

Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando o leite colostro

Histological study of wound healing using milk colostrum

Jefferson Torres Nunes¹; Karinne Sousa de Araújo²; Prisco Medeiros de Melo Neto³

¹Médico-residente em Ginecologia e Obstetrícia – UFPI, Teresina, PI – Brasil.

²Mestre em Engenharia Biomédica – UNIVAP, São José dos Campos, SP, Professora – FACID, Teresina, PI – Brasil.

³Médico Patologista, Professor – FACID, Teresina, PI – Brasil.

Endereço para correspondência

Karinne Sousa de Araújo
Rua Miosótis, 205, apto. 702.
64.048-130 – Teresina, Piauí – Brasil.
knnaraujo@yahoo.com.br

Resumo

Introdução: O leite colostro é produzido após o parto e é usado na medicina popular na inflamação e cicatrização de tecidos. **Objetivo:** Analisar a cicatrização de feridas cutâneas tratadas com leite colostro. **Métodos:** Utilizaram-se 45 ratos Wistar. Confeccionou-se uma ferida de 2 cm de diâmetro no dorso dos animais, os quais, em seguida, foram distribuídos em dois grupos. A ferida dos ratos do grupo I foi tratada com solução salina 0,9%; e a dos animais do grupo II, com o leite colostro. Após a eutanásia, em quatro, sete e quatorze dias pós-cirurgia, as amostras de pele foram submetidas à análise histológica. **Resultados:** O grupo tratado com colostro apresentou formação de tecido de granulação mais maduro, com maior deposição de colágeno, reepitelização parcial da área da ferida e aceleração do processo inflamatório, quando comparado ao tratado com solução salina. **Conclusão:** O leite colostro otimizou o processo de reparação de feridas cutâneas experimentais.

Descritores: Cicatrização; Colostro; Pele.

Abstract

Introduction: The colostrum milk is produced after birth and is used in folk medicine in inflammation and tissue healing. **Objective:** To analyze the healing of skin wounds treated with colostrum milk. **Methods:** We used 45 Wistar rats. It was made a wound, 2 cm in diameter, on the backs of animals and then they were divided into two groups: the wounds of group I were treated with saline 0.9%, and the wounds of group II were treated with colostrum milk. After euthanasia at four, seven and fourteen days post-surgery, the skin samples were subjected to histological analysis. **Results:** The group treated with colostrum milk presented formation of more mature granulation tissue with increased collagen deposition, partial reepithelialization of the wound area and speeding up the inflammatory process compared to the group treated with saline. **Conclusion:** The colostrum milk optimized the process of repair of experimental skin wounds.

Key words: Colostrum; Skin; Wound healing.

Introdução

O processo de cicatrização de feridas nos seres humanos é universal, ocorrendo, após o ferimento, uma sequência de reações físicas, químicas e biológicas cuja finalidade é reconstituir a integridade tecidual. Essa cascata de eventos pode ser dividida nas seguintes fases: inflamatória, proliferativa e na fase de maturação, que, embora distintas, se sobrepõem num processo de envolvimento eminente e dinâmico¹.

Durante o processo de cicatrização, ocorrem, no tecido lesado, a infiltração de células circulantes (neutrófilos e monócitos) e a migração de células das áreas adjacentes, como as epiteliais, os queratinócitos e os fibroblastos². Essas células, em cooperação com as células locais, anteriormente ativadas, são as protagonistas da angiogênese (formação de novos vasos), fibroplasia (produção de colágeno pelos fibroblastos) e deposição de matriz extracelular, e reepitelização da região da ferida¹.

Os profissionais da área de saúde se deparam constantemente com desafios no tratamento de feridas não cicatrizadas ou com dificuldade de cicatrização, fazendo uso de artifícios médicos ou empíricos no intuito de acelerar esse processo fisiológico³. Estudos demonstram utilização, entre outros, de óleos e plantas na reparação cutânea⁴⁻⁹. O leite humano, também, é utilizado nesse processo; entretanto, são escassos os estudos sobre os seus mecanismos de ação¹⁰.

