



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

*616-001.1-08
C957-1.
TES/MEN*

**Efeitos da sulfadiazina de prata em feridas
cirúrgicas experimentalmente induzidas em
camundongos isogênicos BALB/c. Aspectos
morfológicos, microbiológicos, imunológicos e
hematológicos**

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte de
obtenção do título de Mestre*

SINVAL SOARES CRUVINEL
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO
UBERLÂNDIA

2000

SISBI/UFU



1000204855



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Colegiado do Programa de Pós-
Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como parte de
obtenção do título de Mestre*

SINVAL SOARES CRUVINEL

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA APARECIDA DE SOUZA

UBERLÂNDIA

2000

Dedico este trabalho:

À minha esposa Inês e meu filho Sinval Júnior pelo apoio, carinho, paciência e renúncia aos momentos de lazer que não tivemos.

A meus pais Dinah e Genu por terem me proporcionado a chance de nascer, viver e ensinar a ética.

A meus irmãos Sandoval, Hercília, Maria Odete, Genu, Diná e Maria Beatriz pelo carinho.

Aos meus cunhados e cunhadas Ana Maria, Carlos, Luciano, Márcia e Wanderley pela nossa amizade.

A meus sobrinhos e sobrinhas.

A meus sogros Maria Elisa e Nilton pela bondade e carinho.

A minhas cunhadas Brígida, Cecília e Maria Elisa pelo carinho.

A meus concunhados Renato e Udson pela nossa amizade.

Agradecimentos:

A meu orientador, professor Dr. José Roberto Mineo e à professora Dra. Maria Aparecida Souza, co-orientadora, pela amizade, dedicação, disponibilidade e ensinamentos no decorrer deste trabalho.

Ao professor Dr. Ernesto Akio Taketomi, coordenador do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelo apoio.

Ao professor Dr. Adriano Mota Loyola pelas críticas e sugestões.

A Adriana Borges Genari, Elizabeth de Oliveira Miranda, Fabrício Guimarães Prudente e Gabriela Licia Santos Ferreira por terem colaborado intensamente na fase experimental.

Ao professor Arnaldo Moreira da Silva pela colaboração e dedicação na análise histológica.

Ao professor Dr. Ademir Rocha pela carinhosa atenção de rever minuciosamente este trabalho.

À professora Dra. Janethe Deolinda de Oliveira Pena pela revisão do *summary*.

À professora Aparecida Helena Baldo Guimarães por apoiar nossa pesquisa no Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFG.

A Dagmar do Carmo Oliveira Sales, Kátia Arantes de Abreu Pontes, Marcos Humberto Pires, Márcio da Costa Silva, Maria de Fátima Pereira Souza, Sérgio de Mendonça David e demais funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Câncer da FAEPU/UFG.

Ao professor Dr. Marcelo Emílio Beletti por apoiar e orientar nossa pesquisa no Laboratório de Histologia da UFG.

À professora Dra. Ana Alice Diniz Santos por apoiar e orientar nossa pesquisa no Laboratório de Histologia da UFG.

Ao professor Dr. Vicente de Paula Antunes Teixeira da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro pelo acolhimento e apoio para o estudo morfométrico.

Ao professor Dálcio Rodrigues, ao Hélio Heinisch Werneck, a Juscélia Marques Aleman e Rui Silva do laboratório de Histologia da UFG.

Aos professores das disciplinas de Imunologia e Parasitologia, Dagmar Diniz Cabral, Deise Aparecida Oliveira Silva, Geraldo Sadoyama Leal, Jair Pereira da Cunha Júnior, Dra. Júlia Maria Costa Cruz, Dr. Júlio Mendes, Dra. Márcia Cristina Cury, Margareth Leitão Genari, Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho e Dr. Silvio Favoreto Júnior pelos ensinamentos.

Aos amigos Antônio Tomaz Júnior, Hélio Elias Costa Júnior, Maria Andréa Pires Rodrigues, Max Aor Marques, técnicos e auxiliar administrativo do Laboratório de Imunologia da UFU, pela colaboração.

Ao professor Ademir Barsanulfo de Moraes por apoiar e orientar nossa pesquisa no Laboratório de Patologia Clínica do HC-UFU.

A Alexandre de Brito, Fernanda Ribeiro Arantes dos Santos, Flaviana Pereira de Oliveira, Jane Eire Urzedo, Jurandir Vicente Lopes, Lea Duarte Silva, Luci Mary Fátima Belo, Lucivânia Duarte Silva Malvino, Marizete Maria de Lima Magalhães, Ricardo Gilvan de Oliveira, Roberto Barroso Lombas, Tomaz de Aquino Moreira, Vandir de Almeida Barros e demais membros do Laboratório de Patologia Clínica do HC-UFU, por terem colaborado.

A Lígia Rodrigues Sant'anna e toda equipe do Setor de esterilização do HC-UFU.

À professora Dra. Maria Cristina Roque-Barreira do Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por ceder gentilmente camundongos BALB/c.

A Valéria Bretones Pereira da Farmácia Passiflora Araguari por preparar e fornecer a sulfadiazina de prata e creme Lanette.

Às amigas e amigos Danielle Silva Reis, Haydée Maria Sales Bernardes, João Carlos Gonçalves Júnior, Jodi Dee Hunt, Juliana Junqueira da Silva, Luciana Pereira Silva, Fernanda Maria Santiago, Mônica Camargo Sopelete, Patrícia Teixeira Marcolino, Raquel Borges, Silvia Terra, Tiago Mineo e Valeska Barcelos Guzman.

A João Martins Neto, secretário do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pela gentileza, apoio e competência.

A Mary Conceição Couto Teixeira e Erenides Maria Rodrigues pelo apoio e pela colaboração.

Ao professor Luiz Eduardo Amorim Mesquita pelo empréstimo de sua dissertação de mestrado.

A Joana D' Arc Bonifácio (chefe do Setor de Mecanografia do Campus Umuarama), Carlos Alberto Caetano Almeida e Wilton Alves de Araújo pelo grande acolhimento e apoio.

A quem eu tenha deixado de agradecer injustamente, desculpe-me.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Histologia e fisiologia da pele	1
1.2 Reposição de células	10
1.3 Citocinas, células produtoras e efeito sobre os tecidos	10
1.4 Fenômenos teciduais pós-traumatismo	11
1.5 Cicatrização, enxerto e retalho	15
1.6 Queimaduras	19
1.7 Antimicrobianos e a ferida	20
1.8 Revisão de literatura	20
2. OBJETIVOS	26
3. MATERIAL e MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Instrumentos para o procedimento cirúrgico	27
3.3 Substâncias utilizadas topicalmente nas feridas	28
3.4 Procedimento cirúrgico	28
3.5 Divisão dos grupos de acordo com o tratamento das feridas	29
3.6 Observação das feridas	29
3.7 Coleta das amostras de feridas	30
3.8 Processamento histológico das amostras biopsiadas	30
3.9 Coleta de amostras das feridas para análise microbiológica	31
3.10 Teste de susceptibilidade bacteriana a SDP em meio líquido	32
3.11 Coleta de amostras de sangue	33
3.12 Coleta da medula óssea	34

3.13	Cultura de medula óssea	34
3.14	Teste de viabilidade das células de medula óssea cultivadas	35
3.15	Dosagem de IL-4	36
3.16	Dosagem de nitrito (NO_2^-)	37
3.17	Análise estatística	37
4.	RESULTADOS	38
4.1	Análise macroscópica da ferida	38
4.2	Análise histológica das amostras de pele	42
4.3	Avaliação da presença de microorganismos nas feridas	49
4.4	Avaliação da concentração inibidora mínima da SDP	49
4.5	Avaliação da porcentagem leucocitária no sangue periférico	49
4.6	Avaliação da viabilidade das células de medula óssea	56
4.7	Análise da produção de IL-4 e NO	56
5.	DISCUSSÃO	61
6.	CONCLUSÕES	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

Resumo

A sulfadiazina de prata (SDP) é uma sulfonamida bacteriostática insolúvel em água. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, algumas cepas de *Proteus* e *Enterobacteriaceae* e *Candida albicans* geralmente são sensíveis à SDP. Após o uso de SDP em feridas de queimaduras têm surgido (principalmente enterobactérias) resistentes às sulfonamidas. Relatouse efeito intensificador na reepitelização pela SDP e seu veículo. Leucopenia é uma das complicações associadas a este medicamento. Citotoxicidade pela SDP *in vitro* tem sido descrita.

Objetivou-se analisar e comparar o efeito da sulfadiazina de prata em creme Lanette (CL) (SDP/CL; grupo A), com o CL (grupo B) e sem medicamento (grupo C) em feridas cutâneas de 2 x 2 cm, experimentalmente induzidas, no dorso de camundongos isogênicos BALB/c, machos, com idade de doze semanas (dez animais em cada grupo). Surgiu alopecia transitória em torno das feridas nos animais dos grupos A e B, provavelmente pela somatória de citotoxicidade da SDP e de componentes do CL (metil e propilparabeno). As feridas tornaram-se completamente fechadas no 22º, 28º e 31º PO nos animais dos grupos C, B e A, respectivamente. Os dados da avaliação histológica semiquantitativa do tecido de granulação e da deposição de colágeno, e da morfometria de vasos sanguíneos, fibroblastos e granulócitos neutrófilos não indicaram que a SDP acelerou a cicatrização. A epitelização foi mais rápida nos animais do grupo C, seguida pelo grupo B.

A semeadura do material colhido das feridas nos meios de cultura ágar sangue, eosin methylene blue e ágar Sabouraud, mantidos a 37 °C durante 48 horas, mostrou predominância de *Staphylococcus saprophyticus* nas feridas dos animais dos grupos A e C e de *Citrobacter diversus* e *Klebsiella spp* no grupo B. O antibiograma manteve perfil semelhante para as bactérias de mesma espécie detectadas nos animais dos grupos A, B e C. A SDP filtrada não inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, em meio líquido, nas concentrações testadas. A concentração inibidora mínima da SDP não-filtrada para *Escherichia coli* ATCC 25922 foi de 128 µg/ml.

O uso dos medicamentos SDP e/ou CL nas feridas de camundongos não interferiu sobre as populações de leucócitos circulantes. Os estudos de culturas de células de medula óssea mostraram baixa viabilidade (por toxicidade) das células expostas à SDP não-filtrada nas concentrações entre 25 e 250 µg/ml. Testou-se a produção *in vitro* de IL-4 e óxido nítrico, pelos métodos ELISA sanduíche e de Griess, respectivamente; estes elementos não foram detectados, provavelmente por causa dos limites de sensibilidade de tais métodos ou devido ao estágio de maturidade das células estudadas.

Concluímos que outras substâncias podem ser analisadas seguindo o modelo experimental do presente trabalho. Em adição, novos estudos são necessários para se testar o efeito dos componentes do creme Lanette, separadamente, sobre feridas, pêlos e queratinócitos humanos e murinos *in vitro*.

Summary

Silver sulfadiazine (SDP) is an water-insoluble bacteriostatic sulfonamide. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, some *Proteus* and Enterobacteriaceae strains and *Candida albicans* are often responsive to SDP. After beginning the SDP use in burn wounds, it has emerged resistance to sulfonamides, mainly among Enterobacteriae. It was reported an enhancing effect in the rate of reepithelialization by SDP and its vehicle. Leukopenia is an associated complication with this medicine. It has been described *in vitro* citotoxicity caused by SDP.

It was intended to analyze and compare the effect from silver sulfadiazine in cream Lanette (CL) (SDP/CL; A group), to CL (B group) and without medicine (C group) on the skin wounds measuring 2 x 2 cm, induced experimentally, on the back *dorsum* from isogenic BALB/c mice, male, at age of twelve weeks (ten animals per group). The hair loss observed around wounds, on the A and B groups, was transient, probably by the synergistic effects from SDP citotoxicity and the CL's compounds, methyl and propylparaben. The wounds were whole closed at 22th, 28th e 31st PO, for C, B and A groups, respectively. The semi quantitative evaluation in the granulation tissue and collagen deposition, the morphometric studies from the vessels, fibroblasts and neutrophils did not indicate that SDP accelerated the wound healing. The epithelialization was faster in the C group, followed by B group.

The seeding of the harvested sampling from the wounds in the culture medium agar-blood, eosin methylene blue and Sabouraud agar, at 37 °C for 48 hr, revealed that *Staphylococcus saprophyticus* were predominant in the animal's wound from groups A and C. The *Citrobacter diversus* and *Klebsiella spp* were predominant in the animal wounds in group B. The resistance and sensitivity profiles from these bacteria were similar in the same detected species from animals of groups A, B and C. The filtered SDP did not inhibit the *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 growths, in the liquid medium, on the concentration used. The minimum inhibitory concentration of unfiltered SDP for *Escherichia coli* ATCC 25922 was 128 µg/ml in this assay.

The medicine used, SDP and/or CL, on the mice's wounds did not interfered on the circulating leukocyte population. The assays from cultured bone marrow cells shown low viability of the cells exposed to unfiltered SDP on concentrations from 25 to 250 µg/ml, due to toxicity of this drug. It was investigated *in vitro* IL-4 and nitric oxide production, by sandwich ELISA and Griess methods, respectively; these elements were not detected probably because of the sensibility limits of the assays or the immaturity of the cells.

It can be concluded that other medicine may be analyzed by using the experimental design described in the present study. Also, new *in vitro* studies are necessary in order to observe the effect of Lanette's components, particularly on wounds from human and murine hair and keratinocytes.

Abreviaturas

ATCC	Coleção de Cultura Protótipo Americano
BHI	infusão cérebro-coração
CFU	unidades formadoras de colônia
CL	creme Lanette
Con-A	concanavalina A
EGF	fator de crescimento epidérmico
aFGF	fator de crescimento de fibroblastos ácido
bFGF	fator de crescimento de fibroblastos básico
HE	hematoxilina-eosina
IL-...18	interleucina 1, 2, 3, 6, 8, 12, 18
INF- γ	Interferon gama
KGF	fator de crescimento de queratinócitos
KM ⁺	lectina vegetal
LPS	lipopolissacarídeo
MB	membrana basal
MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteases
NO	óxido nítrico
OPD	orto-fenilenodiamina
PBS	solução salina tamponada de fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PHA	fito-hemaglutinina
SDP	sulfadiazina de prata
SDP/CL	sulfadiazina de prata em creme Lanette
TGF- α	fator transformador de crescimento alfa
TGF- β	fator transformador de crescimento beta
Th	linfócitos T auxiliares
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

1. Introdução

1.1 Histologia e fisiologia da pele

Todo organismo tem um revestimento na superfície externa para se isolar do ambiente. Suas funções principais são: proteger contra dano físico, por exemplo, das radiações; defender contra invasão biológica; regular a passagem de material do meio interno para o externo e receber sinais de outros organismos (EBLING, 1992).

Apesar de a anatomia da pele ser diferente nos vários grupos de seres vivos, conforme as interações com o meio ambiente, é possível identificar elementos que se mantiveram durante a evolução. Como exemplos, verificam-se: a existência de proteínas como o colágeno, a proteína animal mais comum, na cutícula do *Ascaris lumbricoides*; a queratina ocorrendo em alguns peixes, e a existência de material estruturalmente semelhante nos invertebrados (EBLING, 1992; COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999).

A pele dos mamíferos é importante para prevenir a perda de líquido, eleutrólitos, proteínas e sangue, manter a termoregulação, promover a síntese de vitamina D₃ e converter esteróides (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Em todos os vertebrados, a pele é formada por epiderme e derme (córion ou cútis). A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado cujas células são renovadas pela camada basal. Além dos queratinócitos, há mais três tipos de células na epiderme: os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Os pêlos são desenvolvidos por meio de invaginações da epiderme, os

folículos pilosos, contornados na base, pela papila dérmica, de origem mesodérmica. Observam-se na derme feixes de músculo liso, dispostos obliquamente, que se inserem de um lado na bainha conjuntiva do folículo e de outro na camada papilar da derme. Estes feixes são denominados músculos eretores dos pêlos (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

As glândulas sebáceas situam-se na derme e os seus ductos desembocam, geralmente, na porção terminal dos folículos pilosos. Os ductos destas glândulas exteriorizam-se diretamente na superfície cutânea dos lábios, na glande e nos pequenos lábios da vulva. A secreção resulta na morte e eliminação das células que a elaboram; tais glândulas são ditas holócrinas (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

As glândulas écrinas (glândulas sudoríparas écrinas) são encontradas na pele de quase todas as regiões anatômicas e localizam-se na derme reticular profunda. Sua porção secretora é envolta pelas células mioepiteliais e têm ductos excretores longos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999). Desembocam na superfície cutânea e são do tipo merócrino por eliminarem apenas os produtos de secreção (EBLING, 1992). As glândulas apócrinas (glândulas sudoríparas apócrinas) situam-se nas axilas, região perianal e aréolas mamárias e têm ductos excretores desembocando sempre num folículo piloso. São de tipo apócrino, em virtude de sua secreção conter pequena parte do citoplasma apical (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

As secreções glandulares têm a função de proteger inespecificamente contra patógenos na superfície cutânea, manter a termorregulação e gerar odor para comunicação sócio-sexual (EBLING, 1992).

Na maioria dos mamíferos, a hipoderme é localizada entre a derme e uma

lâmina fina de músculo estriado denominada panículo carnoso. Esta lâmina é vestigial no ser humano (EBLING, 1992).

Na pele humana, a junção dermo-epidérmica é ondulada, com intrusão da epiderme para a derme (“rete ridges”); a derme entre as reentrâncias epidérmicas é denominada papila dérmica. Esta junção é importante para o sustentáculo mecânico da epiderme e age como barreira contra a eliminação de células e grandes moléculas (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

A hipoderme é formada por tecido adiposo unilocular e une a derme aos órgãos subjacentes. Esta camada tem o papel de deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se apóia. Quando a hipoderme é espessa, denomina-se panículo adiposo, o qual proporciona proteção contra o frio (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Os queratinócitos são as células majoritárias da epiderme; formam-se na camada basal ou germinativa e originam as camadas espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. São as primeiras células a ser expostas a infecções na pele (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Os melanócitos localizam-se, geralmente, nas camadas basal e espinhosa, sintetizam a melanina e a injetam no interior das células epiteliais. Nestas células os grânulos de melanina ficam em posição supranuclear para oferecer proteção ao ácido desoxirribonucléico (DNA) contra radiação ultravioleta e dar cor à pele (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

As células de Langerhans fazem parte do sistema imunitário, podendo processar e acumular na sua superfície os抗ígenos cutâneos, apresentando-os às células T auxiliares (células Th) nos linfonodos (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999; LYDYARD, GROSSI, 1998).

As células de Merkel são tidas como mecano-receptores e/ou secretoras de hormônios; existem em maior quantidade na palma das mãos e planta dos pés (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

A pele humana pode ser glabra (sem pêlos), como na palma das mãos e planta dos pés. Notam-se epiderme espessa dividida em várias camadas bem definidas (com estrato córneo compacto), terminações neurais encapsuladas na derme e ausência de folículos pilosos e glândulas sebáceas (EBLING, 1992).

A pele pilifera tem folículos pilosos e glândulas sebáceas, e faltam terminações neurais encapsuladas na derme (EBLING, 1992).

A derme humana tem a camada papilar, mais superficial, a qual abrange 10% da espessura total da derme; e a camada reticular mais profunda (SMITH, HOLBROOK, BYERS, 1982). A Tabela 1 contém as diferenças básicas entre a derme papilar e a derme reticular. Os elementos fibrosos da derme papilar seguem da lâmina basal para a derme reticular onde formam bainhas em torno dos folículos pilosos e das glândulas e seus ductos (SMITH, HOLBROOK, BYERS, 1982). O limite entre a derme papilar e a derme reticular é marcado pela variação abrupta do tamanho das fibras colágenas e/ou pela posição horizontal dos vasos do plexo subpapilar (SMITH, HOLBROOK, BYERS, 1982). A parte inferior da derme reticular se funde com a hipoderme, da qual recebe nervos e vasos linfáticos e sanguíneos (SMITH, HOLBROOK, BYERS, 1982; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999). A derme contém fibroblastos, leucócitos, mastócitos e macrófagos (EBLING, 1992).

O interstício ou matriz extracelular (MEC) é constituído por uma rede complexa de macromoléculas que apresentam as funções de sequestrar água para manter o turgor dos tecidos moles, reter minerais para enrijecer os tecidos esqueléticos, armazenar fatores de crescimento, controladores da proliferação

celular, e dar condições às células para aderir e migrar. A degradação da MEC acompanha a morfogênese, a cicatrização de feridas, a invasão de tumores e as metástases (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; PEREIRA, 1999).

A macromoléculas da MEC são representadas por: 1. proteínas estruturais fibrosas como o colágeno e a elastina, que formam as fibras colágenas e reticulares (colágeno) e elásticas (elastina); 2. glicoproteínas de adesão, como a fibronectina e a laminina, e proteínas organizadoras como a entactina, a ondulina e a tenascina; 3. um gel de proteoglicanos, ácido hialurônico e sulfatos de condroitina, queratana, dermatana e heparana. Estas macromoléculas agrupam-se em duas organizações gerais: a matriz intersticial e a membrana basal (MB). A matriz intersticial está presente nos espaços entre as células epiteliais, endoteliais e células musculares lisas e no tecido conjuntivo. A matriz intersticial é constituída por: colágenos fibrilares ou intersticiais tipos I, II e III; colágenos não-fibrilares ou amorfos tipos IV, V e VI; elastina e fibronectina; proteoglicanos e ácido hialurônico. A Tabela 2 mostra os principais tipos de colágeno e a sua localização. A MB é constituída principalmente pelo colágeno tipo IV, laminina, sulfato de heparana, proteoglicanos e outras glicoproteínas (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999; PEREIRA, 1999). Os componentes da MEC são sintetizados por fibroblastos, condroblastos, osteoblastos, odontoblastos, células musculares lisas, células de Schwann, células endoteliais e células epiteliais (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999; PEREIRA, 1999).

Os colágenos estruturais mais comuns são compostos por uma tríplice hélice de três cadeias polipeptídicas, denominadas subunidades- α . A seqüência de aminoácidos, nas cadeias polipeptídicas, inclui a glicina em cada terceira posição e a hidroxiprolina para estabilizar a hélice de colágeno. Os colágenos assim constituídos

são resistentes à degradação por proteases inespecíficas (BURGESON, 1982). Os colágenos de tipos VI, VII e VIII, têm as tríplices hélices interrompidas, o que torna estas moléculas mais susceptíveis à degradação por proteases inespecíficas (BURGESON, 1982).

