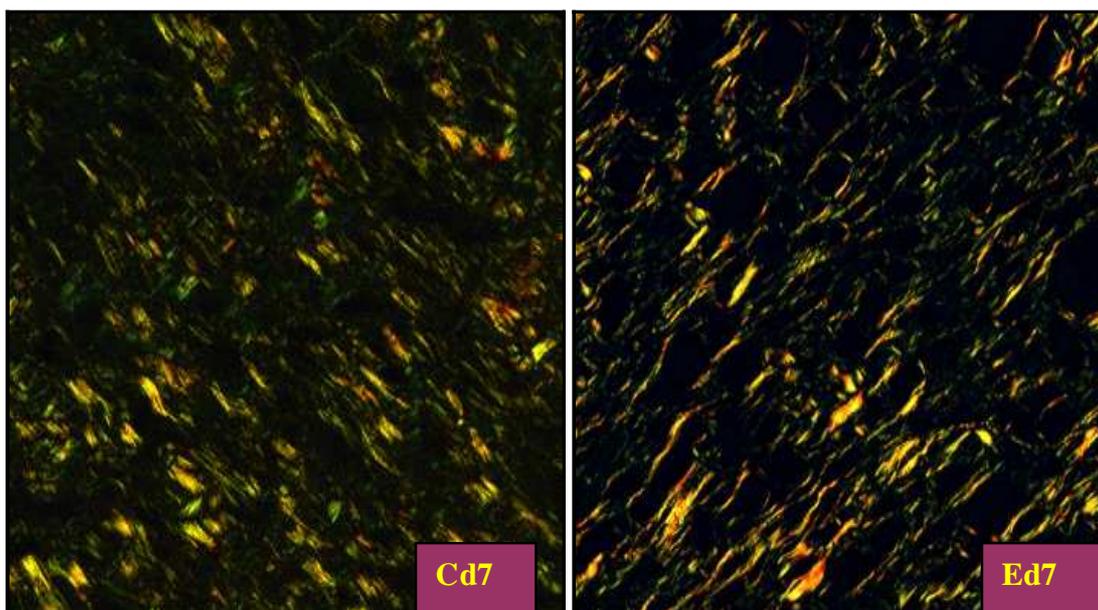


Figura 11 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com sete dias (d7) de evolução. *Sirius Red* 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.

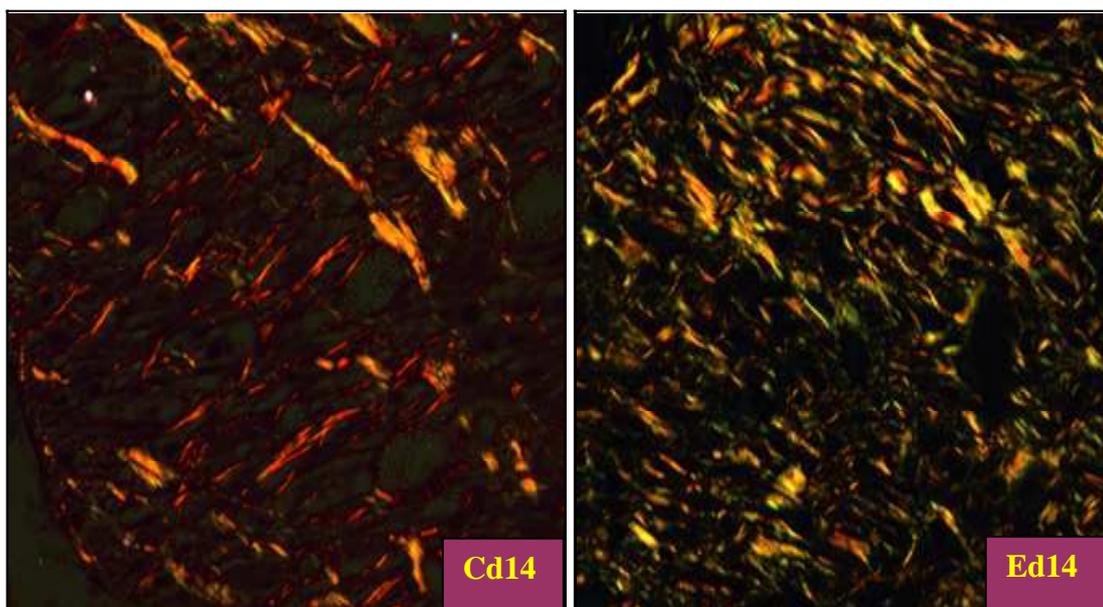


Figura 12 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com quatorze dias (d14) de evolução. *Sirius Red* 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.