Nos primeiros dias pós-parto, as glândulas mamárias produzem o colostro, um leite com coloração amarelada devido ao seu elevado teor de betacaroteno. Comparado ao leite maduro, é mais viscoso, possuindo concentrações mais elevadas de proteínas, minerais e vitaminas lipossolúveis, particularmente A, E e carotenoides, bem como menores teores de lactose, gorduras e vitaminas do complexo B51/f. Caracteriza-se, ainda, por conter resíduos de materiais celulares presentes na glândula mamária e ductos lactíferos^{11, 12}. Tendo em vista um possível efeito cicatrizante do leite humano e a escassa literatura científica a respeito do tema, neste estudo,

objetiva-se analisar histologicamente a cicatrização de feridas cutâneas experimentais após a utilização do leite colostro.

Metodologia

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade Integral Diferencial – FACID (número de protocolo de 066/10) e realizada de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990), conforme a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. O trabalho foi desenvolvido no laboratório de pesquisa da Facid.

Foram utilizados 30 ratos machos da linhagem Wistar, da espécie *Rattus norvegicus*, com peso médio de 300 g, procedentes do biotério da Faculdade Integral Diferencial (FACID). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, conforme a terapêutica adotada (solução salina 0,9% ou colostro). Cada grupo de 15 animais foi dividido em três subgrupos (n=5), de acordo com o período de eutanásia dos ratos que correspondeu ao período de observação no estudo¹⁰.

O leite humano utilizado no trabalho foi proveniente de uma única doadora, captada no Programa de Aleitamento Materno da Maternidade Dona Evangelina Rosa (Teresina, PI), sendo armazenado e transportado, sob refrigeração, conforme o manual de normas técnicas da Rede Brasileira de Bancos de Leite Humano, ou Rede BLH, para bancos de leite humano¹³.

Inicialmente, os animais receberam, por via subcutânea, uma pré-anestesia com atropina, na dose de 0,04 ml/100g, aguardando-se repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico¹⁴. Em seguida, foram submetidos à anestesia dissociativa com xilazina e quetamina, na proporção de 1:1, na dose de 0,1ml/100g¹⁵, seguida de tricotomia da região dorsal.

Após a anestesia, cada rato foi posicionado em decúbito ventral, imobilizado em prancha operatória e submetido à depilação na região dorsal, em área de 6 cm², e à antisepsia com pol-

vidine tópico. Na sequência, foi feita a remoção cirúrgica de fragmento da pele, de aproximadamente 2 cm de diâmetro, com o auxílio de um *punch* metálico, até exposição da fáscia muscular dorsal. A hemostasia foi realizada por compressão digital, utilizando-se gaze esterilizada.

Nos animais do grupo I, foi realizado gotejamento de 1 ml de solução salina a 0,9% sobre o leito da ferida; e nos ratos do II gotejou-se 1 ml de leite colostro. Esses procedimentos foram realizados em cada animal, a cada 24 h, não sendo utilizado qualquer tipo de curativo sobre a lesão. No pós-cirúrgico, receberam pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro, via intramuscular profunda em dose única de 0,02 ml/100g¹⁵.

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em boas condições de higiene, sendo alimentados com dieta padrão do biotério, ração (Labina™) e água *ad libitum*.

Após o período de 4, 7 e 14 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados, de acordo com os princípios éticos adequados (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA) para a dissecação das amostras que foram submetidas à análise. Os ratos receberam aplicação, via intracardíaca, de anestésico tiopental sódico (Cristália) na dose de 0,05 ml/100g. Após cinco minutos, aplicou-se o cloreto de potássio 19,1% (Equiplax), via intracardíaca, com dose única de 0,4 ml/100g¹⁵.