A fibronectina tem sítios de ligação para heparana, fibrina, colágeno e as sequências dos aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), cuja função importante é de aderir células à matriz. Associa-se à adesão, disseminação e migração celular no interstício (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; PEREIRA, 1999).

A laminina tem sítios de ligação para o sulfato de heparana, o colágeno tipo IV e os receptores celulares. A laminina promove o alinhamento das células endoteliais *in vitro* e forma tubos capilares, um evento importante para a angiogênese (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999).

As integrinas são glicoproteínas transmembrana da família de receptores da superfície celular, que mediam a adesão das células à MEC e a interação célula-célula. Estes receptores são componentes importantes para o extravasamento de leucócitos, a agregação de plaquetas e a cicatrização de feridas (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999). Integram o citoesqueleto de actina e a transdução de sinais da MEC para o interior das células. As proteínas intracelulares talina, vinculina, α -actinina, tensina e paxifilina associam-se aos sítios das integrinas e à actina para formar um sistema de sinalização intracelular (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999).

As proteínas matricelulares não atuam como componentes estruturais da MEC, porém interagem com proteínas da matriz, receptores da superfície celular, fatores de crescimento, citocinas e proteases. Estas proteínas interrompem as interações célula-matriz. As proteínas matricelulares são: 1. proteína ácida rica em

cisteína, ou osteonectina, que contribui para o remodelamento tecidual em resposta a injúrias e é um inibidor da angiogênese; 2. trombospondinas, também inibidoras da angiogênese; 3. osteopontina, reguladora da calcificação e mediadora da migração de leucócitos; 4. membros da família das tenascinas, envolvidos na morfogênese e na modulação da adesão celular (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999).

Os proteoglicanos são moduladores do crescimento e da diferenciação celular e têm papéis diversos na regulação da estrutura e da permeabilidade do tecido conjuntivo. O sindecan se liga ao colágeno, à fibronectina e à tromboespondina na MEC. A ligação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) às cadeias de sulfato de heparana do sindecan facilita a ligação do FGF ao seu receptor (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999).

A degradação dos componentes da MEC depende de proteases específicas denominadas metaloproteases (MMP) que contêm zinco no sítio ativo, atuam em pH neutro e requerem cálcio para sua atividade. As MMP são sintetizadas por células fagocitárias e todas as células do tecido conjuntivo. Os quatro grupos de MMP são: 1. colagenases; 2. estromelisinas; 3. gelatinases; 4. metaloproteases ligadas à membrana plasmática. As colagenases podem clivar os três tipos de cadeia α das moléculas de colágeno. As estromelisinas atuam sobre os proteoglicanos, a fibronectina, a laminina e o colágeno tipo IV. As gelatinases agem praticamente sobre todas as proteínas da MEC. As metaloproteases ligadas à membrana plasmática são importantes para ativar as outras MMP. Outras proteases (serina-proteases) geralmente degradam os peptídeos resultantes da degradação pelas MMP (PEREIRA, 1999).

Há dois plexos arteriais e três venosos que suprem a pele. Dos arteriais, um situa-se no limite entre a derme e a hipoderme, e o outro entre as camadas

papilar e reticular. Dois dos plexos venosos acompanham os plexos arteriais; o terceiro localiza-se na derme intermediária (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Os vasos linfáticos da pele iniciam-se nas papilas dérmicas, como tubos de fundo cego e convergem para um plexo entre as camadas papilar e reticular. Deste plexo, são emitidos ramos para outro plexo entre a derme e a hipoderme (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

A inervação da pele é autonômica, apresentando um componente colinérgico para as glândulas écrinas e apócrinas e outro adrenérgico para as glândulas sebáceas, músculos lisos e arteríolas. As terminações neurais sensitivas localizam-se na derme e na hipoderme; podem ser livres ou encapsuladas e têm as funções de perceber o tato, a pressão, o calor e o frio (EBLING, 1992; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999).

Tabela 1. Composição e estrutura da derme papilar e reticular.

Características	Derme papilar	Derme reticular
Organização da matriz extracelular	Fibras de colágeno finas e frouxas	Fibras de colágeno grosseiras e intermediárias
Tipos de colágeno	I, III e pró-colágeno I	I e III
Fibronectina	Estrutura linear	Estrutura reticular
Atividade de colagenase	Completa	Discreta
Fibras elásticas	Fibras oxitalânicas imaturas	Fibras elaunínicas e fibras maduras
Celularidade	Notável	Escassa
Proliferação de fibroblastos	Alta capacidade proliferativa	Baixa capacidade proliferativa
Organização vascular	Microcirculação	Vasos distribuidores

(Modificado de SMITH, HOLBROOK, BYERS, 1982)

Tabela 2. Principais tipos de colágeno.

Tipo	Características	Distribuição nos tecidos
I	fibras com alta resistência tênsil	pele, ossos, tendões, córnea e útero
II	fibras finas; proteína estrutural	cartilagem do disco intervertebral e humor vítreo
III	fibras finas; flexível	pele, submucosas, útero e vasos sanguíneos
IV	associação em bandas	membranas basais
V	fibrilas finas associadas ao tipo I	colágeno pericelular
VI	fibrilas finas associadas aos tipos I e III	igual à dos tipos I e III
VII	estruturas de ancoragem	abaixo de epitélios escamosos
VIII	provavelmente amorfo	endotélio-membrana basal
IX	associa-se a fibrilas do tipo II	cartilagem
XI	associa-se a fibrilas do tipo II	igual à do tipo II
XII	associa-se a fibrilas do tipo I	tendões, ligamentos e fáscias

(Modificado de COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999; PEREIRA, 1999)

1.2 Reposição de células

No adulto, o papel principal da divisão celular é manter os tecidos diferenciados e repor as células perdidas (BICKENBACH, 1981).

As células da epiderme e mucosas (epitélios escamosos estratificados), e trato gastrintestinal (epitélio simples), são produzidas pela transformação contínua de “células tronco” em células diferenciadas que têm vida média curta (BICKENBACH, 1981).

“Queratinócitos-tronco” renovam-se constantemente, produzindo células das quais um grupo não se diferencia enquanto o outro grupo evolui, irreversivelmente, para a diferenciação. A análise da cinética da pele do camundongo tem sugerido que as “células tronco” têm um ciclo celular longo (BICKENBACH, 1981; DOVER, POTTER, 1983; JENSEN, PEDERSEN, BOLUND, 1985; MORRIS, FISCHER, SLAGA, 1985).

1.3 Citocinas, células produtoras e efeito sobre os tecidos

Uma ampla variedade de células, pertencentes ou não ao tecido linfóide, secreta mediadores solúveis ou citocinas que são proteínas de baixo peso molecular, com atividades biológicas múltiplas e superponíveis. A atividade destas moléculas pode ter como alvo as próprias células que as produziram, ou um outro tipo celular; no primeiro caso, fala-se em atividade autócrina; no segundo, em parácrina (KOVACS, 1991).

As citocinas agem ligando-se a receptores específicos na membrana celular e desencadeando uma cascata para indução e aumento ou inibição de genes

regulados por estes mediadores (ROOK, BALKWILL, 1998).

Muitas citocinas influenciam a estrutura do citoesqueleto e a quimiotaxia (KOVACS, 1991). Associadas a hormônios e neurotransmissores, formam uma linguagem de sinais químicos que regulam o desenvolvimento, o reparo tecidual e resposta imune. A compreensão do complexo processo de reparo dos tecidos traumatizados, nos vertebrados superiores, começou após a descoberta das citocinas. Estes mediadores celulares originam-se de fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, queratinócitos, células endoteliais e mastócitos (MARTIN, 1997).

Dentre outros mediadores, os macrófagos ativados secretam interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator transformador de crescimento beta (TGF- β).

Queratinócitos murinos atingidos pelas radiações ultravioleta B produzem IL-10, que diminui a função de células apresentadoras de抗ígenos (APC) sistemicamente e ativam células Th2 esplênicas (ULLRICH, 1994; ENK *et al.*, 1995).

Queratinócitos humanos normais têm capacidade para produzir IL-12 (ARAGANE *et al.*, 1994), IL-3 (LUGER *et al.*, 1985) e IL-18 (STOLL *et al.*, 1997).

Os neutrófilos e queratinócitos secretam TNF que é citotóxico para muitas linhagens de células tumorais, células endoteliais e queratinócitos (SUGARMAN *et al.*, 1985).

1.4 Fenômenos teciduais pós-traumatismo

Após um traumatismo físico ou químico ou infecção local, há uma

perturbação do equilíbrio entre as células do tecido normal.

Os componentes da resposta tissular à injúria são (HUNT, 1981):

1. inflamação;
2. proliferação fibroblástica (fibroplasia);
3. proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese);
4. síntese de tecido conjuntivo;
5. reepitelização.

A inflamação se traduz, basicamente, por migração celular intensificada através de vênulas e extravasamento de moléculas séricas, anticorpos, complemento e proteínas pelos capilares. Estes eventos são controlados pelo aumento do suprimento sanguíneo (vasodilatação) e da permeabilidade capilar (MALE, 1998). Mediadores que agem rapidamente, como aminas vasoativas e produtos do sistema de cininas, modulam a resposta imediata (MALE, 1998). Posteriormente, mediadores como leucotrienos se envolvem no acúmulo e ativação de outras células.

Os sistemas de enzimas plasmáticas importantes na hemostasia e controle da inflamação são o fibrinolítico (plasmina), o de cininas e do complemento.

A bradicinina origina-se da ativação do fator XII do sistema de coagulação; causa dilatação venular, aumento da permeabilidade vascular e contração de músculos lisos (MALE, 1998).

Os mastócitos e as plaquetas são importantes fontes de histamina e serotonina. Estas substâncias causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (MALE, 1998).

Muitos dos efeitos pró-inflamatórios de C3a e C5a, componentes do sistema de complemento, resultam de sua capacidade para liberar grânulos dos

mastócitos.

À medida que linfócitos e monócitos chegam ao local de inflamação, podem tornar-se ativados e liberar citocinas como IL-1, IL-4, IL-6, TNF α e interferon gama (INF- γ). Estes mediadores aumentam a migração celular por estimularem as células endoteliais de vênulas vizinhas a expor moléculas de adesão para os fagócitos, os quais saem dos vasos (MALE, 1998; PEREIRA, 1999).

No período inicial, os neutrófilos e macrófagos retiram bactérias, material estranho e fragmentos celulares da ferida.

Os fibroblastos e as células epiteliais e endoteliais, sob ação das citocinas, crescem e dividem-se para criar novos tecidos e restaurar a função.

O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um potente mitógeno para as células epiteliais (KING, 1985) e promove a cicatrização de feridas em úlceras experimentais de modelos animais (SCHULTZ *et al.*, 1987).

O fator de crescimento de queratinócitos (KGF) é expresso em fibroblastos de feridas e tem um potente efeito mitógeno para queratinócitos. Foram observados atrofia epidérmica, anomalia de folículos pilosos e hiperespessamento dérmico em camundongos duplamente deficientes do gene para KGF (WERNER *et al.*, 1994).

O fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) é produzido por macrófagos e queratinócitos. É mitogênico para este último tipo celular (RAPPOLEE *et al.*, 1988; MARTIN, 1997).

As injúrias induzem a produção de IL-1, que tem efeitos sobre a proliferação de fibroblastos, queratinócitos e timócitos, a síntese de colagenase, o estímulo da produção de IL-2, o estímulo das células B e a indução de febre (HAUSER *et al.*, 1986; KAPLAN, DINARELLO, GELFAND, 1989).

Os fatores de crescimento de fibroblastos ácido e básico (aFGF e bFGF) são mitogênicos para células mesenquimais e queratinócitos (GOSPODAROWICZ et al., 1987).

Os receptores de TGF- β são ubiqüítários. A produção de TGF- β pode ser feita por células T e B, macrófagos, fibroblastos, plaquetas, osteoblastos, osteoclastos, astrócitos e células da microglia. O TGF- β é mitogênico para fibroblastos e desativa macrófagos; além disso, suprime a inflamação *in vivo*, e promove a cicatrização das feridas e a angiogênese (DIAZ-FLORES, 1994). As ações do TGF- β na cicatrização das feridas são complexas: estimula a quimiotaxia de fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos, mastócitos e células T; induz inflamação local e fibrose; estimula a deposição de matriz extracelular e inibe o crescimento de queratinócitos (RHEINWALD, GREEN, 1975).

A formação de capilares ocorre por meio de eventos morfológicos bem definidos, incluindo a vasodilatação das vênulas ou capilares originais, a exclusão da membrana basal pré-existente, a migração e a proliferação das células endoteliais e a formação de um novo lume (DIAZ-FLORES, GUTIERREZ, VARELA, 1994). Monócitos e macrófagos ativados produzem a tromboespondina-1, inibidora da angiogênese *in vivo* e *in vitro*; isto evidencia a inter-relação de fatores reguladores positivos e negativos no processo de cicatrização (DIPIETRO, POLVERINI, 1993). O INF- γ /LPS, a hipóxia e o lactato ativam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), produzido por macrófagos, que é muito importante na angiogênese (XIONG et al., 1998).

Foi demonstrado efeito angiogênico intenso da IL-8 recombinante humana na córnea do rato, na quimiotaxia e na proliferação induzida de células endoteliais de veia umbilical. Estas observações sugerem a participação efetiva da IL-8

na cicatrização de feridas, na artrite reumatóide e no crescimento de tumores (KOCH *et al.*, 1992). Observou-se quantidade elevada de IL-8 em feridas humanas pós-queimadura, cuja cicatrização estava lenta. Houve redução significante da replicação de queratinócitos (IOCONO *et al.*, 2000).

A integrina $\alpha v\beta 3$ é um receptor de células endoteliais para as proteínas de adesão, fibrina, fibronectina e vitronectina. Esta integrina tem funções importantes durante a angiogênese e a formação do tecido de granulação (CLARK *et al.*, 1996).

1.5 Cicatrização, enxerto e retalho

Cicatrização é o processo pelo qual uma ferida se fecha ou se transforma em cicatriz (GARCIA, ROCHA LIMA, 1978; FERREIRA, 1995).

Quando uma ferida limpa, cirúrgica ou pós-traumática, é fechada imediatamente, por aproximação direta das bordas, fala-se em fechamento primário e cicatrização primária ou por primeira intenção. Os fibroblastos produzem colágeno para substituir os tecidos lesados. Os queratinótipos migram sempre em contato com tecido mesenquimal (interação ectodermo-mesenquimal). Esta interação é importante para o deslocamento das células epidérmicas (HUNT, 1981; PEACOCK, COHEN, 1990; PEREIRA, 1999).

Quando não se faz o fechamento imediato de uma ferida a cicatrização é dita secundária ou por segunda intenção. Tal evento pode ocorrer também quando não se aproximam os tecidos adequadamente; nos locais que perderam pele e nos tecidos destruídos por inflamação e/ou infecção. A contração e a epitelização são os dois eventos fundamentais na cicatrização secundária. O tecido de granulação origina-se do tecido conjuntivo circunjacente e se destina a ocupar o coágulo

formado no espaço morto. O desenvolvimento do tecido de granulação inicia-se a partir do 4º dia, sendo a ativação dos fibroblastos um fator essencial para a sua indução (MCCLAIN *et al.*, 1996). Macroscopicamente, o tecido de granulação tem aspecto granuloso, vermelho e úmido. Este tecido é composto, basicamente, de colágeno tipo III, ácido hialurônico, moderada quantidade de proteoglicanos, pequenos vasos sanguíneos, fibroblastos, miofibroblastos, leucócitos e macrófagos (HUNT, 1981; PEREIRA, 1999). Os queratinótipos migram das bordas da ferida, invadem o coágulo de fibrina, e prosseguem até se encontrar no centro daquela. A função de contrair uma ferida é atribuída aos miofibroblastos (GABBANI, RYAN, MAJNO, 1971). Quando a ferida se fecha, o número de células dos vasos sanguíneos e de miofibroblastos diminui. Isto se deve ao fenômeno denominado apoptose ou morte celular programada, graças ao qual o tecido de granulação evolui para cicatriz (DESMOLIÈRE *et al.*, 1995).

Conceitua-se como enxerto a transferência de um segmento tecidual que é desconectado integralmente de seus vasos; sua nutrição será feita por vasos do local receptor. Fala-se em autoenxerto quando o procedimento é feito para o próprio receptor; homoenxerto para um receptor da mesma espécie e heteroenxerto para receptor de espécie diferente (RUDOLPH, BALLANTYNE, 1990).

Denomina-se retalho um segmento de tecido transferido, que se mantém conectado a um pedículo. O retalho microcirúrgico é realizado através da seção de seus vasos no local doador; transferido imediatamente para o local receptor e anastomosam-se os vasos receptores e doadores (DANIEL, WILLIAMS, 1973).

Sempre que possível, a ferida deverá ser fechada imediatamente por aproximação direta das bordas, ou por retalho e/ou enxerto. Estes procedimentos minimizam a perda de líquidos e proteínas, a dor, a contração da ferida, as cicatrizes

hipertróficas e os quelóides.

A cicatrização de feridas é muito complexa e o ser humano está sempre à procura de uma substância que acelere este processo ou resulte em uma cicatriz imperceptível.

Vários fatores podem afetar a cicatrização de uma ferida (Tabela 3). A suplementação alimentar com arginina aumenta a síntese de colágeno *in vivo* e, estimula a mitogênese de linfócitos em resposta à fito-hemaglutinina e concanavalina A *in vitro* (BARBUL *et al.*, 1990; KIRK *et al.*, 1993).

Quando um medicamento de uso tópico ou sistêmico é tóxico para os macrófagos, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos, estas células podem morrer. Caso permaneçam vivas, talvez não consigam sintetizar citocinas fundamentais no processo de reparação dos tecidos.

Tabela 3- Fatores que interferem na cicatrização.

1. Menor síntese de colágeno

A. Antes da cirurgia

Diabete melito
Esteróides
Hipóxia
Infecção
Irradiações
Jejum
Senilidade
Politraumatismos
Uremia

B. Durante a cirurgia

Injúria nos tecidos
Má aposição dos tecidos
Menor aporte de sangue

C. Após a cirurgia

Drogas citostáticas
Hipovolemia
Hipóxia
Jejum

2. Maior lise de colágeno

Esteróides
Infecção
Inflamação
Jejum
Traumatismo grave

1.6 Queimaduras

As queimaduras são lesões causadas por agentes físicos ou químicos. As feridas na superfície cutânea podem infectar-se e causar imunossupressão e morte do indivíduo. A fisiopatologia das queimaduras cutâneas é complexa, pois se destrói o maior órgão do corpo (RUSSO, 1976; HEIMBACH, 1987; WARDEN, 1987).

Nas queimaduras de primeiro grau, notam-se dor e hiperemia; esta desaparece até 48 horas após o traumatismo. Ocorre a destruição da epiderme. As queimaduras de segundo grau são divididas em superficiais e profundas. Nas superficiais, sente-se dor e surgem vesículas. Há a destruição da epiderme e derme superficial, sem lesão irreversível das terminações neurais. A reepitelização das feridas ocorre até três semanas. As queimaduras de segundo grau profundas são indolores, pouco vascularizadas ou avascularizadas. Ocorre a destruição extensa da derme e a reepitelização se faz entre 4 e 6 semanas. Geralmente, o novo epitélio é fino e frágil. Estas lesões podem desenvolver cicatrizes elevadas no ser humano. Nas queimaduras de terceiro grau, não se sente dor e a destruição da pele é total. O agente físico ou químico pode causar a destruição dos ossos, tendões e vasos subjacentes (RUSSO, 1976; HEIMBACH, 1987; WARDEN, 1987).

O tratamento das feridas é feito retirando-se os tecidos mortos, limpando-se as lesões com água e sabão neutro ou um anti-séptico, por exemplo, clorhexidina e polivinilpirrolidona. Muitos Serviços Médicos recomendam a aplicação de um medicamento antimicrobiano nas feridas. Quando o tecido de granulação, nas feridas profundas, se torna evidente, deve-se iniciar a cobertura com enxerto de pele e/ou retalho (RUSSO, 1976; HEIMBACH, 1987; WARDEN, 1987).

1.7 Antimicrobianos e a ferida

A procura de substâncias para evitar e extinguir com a infecção local nas feridas, promover e acelerar a eliminação dos tecidos mortos e induzir o fechamento rápido das feridas, principalmente as resultantes de queimaduras, sempre foi motivo da inquietude humana. Entre as substâncias já utilizadas com tais finalidades, contam-se: ácido carbólico; bicloreto de mercúrio; bromelaína; proteinase neutra obtida de *Bacillus subtilis*; óxido de zinco; goma arábica; banha; colódio; óleo de castor; parafina; violeta de genciana; ácido tânico-sulfadiazina sódica, creme de gentamicina a 0,5% e nitrato de prata a 0,5% (RUSSO, 1976; LYNCH, BLOCKER, 1977; FOX, 1983).

Alguns centros de tratamento de queimaduras ainda usam, topicalmente, a pomada de acetato de mafenida (monoacetato α -amino-p-tolueno-sulfonamida) na concentração de 11,4% (FOX, 1983). Este medicamento é bacteriostático e tem boa penetração na escara. A aplicação é fácil e o uso e não causa pigmentação da ferida e das roupas (FOX, ROSE, 1942; FOX, 1983). Por outro lado, catabólito do produto causa diurese osmótica, distúrbios ácido-básicos e acidose metabólica hiperclorêmica. A aplicação de mafenida se segue de liberação demorada da escara e retardo da regeneração epitelial (LYNCH, BLOCKER, 1977; FOX, 1983).

1.8 Revisão de literatura

A sulfadiazina de prata (SDP) é um antimicrobiano sintetizado por Fox (1968), formado pela reação da sulfadiazina com o nitrato de prata. A prata substitui o hidrogênio ionizável da sulfadiazina. Forma-se um sal cuja molécula é grande e

insolúvel em água. A fórmula estrutural plana da SDP está demonstrada na Figura 1.

A SDP deve ser preparada adicionando-se 30 milímoles de SDP em 100 mililitros (ml) de água. A emulsão resultante deve ser misturada com 900 g de creme solúvel em água. A concentração final é de 30 milímoles de SDP por quilograma (kg) de creme. O creme final é branco, inodoro, e deve ser aplicado uma a duas vezes ao dia sobre a ferida, a qual pode ser ocluída ou ficar descoberta (FOX, 1968).