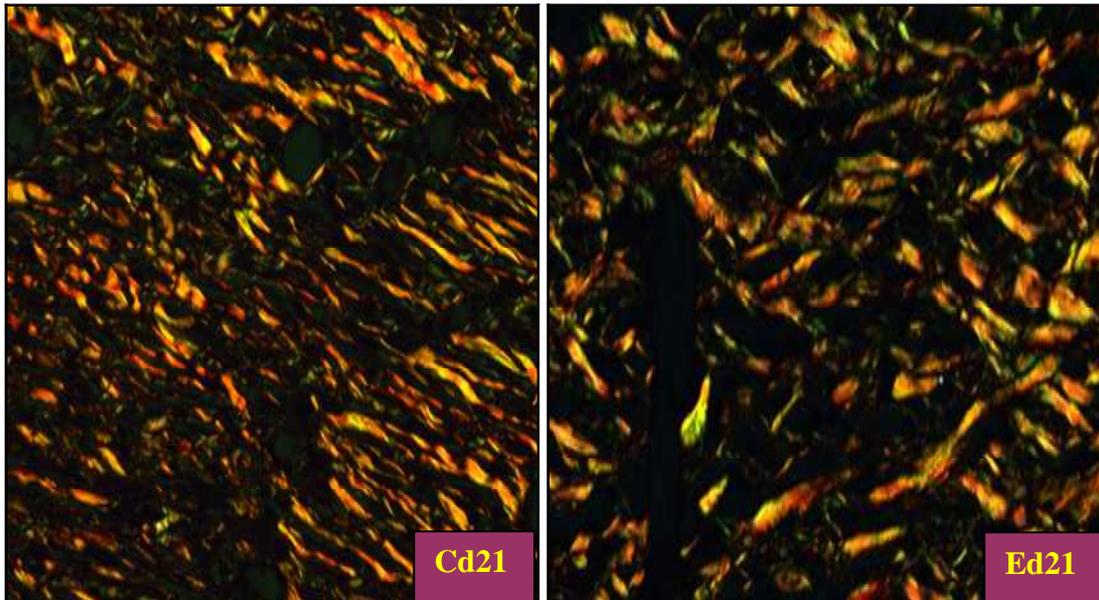


Figura 13 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com vinte e um dias (d21) de evolução. *Sirius Red* 200X. O colágeno tipo I apresenta-se nas cores laranja e vermelho; o colágeno tipo III, na cor verde.

4.3.4 Angiogênese

O número de vasos, avaliado no terceiro dia, foi maior no grupo experimento ($p < 0,001$). No sétimo dia, o número de vasos foi semelhante nos dois grupos ($p = 0,653$), passou a ser maior no grupo experimento no décimo-quarto dia ($p = 0,003$) e voltou a ser semelhante no vigésimo-primeiro dia ($p = 0,157$) (figura 14).

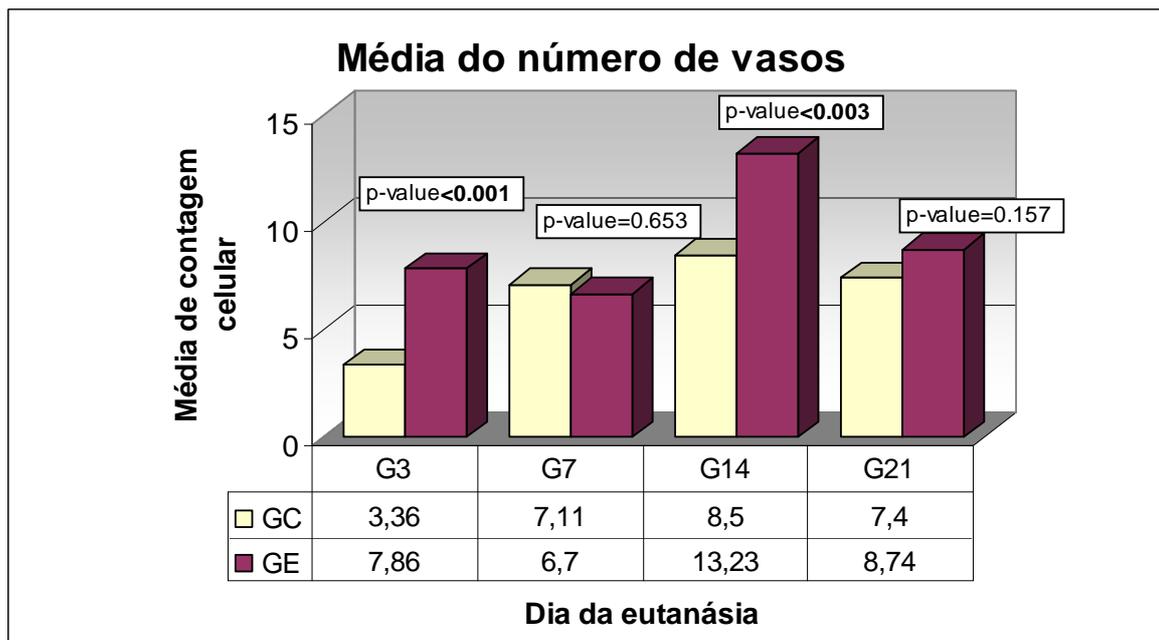


Figura 14 - Média do número de vasos nos cortes histológicos dos grupos controle e experimento

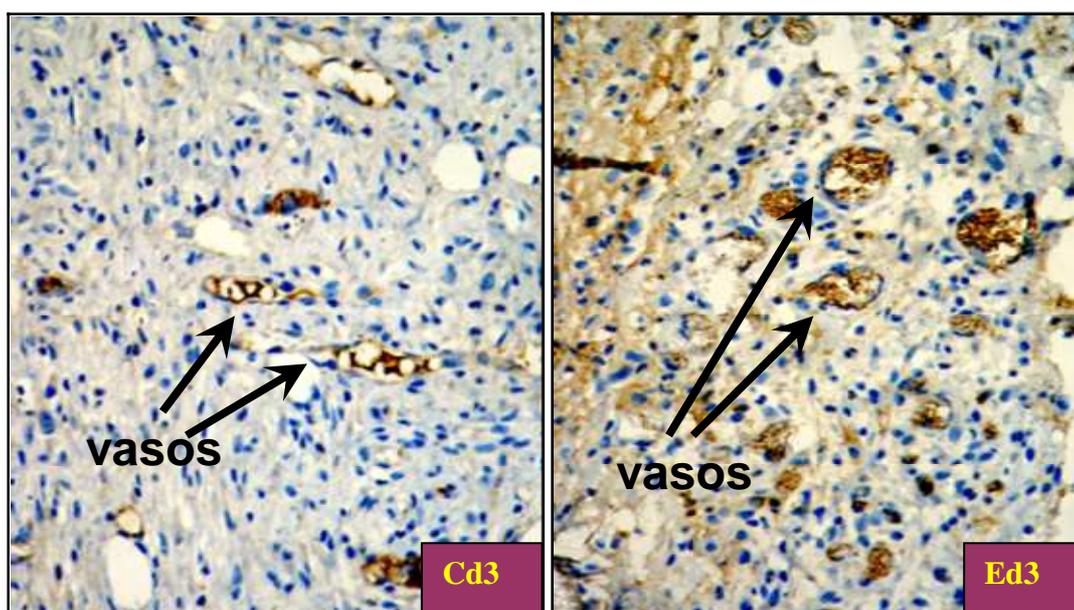


Figura 15 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com três dias (d3) de evolução. Anti-CD34 400X.