Logo após a eutanásia, a peça cirúrgica foi retirada, sendo constituída da cicatriz ou lesão cutânea, com margem de 1 cm de pele em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do animal. Em seguida, as peças foram identificadas e passaram pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina.

Obtidos os blocos, foram realizados cortes longitudinais com espessura de 5 µm em um micrótomo rotativo, resultando em cortes semisseccionados que foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina, para estudo histomorfológico, sob microscopia de luz.

A análise histológica descritiva foi realizada por um patologista que verificou os seguintes critérios: presença de infiltrado inflamatório,

proliferação vascular e de fibroblastos, formação de tecido de granulação, deposição de colágeno e reepitelização da área da lesão.

Resultados

Após quatro dias do procedimento cirúrgico, foi observado que a lesão de cada animal tratado com a solução salina apresentou-se recoberta por uma crosta fibrinosa e, na área subjacente, verificou-se intensa formação de vasos sanguíneos e proliferação fibroblástica (Figura 1). Nos animais tratados com o leite colostro, foi verificada formação de tecido de granulação com deposição inicial de colágeno na matriz extracelular (Figura 2). Observou-se intenso infiltrado inflamatório em ambos os grupos, porém com maior espaçamento no interstício no grupo tratado com solução salina. Não houve sinais de reepitelização na área da ferida no período analisado.

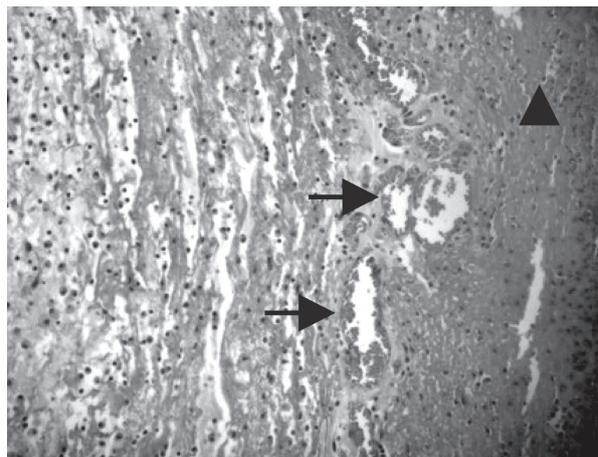


Figura 1: Fotomicrografia de ferida cutânea de animal do grupo tratado com solução salina no quarto dia após a cirurgia. Coloração HE, aumento 100x. (▲ Crosta fibrinosa; → Neovasos)

No sétimo dia pós-cirúrgico, os dados histológicos evidenciaram moderado infiltrado inflamatório e formação de tecido de granulação com intensa neovascularização e proliferação fibroblástica nos dois grupos (Figura 3 e 4); contudo, nos animais tratados com leite colostro, o te-

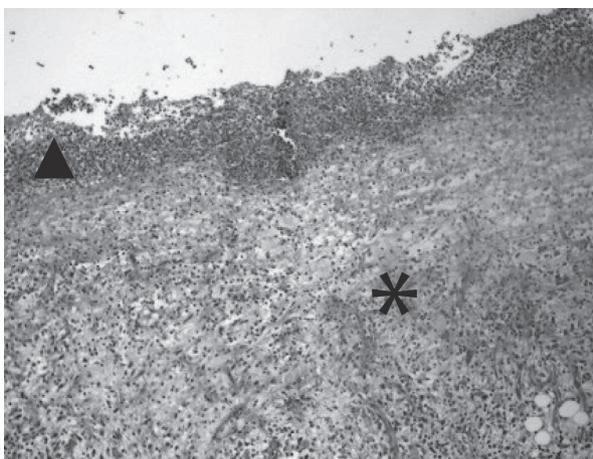


Figura 2: Fotomicrografia de ferida cutânea de rato do grupo tratado com leite colostro, no quarto dia após a cirurgia. Coloração HE, aumento 100x. (▲ Crosta; * Tecido de granulação)