A sulfadiazina é um ácido fraco (FOX, ROSE, 1942) que inibe o ácido para-amino-benzóico por competição. Este reage com a pteridina, formando o ácido pteróico, o qual se associa ao ácido glutâmico e assim constitui o ácido fólico. As bactérias utilizam esta via para obter o tetraidrofolato que é uma coenzima na síntese de bases púricas e timina. Desta maneira, tal medicação é definida como bacteriostática (BIER, 1976).

As sulfonamidas são solubilizadas quando ficam em contato prolongado com líquidos biológicos possuidores de íon cloreto e grupos reativos como, por exemplo, as sulfidrilas da cisteína (FOX, 1968). A SDP não reage rapidamente com estes grupos, de modo que sua ação antibacteriana não diminui (FOX, 1983). A insolubilidade da SDP propicia sua manutenção em concentrações elevadas nos exsudatos das feridas (FOX, 1983). Há pouca absorção de sulfadiazina pelas feridas, sendo que sua concentração sérica pode variar de 3 a 5 mg%, enquanto a concentração na urina raramente excede 50 a 100 mg% (MUNSTER, 1980).

Jensen & Davidson (1966) demonstraram que a prata substitui o hidrogênio das pontes entre os nitrogênios das purinas (adenina e guanina) e das pirimidinas (citosina e timina) do DNA. Isto altera a distância normal de 3 Angströns para 3,8 Angströns e distorce a molécula do DNA descrita por Watson & Crick (Figura 2). Supõe-se que a ligação entre a prata e o nitrogênio seja mais forte que as pontes de

hidrogênio e impeça a multiplicação bacteriana (FOX, 1969). A SDP reage rapidamente com o DNA e libera a sulfadiazina (FOX, 1983).

A estrutura polimérica da SDP, constituída de seis átomos de prata ligados a seis moléculas de sulfadiazina, pode contribuir para maior estabilidade deste antimicrobiano comparativamente a outras sulfonamidas (FOX, 1983).

A SDP tem sido usada mais freqüentemente no tratamento das feridas de pessoas queimadas (FOX, RAPPOLE, STANFORD, 1969; BROOK, RANDOLPH, 1981; ATOYEBI, SOWEMIMO, ODUGBEMI, 1992), e, menos comumente, em: carcinoma de mama ulcerado inoperável; feridas infectadas pós-operatórias de artroplastias, tumores de partes moles; e úlceras resultantes de infecções cutâneas por *Herpes zoster* (FOX, 1983; MONTES, MUCHINIK, FOX, 1986).

Foi relatado efeito intensificador da reepitelização pela SDP e seu veículo (GERONEMUS, MERTZ, EAGLSTEIN, 1978). A razão SDP:DNA bacteriano é muito mais elevada que a razão SDP:DNA célula epitelial; entende-se assim porque a SDP inibe as divisões bacterianas e não impede a regeneração das células epiteliais (FOX, 1983).

A SDP é ativa, *in vitro*, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, certas cepas de *Proteus*, outras bactérias da família Enterobacteriaceae e *Candida albicans* (MONAFO, FREEDMAN, 1987). A ligação irreversível da prata ao grupo tiol da cisteína (Cys-150), na fosfomanose-isomerase, inativa esta enzima que é essencial na síntese da parede celular de *Candida albicans* (WELLS *et al.*, 1995).

A SDP pode ser ligada a moléculas e polímeros, como os colágenos humanos e porcinos; o produto resultante é isento de bactérias e resistente a infecções (FOX, 1983; DEITCH *et al.*, 1989).

Pode ocorrer reação de hipersensibilidade após o uso de SDP (MUNSTER, 1980).

Observou-se alta incidência de enterobactérias resistentes às sulfonamidas após o uso de SDP em feridas de queimaduras extensas (LOWBURY *et al.*, 1976). Houve uma redução intensa de cepas de *Klebsiella* sp., *Escherichia coli* e *Enterobacter cloacae*, resistentes às sulfonamidas, após a interrupção do uso destes antimicrobianos nos pacientes queimados (BRIDGES; LOWBURY, 1977; GAYLE *et al.*, 1978). Têm surgido cepas de *Pseudomonas* resistentes *in vivo* na China, na Índia, no Peru e nos Estados Unidos (FOX, 1983).

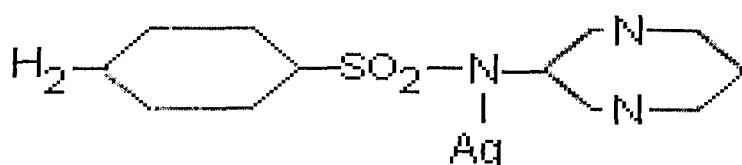
Foi detectada leucopenia (concentração de leucócitos do sangue periférico abaixo de 4000 por milímetro cúbico), nas pessoas queimadas sob tratamento com SDP (CHAN, JARRET, MOYLAN, 1976; VALENTE, AXELROD, 1978; CAFFEE, BINGHAM, 1982; CHOBAN, MARSHALL, 1987). Num estudo realizado em crianças, sugeriu-se que algum dos componentes do veículo¹ teria causado a leucopenia (KIKER *et al.*, 1977).

Descreveu-se que a toxicidade *in vitro* sobre fibroblastos humanos foi mais intensa na suspensão de SDP não-filtrada (McCAULEY *et al.*, 1989).

A intoxicação pela prata (argiria) pode lesar os rins e o fígado e causar neuropatias periféricas e encefalite. A argiria foi descrita em um homem de 59 anos de idade portador de úlceras flebostáticas crônicas nos membros inferiores. Este paciente utilizou sulfadiazina de prata a 1% nas úlceras duas vezes ao dia durante cinco meses. A concentração plasmática de prata foi de 10 µg/l (valor de referência menor que 1 µg/l) quando se diagnosticou a argiria; após a interrupção do uso da

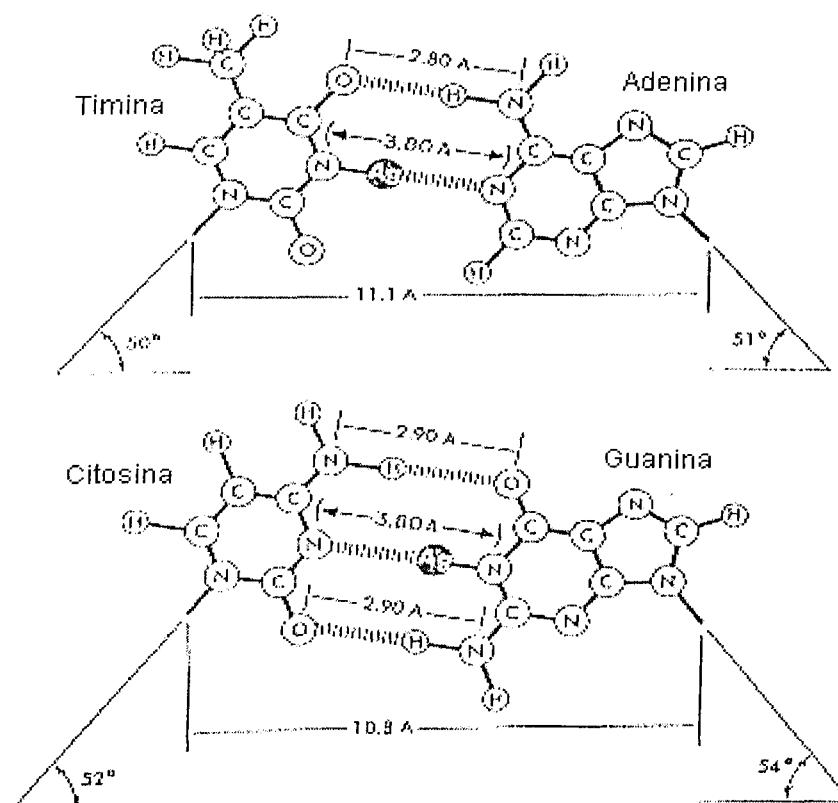
¹ Vaselina branca - United States Pharmacopeia - USP, álcool estearílico, isopropil miristato, monooleato sorbitan, estearato polioxil 40, propilen glicol e o preservativo metilparaben US a 0,3%).

SDP, decresceu para 5,1 µg/l e 1 µg/l na terceira e décima segunda semanas, respectivamente (PAYNE *et al.*, 1992).



FOX, 1968

Figura 1. Fórmula estrutural plana da sulfadiazina de prata.



(Modificado de FOX, RAPPOLE, STANFORD, 1969)

Figura 2. Modelo proposto de ligação da prata ao nitrogênio nas bases nitrogenadas na molécula do DNA.

2. Objetivos

A SDP tem sido utilizada topicalmente para tratar queimaduras no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia há muitos anos. Como os dados da literatura apontam efeitos benéficos e maléficos deste medicamento, pretende-se analisar, no presente trabalho, os seguintes aspectos relacionados à aplicação do citado medicamento em feridas experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos BALB/c:

- a-) comparar o fechamento das feridas (epitelização e cicatrização) e os aspectos histológicos destes processos entre grupos de animais tratados ou não com a SDP;
- b-) avaliar os aspectos microbiológicos das feridas dos animais tratados ou não. Verificar a sensibilidade das bactérias detectadas aos antibióticos mais freqüentemente utilizados e determinar a concentração inibidora mínima da SDP filtrada e não-filtrada;
- c-) analisar o efeito do tratamento das feridas sobre as populações de leucócitos circulantes. Verificar a viabilidade das células da medula óssea dos camundongos expostas à SDP não-filtrada. Testar *in vitro* se há produção de IL-4 e óxido nítrico pelas células da medula óssea dos camundongos BALB/c expostas à SDP filtrada e não-filtrada, Concanavalina A, KM⁺, LPS e LPS com INF- γ .

3. Material e métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c, machos, com idade de doze semanas, gentilmente cedidos pelo biotério do Departamento de Microbiologia Parasitologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram divididos em três grupos de dez cada um. A limpeza das gaiolas foi feita diariamente. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas – Bloco 2 A – Universidade Federal de Uberlândia (UFU), à temperatura ambiente, com exaustão do ar. Água e alimento estiveram disponíveis *ad libitum*.

3.2 Instrumentos para o procedimento cirúrgico

Foram utilizados um frasco de vidro com tampa metálica, algodão hidrófilo com espessura de 3 cm e éter etílico².

Desenvolveu-se um molde plástico transparente de 2 x 2 cm.

A pinça anatômica e a tesoura de ponta fina de 14 cm foram esterilizadas em autoclave a 120°C durante 30 minutos. Estes instrumentos foram utilizados na ressecção de tecido do primeiro animal de cada experimento e foram desinfetados no álcool etílico a 70% para uso nos outros animais.

Empregaram-se *swabs* esterilizados no Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia – Fundação de

² Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro.

Assistência e Pesquisa Universitária (HC-UFU-FAEPU), nas coletas de material das feridas para análise microbiológica.

3.3 Substâncias utilizadas topicamente nas feridas

Durante todo o período experimental, dependendo do grupo em que os animais foram alocados, como se vai especificar no item 3.5, o tratamento das feridas foi realizado com SDP micronizada³ dispersa no creme Lanette (CL)⁴ ou apenas com CL. A SDP em pó, SDP no CL a 1% e o CL sem a adição do antimicrobiano foram preparados e fornecidos pela Farmácia Passiflora Ltda (Araguari M.G., Brasil).

3.4 Procedimento cirúrgico

Cada camundongo foi introduzido em frasco de vidro de tampa metálica tendo no fundo, algodão hidrófilo umedecido com éter etílico. Quando cessavam os movimentos voluntários do animal e ele se mantinha em respiração espontânea, era retirado, pesado e devolvido para o frasco até retornar à situação de queda da vigília. Em seguida, os camundongos eram retirados novamente e colocados em decúbito ventral sobre placa de isopor. A área cirúrgica foi delimitada com fucsina básica e um molde plástico transparente de 2 x 2 cm, no dorso do animal, a 1 cm da implantação das orelhas.

³ Galena, Brasil.

⁴ Álcool de polioxetileno com alquil-sulfato de sódio (Galena, Brasil) a 15%; oleato de oleila (Galena, Brasil) a 16%; sorbitol (Galena, Brasil) a 10%; EDTA dissódico (Emelffar, Brasil) a 0,1%; metilparabeno a 0,2% (Purifarma, Brasil); propilparabeno (Galena, Brasil) a 0,1%; butil-hidroxi-tolueno (Emelffar, Brasil) a 0,05%; água destilada em quantidade suficiente para (qsp) 100 ml.

Após este procedimento, utilizou-se uma tesoura de ponta fina para extirpar a pele, os panículos adiposo e carnoso. A Figura 3 mostra a úlcera produzida no dorso dos camundongos.

3.5 Divisão dos grupos de acordo com o tratamento das feridas

Imediatamente após a ressecção da pele e dos panículos adiposo e carnoso, procedeu-se ao tratamento das feridas e à coleta de amostras para a análise ao longo de todo o experimento. Os animais foram divididos em três grupos, conforme o que se passou sobre a ferida dorsal acima relatada: grupo A- espátula de madeira estéril com SDP/CL; grupo B (controle do veículo)- espátula de madeira estéril com CL; e grupo C (simulado ou *sham*) espátula de madeira estéril, sem a adição de substâncias. Os camundongos foram recolocados nas gaiolas e observados quanto ao processo de epitelização e cicatrização, por um período de até 33 dias. Para a coleta de material, um animal de cada grupo foi sacrificado, a intervalos de 48 horas, do primeiro ao décimo terceiro dia do experimento. A partir deste momento, os camundongos foram sacrificados no 25º, 30º e 33º dias. A cada coleta, os animais receberam denominação da seguinte forma: a letra correspondente ao grupo seguido de um número, de modo que, no início da realização das coletas, foi utilizado o número 1 e, para o último animal, no 33º dia, o número 10.

3.6 Observação das feridas

Para avaliar os aspectos macroscópicos da ferida e pele vizinha durante a

evolução do processo de cicatrização, tais como formação de crosta, alopecia, formação de pêlos, epitelização e contração, no período de 33 dias, os animais de todos os grupos foram observados e fotografados com máquina Yashica FX-D, flash CS-405 e macrolente Kyocera com *zoom*. A análise da evolução das feridas cirúrgicas foi feita em fotografias de papel coloridas 15 x 10 cm.

3.7 Coleta das amostras de feridas

Imediatamente após o procedimento cirúrgico, retirou-se um animal de cada grupo, denominando-os A1, B1 e C1, por ser o dia inicial do experimento, até A10, B10 e C10 ao final do experimento, conforme foi descrito no item 3.5. Os animais foram anestesiados por via inalatória com éter e em seguida colocados em decúbito ventral sobre placa de isopor; ressecaram-se, com tesoura de ponta fina, a pele, os panículos adiposo e carnoso na borda lateral superior direita da ferida e a cicatriz à medida que havia epitélio e/ou pêlo. Os fragmentos de tecido foram colocados em frasco âmbar contendo formalina tamponada com PBS a 10%, para posterior inclusão e cortes, visando a análise histológica.

3.8 Processamento histológico das amostras biopsiadas

Dos fragmentos de tecido fixados em formalina, foram seccionados fragmentos de 3 mm cada um, com lâmina 24 de bisturi, contendo transição de pele normal, ferida e/ou cicatriz. Tais amostras foram processadas conforme normas da rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFG-FAEPU e incluídas em parafina. As secções histológicas foram coradas por hematoxilina-eosina (HE) e

tricrômico de Masson. Durante o exame dos preparados histológicos foi realizada avaliação semiquantitativa do tecido de granulação e da deposição de colágeno, expressando-se os resultados da seguinte maneira: 1+ grau discreto; 2+ grau moderado e 3+ grau acentuado.

Utilizou-se o programa de computador HLIMAGE ++ 97 (Rev C, Copyright[©] 1995, 1996, 1997) para realizar a morfometria. Capturou-se a imagem dos tecidos para o computador com a câmara Olympus 200 acoplada ao microscópio BX 40. Contou-se o número de vasos sanguíneos, em dez campos, com a objetiva de 40 x, equivalendo à área de 3200 μ^2 cada campo. Utilizaram-se o mesmo número de campos, a mesma área e a objetiva de 100 x, para contar fibroblastos e granulócitos neutrófilos.

3.9 Coleta de amostras das feridas para análise microbiológica

As amostras das feridas foram colhidas de todos os grupos de animais, com swabs estéreis, imediatamente antes da realização dos curativos diários. Foram levadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia do HC-UFU-FAEPU e semeadas nos meios de cultura ágar-sangue, *eosin methylene blue* (EMB) e ágar Sabouraud e foram mantidas a 37 °C durante 48 horas. Quando houve crescimento de colônias, estas foram isoladas e identificadas. Para a identificação de *Staphylococcus spp.*, utilizaram-se os testes da bacitracina, da novobiocina e da fermentação da glicose. Os testes de Christie, Atkins e Munch-Peterson (CAMP), da catalase e da coagulase foram empregados para estreptococos β-hemolíticos do grupo B. Os testes de fermentação da lactose, da optoquina, da bilisculina, do sorbitol, do tipo de hemólise e do crescimento em meio hipertônico de NaCl a 6,5%

serviram ao reconhecimento de *Streptococcus* spp. Para a identificação de bactérias Gram-negativas, utilizaram-se os seguintes testes bioquímicos: da oxidase, *oxidative-fermentative*, redução de nitrato, produção de urease, H₂S e indol, utilização de arginina, citrato, fenilalanina, lisina, ornitina e malonato. Fermentação dos carboidratos lactose, rafinose, raminose e sacarose.

Realizou-se o teste de sensibilidade bacteriana a antibióticos *in vitro* (antibiograma) pela técnica de difusão em gel de BAUER *et al.* (1966). Os discos continham os agentes antibióticos: amicacina, ampicilina, aztreonam, ampiciclina/sulbactam, cefalosporina, cefepime, cefoxitina, ceftriaxone, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, lincomicina, meropenem, pefloxacina, sulfazotrin e tetraciclina.

Observou-se, num período de 48 horas, se houve crescimento de colônias de leveduras; em caso positivo, foi usado o sistema automatizado para identificação destas (Vitek Systems ATB Expression Bio-Mérieux SA La Balme les Grottes, France).

3.10 Teste de susceptibilidade bacteriana a SDP em meio líquido (concentração inibidora mínima)

Foram preparadas duas suspensões de SDP em RPMI 1640 incompleto⁵ na concentração de 2 mg/ml. Ambas as suspensões foram homogeneizadas, uma com pipeta de 10 ml e a outra manualmente, durante 10 minutos. Aquela foi filtrada em membrana de milipore 0,2 µm. Ambas foram estocadas no congelador a -20 °C. Dois dias após, estas suspensões foram diluídas no meio de cultura para microorganismos, infusão cérebro-coração (BHI).

⁵RPMI base, bicarbonato de sódio a 0,2% e 10 mM de HEPES, Sigma, USA.

Obtiveram-se treze concentrações, variando de 0,063 a 256 µg/ml. Adicionaram-se as suspensões não-filtradas do antimicrobiano ao BHI com 5×10^5 unidades formadoras de colônia (CFU) de *Escherichia coli*⁶. As suspensões filtradas do antimicrobiano foram adicionadas ao BHI com 5×10^5 CFU de *Staphylococcus aureus*⁷, em consequência, as concentrações de SDP tornaram-se a metade das originais. Os tubos de vidro transparente, ocluídos com algodão estéril, foram incubados em estufa a 37°C por 22 horas. Analisou-se a turvação nos tubos com base nos padrões nefelométricos de McFarland. Foi utilizada alça de platina calibrada de 0,001 ml, para retirar uma amostra de material deste tubo e cultivá-lo em placas de Petri com ágar-sangue. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 22 horas, após o que foram feitas as contagens das colônias resultantes.

3.11 Coleta de amostras de sangue

Nos diferentes períodos e grupos previamente estabelecidos, os camundongos foram colocados em decúbito dorsal sobre placa de isopor, com as quatro patas em abdução máxima, fixadas com alfinetes. A seguir realizou-se punção cardíaca, para-esternal esquerda, com agulha de 13 x 4,5 e seringa⁸ de 1 ml. O sangue foi colhido até o óbito do animal, colocado em frasco Microtainer⁹, imerso em gelo por 6 a 8 horas e centrifugado a 1000 x g, por 10 minutos em temperatura ambiente, para a obtenção do soro. Adicionalmente, uma gota de sangue foi colocada em lâmina, realizou-se o esfregaço e corou-se pelo método de Wright.

⁶ ATCC 25922.

⁷ ATCC 29213.

⁸ Becton Dickinson Indústria Cirúrgica Limitada B-D, Curitiba, Brasil.

⁹ Becton Dickinson and Company B-D, Franklin Lakes, USA.

Estabeleceu-se a percentagem diferencial de leucócitos, através da leitura microscópica no aumento de 1000 x.

3.12 Coleta da medula óssea

Para coleta da medula, os camundongos foram sacrificados e colocados em álcool etílico a 70%. Incisou-se a pele da face anterior e medial dos membros posteriores, região inguinal e quadrantes posteriores do abdome e fez-se a divulsão dos músculos até atingir a tibia e fêmur. Estes dois ossos foram retirados e imersos em meio de cultura líquido RPMI 1640 incompleto¹⁰. Em seguida, procedeu-se à aspiração da medula óssea com seringa e agulha 13 x 4,5, contendo 5 ml do meio de cultura.

3.13 Cultura de medula óssea

Após a coleta da medula óssea dos camundongos tratados ou não com sulfadiazina de prata, a suspensão celular foi lavada duas vezes por centrifugação a 250 x g, a 4°C, por 10 minutos. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo¹¹. A viabilidade foi determinada por contagem diferencial em câmara de Neubauer, na presença do corante vital azul de Tripan. A concentração celular foi ajustada de modo a conter 2×10^6 células por ml de meio RPMI completo.

¹⁰ Sigma.

¹¹ RPMI-1640 suplementado com bicarbonato de sódio a 0,2%, 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100 mM de aminoácidos não-essenciais, 5×10^{-5} M de 2-mercaptopetanol, Sigma, USA.e 5 % de soro bovino fetal (SBF), Gibco, USA.

As amostras foram distribuídas ($180 \mu\text{l}$ por poço) em duplicata, em placas de cultura de 96 poços, com a adição ou não de $20 \mu\text{l}$ por poço, dos estímulos e sulfadiazina de prata filtrada, em membrana de milipore de $0,2 \mu$, nas concentrações finais de 0,02 a $50 \mu\text{g/ml}$, Con-A a $5 \mu\text{g/ml}$, lipopolissacarídeo (LPS) a $10 \mu\text{g/ml}$, LPS a $10 \mu\text{g/ml}$ adicionado de 5% de meio condicionado de células L12L10, transformadas para a produção de IFN- γ murino (IFN- γ) ou 5% de IFN- γ , apenas. Após 48 horas de cultivo a 37°C em estufa contendo ar e 5% de CO_2 , os sobrenadantes foram coletados e analisados quanto à produção de IL-4 e NO.