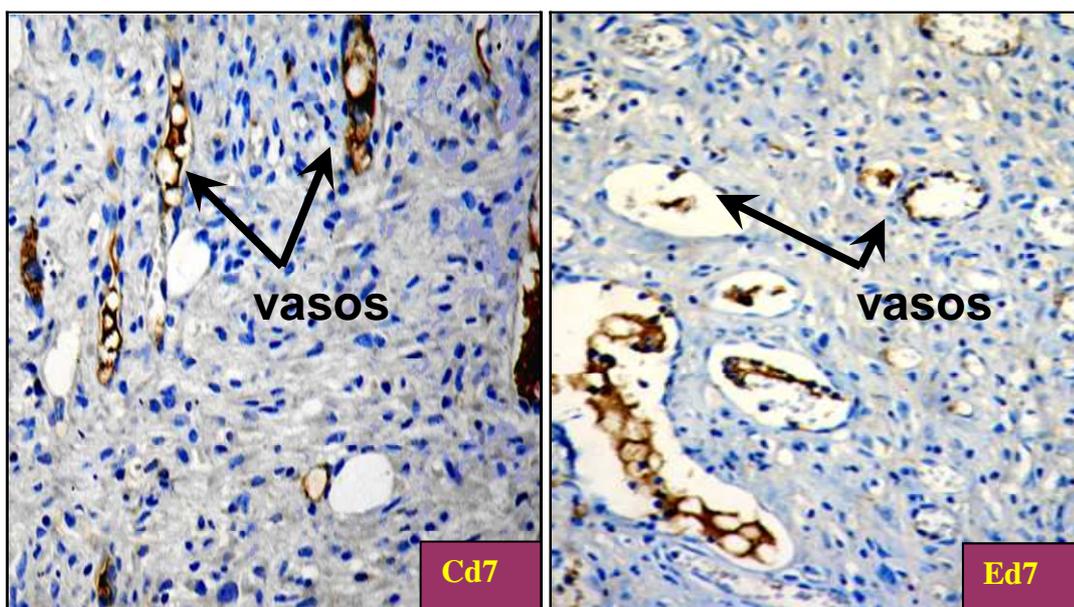


Figura 16 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com sete dias (d7) de evolução. Anti-CD34 400X.

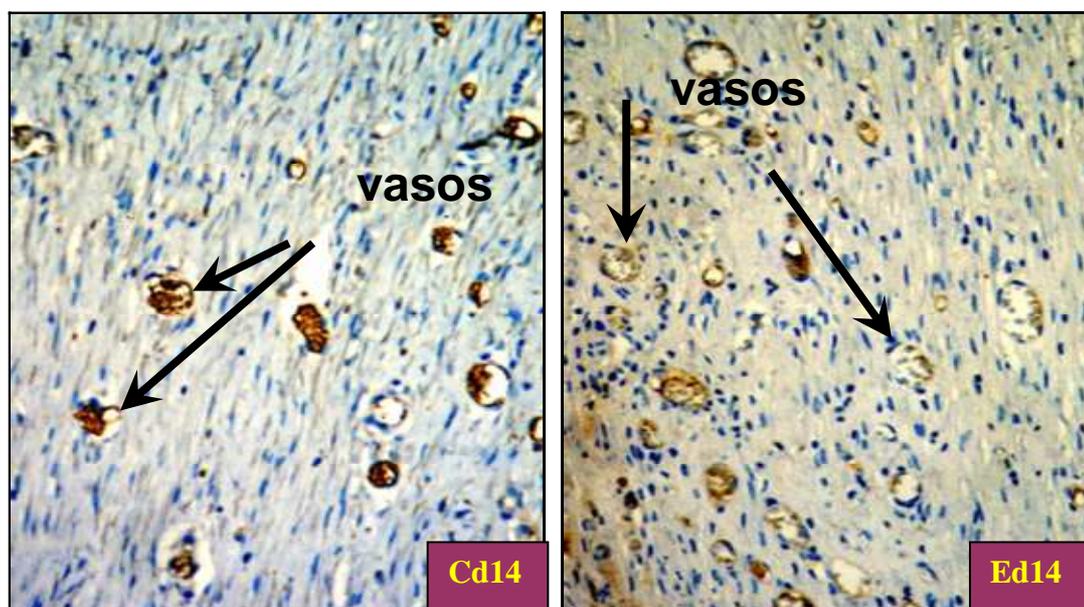


Figura 17 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com quatorze dias (d14) de evolução. Anti-CD34 400X.