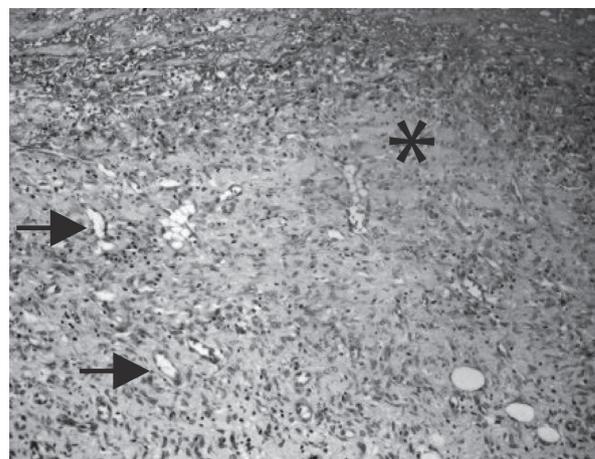


Figura 4: Fotomicrografia de ferida cutânea de animal do grupo tratado com leite colostro, no sétimo dia após a cirurgia. Coloração HE, aumento 100x. (* Tecido de granulação; → Neovasos)

cido de granulação se encontrava permeado por fibras colágenas. Os ratos do grupo tratado com o leite colostro apresentaram reepitelização parcial nas bordas das feridas, enquanto que não houve evidências de proliferação epitelial nos animais do grupo tratado com solução salina.

A análise microscópica demonstrou, após 14 dias do procedimento cirúrgico, presença de tecido de granulação com desaparecimento de alguns vasos sanguíneos e moderada deposição

de colágeno na matriz extracelular no grupo tratado com solução salina; porém, apresentou um tecido ainda imaturo, quando comparado ao evidenciado nos animais tratados com leite colostro (Figura 5 e 6). Além disso, foi possível observar na comparação intergrupos, moderado infiltrado inflamatório no grupo I, contrapondo a leve exsudação celular, no II. Ambos os grupos apresentaram sinais de reepitelização, e observou-se que no grupo tratado com leite colostro, houve reepitelização parcial da área das feridas (Figura 6).

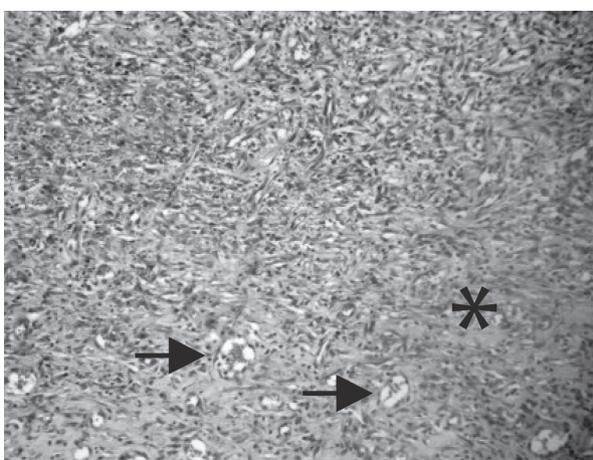


Figura 3: Fotomicrografia de ferida cutânea de rato do grupo tratado com solução salina, no sétimo dia após a cirurgia. Coloração HE, aumento 100x. (* Tecido de granulação; → Neovasos)



Figura 5: Fotomicrografia de ferida cutânea de animal do grupo tratado com solução salina, no 14º dia após a cirurgia. Coloração HE, aumento 100x. (* Tecido de granulação)