Em um outro experimento, para o teste de viabilidade celular em 24, 48, 72 e 96 horas, foram adicionados em triplicata, os estímulos KM^+ a $2 \mu\text{g/ml}$, Con-A a $5 \mu\text{g/ml}$, e a sulfadiazina de prata não-filtrada nas concentrações finais de 0,3 a 250 $\mu\text{g/ml}$. Colheram-se os sobrenadantes destas placas para análise da produção de IL-4 e NO.

3.14 Teste de viabilidade das células de medula óssea cultivadas

Para se realizar o teste de viabilidade celular em 24, 48, 72 e 96 horas das suspensões celulares, descritas no último parágrafo do tópico anterior, colocaram-se $10 \mu\text{l}$ de cada suspensão e $5 \mu\text{l}$ de Fluoroquench¹² entre lâmina e lamínula. Contaram-se, ao microscópio Olympus BX50, quinhentas células, vivas e mortas, as quais se coraram em verde e vermelho, respectivamente. Calculou-se a porcentagem de células vivas.

¹² One Lambda, Canoga Park, USA.

3.15 Dosagem de IL-4

Para a dosagem de IL-4, placas de poliestireno de alta afinidade¹³ foram incubadas por 18 horas a 4°C, após a adição de 50 µl por orifício de anticorpo monoclonal¹⁴ na concentração de 10 µg/ml, diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M, pH 9,6 (TC). Em seguida, as placas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado¹⁵ a 5% em PBS (PBS-M 5%), por uma hora, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T 0,05%)¹⁶. Em seguida, adicionaram-se as diferentes concentrações da curva padrão¹⁷ a partir de 10 ng/ml até a 11ª diluição na razão dois, assim como as amostras testes as quais foram incubadas a 4°C por 18 horas. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS-T 0,05%, adicionou-se o segundo anticorpo¹⁸ na diluição de 1:5000, em PBS-M 5% e, incubou-se a 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas novamente e adicionou-se o conjugado enzimático¹⁹ na diluição de 1:10.000 em PBS-T 0,05%. Após uma hora de incubação a 37°C, as placas foram lavadas e a reatividade determinada pela adição de substrato enzimático²⁰, diluído em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,5, contendo peridrol²¹ a 0,03%. Após 15 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2N e a leitura efetuada a 492 nm em leitor de microplacas²².

¹³ Corning, USA;

¹⁴ Anti-IL-4, BVD6, ATCC, USA;

¹⁵ Nestlé, Araçatuba, SP;

¹⁶ Sigma, USA.

¹⁷ rMu-IL-4, Sigma, USA.

¹⁸ Anticorpo monoclonal anti-IL-4 biotinilado, obtido do hibridoma 11B11, ATCC, USA.

¹⁹ Avidina ligada à peroxidase, Sigma, USA.

²⁰ Orto-fenilenodiamina (OPD), Sigma, USA.

²¹ Merck.

²² Flow Titertek Multiskan Plus, USA;

3.16 Dosagem de nitrito (NO_2^-)

Utilizou-se o método de Griess para a dosagem de NO_2^- , uma maneira de se avaliar a produção de óxido nítrico (NO). Como curva-padrão, foi utilizado o NaNO_2^{23} com diluição inicial de 200 μM até 0,19 μM , em água bidestilada. Não se diluíram as amostras sobrenadantes de cultura das células da medula óssea. O reagente de Griess²⁴ foi misturado na proporção de 1:1 (NEED:Sulfanilamida). As amostras, bem como todas as diluições da curva-padrão, foram adicionadas em um volume de 50 μl , em poços de microplacas. Em seguida, acrescentou-se o reagente de Griess, também num volume de 50 μl , nos poços em que se colocaram a curva e as amostras. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 570 nm. A concentração de NO_2^- presente nas amostras foi calculada de acordo com a curva de regressão linear.

3.17 Análise estatística

Para a análise dos resultados utilizou-se o GraphPad²⁵. Foi aplicado o teste t de Student para duas amostras independentes a fim de comparar os grupos A, B e C em relação à porcentagem de leucócitos no sangue periférico e ao número de fibroblastos, granulócitos neutrófilos e vasos na lesão cutânea; em relação à porcentagem de células de medula óssea nas suspensões controle, com KM⁺, Con-A e sulfadiazina de prata não-filtrada. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 ou 5% o nível para a rejeição da hipótese de nulidade.

²³ Vetec

²⁴ Sulfanilamida a 1% (Sigma) em H_3PO_4 a 2,5%, NEED a 0,1% (Sigma) em H_3PO_4 a 2,5%.

²⁵ A versão 3.00 para Windows do "Software", San Diego, Califórnia, USA, www.graphpad.com

4. Resultados

4.1 Análise macroscópica da ferida

As feridas dos animais no grupo C mantiveram-se mais secas que as dos grupos A e B desde o segundo dia do experimento (Figura 4). Foi notada alopecia em torno das feridas nos animais dos grupos A e B a partir do décimo-primeiro dia pós-operatório (PO; Figura 5). Detectaram-se pêlos na periferia da alopecia no 15º dia PO, nos animais do grupo B e no 16º dia PO no grupo A (Figura 6).

As feridas tornaram-se completamente fechadas no 22º, 28º e 31º PO nos animais dos grupos C, B e A, respectivamente. Observaram-se os pêlos, vizinhos às lesões, cobrindo-as parcialmente ou totalmente (Figura 7).



Figura 3. Úlcera de 2 x 2 cm após a retirada da pele e dos panículos adiposo e carnoso no dorso do camundongo BALB/c.

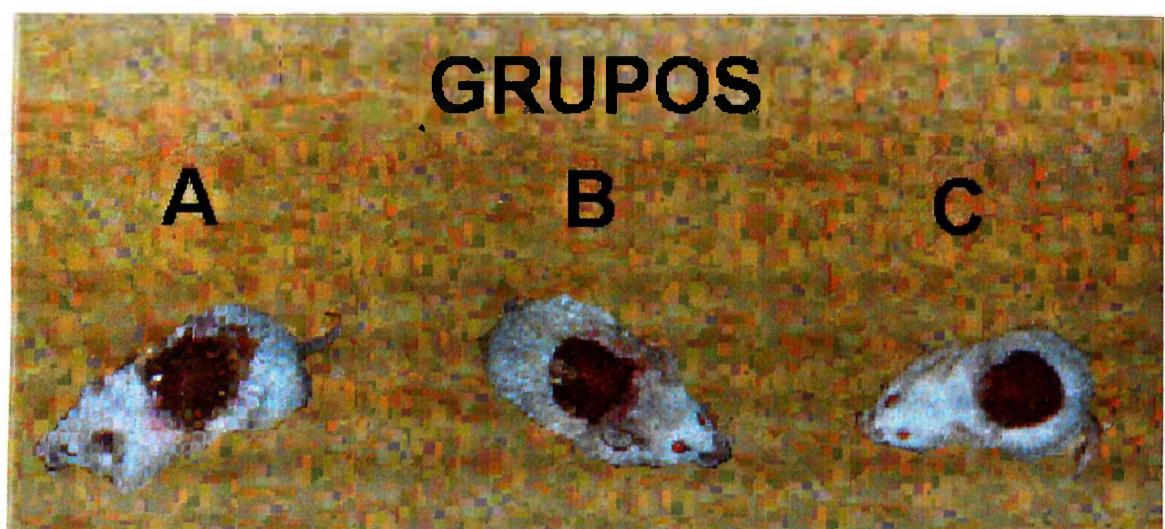


Figura 4. Segundo dia pós-operatório. Os pêlos em torno das feridas dos animais dos grupos A (sulfadiazina de prata com creme Lanette) e B (creme Lanette), estão impregnados com medicamentos. No animal do grupo C (controle) não se aplicou nenhum produto químico.

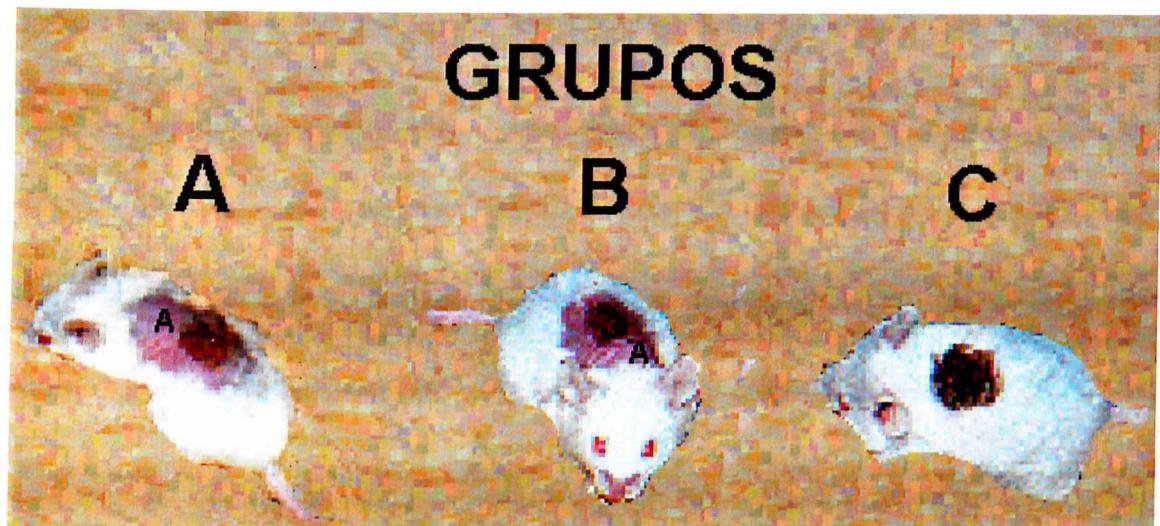


Figura 5. Observa-se uma área de alopecia (A) em torno da ferida nos animais dos grupos A (sulfadiazina de prata com creme Lanette) e B (creme Lanette). No animal do grupo C (controle sem medicamento), não há alopecia.

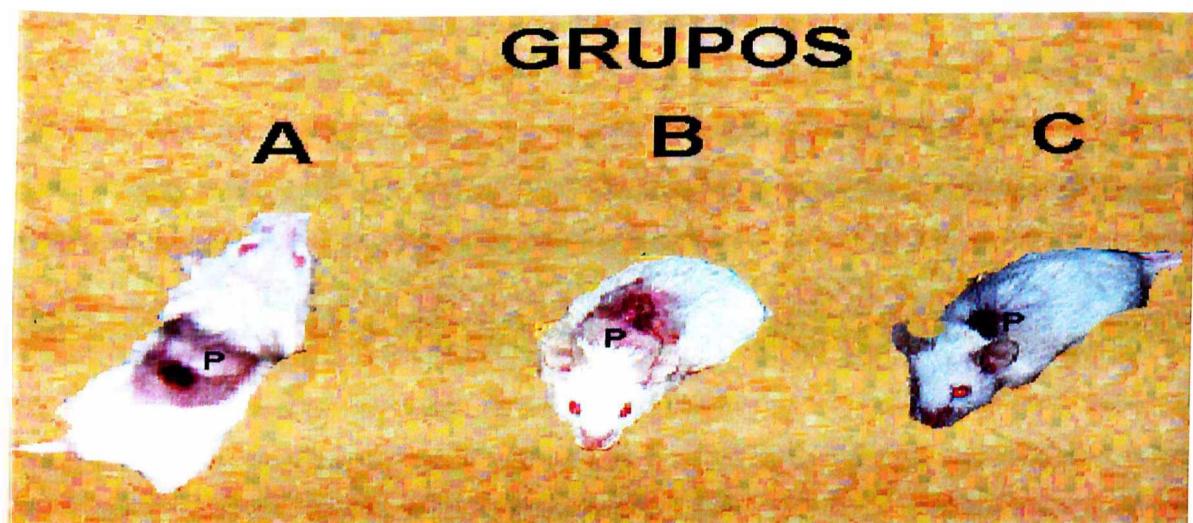


Figura 6. Notam-se pêlos (P) nos locais da alopecia nos animais dos grupos A (sulfadiazina de prata com creme Lanette) e B (creme Lanette) e em torno da cicatriz no animal do grupo C (controle sem medicamento).

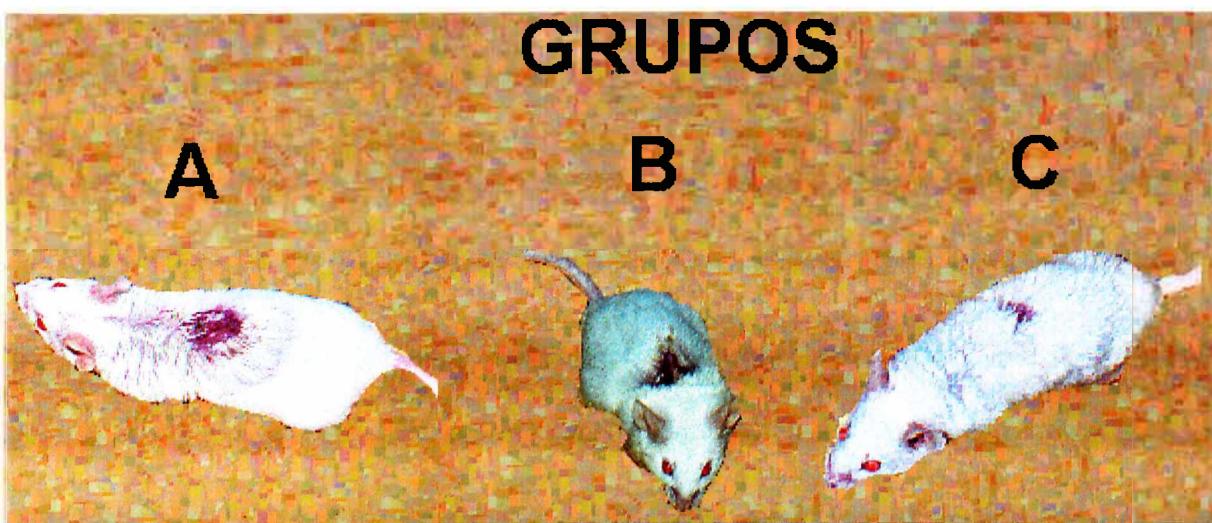


Figura 7. Feridas totalmente epitelizadas no 31º PO do animal do grupo A (sulfadiazina de prata com creme Lanette), 28º PO do animal do grupo B (creme Lanette) e 22º PO do animal do grupo C (controle sem medicamento).

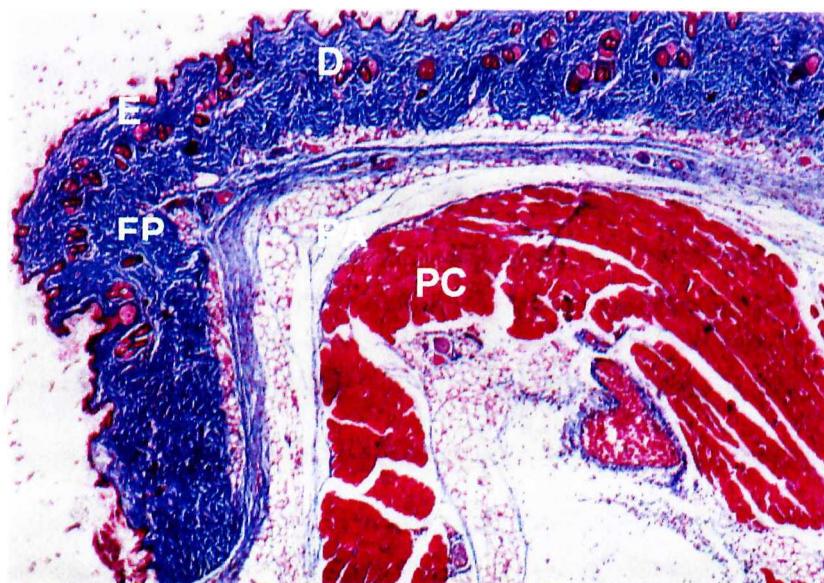


Figura 8. Histologia cutânea normal de camundongo BALB/c. E: Epiderme; D: derme; PA: panículo adiposo; PC: panículo carnoso; FP: folículo piloso. Tricrômico de Masson; aumento original 40x.

4.2 Análise histológica das amostras de pele

A Figura 8 mostra a histologia normal da pele e tecidos subjacentes no camundongo BALB/c. As Figuras 9-16 mostram a evolução histológica das feridas em cicatrização, nos animais dos três grupos experimentais, quanto ao surgimento do tecido de granulação e à deposição de colágeno.

A análise semiquantitativa da formação do tecido de granulação e dos depósitos de colágeno, nos três grupos de animais estudados, está demonstrada na Tabela 4.

De acordo com a Tabela 5, a média de fibroblastos foi显著mente maior no grupo C do que no grupo A, nos dias 0 e 4º PO; esta diferença de valores, entre os dois grupos, se inverteu no 30º PO. A média de fibroblastos foi显著mente maior no grupo C do que no grupo B no dia 0 PO; e显著mente menor no 25º e 33º PO.

A média de neutrófilos foi显著mente maior no grupo C do que nos grupos A e B, no 12º PO (Tabela 5).

A média do número de vasos foi显著mente maior no grupo C do que no grupo A, no 4º e 10º PO. Foi maior também que no grupo B no 4º PO. Esta relação de superioridade, entre os grupos B e C, se inverteu no 30 e 33º PO (Tabela 5).

A média do número de vasos foi显著mente maior no grupo B, do que no grupo A, no 6º PO. Houve inversão da diferença entre estes dois grupos, no 8º PO (Tabela 5).

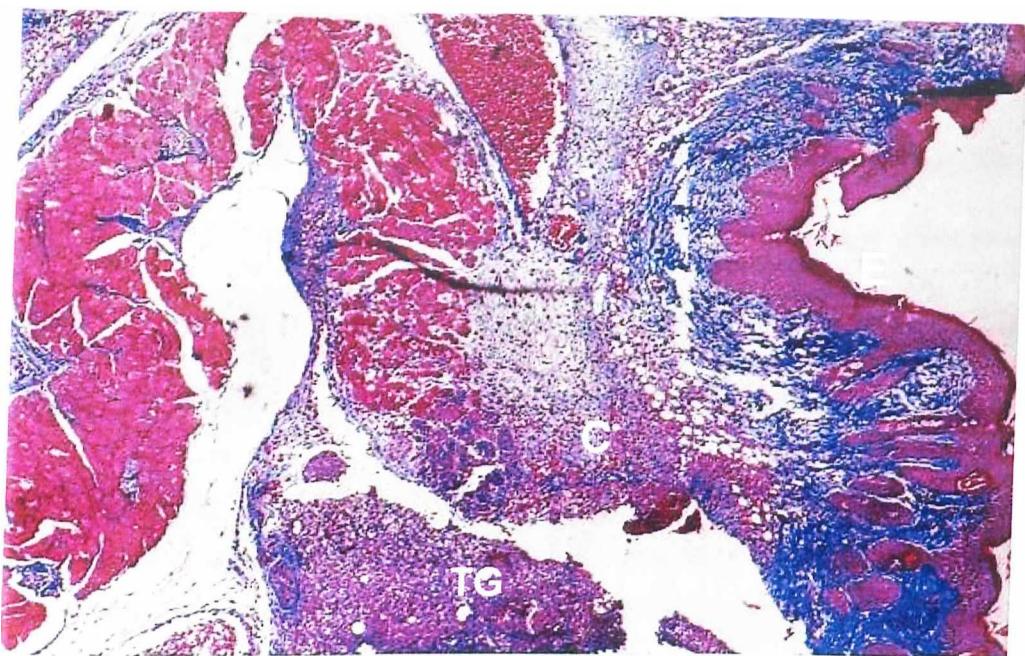


Figura 9. Quarto PO, B3 (creme Lanette). Notam-se hiperplasia epidérmica (E), tecido de granulação (TG) e depósito de colágeno (C). Tricrômico de Masson: aumento de 40x.

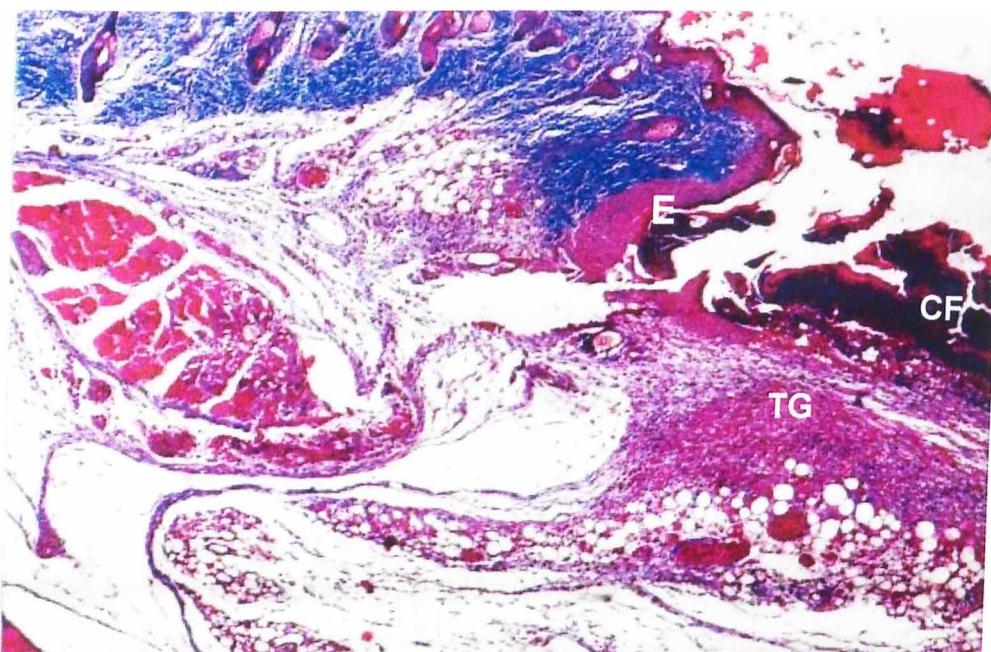


Figura 10. Quarto PO, C3 (controle sem medicamento). Notam-se crosta de fibrina (CF), hiperplasia epidérmica e tecido de granulação. Tricrômico de Masson: aumento de 40x.