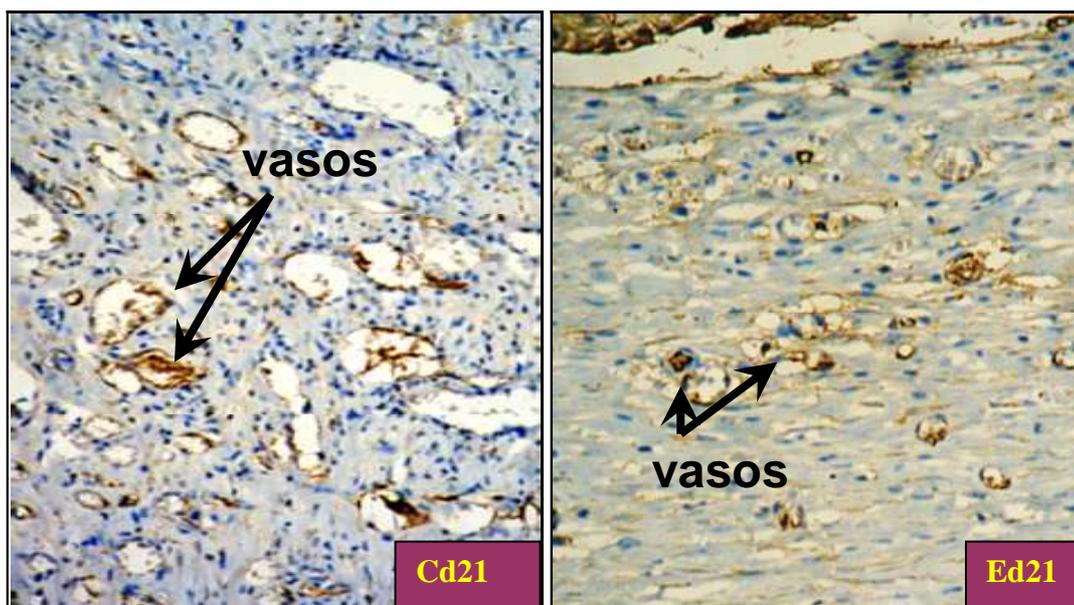


Figura 18 - Fotomicrografias de cortes histológicos da lesão de animal do grupo controle (C) e do grupo experimento (E), com vinte e um dias (d21) de evolução. Anti-CD34 400X.

4.4 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DOS RESULTADOS

Os resultados que apresentaram diferença significativa entre os grupos são apresentados no quadro 9.

Quadro 9 - Comparação dos grupos em relação à presença de bactérias em d14

		GC	GE
macroscopia	crostas	24h	48h
	reepitelização	72h	24h
	granulação	72h	24h
microscopia	inflamação d3 (agudo)	20%	80%
	colágeno I d7/d21		>
	colágeno III d21		>
	vasos d3/d14		>

5 DISCUSSÃO

Nicholson e Armstrong¹² referiram além da atividade anti-inflamatória do metronidazol, a presença de granulação precoce e a diminuição do edema. Walwaikar *et al.*⁶², também, referiram atividade anti-inflamatória do metronidazol.

Este estudo, no entanto, discorda de Nicholson e Armstrong¹² e Walwaikar *et al.*⁶², pois o grupo experimento demonstrou maior atividade inflamatória. A ação anti-inflamatória relatada por Nicholson e Armstrong¹² e Walwaikar *et al.*⁶², pode ter ocorrido em função da presença de granulação precoce e pela redução do edema e não por uma ação anti-inflamatória específica do metronidazol.

Considerando que houve predomínio de polimorfonucleares, no grupo experimento, é possível correlacionar o metronidazol à indução do maior afluxo de polimorfonucleares, tornando mais intensa a fase inflamatória.

Nicholson e Armstrong¹² relataram que o metronidazol induz à formação do tecido de granulação, de forma mais precoce. Na presente dissertação verificou-se tecido de granulação, precoce, macroscopicamente, com diferença de dois dias. Este resultado atribuiu-se à maior concentração de colágeno e vasos encontrada no grupo experimento, provavelmente, propiciada pela intensa fase inflamatória.

Rao *et al.*⁵⁴ referiram que o metronidazol tópico retarda o processo de epitelização. Na opinião dos autores a alta dosagem do metronidazol tópico, 10mg/kg, promoveu um efeito de citotoxicidade, retardando a cicatrização, sobrepujando seu efeito antioxidante.

No entanto, neste estudo utilizou-se uma dosagem maior, de 50mg/kg, em uso tópico, não registrando nenhum sinal de citotoxicidade. Talvez, o retardo cicatricial, encontrado por Rao *et al.*⁵⁴, tenha sido ao contrário da dedução dos autores, em função de uma baixa dosagem.

Com relação ao estudo de Rao *et al.*⁵⁴ deve-se considerar, ainda, o fato do gel possuir o menor padrão de absorção, comparado com as outras formulações⁵².

Mandelbaum *et al.*¹ referiram que a reepitelização é percebida, macroscopicamente, após três dias, fato confirmado no grupo controle, deste estudo, porém o tempo de reepitelização do experimento, teve início dois dias antes do grupo controle. Este fato corrobora com a hipótese da atividade aceleradora da cicatrização pelo metronidazol. O metronidazol impediu, também, a formação precoce das crostas.

Para que haja a reepitelização adequada além do estímulo pela falta de contato celular e fatores de crescimento, que ativam as células epidermais, há necessidade de um substrato, que somente é fornecido quando o tecido de granulação alcança a epiderme²⁹. Como os grupos experimentais apresentaram, nesta pesquisa, precocidade da granulação, maior concentração de colágeno e maior número de vasos, era esperada a precocidade da reepitelização.

É na fase inflamatória que tem-se a vasodilatação, o aumento da permeabilidade capilar, a ativação dos fibroblastos e a indução da formação do tecido de granulação¹⁹.

A maior atividade inflamatória registrada no grupo experimento foi, provavelmente, a responsável pela maior concentração de colágeno, que culminou com a granulação precoce. O metronidazol pode ter ativado os fibroblastos de forma a produzirem maior quantidade de colágeno.

Nesta presente pesquisa, os grupos experimento apresentaram as maiores taxas de colágeno. O colágeno I teve suas médias maiores, no sétimo e no vigésimo-primeiro dia e o colágeno III apresentou maior concentração no vigésimo-primeiro dia. Não se pode afastar a possibilidade de que se a amostra fosse maior, os resultados seriam significantes nos demais dias avaliados.

O fibroblasto é uma célula reguladora, devido a sua função de síntese e reabsorção de colágeno, promovendo o equilíbrio qualitativo e quantitativo desta proteína. O fibroblasto sintetiza fibrilas colágenas tipo I e III, sendo responsável pelas substituições das fibrilas de colágeno do tipo III, pelo tipo I²¹.

É provável que, de alguma forma, o metronidazol interfira no padrão fisiológico do fibroblasto, promovendo maior síntese de fibrila colágena III, ou menor reabsorção da mesma, conferindo ao colágeno um padrão de imaturidade.

A cicatrização depende da vascularização, além da capacidade de produzir colágeno. A vascularização promove a chegada das células ao sítio inflamatório, o aporte de nutrientes e de oxigênio.

Para Reed *et al.*²³ a formação de vasos é modulada pelo TGF- β e pelas proteínas da matriz. Este fator aumenta a produção de citocinas, as quais induzem a angiogênese; estimula a produção do colágeno tipo I e inibe a produção de colagenase intersticial.

Ingberg e Folkman²⁷ referem que o colágeno tipo I encontra-se entre as proteínas da matriz que regulam o reparo das feridas, estimulando a formação de vasos.

O metronidazol poderia, em uma dosagem adequada, propiciar os fibroblastos a produzirem mais colágeno, promovendo o aumento da neovascularização.

Os resultados deste estudo demonstraram angiogênese em maiores proporções na presença do metronidazol.

Pela avaliação dos resultados da histologia, há uma impossibilidade de reconhecer se o metronidazol tem ação direta ou facilitadora na cicatrização.

Este estudo afasta a possibilidade do melhor resultado encontrado nas feridas do grupo experimento se dever ao fato do metronidazol ser um antibiótico, tendo atuação sobre a replicação bacteriana ou mesmo sobre a replicação das bactérias colonizadoras promovendo um efeito acelerador do processo cicatricial, uma vez que os resultados das culturas não apresentaram diferenças significantes.

Pode ocorrer que o metronidazol atue aumentando a atividade inflamatória, tendo como consequência um maior afluxo de fibroblastos, no sítio da lesão. Na seqüência, faria com que estes fibroblastos produzissem uma maior quantidade de colágeno. O colágeno tipo I aumentaria o padrão de neovascularização.

Sendo que a angiogênese aumenta o aporte de nutrientes e o ingresso celular na região afetada, promovendo menor tempo de cicatrização²⁹, pelos resultados encontrados concluiu-se que o metronidazol propiciou maior angiogênese, promovendo a precocidade da cicatrização.

A precocidade da granulação e da reepitelização parece não ter relação com a via utilizada e a dosagem, pois Prasad e Rao¹⁰, Rao *et al.*¹¹ Girish e Patil¹³ e utilizaram a via oral; Rao *et al.*⁵⁴ e o presente estudo utilizaram uso tópico. Todos utilizaram dosagens diferentes: 108mg/kg, 180mg/kg, 160mg/kg, 10mg/kg

e 50 mg/kg, respectivamente. No entanto, os resultados alcançados foram favoráveis à reepitelização precoce.

A dosagem de metronidazol utilizada nesta pesquisa de 50mg/kg pareceu uma dosagem intermediária efetiva, do ponto de vista pró-cicatricial, capaz de propiciar maior produção do colágeno; Girish e Patil¹³ que utilizaram a dosagem de 108mg/kg apresentaram maior quantidade de colágeno. A dosagem, utilizada por Borden *et al.*⁵⁷, 20mg/kg, provavelmente, não alcançou um valor mínimo capaz de promover alteração na quantidade de hidroxiprolina e culminou com atraso na cicatrização e a alta dose, utilizada por Prasad e Rao¹⁰, 160mg/kg, pode ter sido responsável, também, pela diminuição na quantidade de hidroxiprolina e retardo cicatricial por citotoxicidade. Deve-se, ainda, considerar que Girish e Patil¹³, Borden *et al.*⁵⁷ e Prasad e Rao¹⁰ utilizaram via enteral e neste estudo utilizou-se uso tópico.

Provavelmente, a dosagem represente o limite qualificador para o efeito do metronidazol sobre a síntese de colágeno. Assim, dosagens baixas como a utilizada por Borden *et al.*⁵⁷ (20mg/kg) não propiciariam uma maior síntese de colágeno; entretanto, dosagens altas, como exemplo, a utilizada por Prasad e Rao¹⁰ (160mg/kg) apresentariam um efeito citotóxico sobre os fibroblastos, inibindo a produção do colágeno.

Esta pesquisa utilizou 50mg/kg, em uso tópico, com sucesso na maior síntese de colágeno, havendo, obviamente, um destaque para o uso tópico, em função de sua baixa taxa de absorção sistêmica⁶⁰.

Deve-se, ainda, registrar a importância de se obter, com uso tópico, resultados compatíveis ao uso enteral, lembrando que a taxa de absorção sistêmica para o uso tópico é baixa, 0,6 µg/ml, após quatro horas da aplicação do metronidazol gel 25%; sendo de 5 a 10 µg/ml, após 250 e 500 mg, respectivamente, via endo-venosa⁵³.

Como a dosagem parece ser o fator definidor da ação pró-cicatricial, há que se estabelecer com relação ao metronidazol, tópico, a dosagem mínima que determine a precocidade da cicatrização.

6 CONCLUSÕES

Analisando os resultados pôde-se concluir que, no rato:

1. o metronidazol propicia a precocidade da epitelização e da formação do tecido de granulação;
2. o metronidazol propicia maior produção de colágeno I em no sétimo e no vigésimo-primeiro dia;
3. o metronidazol propicia maior produção de colágeno III no vigésimo-primeiro dia;
4. o metronidazol propicia maior angiogênese no terceiro e no décimo-quarto dia.