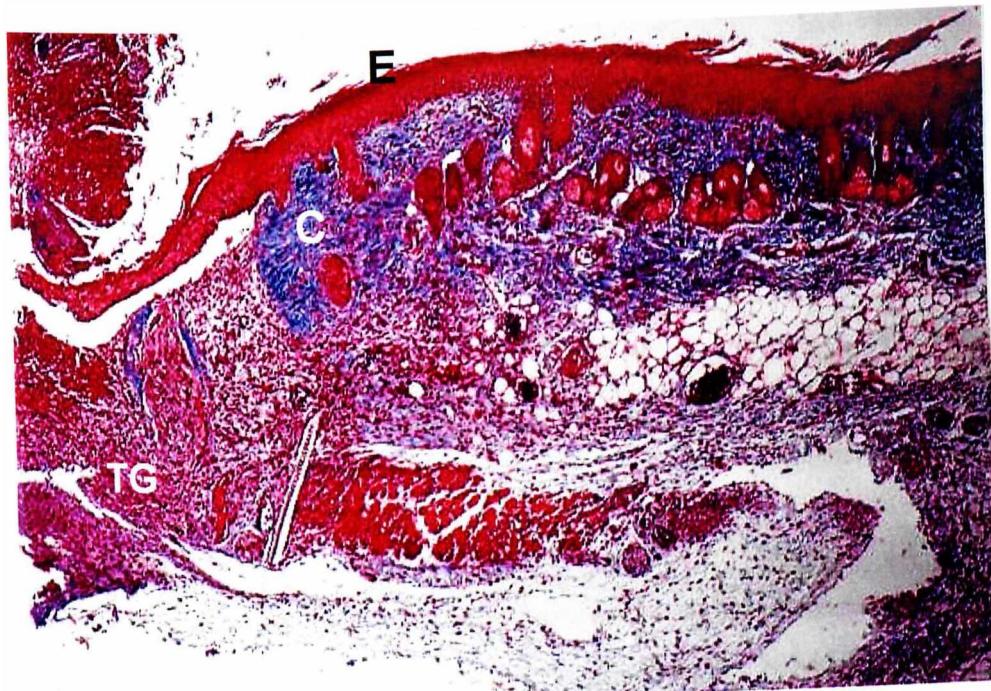


Figura 11. Sexto PO, A4 (sulfadiazina de prata com creme Lanette). Notam-se hiperplasia epidérmica (E), tecido de Notam-se hiperplasia epidérmica (E), tecido de colágeno (C) e depósito de colágeno (C). Tricrômico de Masson: aumento de 40x.

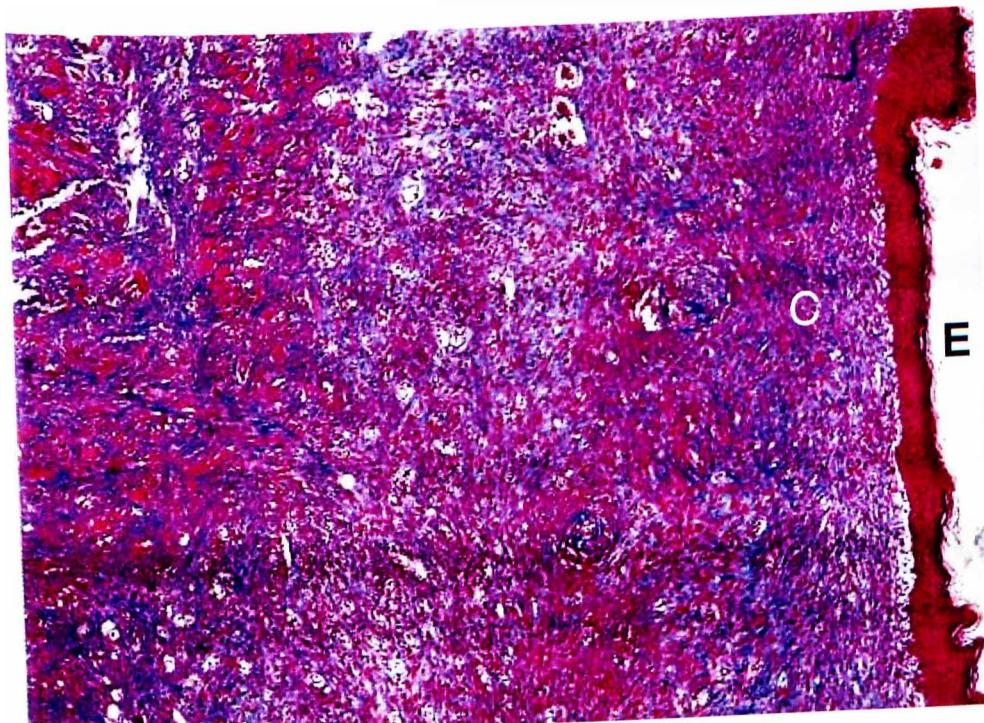


Figura 12. Décimo-segundo PO, A7 (sulfadiazina de prata com creme Lanette). Notam-se hiperplasia epidérmica (E) e depósito de colágeno (C). Tricrômico de Masson: aumento de 40x.

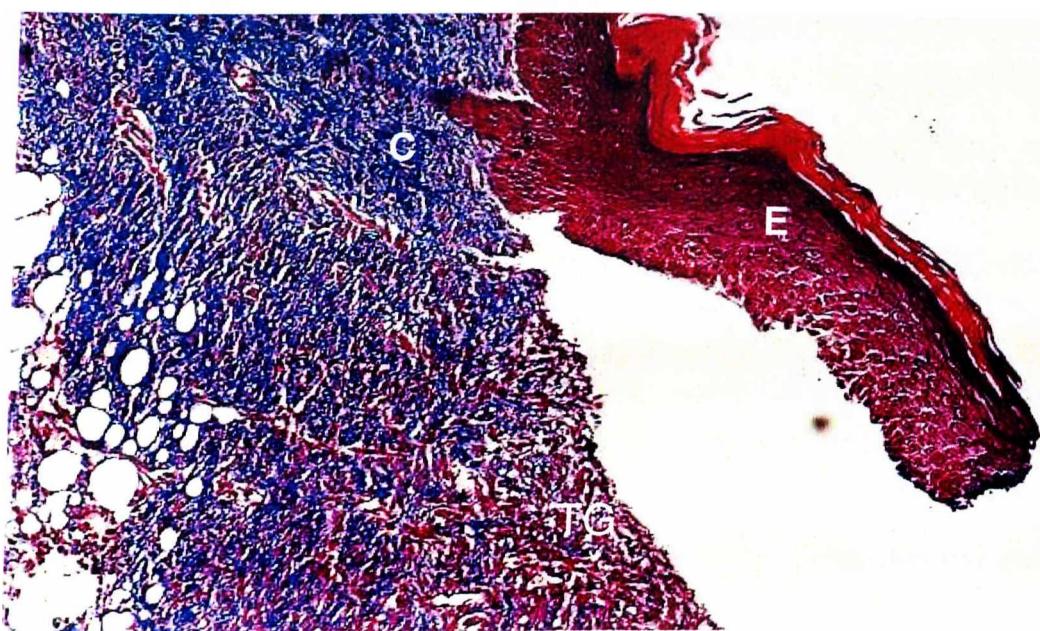


Figura 13. Décimo-segundo PO, B7 (creme Lanette). Notam-se hiperplasia epidérmica (E), depósito de colágeno (C) e tecido de granulação (TG). Tricrômico de Masson: aumento de 100x.

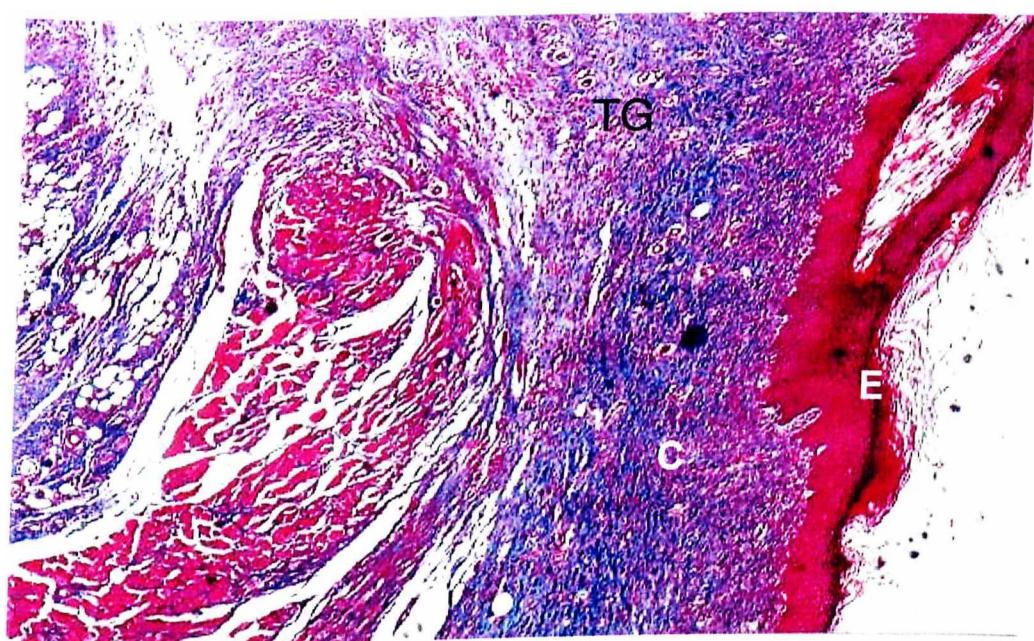


Figura 14. Décimo-segundo PO, C7 (controle sem medicamento). Notam-se hiperplasia epidérmica (E), depósito de colágeno (C) e tecido de granulação (TG). Tricrômico de Masson: aumento de 40x.

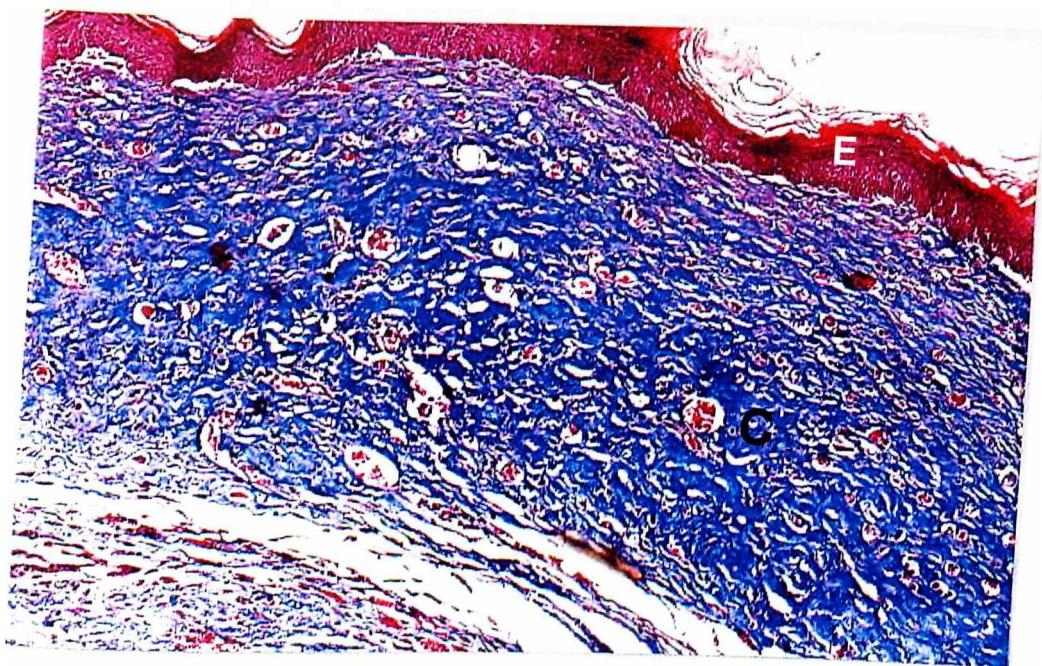


Figura 15. Trigésimo-primeiro PO, A9 (sulfadiazina de prata com creme Lanette). Notam-se hiperplasia epidérmica (E) e depósito de colágeno (C). Tricrômico de Masson: aumento de 100x.

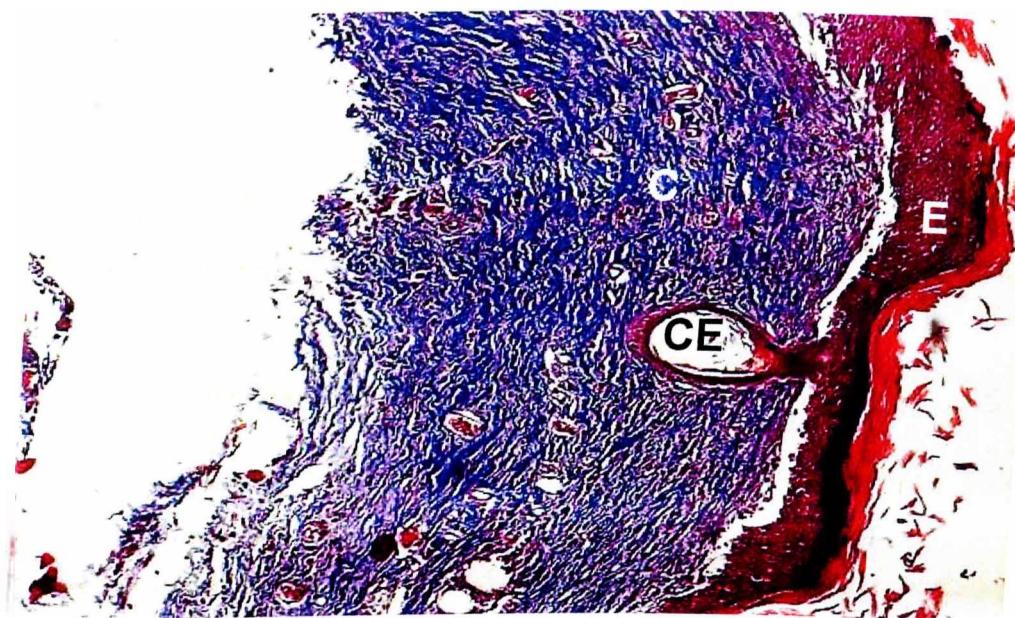


Figura 16. Trigésimo-terceiro PO, B10 (creme Lanette). Notam-se hiperplasia epidérmica (E), depósito de colágeno (C) e um cisto epidermóide (CE). Tricrômico de Masson: aumento de 100x.

Tabela 4 - Análise semiquantitativa da formação de colágeno e tecido de granulação em cortes das lesões cutâneas dos camundongos BALB/c tratados com sulfadiazina de prata (grupo A) ou creme Lanette (grupo B) e não-tratados (grupo C).

Grupos	Animais	Tecido de granulação	Colágeno
A	A1	-	-
	A2	-	-
	A3	-	-
	A4	2+/3+	1+/3+
	A5	3+/3+	2+/3+
	A6	3+/3+	2+/3+
	A7	3+/3+	2+/3+
	A8	NE	NE
	A9	-	3+/3+
	A10	AM	AM
B	B1	-	-
	B2	-	-
	B3	1+/3+	2+/3+
	B4	3+/3+	2+/3+
	B5	3+/3+	2+/3+
	B6	3+/3+	2+/3+
	B7	-	3+/3+
	B8	-	3+/3+
	B9	-	3+/3+
	B10	-	-
C	C1	-	-
	C2	-	-
	C3	2+/3+	-
	C4	2+/3+	1+/3+
	C5	NE	NE
	C6	3+/3+	2+/3+
	C7	3+/3+	3+/3+
	C8	-	3+/3+
	C9	-	3+/3+
	C10	-	3+/3+

-: ausência; 1+: grau discreto; 2+: grau moderado; 3+: grau acentuado; NE: área cirúrgica não evidenciada; AM: animal morto.

Tabela 5 - Morfometria das lesões cutâneas dos camundongos BALB/c tratados com sulfadiazina de prata (grupo A) ou creme Lanette (grupo B) e não-tratados (grupo C).

PO ²	Grupo	Fibroblastos ¹ MÉDIA ± SD ³	Neutrófilos ¹ MÉDIA ± SD		Vasos ¹ MÉDIA ± SD
0	A1	1,2 ± 1,4	4,5 ± 4,5 6,9 ± 7,2 6,4 ± 6,7	0,5 ± 1,1 1,2 ± 1,0 1,5 ± 1,4	
	B1	0,6 ± 0,97			
	C1	2,9 ± 1,9			
2	A2	1,9 ± 2,5	3,2 ± 2,0 4,4 ± 3,3 3,3 ± 1,8	1,8 ± 0,92 1,8 ± 1,6 1,5 ± 1,3	
	B2	1,7 ± 1,8			
	C2	2,1 ± 1,3			
4	A3	3,4 ± 3,4	4,6 ± 3,8 4,8 ± 3,5 3,4 ± 2,2	2,9 ± 1,1 3,2 ± 1,3 5,0 ± 2,4	
	B3	9,0 ± 3,4			
	C3	7,5 ± 4,1			
6	A4	6,8 ± 2,3	1,5 ± 1,7 2,4 ± 2,4 2,9 ± 1,3	1,9 ± 0,88 3,2 ± 1,4 2,8 ± 1,4	
	B4	9,7 ± 3,8			
	C4	9,8 ± 6,9			
8	A5	8,8 ± 2,6	1,2 ± 1,0 0,3 ± 0,95 NE	5,2 ± 2,7 2,0 ± 1,2 NE	
	B5	9,5 ± 3,6			
	C5	NE ⁴			
10	A6	6,4 ± 4,3	2,5 ± 3,5 2,1 ± 2,5 1,1 ± 2,0	3,0 ± 2,1 5,7 ± 3,5 3,4 ± 1,3	
	B6	8,4 ± 3,5			
	C6	9,3 ± 5,6			
12	A7	8,6 ± 2,8	0,2 ± 0,42 0,9 ± 1,3 3,6 ± 3,2	5,4 ± 3,2 4,7 ± 0,82 6,1 ± 5,5	
	B7	9,8 ± 4,0			
	C7	9,4 ± 3,0			
25	A8	NE	NE 0,30 ± 0,67 0	NE 4,0 ± 1,1 3,6 ± 1,8	
	B8	6,4 ± 2,0			
	C8	3,8 ± 1,6			
30	A9	5,5 ± 3,3	0,20 ± 0,42 0,70 ± 1,1 0	3,7 ± 2,2 3,9 ± 1,8 2,3 ± 1,4	
	C9	2,9 ± 2,1			
	B9	3,7 ± 2,8			
33	A10	AM ⁵	AM 0 0	AM 4,3 ± 2,4 1,9 ± 1,4	
	B10	5,9 ± 3,1			
	C10	3,2 ± 2,0			

¹número de fibroblastos, granulócitos neutrófilos e vasos sanguíneos por 3200 μ^2 ; ²PO= pós-operatório; ³SD= desvio padrão; ⁴NE= área cirúrgica não evidenciada; ⁵AM= animal morto.

4.3 Avaliação da presença de microorganismos nas feridas

Como se observa na Tabela 6, houve predominância de bactérias da espécie *Staphylococcus saprophyticus* nos grupos A e C. Bactérias da espécie *Citrobacter diversus* e do gênero *Klebsiella* foram predominantes no grupo B. Outros tipos de bactérias também cresceram nas culturas, porém em menor freqüência. Apenas uma espécie de levedura de crescimento rápido foi detectada em uma amostra do grupo B.

As Tabelas 7, 8 e 9 mostram que bactérias da mesma espécie apresentaram perfil de sensibilidade e resistência, aos antibióticos testados, semelhante para os três grupos.

4.4 Avaliação da concentração inibidora mínima da SDP

Não se observou turvação no frasco de SDP não-filtrada à concentração de 128 µg/ml. Houve crescimento de duas colônias de *Escherichia coli*, após a semeadura de uma amostra desta suspensão.

Observou-se turvação, correspondente à existência de 3×10^8 bactérias por ml, nas suspensões de SDP não-filtrada em concentrações abaixo de 128 µg/ml e em todas as suspensões de SDP filtrada.

4.5 Avaliação da porcentagem leucocitária no sangue periférico

Observou-se que não houve diferença estatística significante, ao se

comparar os três grupos, quanto à porcentagem de leucócitos presentes nas amostras (Tabela 10).

Tabela 6- Análise microbiológica qualitativa das superfícies das feridas dos camundongos BALB/c no período pós-operatório, tratados ou não com sulfadiazina de prata.

Amostras ³	Microorganismos ¹ mais freqüentes (+/-) ²						
	STA	STR	ENT	CIT	KLE	PRO	Fungos
A1	-	-	-	-	-	-	-
A2	+	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-	-
A5	+	+	-	-	-	-	-
A6	+	+	-	-	-	-	-
A7	+	-	+	-	-	-	-
A8	NR ⁴	NR	NR	NR	NR	NR	NR
A9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
A10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B1	-	-	-	-	+	+	-
B2	+	-	-	-	+	+	-
B3	+	-	-	-	+	+	-
B4	+	-	-	-	-	+	-
B5	-	-	-	-	+	-	-
B6	-	-	-	-	+	-	-
B7	-	-	-	-	-	-	-
B8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C1	-	-	-	-	-	-	-
C2	+	-	-	-	+	+	-
C3	+	-	-	-	-	-	-
C4	+	-	-	-	-	-	-
C5	+	-	-	-	-	-	-
C6	+	-	-	-	-	-	-
C7	+	-	-	-	-	-	-
C8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C9	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

C10 NR NR NR
¹Foram analisados quanto à presença dos seguintes microorganismos: STA = *Staphylococcus* spp; STR = *Streptococcus* spp; ENT = *Enterococcus* spp; CIT= *Citrobacter* spp; KLE = *Klebsiella* spp; PRO = *Proteus* spp; *Candida colliculosa* = *Candida* spp; Levedura de crescimento rápido. ²Presença (+) ou ausência (-) do respetivo microorganismo analisado.³As amostras foram coletadas em sete períodos diferentes em cada grupo de animais denominados A (sulfadiazina de prata em creme Lanette), B (creme Lanette), C (não recebeu nenhum tratamento medicamentoso), e analisados quanto ao crescimento de microorganismos.⁴NR, não realizada por ter ocorrido a cicatrização total das feridas.

Tabela 7 – Sensibilidade e resistência das bactérias isoladas das superfícies das feridas dos camundongos BALB/c, no período pós-operatório, tratados com sulfadiazina de prata em creme Lanette (grupo A).