REFERÊNCIAS

1. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares/ Parte I. An Bras Dermatol. 2003; 78(4): 393-410.
2. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte II. An Bras Dermatol. 2003; 78(5):525-42.
3. Pressure ulcer stages revised by NPUAP. National Pressure Ulcer Advisory Panel 2007. Disponível em URL: <http://www.npuap.org/pr2htm> Acessado em 19/08/08.
4. Feridas: úlcera de pressão. Disponível em URL: <http://www.eerp.usp.br/projetos/feridas/defpres.html> Acessado em 19/08/08.
5. Costa MP, Sturtz G, Costa FPP, Ferreira MC, Barros-Filho TEP. Epidemiologia e tratamento das úlceras de pressão: experiência de 77 casos. Acta ortop bras 2005;13(3):124-33.
6. Isik F, Engrav L, Rand R, Kierney P, Cardenas D. Reducing the period of immobilization following pressure sore surgery: a prospective, randomized trial. Plastic and reconstructive surgery. 1997;100(2):350-4.
7. Ereno D. Curativo de Borracha. Revista Pesquisa Fapesp, n.º88, junho de 2003. Disponível em URL: <http://www.fapesp.org.br/www.revistapesquisa.fapesp.br>. Acessado em 19/08/2008.
8. Morais GFC, Oliveira SHS, Soares MJGO. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. Texto contexto enferm. 2008; 17(1):98-105.
9. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE *et al*. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. Arch Dermatol. 1994;130(4):489-93.
10. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. Indian J Exp Biol. 1995; 33(11):845-7.
11. Rao CM, Glosch A, Raghothama C, Bairy KL. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? Burns. 2002; 28(5):427-9.
12. Nicholson TJ, Armstrong D. Topical metronidazole (10 percent) decreases posthemorrhoidectomy pain and improves healing. Dis Colon Rectum. 2004; 47(5):711-6.
13. Girish MB, Patil PA. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. Indian J Pharmacol. 2005;37(4):247-50.
14. Poletti NAA, Caliri MHL, Simão CDSR, Juliani KB, Tácito VE. Feridas malignas: uma revisão de literatura. Rev bras cancerol. 2002;48(3):411-17.

15. Kalinski C, Schnepf M, Laboy D, Hernandez L, Nusbaun J, McGrinder B, Comfort C, Alvarez OM. Effectiveness of a topical formulation containing metronidazole for wound odor and exudate control. *Wounds*. 2005;17(4):84-90.
16. Dieter MF. Ação do medicamento canova na cicatrização do dorso de camundongo após incisão e sutura: avaliação macro e microscópica [dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
17. Robson MC. Wound infection. A failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am*. 1997 ; 77(3):637-50.
18. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005;31(6):674-86.
19. Hanson D, Langemo D, Thompson P, Anderson J, Hunter S. Understanding wound fluid and the phases of healing. *Adv Skin Wound Care*. 2005;18(7):360-2.
20. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*.1999; 341(10):738-46.
21. Simões MJ, Cabral ACV, Boyaciyan K, Kulay Júnior L. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. *Rev paul med*. 1986;104(3):132-5.
22. Kurzer G, Erika L, Kurzer AS. Reparación de heridas de piel y mucosas. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia*. 1999;11(1):5-14.
23. Reed MJ, Corsa A, Pendergrass W, Penn P, Sage EH, Abrass IB. Neovascularization in aged mice. Delayed angiogenesis is coincident with decrease levels of transforming growth factor basic 1 and type I collagen. *Am J Pathol*. 1998;152(1):113-23.
24. Eiján AM, Davel L, de Lusting ES. Modulation de la angiogenesis inducida por linfocitos por proteína de la matriz extracelular. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 1993; 43(3-4): 53-7.
25. Grinnell F, Billingham RE, Burgess L. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol*. 1981;76(3):181-9.
26. Thakral KK, Goodson WH , Hunt TK. Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. *J Surg Res*. 1979;26(4):430-6.
27. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol*. 1989; 109(1):317-30.
28. Souza DW, Machado TSL, Zoopa ALV, Cruz RSF, Gárague AP, Silva LCLC. Ensaio da aplicação de creme à base de *Triticum vulgare* na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em equinos. *Rev Bras PI Med*. 2006;8(3):9-13.
29. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005; 41(1):27-51.
30. Martin P. Wound healing: aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81.
31. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(9):4219-23.