Amostra ³	Microorganismos ¹ mais freqüentes (+/-) ²					
	STA	STR	ENT	CIT	KLE	PRO
A1	-	-	-	-	-	-
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, q, r, u, v, w, y ♠ t, x					
A2	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	-	-	-
A4	-	-	-	-	-	-
	▼ a, g, h, i, j, l, m, n, o, q, r, s, t, u, v, w, y ♠ x	▼ a, b, d, j, k, l, m, n, s, v ♠ p, x				
A5	-	-	-	-	-	-
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, o, q, r, u, v, w, y ♠ t, x	▼ b, d, e, j, k, m, n, o, q, s, v, y ♠ p, x	▼ b, d, k, x, y			
A6	-	-	-	-	-	-
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, o, q, r, s, u, v, w, y ♠ t, x		♦ e, j, l, p, s, v			
A7	-	-	-	-	-	-
	♦ t, x					
A8	NR ⁴	NR	NR	NR	NR	NR
A9	NR	NR	NR	NR	NR	NR
A10	NR	NR	NR	NR	NR	NR

¹Microorganismo: STA = *Staphylococcus* spp; STR = *Streptococcus* spp; ENT = *Enterococcus* spp; CIT= *Citrobacter* spp; KLE = *Klebsiella* spp; PRO = *Proteus* spp.

²Presença (+) ou ausência (-) do respectivo microorganismo analisado. ³As amostras foram coletadas em sete períodos diferentes, o grupo de animais foi denominado A (sulfadiazina de prata em creme Lanette). Analisou-se o crescimento de microorganismos, testou-se a sensibilidade aos agentes antibióticos (BAUER et al., 1966): amicacina^a, ampiciclina^b, aztreonam^c, ampiciclina/sulbactam^d, cefalosporina^e, cefepime^f, cefoxitina^g, ceftriaxone^h, ciprofloxacinaⁱ, clindamicina^j, cloranfenicol^k, eritromicina^l, gentamicina^m, imipenemⁿ, levofloxacina^o, lincomicina^p, meropenem^q, ofloxacina^r, oxacilina^s, pefloxacina^t, rifampicina^u, sulfazotrin^v, teicoplanina^w, tetraciclina^x e vancomicina^y. (▼) Sensibilidade ao antibiótico. (♠)Resistência ao antibiótico. ⁴NR, não realizada por ter ocorrido o fechamento total das feridas.

Tabela 8– Sensibilidade e resistência das bactérias isoladas das superfícies das feridas dos camundongos BALB/c, no período pós-operatório, tratados com creme Lanette (grupo B).

Amostra ³	Microorganismos ¹ mais freqüentes (+/-) ²					
	STA	STR	ENT	CIT	KLE	PRO
B1	-	-	-	-	-	-
	▼ a, e, g, h, i, j, m, n, o,			▼ a, c, f, h, i, m, n, o, q, t, v	▼ a, c, d, e, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	
B2	q, r, s, u, v, w, y ♠ t, x	-	-	♦ b, e, g	♦ b	-
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, o,			▼ a, c, f, h, i, m, n, o, q, t, v	▼ a, c, d, e, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	
B3	q, r, u, v, w, x, y ♠ s, t	-	-	♦ b, d, e, g	♦ b	-
	▼ a, g, h, i, j, l, m, n, o, q,			▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v	▼ a, c, d, e, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	
B4	r, s, u, v, w, x, y ♠ t	-	-	♦ b, e, g	♦ b	-
	▼ a, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v			▼ a, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	▼ a, b, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	
B5	-	-	-	-	♦ b	
	▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v			▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v	▼ a, b, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	
B6	-	-	-	♦ b, e, g		
	▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v			▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v		
B7	-	-	-	♦ b, e, g		
	▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v			▼ a, c, d, f, h, i, m, n, o, q, t, v		
B8	NR ⁴	NR	NR	NR	NR	NR
B9	NR	NR	NR	NR	NR	NR
B10	NR	NR	NR	NR	NR	NR

¹Microorganismo: STA = *Staphylococcus* spp; STR = *Streptococcus* spp; ENT = *Enterococcus* spp; CIT= *Citrobacter* spp; KLE = *Klebsiella* spp; PRO = *Proteus* spp. ²Presença (+) ou ausência (-) do respectivo microorganismo analisado. ³As amostras foram coletadas em sete períodos diferentes, o grupo de animais foi denominado B (creme Lanette). Analisou-se o crescimento de microorganismos, testou-se a sensibilidade aos agentes antibióticos (BAUER et al., 1966): amicacina^a, ampiciclina^b, aztreonam^c, ampiciclina/sulbactam^d, cefalosporina^e, cefepime^f, cefoxitina^g, ceftriaxone^h, ciprofloxacinaⁱ, clindamicina^j, cloranfenicol^k, eritromicina^l, gentamicina^m, imipenemⁿ, levofloxacina^o, lincomicina^p, meropenem^q, ofloxacina^r, oxacilina^s, pefloxacina^t, rifampicina^u, sulfazotrin^v, teicoplanina^w, tetraciclina^x e vancomicina^y. (▼) Sensibilidade ao antibiótico. (♠)Resistência ao antibiótico. ⁴NR, não realizada por ter ocorrido o fechamento total das feridas.

Tabela 9— Sensibilidade e resistência das bactérias isoladas das superfícies das feridas dos camundongos BALB/c, no período pós-operatório, não tratados com medicamentos (grupo C).

Amostra ³	Microorganismos ¹ mais freqüentes (+/-) ²					
	STA	STR	ENT	CIT	KLE	PRO
C1	-	-	-	-	-	-
	▼ a, i, l, m, n, o, q, r, s,					
C2	u, v, w, y ♠ e, g, h, j, t, x	-	-	-	-	-
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, o,			▼ a, c, f, h, i, m, n, o, q, t, v	▼ a, c, d, e, f, g, h, i, m, n, o, q, t, v	
C3	q, r, u, v, w, x, y ♠ s, t	-	-		♠ b, d, e, g	♠ b
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, o,					
C4	q, r, s, u, v, w, y ♠ t, x	-	-	-	-	-
	▼ a, g, h, i, j, l, m, n, o,					
C5	q, r, s, u, v, w, y ♠ t, x	-	-	-	-	-
	▼ a, g, h, i, j, l, m, n, o,					
C6	q, r, s, u, v, w, y ♠ t, x	-	-	-	-	-
	▼ a, e, g, h, i, j, l, m, n, o,					
C7	q, r, s, u, v, w, y ♠ t, x	-	-	-	-	-
	NR ⁴	NR	NR	NR	NR	NR
C8	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C9	NR	NR	NR	NR	NR	NR
C10	NR	NR	NR	NR	NR	NR

¹Microorganismo: STA = *Staphylococcus* spp; STR = *Streptococcus* spp; ENT = *Enterococcus* spp; CIT= *Citrobacter* spp; KLE = *Klebsiella* spp; PRO = *Proteus* spp. ²Presença (+) ou ausência (-) do respectivo microorganismo analisado. ³As amostras foram coletadas em sete períodos diferentes, o grupo de animais foi denominado C (sem medicamento). Analisou-se o crescimento de microorganismos, testou-se a sensibilidade aos agentes antibióticos (BAUER *et al.*, 1966): amicacina^a, ampiciclina^b, aztreonam^c, ampiciclina/sulbactam^d, cefalosporina^e, cefepime^f, cefoxitina^g, ceftriaxone^h, ciprofloxacinaⁱ, clindamicina^j, cloranfenicol^k, eritromicina^l, gentamicina^m, imipenemⁿ, levofloxacina^o, lincomicina^p, meropenem^q, ofloxacina^r, oxacilina^s, pefloxacina^t, rifampicina^u, sulfazotrin^v, teicoplanina^w, tetraciclina^x e vancomicina^y. (▼) Sensibilidade ao antibiótico. (♠)Resistência ao antibiótico. ⁴NR, não realizada por ter ocorrido o fechamento total das feridas.

Tabela 10 - Porcentagem de células leucocitárias, nas amostras de sangue periférico dos camundongos, após cirurgia e tratamento ou não com sulfadiazina de prata.

Amostras ¹	Diferencial de leucócitos (%)				
	Bastonetes	Segmentados	Eosinófilos	Linfócitos	Monócitos
A1	0	31	0	67	2
A2	1	24	1	72	2
A3	3	45	1	50	1
A4	8	64	0	26	2
A5	4	55	1	38	2
A6	12	18	0	65	5
A7	7	40	0	51	2
A8	0	6	2	90	2
A9	NR ²	NR	NR	NR	NR
A10	NR	NR	NR	NR	NR
B1	2	18	1	75	4
B2	0	30	1	61	8
B3	10	65	1	20	4
B4	6	58	0	30	6
B5	4	55	1	38	2
B6	10	50	0	40	0
B7	10	47	0	37	0
B8	0	46	1	50	3
B9	NR	NR	NR	NR	NR
B10	NR	NR	NR	NR	NR
C1	NR	NR	1	60	1
C2	0	38	1	40	7
C3	5	47	0	32	4
C4	3	61	1	72	2
C5	1	24	0	49	2
C6	6	43	1	52	10
C7	3	34	1	50	7
C8	1	41	NR	NR	NR
C9	NR	NR	NR	NR	NR
C10	NR	NR	NR	NR	NR

Foram colhidas amostras de sangue dos camundongos que foram submetidos à ressecção cirúrgica, em 9 períodos, a partir do dia zero e, realizadas as contagens diferenciais de leucócitos. O grupo A recebia o tratamento com sulfadiazina de prata em creme Lanette, o grupo B apenas o veículo (creme Lanette) e o grupo C não recebeu nenhum tratamento medicamentoso. ²NR, não realizada, devido às amostras conterem quantidades insuficientes de sangue para a análise.

4.6 Avaliação da viabilidade das células de medula óssea

A porcentagem de células vivas, do camundongo BALB/c, apresentou-se significantemente mais baixa do que nas suspensões controle, quando as células foram expostas à SDP não-filtrada nas concentrações entre 50 µg/ml e 250 µg/ml. A viabilidade das células, nas suspensões de SDP não-filtrada à concentração de 25 µg/ml, apresentou-se mais próxima da viabilidade da suspensão controle no período de 72 horas. Não houve diferença significante estatisticamente entre a porcentagem de células vivas nas suspensões controle, da SDP não-filtrada nas concentrações abaixo de 25 µg/ml, do KM⁺ a 2 µg/ml e da Con-A a 5 µg/ml (Figuras 17 e 18).

4.7 Análise da produção de IL-4 e NO

Com o objetivo de analisar se as células da medula óssea murina estariam sofrendo alguma interferência devido ao tratamento com sulfadiazina de prata filtrada e não-filtrada, LPS com e sem IFN- γ , IFN- γ , Con-A e KM⁺, os sobrenadantes dessas células foram colhidos e analisados quanto à produção de IL-4 e NO. Observou-se que a sensibilidade da reação foi de 0,4 a 10 ng/ml e 4 a 200 µM, para IL-4 e NO₂⁻, respectivamente (Figuras 19 e 20). A quantidade de IL-4 e NO produzidos, nas amostras analisadas, estiveram abaixo do limite de detecção.

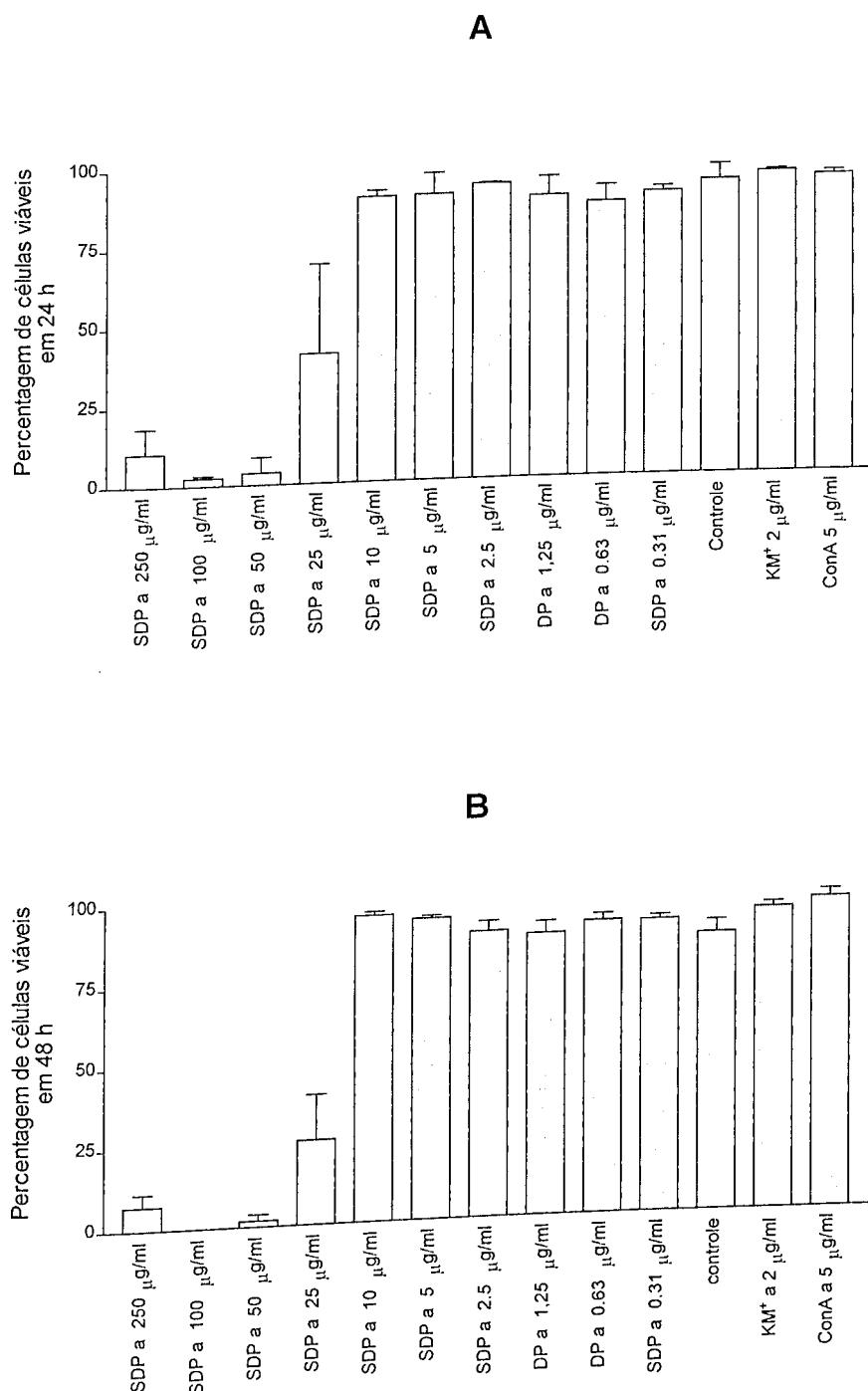


Figura 17. Determinação da viabilidade das células da medula óssea, do camundongo BALB/c, nos períodos de 24 h (A) e 48 h (B). Colocaram-se 180 µl, por poço na placa de cultura de 96 orifícios, da suspensão contendo 2×10^6 células por ml em meio de cultura RPMI completo. Distribuíram-se as amostras, em triplicata, com a adição ou sem de 20 µl por poço da sulfadiazina de prata não-filtrada, KM⁺ e Con-A, cujas concentrações finais foram de 0,3 a 250 µg/ml; 5 µg/ml e 2 µg/ml, respectivamente.

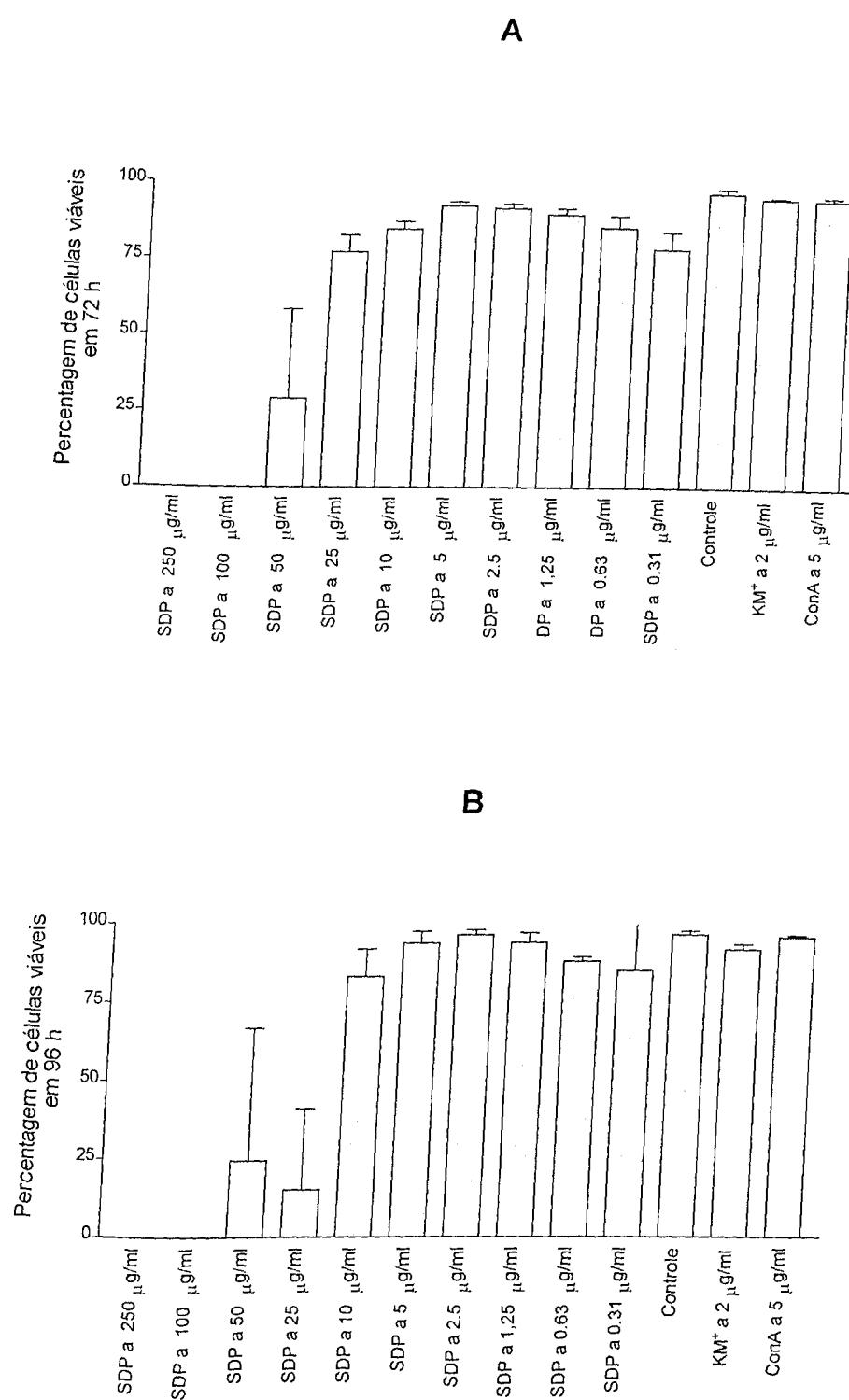


Figura 18. Determinação da viabilidade das células da medula óssea, do camundongo BALB/c, nos períodos de 72 h (A) e 96 h (B). Colocaram-se 180 µl, por poço na placa de cultura de 96 orifícios, da suspensão contendo 2×10^6 células por ml em meio de cultura RPMI completo. Distribuíram-se as amostras, em triplicata, com a adição ou sem de 20 µl por poço da sulfadiazina de prata não-filtrada, KM⁺ e Con-A, cujas concentrações finais foram de 0,3 a 250 µg/ml; 5 µg/ml e 2 µg/ml, respectivamente.

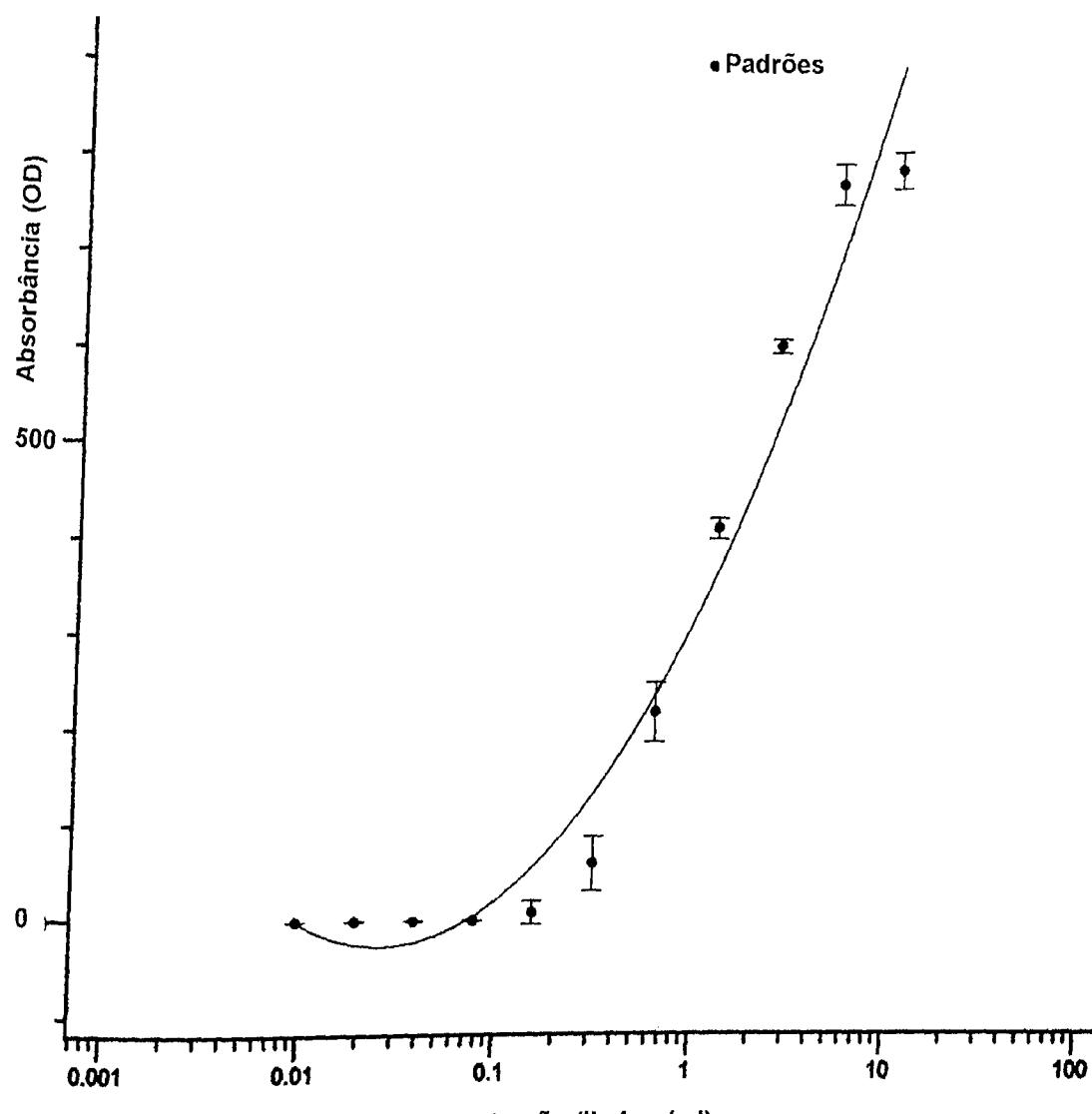
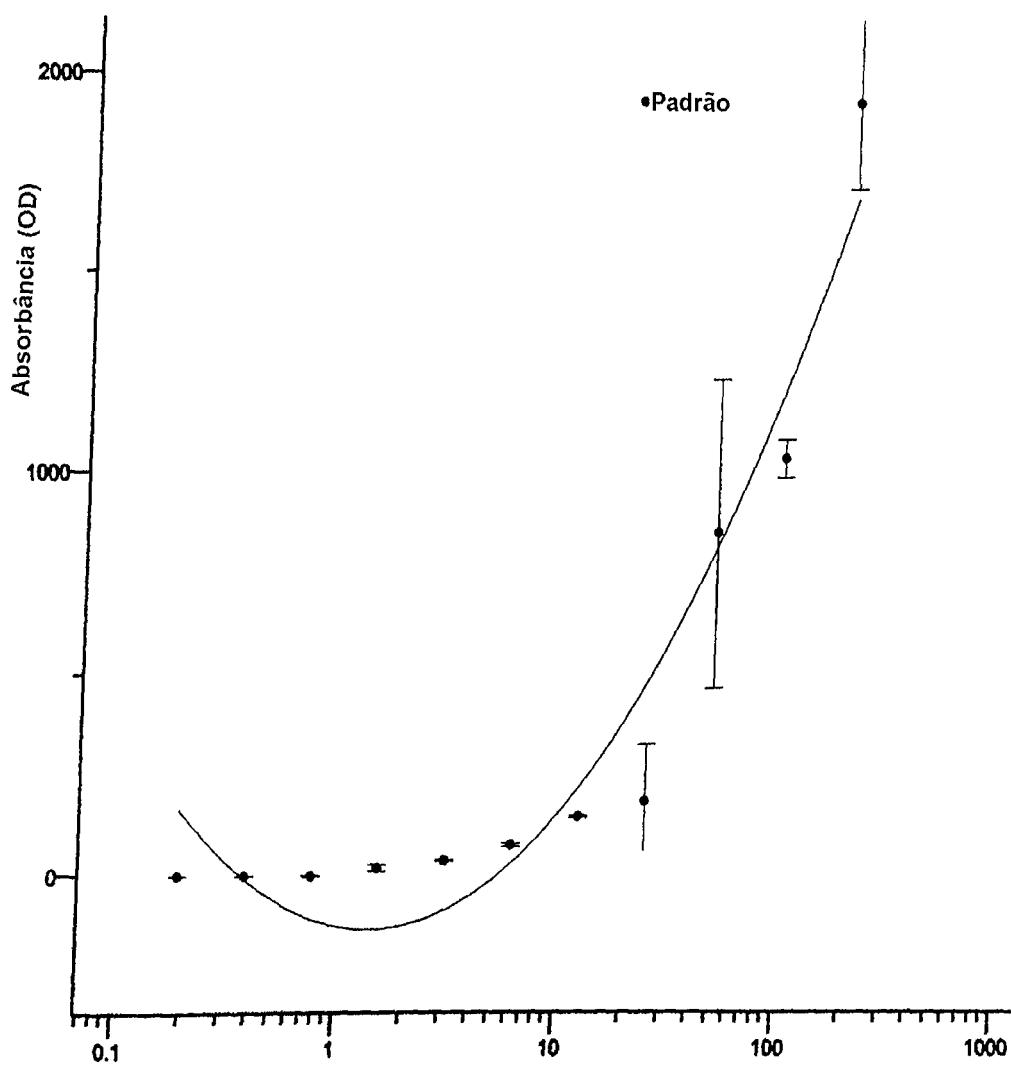


Figura 19. Curva padrão para dosagem de IL-4 em sobrenadantes de cultura de células da medula óssea adicionadas de SDP filtrada; SDP não filtrada; Con-A e KM⁺ nas concentrações finais de 0,02 a 50 µg/ml; 0,3 a 250 µg/ml; 5 µg/ml e 2 µg/ml, respectivamente. LPS a 10 µg/ml, LPS a 10 µg/ml adicionado de 5% de meio condicionado de células L12L10 (IFN-γ murino) ou 5% de IFN-γ, apenas.



$$\text{Abs} = -121,7 - 122,7 \log(\text{conc}) + 395,8(\log(\text{conc}))^2$$

coeficiente de correlação = 0,966

Figura 20. Curva padrão para dosagem de nitrito em sobrenadantes de cultura de células de medula óssea adicionadas de SDP filtrada; SDP não-filtrada; Con-A e KM⁺ nas concentrações finais de 0,02 a 50 µg/ml; 0,3 a 250 µg/ml; 5 µg/ml e 2 µg/ml, respectivamente. LPS a 10 µg/ml, LPS a 10 µg/ml adicionado de 5% de meio condicionado de células L12L10 (IFN-γ murino) ou 5% de IFN-γ, apenas.

5. Discussão

Escolha dos animais e freqüência de uso dos medicamentos

No presente estudo, optou-se por trabalhar com camundongos machos BALB/c, por serem isogênicos e para evitar prováveis influências do ciclo hormonal feminino sobre a cicatrização. Estes animais têm sido utilizados em pesquisa de cicatrização de feridas em vários centros do mundo também por causa de seu fácil manuseio.

Aplicaram-se os medicamentos sobre as feridas uma vez ao dia, por analogia com a rotina dos pacientes humanos tratados com a SDP topicalmente.

Alopecia, crescimento dos pêlos e epitelização das feridas

Observa-se que a maioria dos protocolos experimentais na cicatrização das feridas cutâneas adota a tricotomia prévia (BROWN *et al.*, 1988; LEITCH, KUCUKCELEBI, ROBSON, 1993; LANSDOWN *et al.*, 1997; FRANK *et al.*, 1999; STALLMEYER *et al.*, 1999), conduta não adotada no presente experimento. A observação macroscópica das feridas neste estudo não foi prejudicada por não se ter realizado a tricotomia. Um dos pontos de vista favoráveis à não-realização da tricotomia, além da economia de tempo, foi a oportunidade de se constatar macroscopicamente a associação da aplicação do creme Lanette (CL) com a queda dos pêlos; até onde sabemos, tal efeito não foi relatado anteriormente. No trabalho de Lansdown *et al.* (1997) não houve evidências que a SDP influenciara o crescimento dos pêlos nos ratos. Os queratinócitos de prepúcios humanos juvenis, expostos à SDP *in vitro*, apresentaram, à microscopia eletrônica, deformidades na membrana celular, intumescimento das organelas citoplasmáticas e a destruição da membrana nuclear (SCHALLER, KORTING, SCHMID, 1996). No presente

estudo, notou-se que os pêlos começaram a surgir, no local da alopecia, 7 dias após a interrupção do contato direto com a SDP/CL ou o CL. Supõe-se que a toxicidade sobre os queratinócitos tenha sido induzida por dois componentes do CL, ésteres do ácido parahidroxibenzóico designados como metil e propilparabeno, cuja ciliotoxicidade foi descrita por Jian & Po (1993). É provável que tenha havido uma somatória dos efeitos citotóxicos destas substâncias e da SDP, apesar da falta de evidências, à microscopia de luz, de toxicidade sobre os queratinócitos que formaram a neoepiderme, considerando que a hiperplasia epidérmica detectada nos animais dos três grupos foi semelhante.

A análise das Figuras 6 e 7 sugere que a toxicidade da SDP/CL (grupo A) e CL (grupo B) sobre queratinócitos foi reversível, pois os pêlos se mostraram semelhantes macroscopicamente nos animais dos três grupos.

A diferença de tempo para fechar as feridas (22° , 28° e 31° PO no animal do grupo C, B e A, respectivamente) parece não ter gerado, no período observado, cobertura cutânea melhor no camundongo sem tratamento.

Geronemus, Mertz & Eaglstein (1978) observaram macroscopicamente, em feridas de porcos domésticos, reepitelização mais rápida quando se utilizou a SDP e/ou o veículo desta. Estes autores não informaram quais são os componentes do creme hidromiscível veiculador da SDP e, sugeriram que a reepitelização rápida não tivesse sido por causa da ação antimicrobiana da SDP.

Fox (1983) descreveu que a razão SDP:DNA bacteriano é muito mais elevada que a razão SDP:DNA da célula epitelial, e supôs que seja este o motivo pelo qual a SDP inibe as divisões bacterianas e não impede a regeneração das células epiteliais.

Aspectos histológicos da cicatrização das feridas

De acordo com a Tabela 4, a SDP não parece ter acelerado a cicatrização das feridas, considerando que, no grupo, o tecido de granulação foi evidenciado somente a partir do 6º dia PO, enquanto, nos animais dos grupos B e C, já era perceptível no 4º dia PO.

Por outro lado, o CL se associou a tecido de granulação e proliferação colágena evidentes já no 4º dia PO. Nesta data, os camundongos dos outros grupos não mostraram sinais de fibrose colágena (embora o controle C já tivesse tecido de granulação). Isto sugeriria que o CL estimula cicatrização mais precoce.

Tais conjecturas devem ser encaradas com reservas, levando em conta que se analisou apenas um animal de cada grupo em cada dia de sacrifício. Assim, o camundongo do grupo A (SDP) morto no 4º dia PO poderia ter alguma condição associada a má cicatrização, enquanto o do grupo B (CL) sacrificado no mesmo dia poderia apresentar, por alguma razão, tendência a cicatrização mais precoce. Deve-se frisar que os animais não foram autopsiados após o sacrifício. Para avaliar melhor tal questão, deve-se estudar um número maior de animais submetidos aos tratamentos descritos e cujas lesões sejam colhidas nas mesmas datas.

O comportamento dos três grupos, a partir do 6º dia PO, parece semelhante em relação ao tecido de granulação (que é evidente até o 12º dia PO e não mais do 25º dia PO em diante) e à fibrose colágena (que é máxima a partir do 25º a 30º dia PO).

Os resultados do estudo morfométrico (Tabela 5) foram freqüentemente contraditórios em relação à contagem de fibroblastos e vasos sanguíneos ao nível das feridas. Quanto aos fibroblastos, observaram-se diferenças significantes somente nos dias 2, 4 e 30 do PO, com números maiores, respectivamente, em C (2), C e B (4) e A (30). Não parece sensato que houvesse mais fibroblastos no

camundongo controle no 2º PO (exceto se o animal já os tivesse previamente ao experimento). Também foge à lógica o predomínio de tais células no animal do grupo A (SDP/CL) no 30º dia, considerando que a fibrose colágena, nesta data, ocorreu em igual intensidade na pele deste animal e dos representantes dos outros grupos (B e C), conforme consta da Tabela 4.

A análise morfométrica dos vasos mostrou resultados ainda mais paradoxais, com predomínio significante em animais dos diferentes grupos ao longo do experimento. Por exemplo, no 4º PO, constatou-se maior número de vasos em C; no 6º PO, em B; no 8º em A e, no 10º, de novo em C. Tal alternância, em princípio, é inexplicável.

Pareceu haver coerência dos achados morfométricos somente em relação aos granulócitos neutrófilos que, segundo a Tabela 5, não mostraram diferenças significativas nos animais dos três grupos, exceto no 12º PO, quando a pele do camundongo controle (C7) mostrou neutrofilia tissular significantemente maior que a de seus pares sacrificados na mesma data; talvez isto tenha ocorrido por infecção secundária local.

A inconsistência dos resultados dos exames morfométricos não é fácil de justificar. O examinador dos preparados histológicos foi sempre o mesmo; não se questiona a qualidade das lâminas examinadas e não houve mudanças de aparelho no decurso dos vários exames.

Não se pode excluir a nosso ver, que as diferenças e variações observadas se liguem ao fato de que se examinaram amostras cutâneas de animais diversos (um de cada grupo, por vez, em cada uma das dez datas do experimento). É possível que o estudo de um número maior de camundongos por data diminuisse ou até eliminasse as discrepâncias dos resultados.

Lansdown *et al.* (1997) relataram que o uso da SDP nas feridas cirúrgicas cutâneas, fechadas por primeira intenção, de ratos Wistar reduziu a quantidade de células do processo inflamatório, induziu a formação mais rápida do tecido de granulação e aumentou o reparo epidérmico. No presente trabalho, entretanto, percebeu-se que a quantidade de granulócitos neutrófilos foi显著mente maior nos animais do grupo C apenas no décimo segundo dia de experimento e não se observaram os efeitos benéficos, descritos por aqueles autores, da SDP na formação do tecido de granulação nas feridas dos animais tratados.

Aspectos microbiológicos das feridas

Nossa preferência pelo método bacteriológico qualitativo se deveu ao fato de ser este método menos oneroso e por consumir menos tempo.

Outros autores têm optado pela bacteriologia quantitativa como parâmetro nas suturas tardias de feridas e cicatrização por segunda intenção (ROBSON *et al.*, 1968; ROBSON, HEGGERS, 1969, 1970). Já Pruitt *et al.* (1998), analisando queimaduras, consideraram que a bacteriologia quantitativa não é capaz de diferenciar entre colonização e infecção da lesão, e que a análise histológica é o método mais eficaz e rápido para diagnosticar uma infecção invasiva na queimadura.

Atoyebi, Sowemimo & Odugbemi (1992) trataram queimaduras humanas, desde a admissão dos pacientes no hospital, limpando-as com cloro-hexidina e aplicando SDP a 1% uma vez ao dia durante cinco semanas. Estes autores observaram, por meio da bacteriologia qualitativa, o predomínio das bactérias Gram-positivas na primeira semana e Gram-negativas da segunda à quinta semana, entre estas *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella aerogenes* e *Proteus spp.* Percebe-se que, apesar do uso do anti-séptico cloro-hexidina e da SDP, as feridas não ficaram estéreis, e também mudou o perfil de bactérias encontradas.

A bacteriologia quantitativa das feridas no dorso de ratos tratados topicalmente, três vezes ao dia, com acetato de mafenida (AM), ou com SDP, ou ainda com SDP associada ao digluconato de cloro-hexidina (SDPCLH), detectou de 10^3 a 10^5 microorganismos por grama de tecido, e identificou *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis* (LEITCH, KUCUKCELEBI, ROBSON, 1993). Assim, a aplicação mais freqüente do anti-séptico e dos antimicrobianos sobre as feridas parece não ter impedido a proliferação bacteriana.

O predomínio da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus saprophyticus* nos grupos A e C sugere que a concentração da SDP nas feridas não foi adequada para inibir a proliferação deste germe, ou este foi resistente ao antimicrobiano estudado. O predomínio dos bacilos Gram-negativos *Citrobacter diversus* e *Klebsiella* spp no grupo B, sugere que a concentração e o efeito antimicrobiano da SDP foram adequados para impedir a proliferação destes microrganismos nas feridas dos animais no grupo A. O CL, provavelmente propiciou condições bioquímicas mais favoráveis a estas bactérias do que à bactéria *Staphylococcus saprophyticus* nas feridas dos animais do grupo B. Tem sido descrita resistência de bactérias aos parabenos. No estudo de Close & Nielsen (1976), os autores isolaram uma cepa de *Pseudomonas cepacia*, resistente ao metil e propilparabeno, preservativos de uma emulsão de água e óleo. Observou-se que esta cepa degradara metil e propilparabeno.

Resistência de *Staphylococcus saprophyticus* a pefloxacina e tetraciclina nos grupos A (SDP/CL) e C (sem medicamento), durante todo o experimento, conforme as Tabelas 7 e 9, mostra que o produto não alterou a resposta desta bactéria àqueles antibióticos testados. Como não foi detectada *Staphylococcus saprophyticus* no grupo B (CL) em todos os períodos, não se pode inferir que o CL

gerou condições para este germe se tornar sensível à tetraciclina.

A não-mudança de resistência de *Citrobacter diversus* no grupo B (Tabela 8) indica que os componentes do creme Lanette não tiveram capacidade para eliminar aquela propriedade do germe.

No presente estudo, realizou-se o teste da concentração inibidora mínima para comparar o efeito antimicrobiano das suspensões de SDP filtrada e não-filtrada. Verificou-se que a suspensão filtrada não foi suficiente para inibir a proliferação da bactéria usada no teste (*Staphylococcus aureus*), presumivelmente por retenção de moléculas do antimicrobiano na membrana de milipore.

Fox & Rose (1942) relataram que a concentração inibidora mínima da sulfadiazina (pura) para *Escherichia coli* ATCC 25922, foi de 1,43 µg/ml. Em nosso experimento, o certificado de análise do laboratório fornecedor da SDP micronizada informou um teor de sulfadiazina livre de 0,26%. Considerando que a concentração inibidora mínima da sulfadiazina de prata, no presente estudo, para *Escherichia coli* da mesma cepa testada por Fox & Rose, foi de 128 µg/ml, tal concentração corresponde a 0,33 µg/ml de sulfadiazina livre, valor cerca de seis vezes menor que o verificado por aqueles autores. Isto parece indicar que a associação da prata à sulfadiazina aumenta a eficácia antimicrobiana da sulfonamida.

Leucócitos no sangue periférico

Estabeleceu-se a porcentagem dos leucócitos no sangue periférico para verificar se o uso da SDP/CL ou o CL, nas feridas dos animais dos grupos A e B, respectivamente, interferiu na produção das células progenitoras da medula óssea.

No presente estudo, não se detectou redução na porcentagem dos leucócitos circulantes nos grupos SDP/CL e CL em relação aos controles; isto sugere que os produtos aplicados à pele não tiveram efeito tóxico sobre a

medula óssea. Este achado difere dos constatados por Gamelli, Hebert & Foster (1985) e Gamelli, Paxton & O'Reilly (1993), trabalhando com camundongos BDF₁. No primeiro estudo (1985) os autores promoveram queimaduras dorsais entre 5% (3,65 cm²) e 20% da superfície corpórea total (SCT); os animais não foram submetidos à aplicação de antimicrobianos topicamente. Fez-se a excisão das feridas e a sutura imediata, em uma e dezoito horas pós-queimadura, nos animais com 10% de SCT queimada. Observou-se uma sobrevida de 90% nos grupos com lesões entre 5 e 10% da SCT. Comparados ao grupo controle, os animais com queimadura de 10% apresentaram redução significante de leucócitos no sangue periférico no primeiro e quarto dia pós-queimadura (DPQ). O número de leucócitos duplicou no oitavo DPQ e se normalizou no décimo segundo DPQ. Adicionalmente, não houve redução de células da medula óssea no primeiro DPQ; as mesmas aumentaram significantemente no quarto DPQ e se normalizaram a partir do oitavo DPQ.

No experimento seguinte (1993), camundongos foram submetidos à excisão de pele dorsal que gerou áreas cruentas de 10% SCT, tratadas, a seguir, com SDP a 1%. O estudo do sangue periférico revelou redução significante do teor de granulócitos e linfócitos no primeiro, quarto e sétimo DPO. É provável que o tamanho das feridas, nos animais do presente experimento, não tenha sido suficiente para absorver uma quantidade de SDP que atingisse níveis tóxicos para as células da medula óssea. Também se deve considerar que os animais dos dois experimentos foram de cepas diferentes.

Boosalis *et al.* (1987) estudaram vinte e três pacientes, com queimaduras entre 12 e 90% da SCT, tratados topicamente com SDP. Estes autores observaram que a concentração da prata na urina foi maior nos casos de feridas mais extensas. O estudo evidenciou ainda que a absorção da prata foi proporcional à porcentagem

da SCT. Não se observou leucopenia, levando os autores a inferir que a prata não induziu toxicidade medular. O artigo não tece comentários sobre possíveis efeitos nocivos da sulfadiazina, restringindo-se à análise da prata.

Tsipouras, Rix & Brady (1997) investigaram a absorção da SDP e do cloreto de prata através de membranas artificiais. A membrana de colágeno reproduziu a retenção da prata no tecido de granulação. Os autores supõem que o aumento do tecido de granulação minimize a absorção da prata e diminua a probabilidade dos efeitos tóxicos causados por esta.

Há oito anos tem-se utilizado, no Serviço de Cirurgia Plástica do HC-UFGM-FAEPU, a SDP no tratamento tópico de queimaduras humanas. Observou-se leucopenia transitória em aproximadamente 0,8% dos pacientes tratados, não sendo necessário interromper o uso do medicamento (dados não publicados).

Viabilidade de células da medula óssea

A análise da Figura 17 mostra que as porcentagens de células viáveis da medula óssea dos camundongos foram显著mente menores após 24 e 48 horas nos casos de tratamento por SDP não-filtrada, nas concentrações de 25 µg/ml a 250 µg/ml, quando comparadas às dos controles. Aparentemente, a toxicidade do produto começa a manifestar-se na concentração de 25 µg/ml, agravando-se a partir daí.

Apesar de não ter ocorrido diferença significante na porcentagem de células viáveis das suspensões de 50 µg/ml a 250 µg/ml, observou-se que nesta última o porcentual de células vivas foi maior. Como a SDP não é hidrossolúvel, talvez tenha ocorrido homogeneização inadequada da suspensão de 250 µg/ml, antes de pipetá-la, impedindo que a concentração fosse a esperada, conseqüentemente o efeito tóxico foi menor do que se esperava.

Curiosamente, em 72 horas, não se verificou, conforme a Figura 18, efeito tóxico da SDP não-filtrada na concentração de 25 µg/ml. Em 72 e 96 horas, constatou-se queda da viabilidade celular, na suspensão de 50 µg/ml, porém em percentuais superiores aos verificados às 24 e 48 horas. Já em 96 horas, sem diferença significativa, as culturas adicionadas de SDP não-filtrada a 25 µg/ml apresentaram menor porcentagem de células vivas do que a 50 µg/ml. Tais diferenças, em princípio, são inexplicáveis.