32. Health Services/ Technology/ Assesment Text. Wound-healing technologies: low-level laser and vacuum-assisted closure. AHRQ Publication number 05-E005-1 december 2004. Disponível em URL: <http://www.ahrq.gov/clinic/epcsums/woundsum.htm> Acessado em 19/08/08.
33. Chow AW, Bendnorz D, Guze LB. Susceptibility of obligate anaerobes to metronidazole: an extend study of 1,054 clinical isolates. Proceedings of the Internacional Metronidazole Conference, Montreal, Quebec, Canadá. Excerpta Medica. 1977;286-92.
34. Warner JF, Perkins RL, Cordero L. Metronidazole therapy of anaerobic bacteremia, meningitis and brain abscess. Arch Intern Med. 1979; 139(2):167-9.
35. Sutter VL, Finegold SM. In vitro studies with metronidazole against naerobic bacteria. In Finegold, S.M.(ed): Metronidazole. Proceedings of the Internacional Conference, Montreal, Quebec, Canadá. Excerpta Medica. 1977;279-85.
36. Ings RMJ, Constable FL. An investigation into the effect of metronidazole on the morphology of *Trichomonas vaginalis*. J Antimicrob Chemother.1975;1(1):121-6.
37. Ingham HR, Selkom JB, Roxby CM. The bacteriology and chemotherapy of cerebral abscesses secondary to middle ear disease and dental sepsis. Royal Society of Medicine Internacional Congress and Symposium Series, nº 18. Royal Society of Medicine and Academic Press. 1979; 18:91-5.
38. Jokipii AM, Myllylä VV, Hokkanen E, Jokipii L. Penetration of the blood brain barrier by metronidazole and tinidazole. J Antimicrob Chemother.1977;3(3): 239-45.
39. Lerner PI. Susceptibility of pathogenic actinomycetes to antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother.1974;5(3):302-9.
40. George RH, Bint AJ. Treatment of a brain abscess due to *Bacteroides fragilis* with metronidazole. J Antimicrob Chemoter.1976;2(1):101-2.
41. Ingham HR, Rich GE, Selkon JB, Hale JH, Roxby CM, Betty MJ, *et al.* Treatment with metronidazole of three patients with serious infections due to *bacteroides fragilis*. J Antimicrob Chemother.1975; 1(2):235-42.
42. Shinn DL. Vincent's disease and its treatment. Proceedings of the Internacional Metronidazole Conference, Montreal, Quebec, Canadá. Excerpta Medica .1977;334-40.
43. O' Grady LR, Ralph ED. Anaerobic meningitis and bacteremia caused by *Fusobacterium* species. Am J Dis Child.1976; 130(8):871-3.
44. Edwards DI, Dye M, Carne H. The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclicdrugs. J Gen Microbiol.1973; 76(1):135-45.
45. Lindmark DG, Müller M. Antitrichomonad action, mutagenecity and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. Antimicrob Agents Chemother.1976;10(3) :476-82.
46. O' Brien RW, Morris JG. Effect of metronidazole on hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum*. Arch Mikrobiol.1972; 84(3):225-33.

47. LaRusso NF, Tomasz M, Kaplan D, Müller M. Absence of strand breaks in deoxyribonucleic acid treated with metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978; 13(1):19-24.
48. Müller M. Mode of action of metronidazole on anaerobic microorganisms. In Phillips I, and Collier J (eds): *Metronidazole (Royal Society of Medicine International Congress and Symposium series N°: 18)* London, Royal Society of Medicine and Academic Press. 1979; pag 223.
49. Chien YW, Mizuba SS. Activity–electroreduction relationship and antimicrobial metronidazole analogues. *J Med Chem.* 1978; 21(4):374-80.
50. Edwards DI, Knight RC, Kantor I. Interaction of nitroimidazole drugs with DNA. *Proceedings of the Tenth International Congress of Chemotherapy, volume II.* American Society of Microbiology. 1978; 714-6.
51. Poi WR. Influência da pasta à base de metronidazol a 10 por cento e lidocaína a 2 por cento sobre o processo de reparo em alvéolo dental infectado : análise histológica e histométrica em ratos [tese de doutorado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 1996.
52. Elewski BE. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. *Adv Ther.* 2007; 24(2): 239-46.
53. Stolze K, Stellfeld M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(9pt2): 693-7.
54. Rao CM, George KM, Bairy KL, Somayaji SN. An appraisal of the healing profiles of oral and external (gel) metronidazole on partial thickness burn wounds. *Indian J Pharmacol.* 2000; 32(5):282-7.
55. Noyan U , Yilmaz S , Kuru B ; Kadir T , Acar O , Buget E . A clinical and microbiological evaluation of systemic and local metronidazole delivery in adults periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 1997;24(3):158-65.
56. Bonnes G. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochemical Pharmacol.* 1992;44(5):895-8.
57. Borden EB, Sammartano RJ, Dembe C, Boley SJ. The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgery.* 1985; 97(3):331-6.
58. Salem RJ, Johnson J, Devitt P. Short term metronidazole therapy contrasted with povidone-iodine spray in the prevention of wound infection after appendectomy. *Br J Surg.* 1979;66(6):430-1.
59. Trindade Neto PB, Rocha KBF, Lima JB, Nunes JCS, Oliveira e Silva AC. Rosácea granulomatosa: relato de caso- enfoque terapêutico. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(supl 3): 320-3.
60. Pedrazzoli V, Kilian M, Karring T. Comparable clinical and microbiological effects of topical subgingival application of a 25% metronidazole gel and scaling in the treatment of a adult periodontitis. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(9pt2): 715-22.
61. Mitchell DA. Metronidazole: its use in clinical dentistry. *J Clin Periodontol.* 1984. 11(3):145-8.

62. Walwaikar PP, Morye VK, Gawde AS. Open, prospective trial to evaluate the efficacy and safety of combination of metronidazole and povidine comparison to povidine iodine alone in pre and postoperative sterilization and surgical wound healing. *J Indian Med Assoc.* 2002; 100(10):615-8.
63. Sharp PE, La Regina MC. *The laboratory rat*. Washington: CRC Press; 1998. p. 103-12.
64. Pereira AL, Bachion MM. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev bras enferm.* 2005;58(2):208-13.
65. Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2003. p. 829. 10ª edição.
66. Brito NMB, Silva PRF, Silva GCF, Casella SFM, Sampaio ARS, Carvalho RA. Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas, em ratos, tratadas com óleo de andiroba. *Rev para med.* 2001; 15(2):17-22.
67. Vizzotto Junior AO, Noronha L, Scheffel DLH, Campos ACL. Influência da cisplatina administrada no pré e pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. *J Bras Patol Med Lab.* 2003;39(2):143-49.
68. Junqueira LC, Bignolas G, Bretani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447-55.
69. Hussein MR. Evaluation of angiogenesis in normal and lichen planus skin by CD34 protein immunohistochemistry: preliminary findings. *Cell Biol Int.* 2007; 31(10): 1292-295.
70. Pisacane AM, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cell Oncol.* 2007; 29(1): 59-66.

NORMAS ADOTADAS

Normativa de Vancouver: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals do International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org).

Normativa da Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 14.724- informações e documentos, trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997; 126(1):36-47.