Gamelli, Paxton & O'Reilly (1993) observaram *in vitro* que suspensões de SDP não-filtrada na concentração de 25 µg/ml inibiram totalmente a proliferação de células da medula óssea. Os autores empregaram um método de cultura em meio sólido diferente do utilizado no presente experimento, o qual não teve o mesmo efeito medular.

Interleucina 4 e óxido nítrico

Sabe-se que as lectinas vegetais Con-A e KM⁺, o INF-γ, as interleucinas-12 e 18 e o LPS induzem a produção de óxido nítrico nos macrófagos esplênicos, peritoneais ou da medula óssea murina (ITO *et al.*, 1984; STUEHR, MARLETTA, 1987; HIROHASHI, RICHARDS, MORRISON, 1996; MUNDER, 1998; SOUZA, 1998).

Imaginou-se, no presente estudo, que as células da medula óssea, quando expostas a Con-A, KM⁺, LPS e INF-γ, secretassem óxido nítrico, fato que não foi constatado. Não se questiona o método de detecção de nitrito, pois o mesmo é referido na maioria dos protocolos de dosagem da referida substância. Supõe-se que as células não tenham atingido maturidade suficiente para secretar óxido nítrico em níveis detectáveis.

Perspectiva de novos trabalhos

Vislumbram-se ensaios com outras substâncias seguindo o modelo experimental do presente trabalho. Imagina-se, como nova perspectiva, que deve ser feito outro estudo testando o efeito dos componentes do creme Lanette, separadamente, sobre feridas, pêlos e queratinócitos humanos e murinos *in vitro*.

6. Conclusões

1. a sulfadiazina de prata e o creme Lanette causaram retardo da epitelização de feridas cutâneas nos camundongos BALB/c. Os aspectos histológicos das feridas cutâneas destes animais sugerem que a sulfadiazina de prata não acelerou a cicatrização.
2. a sulfadiazina de prata em creme Lanette a 1% e o creme Lanette, utilizados nas feridas cutâneas dos camundongos BALB/c, não interferiram no perfil de sensibilidade e resistência *in vitro* das bactérias analisadas. A concentração inibidora mínima da sulfadiazina de prata não-filtrada sugere que associação da sulfadiazina com a prata aumenta a eficácia antimicrobiana do produto.
3. a sulfadiazina de prata em creme Lanette a 1% e o creme Lanette utilizados nas feridas cutâneas dos camundongos BALB/c, não interferiram nas contagens de leucócitos circulantes.
4. a sulfadiazina de prata não-filtrada, nas concentrações entre 25 e 250 µg/ml, foi tóxica *in vitro* para as células de medula óssea dos camundongos BALB/c.
5. nas suspensões de células de medula óssea dos camundongos BALB/c expostas à concanavalina A, lectina KM⁺, lipopolissacarídeo e interferon γ não se detectaram interleucina 4 e óxido nítrico, provavelmente devido aos limites de detecção dos ensaios utilizados ou por imaturidade das células estudadas.

7. Referências bibliográficas

- ARAGANE, Y.; RIEMANN, H.; BHARDWAJ, R. S.; SCHWARZ, A.; SAWADA, Y.; YAMADA, H.; LUGER, T.A.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G.; SCHWARZ, T. IL-12 is expressed and released by human keratinocytes and epidermoid carcinoma cell lines. *J. Immunol.*, v. 153, p. 5366-5372, 1994.
- ATOYEBI, O. A.; SOWEMIMO, G. O.; ODUGBEMI, T. Bacterial flora of burns wounds in Lagos, Nigeria: a prospective study. *Burns*, v. 18, n. 6, p. 448-51, 1992.
- BARBUL, A.; LAZAROU, S. A.; EFRON, D. T.; WASSERKRUG, H. L.; EFRON, G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery*, v. 108, n. 2, p. 331-337, 1990.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 45, n. 1, p. 493-496, 1966.
- BICKENBACH, J. R. Identification and behaviour of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J. Dent. Res.*, v. 60, p. 1611-1620, 1981.
- BIER, O. Quimioterapia antibacteriana. In: BIER, O. (ed.). **Bacteriologia e imunologia**. 17. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1976. p. 148-162.
- BOOSALIS, M. G.; McCALL, J. T.; AHRENHOLZ, D. H.; SOLEM, L. D.; McCLAIN,

C.J. Serum and urinary silver levels in thermal injury patients. **Surgery**, v. 101, n. 1, p. 40-43, 1987.

BRIDGES, D.; LOWBURY, E. J. L. Drug resistance in relation to use of silver sulphadiazine cream in a burns unit. **J. Clin. Path.**, v. 30, p. 160-164, 1977.

BROOK, I.; RANDOLPH, J. G. Aerobic and anaerobic bacterial flora of burns in children. **J. Trauma**, v. 21, n. 4, p. 313-318, 1981.

BROWN, L. F.; WATER, L. V. D.; HARVEY, V. S.; DVORAK, H. F. Fibrinogen influx and accumulation of cross-linked fibrin in healing wounds and in tumor stroma. **Am. J. Pathol.**, v. 130, n. 3, p. 455-465, 1988.

BURGESON, R. E. Genetic heterogeneity of collagens. **J. Invest. Dermatol.**, v. 79, p. 25s-30s, 1982.

CAFFEE, H. H.; BINGHAM, H. G. Leukopenia and silver sulphadiazine. **J. Trauma**, v. 22, n. 7, p. 586-587, 1982.

CHAN, C. K.; JARRET, F.; MOYLAN, J. A. Acute leukopenia as an allergic reaction to silver sulfadiazine in burn patients. **J. Trauma**, v. 16, n. 5, p. 395-396, 1976.

CHOBAN, P. S.; MARSHALL, W. J. Leukopenia secondary to silver sulfadiazine: frequency, characteristics and clinical consequences. **Am. Surg.**, v. 53, n. 9, p. 515-517, 1987.

CLARK, R. A. F.; TONNENSEN, M. G.; GAILIT, J.; CHERESH, D. A. Transient functional expression of $\alpha\beta\gamma 3$ on vascular cells during wound repair. **Am. J. Pathol.**, v. 148, n. 5, p. 1407-1421, 1996.

CLOSE, J. A., NEILSEN, P. A. Resistance of a strain of *Pseudomonas cepacia* to esters of p-hydroxybenzoic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 31, n. 5, p. 718-722, 1976.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Tissue repair: cellular growth, fibrosis, and wound healing. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (ed.). **Pathologic basis of disease**. 6th. ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p. 89-112.

DANIEL, R. K.; WILLIAMS, H. B. The free transfer of skin flaps by microvascular anastomoses: an experimental study and a reappraisal. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 52, p. 16, 1973.

DEITCH, E. A.; SITTIG, K.; HEIMBACH, D.; JORDAN, M.; CRUSE, W.; KAHN, A.; ACHAUER, B.; FINLEY, R.; MATSUDA, T.; SALISBURY, R.; MANI, M.; SAFFLE, J. Results of a multicenter outpatient burn study on the safety and efficacy of Dimac-SSD, a new delivery system for silver sulfadiazine. **J. Trauma**, v. 29, n. 4, p. 430-434, 1989.

DESMOLIÈRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Am. J. Pathol.**, v. 146, n. 1, p. 56-66, 1995.

DIAZ-FLORES, L.; GUTIERREZ, R.; VARELA, H. Angiogenesis: an update. **Histol. Histopathol.**, v. 9, n. 4, p. 807–843, 1994.

DIPPIETRO, L. A.; POLVERINI, P. J. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitor thrombospondin 1. **Am. J. Pathol.**, v. 143, n. 3, p. 678-684, 1993.

DOVER, R.; POTDEN, C. S. Cell cycle kinetics of cultured human epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 80, n. 5, p. 423-429, 1983.

EBLING, F. J. G. Comparative dermatology. Anatomy and organization of human skin. Functions of the skin. In: CHAMPION, R. H.; BURTON, J. L. and EBLING, F. J. G. (ed.). **Textbook of dermatology**. 5th ed. Oxford: Blackwell, 1992. p. 17-155.

ENK, C. D.; SREDNI, D.; BLAUVELT, A.; KATZ, S. I. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure *in vivo* and *in vitro*. **J. Immunol.**, v. 154, p. 4851–4856, 1995.

FERREIRA, A. B. H. **Dicionário Aurélio Básico da Língua Portuguesa**. São Paulo: Nova Fronteira, 1995. p. 149.

FOX, C. L., Jr.; ROSE , H. M. Ionization of sulfonamides. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 50, p. 142-145, 1942.

FOX, C. L., Jr. Silver sulfadiazine – a new topical therapy for *Pseudomonas* in burns.

Arch. Surg., v. 96, p. 184-188, 1968.

SISBI/UFU
204855

FOX, C. L., Jr.; RAPPOLE, B. W.; STANFORD, W. Control of *Pseudomonas* infection in burns silver sulfadiazine. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 128, p. 1021-1026, 1969.

FOX, C. L., Jr. Topical therapy and the development of silver sulfadiazine. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 157, p. 82-88, 1983.

FRANK, S.; STALLMEYER, B.; KÄMPFER, H.; KOLB, N.; PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. **FASEB J.**, v. 13, p. 2002-2014, 1999.

GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, p. 549-550, 1971.

GAMELLI, R. L; HEBERT, J. C.; FOSTER, R. S. Effect of burn injury on granulocyte and macrophage production. **J. Trauma**, v. 25, n. 7, p. 615-619, 1985.

GAMELLI, R. L.; PAXTON, T. P.; O'REILLY, M. Bone marrow toxicity by silver sulfadiazine. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 177, n. 2, p. 115-120, 1993.

GARCIA, O. M.; ROCHA LIMA, C. H. **Dicionário Enciclopédico**. Rio de Janeiro: Larousse, 1978. p.210.

GAYLE, W. E.; MAYHALL, C. G.; LAMB, A.; APOLLO, E.; HAYNES, B. W. Resistant *Enterobacter cloacae* in a burn center: The ineffectiveness of silver sulfadiazine. **J. Trauma**, v. 18, p. 317, 1978.

GERONEMUS, R. G.; MERTZ, P. M.; EAGLSTEIN, N. N. Wound healing: The effects of topical antimicrobial agents. **Arch. Dermatol.**, v. 115, p. 1311-1314, 1978.

GOSPODAROWICZ, D.; FERRARA, N.; SCHWEIGERER, L.; NEUFELD, G. **Endocr. Rev.**, v. 8, p. 95-114, 1987.

HAUSER, C.; SAURAT, J. H.; SCHMITT, A.; JAUNIN, F.; DAYER, J. M. Interleukin-1 is present in normal human epidermis. **J. Immunol.**, v. 136, n. 9, p. 3317-3323, 1986.

HEIMBACH, D. M. Excisão e enxertia precoces da queimadura. In: BOSWICK, J. A. (ed.). **Clínicas cirúrgicas da América do Norte**, G. Rio de Janeiro: Interlivros, 1987. p. 103-118,

HIROHASHI, N.; RICHARDS, M.; MORRISON, D. C. Selective effects of serum on bacterial LPS-induced IL-6 and nitric oxide production in murine peritoneal macrophages. **J. Endotox. Res.**, v. 3, p. 395, 1996.

HUNT, T. K. Wound healing. In: DUNPHY, J. E.; WAY, L. W. and associate authors (ed.). **Current surgical diagnosis & treatment**. California: Lange, 1981. p. 93-105.

IOCONO, J. A.; COLLERAN, K. R.; REMICK, D. G.; GILLESPIE, B. W.; EHRLICH,

H. P.; GARNER, W. L. Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. **Wound Repair Regen.**, v. 8, p. 216-225, 2000.

ITO, Y.; TSURUDOME, M.; YAMADA, A.; HISHIYAMA, M. Interferon induction in mouse spleen cells by mitogenic and non mitogenic lectins. **J. Immunol.**, v. 132, p. 2440-2444, 1984.

JENSEN, P. K. A.; PEDERSEN, S.; BOLUND, L. Basal cell subpopulations and cell cycle kinetics in human epidermal explant cultures. **Cell and Tissue Kinetics**, v. 18, n. 2, p. 201-215, 1985.

JENSEN, R. H.; DAVIDSON, N. Spectrophotometric, potentiometric, and density gradient ultracentrifugation studies of the binding of silver ion by DNA. **Biopolymers**, v. 4, p. 17-32, 1966.

JIAN, L.; PO, L. W. Kinetic evaluation of the ciliotoxicity of methyl- and propyl-p-hydroxybenzoates using factorial experiments. **J Pharm Pharmacol**, Feb, v. 45, n. 2, p. 98-101, 1993.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Pele e anexos. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (eds.). **Histologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 303-314.

KAPLAN, E.; DINARELLO, C. A.; GELFAND, J. A. Interleukin 1 and the response to injury. **Immunol. Res.**, v. 8, n. 2, p. 118-129, 1989.

KIKER, R. G.; CARVAJAL, H. F.; MLCAK, R. P.; LARSON, D. L. A controlled study of the effects of silver sulfadiazine on white blood cell counts in burned children. **J. Trauma**, v. 17, n. 11, p. 835-836, 1977.

KING, L. E., Jr. What does epidermal growth factor do and how does it do it? **J. Invest. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 165-167, 1985.

KIRK, S. J.; HURSON, M.; REGAN, M. C.; HOLT, D. R.; WASSERKRUG, H. L.; BARBUL, A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. **Surgery**, v. 114, n. 2, p. 155, 1993.

KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; DIPIETRO, L. A; ELNER, V. M.; ELNER, S. G.; STRIETER, R. M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, p. 1798-1801, 1992.

KOVACS, E. J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunol. Today**, v. 12, p. 17-23, 1991.

LANSDOWN, A. B. G.; SAMPSON, B.; LAUPATTARAKASEM, P.; VUTTIVIROJANA, A. Silver aids healing in the sterile skin wound: experimental studies in the laboratory rat. **Br. J. Dermatol.**, v. 104, p. 728-735, 1997.

LEITCH, I. O.; KUCUKCELEBI, A.; ROBSON, M. C. Inhibition of wound contraction by topical antimicrobials. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v. 63, p. 289-293, 1993.

LOWBURY, E. J. L.; BABB, J. R.; BRIDGES, K.; JACKSON, D. M. Topical chemoprophylaxis with silver sulphadiazine and silver nitrate chlorhexidine creams: emergence of sulphonamide-resistant Gram-negative bacilli. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 493-496, 1976.

LUGER, T. A., WIRTH, U.; KOCH, A. Epidermal cells synthesise a cytokine with Interleukin-3 like properties. **J. Immunol.**, v. 134, p. 915-919, 1985.

LYDYARD, P.; GROSSI, C. Cells involved in the immune response. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (ed.). **Immunology**. 5th ed. London: Mosby, 1998. p. 14-26.

LYNCH, J. B ; BLOCKER, T. G. Thermal burns. In: CONVERSE, J. M. (ed.). **Reconstructive plastic surgery**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1977. p. 464-515.

MALE, D. Cell migration and inflammation. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (ed.). **Immunology**. 5th ed. London: Mosby, 1998. p. 62-68.

MARTIN, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75-81, 1997.

McCAULEY, R. L.; LINARES, H. A.; PELLIGRINI, V.; HERNDON, D. N.; ROBSON, M. C.; HEGGERS, J. P. *In vitro* toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. **J. Surg. Res.**, v. 46, n. 3, p. 267-274, 1989.

McCLAIN, S. A.; SIMON, M.; JONES, E.; NANDI, A.; GAILIT, J. O.; TONNENSEN, M. G.; NEWMAN, D.; CLARK, R. A. F. Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. **Am. J. Pathol.**, v. 149, n. 4, p. 1257-1270, 1996.

MONAFO, W. W.; FREEDMAN, B. Terapia tópica para Queimaduras. In: BOSWICK, J. A. (ed.). **Clínicas cirúrgicas da América do Norte**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1987. v. 1, p. 143-156.

MONTES, L. F.; MUCHINIK, G.; FOX, C. L., Jr. Response of varicella zoster virus and Herpes zoster to silver sulfadiazine. **Cutis**, v. 38, p. 363-365, 1986.

MORRIS, R. J.; FISCHER, S. M.; SLAGA, T. J. Evidence that the centrally and peripherally located cells in the murine epidermal proliferative unit are two distinct cell populations. **J. Invest. Dermatol.**, v. 84, n. 4, p. 277-281, 1985.

MUNDER, M.; MALLO, M.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Murine Macrophages Secrete Interferon γ upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. **J. Exp. Med.**, v. 187, n. 12, June 15, p. 2103-2108, 1998.

MUNSTER, A. M. The early management of thermal burns. **Surgery**, v. 87, n. 1, p. 29-40, 1980.

PAYNE, C. M. E.; BLADIN, C.; COLCHESTER, A. C. F.; BLAND, J.; LAPWORTH, R.; LANE, D. Argyria from excessive use of topical silver sulphadiazine. **The Lancet**,

v. 34, p. 126, 1992.

PEACOCK, E. E., Jr.; COHEN, I. K. Wound healing. In: McCARTHY, J. G. (ed.).

Plastic Surgery. 1st ed. Philadelphia: Saunders, 1990. p. 161-185.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In:
FILHO, G. B. (ed.). **Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p.
54-69.

PRUITT, B. A.; McMANUS, A. T.; KIM, S. H.; GOODWIN, C. W. Burn wound
infections: current status. **World J. Surg**, v. 22, p. 135-145, 1998.

RAPPOLEE, D. A.; MARK, D.; BANDA, M. J.; WERB, Z. Wound macrophages
express TGF- α and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping.
Science, v. 241, p. 708-712, 1988.

RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human keratinocytes:
the formation of keratinising colonies from single cells. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 331-343,
1975.

ROBSON, M. C.; LEA, C. E.; DALTON, J. B.; HEGGERS, J. P. Quantitative
bacteriology and delayed wound closure. **Surg. Forum**, v. 19, p. 501-502, 1968.

ROBSON, M. C.; HEGGERS, J. P. Bacterial quantification of open wounds. **Mil.
Med.**, v. 134, p. 19-24, 1969.

ROBSON, M. C.; HEGGERS, J. P. Delayed wound closures based on bacterial counts. **J. Surg. Oncol.**, v. 2, p. 379-383, 1970.

ROOK, G.; BALKWILL, F. Cell-mediated immune In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. (ed.). **Immunology**. 5th ed. London: Mosby, 1998. p. 121-135.

ROSS, R.; RAINES, E. W.; BOWEN-POPE, D. F. The biology of platelet-derived growth factor. **Cell**, v. 46, n. 2, p. 155-169, 1986.

RUDOLPH, R. ; BALLANTYNE, D. L., Jr. Skin grafts. In: McCARTHY, J. G. (ed.). **Plastic Surgery**. 1st ed. Philadelphia: Saunders, 1990. p. 221-274.

RUSSO, A. C. **Tratamento das queimaduras**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1976. 249 p.

SAGE, H. Collagens of basement membranes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 79, p. 51S-59S, 1982.

SANDBERG, L. B.; SOSKEL, N. T.; LESLIE, J. G. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. **N. Engl. J. Med.**, v. 304, p. 566-579, 1981.

SCHALLER, M.; KORTING, H. C.; SCHMID, M. H. Interaction of cultured human keratinocytes with liposomes encapsulating silver sulphadiazine: proof of the uptake of intact vesicles. **Br. J. Dermatol.**, v. 134, p. 445-450, 1996.

SCHULTZ, G. S.; WHITE, M. W.; MITCHELL, R.; BROWN, G.; LYNCH, J.; TWARDZIK, D. R.; TODARO, G. J. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor- α and vaccinia growth factor. **Science**, v. 235, p. 350-352, 1987.

SHATTON, J.; SCHUBERT, M. Isolation of a mucoprotein from cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 211, p. 565-573, 1954.

SMITH, L. T.; HOLBROOK, K. A.; BYERS, P. H. Structure of the dermal matrix during development and in the adult. **J. Invest. Dermatol.**, v. 79, p. 93S-104S, 1982.

SOUZA, M. A. Lectina KM⁺ de *Artocarpus integrifolia* induz produção de interleucina 12 e proteção contra infecção por *Leishmania major*. 1998. 134p. Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade Estadual de São Paulo.

STALLMEYER, B.; KÄMPFER, H.; KOLB, N.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. **J. Invest. Dermatol.**, v. 113, n. 6, p. 1090-1098, 1999.

STOLL, S.; MÜLLER, G.; KURIMOTO, M.; SALOGA, J.; TANIMOTO, T.; YAMAUCHI, H.; OKAMURA, H.; KNOP, J.; ENK, A. H. Production of IL-18 (IFN- γ -inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. **J. Immunol.**, v. 159, p. 298-302, 1997.

STUEHR, D. J.; MARLETTA; M. A. Induction of nitrite/nitrate synthesis in by BCG infection, lymphokines or interferon-[gamma]. *J. Immunol.*, v. 139, p. 518, 1987.

SUGARMAN, B. J.; AGGARWAL, B. B.; HASS, P. E.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A., Jr.; SHEPARD, H. M. Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science*, v. 230, p. 943-945, 1985.

TSIPOURAS, N.; RIX, C. J.; BRADY, P. H. Passage of silver ions through membrane-mimetic materials, and its relevance to treatment of burn wounds with silver sulfadiazine cream. *Clin. Chem.*, v. 43, n. 2, p. 290-301, 1997.

ULLRICH, S. E. Mechanism involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV irradiation. Keratinocyte-derived IL-10 modulates antigen-presenting cell function of splenic adherent cells. *J. Immunol.*, v. 152, p. 3410-3416, 1994.

VALENTE, P.; AXELROD, J. L. Acute leukopenia associated with silver sulfadiazine therapy. *J. Trauma*, v. 18, n. 2, p. 146-147, 1978.

WARDEN, G.D. Tratamento ambulatorial das lesões térmicas. In: BOSWICK, J. A. (ed.). **Clínicas cirúrgicas da América do Norte**, G. Rio de Janeiro: Interlivros, 1987. p. 157-168.

WELLS, T. N. C.; SCULLY, P.; PARAVICINI, G.; PROUDFOOT, A. E. I.; PAYTON, M. A. Mechanism of Irreversible Inactivation of Phosphomannose Isomerases by Silver Ions and Flamazine. **Biochem.**, v. 34, n. 24, p. 7896-7903, 1995.

WERNER, S.; SMOLA, H.; LIAO, X.; LONGAKER, M. T.; KRIEG, T.; HOFSCHEIDER, P. H.; WILLIAMS, L. T. The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. **Science**, v. 266, p. 819-822, 1994.

XIONG, M.; ELSON, G.; LEGARDA, D.; LEIBOVICH, S. J. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. **Am. J. Pathol.**, v. 153, n. 2, p. 587-598, 1998.

FU-00013843-1