International Anatomical Nomenclature Committee. *Nomina histologica*. 2nd ed. New York: Ithaca, 1983.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature: *Nomina anatomica veterinária*. 3rd ed. New York: Ithaca, 1983.

Becker I [editor]. *Nomenclatura anatômica da língua portuguesa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

APÊNDICE I

MAPEAMENTO IMUNOISTOQUÍMICA

Lâmina 01 - Controle D3 - C1D3

	A	B	C
4	C1 R7 D3	C1 R4 D3	C1 R1 D3
3	C1 R8 D3	C1 R5 D3	C1 R2 D3
2	C1 R9 D3	C1 R6 D3	C1 R3 D3
1	C1 R10 D3		

Lâmina 02 - Controle D7 - C2D7

	A	B	C
4	C2 R17 D7	C2 R14 D7	C2 R11 D7
3	C2 R18 D7	C2 R15 D7	C2 R12 D7
2	C2 R19 D7	C2 R16 D7	C2 R13 D7
1	C2 R20 D7		

Lâmina 03 - Controle D14 - C3D14

	A	B	C
4	C3 R27 D14	C3 R24 D14	C3 R21 D14
3	C3 R28 D14	C3 R25 D14	C3 R22 D14
2	C3 R29 D14	C3 R26 D14	C3 R23 D14
1	C3 R30 D14		

Lâmina 04 - Controle D21 - C4D21

	A	B	C
4	C4 R37 D21	C4 R34 D21	C4 R31 D21
3	C4 R38 D21	C4 R35 D21	C4 R32 D21
2	C4 R39 D21	C4 R36 D21	C4 R33 D21
1	C4 R40 D21		

Lâmina 05 - Experimento D3 - E1D3

	A	B	C
4	E1 R7 D3	E1 R4 D3	E1 R1 D3
3	E1 R8 D3	E1 R5 D3	E1 R2 D3
2	E1 R9 D3	E1 R6 D3	E1 R3 D3
1	E1 R10 D3		

Lâmina 06 - Experimento D7 - E2D7

	A	B	C
4	E2 R17 D7	E2 R14 D7	E2 R11 D7
3	E2 R18 D7	E2 R15 D7	E2 R12 D7
2	E2 R19 D7	E2 R16 D7	E2 R13 D7
1	E2 R20 D7		

Lâmina 07 - Experimento D14 - E3D14

	A	B	C
4	E3 R27 D14	E3 R24 D14	E3 R21 D14
3	E3 R28 D14	E3 R25 D14	E3 R22 D14
2	E3 R29 D14	E3 R26 D14	E3 R23 D14
1	E3 R30 D14		

Lâmina 08 - Experimento D21 - E4D21

	A	B	C
4	E4 R37 D21	E4 R34 D21	E4 R31 D21
3	E4 R38 D21	E4 R35 D21	E4 R32 D21
2	E4 R39 D21	E4 R36 D21	E4 R33 D21
1	E4 R40 D21		

ANEXO I

ANEXO II

IMUNOISTOQUÍMICA CD34- TÉCNICA

As peças retiradas do cassete foram emblocadas em parafina. Encaminhadas para cortes histológicos em micrótomo de parafina e os cortes com espessura de cinco micra foram estendidos em lâminas, previamente lavadas em solução sulfocrômica, emulsionadas com adesivo à base de poli-L-lisina (Poly-L-Lysine, da marca sigma, USA, código P8920) a 10% e colocadas em estufa a 60°C durante 12 horas para melhor aderência desses às lâminas .

Depois de identificadas por cada anticorpo as lâminas voltaram à estufa a 60°C por 20 minutos e, a seguir, foram colocadas em 3 banhos de xilol 5 minutos cada e em 3 banhos de álcool em concentrações decrescentes de 95%, 70%, 50% e água corrente 5 minutos, conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente. Em seguida a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol a 70% durante 20 minutos, então as lâminas foram lavadas em água destilada.

A recuperação antigênica seguiu os procedimentos descritos nos *data-sheet* destes. As lâminas do anticorpo ACTINA LISA (dil.:1:250) marca Dako código M0851 e CD34 (dil.:1:250) marca Dako código M7165 foram mergulhadas em tampão citrato de sódio a 0,01M com ph igual a 6.0 em câmara de pressão PASCAL 2,5 minutos, quando começava a pressão (temperatura chegava a 117°C). Depois de desligada, quando a temperatura chegava a 90°C, a câmara de pressão já estava pronta para abrir.

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão PBS ph 7,4 com TWIN 20 marca Sigma código P7949 para diminuir o *background*, foram 3 banhos de 5 minutos cada.

Em seguida os cortes foram ciclados por uma caneta hidrofóbica da marca Dako código S2002, para evitar que a solução com o anticorpo diluído escorresse, e incubados com os anticorpos, previamente, diluídos em uma solução de PBS-TWIN20+BSA a 0,1% (solução para bloquear as proteínas inespecíficas). Após uma hora de reação em temperatura ambiente foi aplicado o kit da Easy Path ABC Universal, sendo que ao fim de cada etapa as lâminas são lavadas em tampão PBS-TWIN20.

A seguir foi adicionado o cromógeno DAB marca Dako código K3468 por 30 segundos a 1 minuto em média. Em seguida as lâminas foram lavadas em

água destilada e contracoradas em hematoxilina de Harris, azuladas em água corrente (núcleos em azul para revelar a morfologia do tecido), desidratadas em álcool com concentrações crescentes 50%, 70%, 90% e P.A. e depois 4 banhos em xilol e finalmente montadas com goma Damar da marca Proquímios para fixação das lamínulas e posterior observação ao microscópio óptico. Os cortes foram pescados para as lâminas. Foram mantidos em estufa por 24h, para melhor aderência à lâmina. Sofreram desparafinização e desidratação em álcool®.