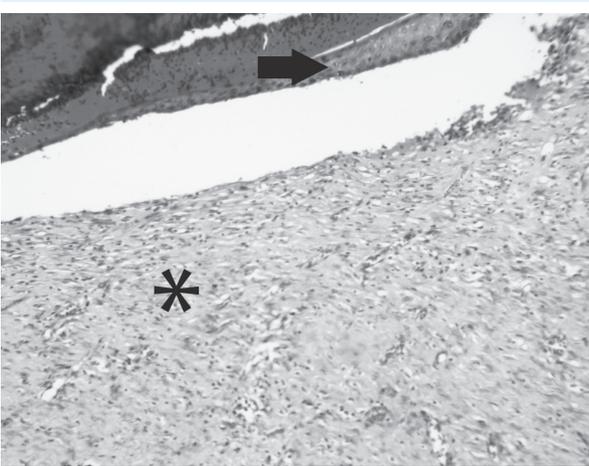


Figura 6: Fotomicrografia de ferida cutânea de animal do grupo tratado com leite colostro, no 14º dia após a cirurgia. Coloração HE, aumento 100x. (* Tecido de granulação; ➔ Reepitelização)

Discussão

A duração do período de produção do leite colostro não é bem definida, existindo grandes variações individuais. Considera-se colostro, numa tentativa de uniformização, a produção láctea do primeiro ao quinto dia pós-parto. As modificações em sua composição, após o quinto dia, ocorrem de forma gradual e progressiva¹⁶. O leite humano é constituído por inúmeras substâncias como fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento epidérmico (EGF), insulina semelhante 1 (IGF 1) e os fatores transformadores do crescimento alfa e beta¹². Acredita-se que a presença dessas substâncias na composição do leite colostro possa ter induzido a formação de neovasos, além da proliferação de fibroblastos que, por sua vez, favoreceu a produção e a maior deposição de colágeno na matriz extracelular, visto que a síntese das fibrilas de colágeno é iniciada após o quarto dia de processo cicatricial^{17, 18, 19}, e foi mais evidente nos ratos do grupo tratado com leite, quando comparado aos animais que receberam solução salina.

Embora a proliferação das células epiteliais se inicie no segundo ou terceiro dia do

processo cicatricial, não foi evidenciada uma influência direta do colostro na reepitelização, nos primeiros quatro dias pós-cirúrgico. No entanto, a partir do sétimo dia de tratamento tópico com leite colostro, foram observadas alterações macroscópicas e microscópicas favoráveis à reepitelização da área da ferida, que pode ter sido diretamente estimulada pelos fatores de crescimento, principalmente o EGF^{10, 12}.

Ambos os grupos apresentaram intenso infiltrado inflamatório na área da ferida no quarto dia pós-operatório, porém com maior espaçamento no interstício no grupo tratado com solução salina, sugerindo presença de exsudato mais evidente²⁰. No processo fisiológico da cicatrização, é observado que, geralmente com o passar do tempo, o infiltrado inflamatório tende a regredir à medida que o colágeno se concentra⁹. Com o emprego do leite colostro, a diminuição do processo inflamatório foi mais evidente no 14º dia pós-cirurgia, quando comparado ao emprego da solução salina, evidenciando-se, assim, o importante papel desempenhado pelos agentes anti-inflamatórios e antioxidantes que compõem o leite humano. Além dos fatores de crescimento, o colostro é muito rico em fatores de defesa, elementos de capital importância na proteção do recém-nascido contra microrganismos presentes no canal de parto²¹. Nesse tipo de leite, observa-se presença de agentes anti-inflamatórios, entre outros, a lactoferrina, a lisozima, a IgA secretória, bem como enzimas antioxidantes, como, por exemplo, a catalase e a glutathione peroxidase, além de antiproteases, tais como a alfa-1 anti-tripsina e a alfa-1 anti-quimiotripsinase¹².

Em estudos recentes, Amaral et al.¹⁰ pesquisaram os efeitos macroscópicos do leite humano em feridas cutâneas em ratos, para tanto empregaram o leite humano resfriado e cru, e demonstraram que o leite apresenta potencial efeito cicatrizante, quando comparado à solução salina 0,9%, corroborando os resultados encontrados no estudo aqui apresentado.

Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, aplicando-se a metodologia e com base na revisão de literatura pertinente, pode-se concluir que a utilização tópica de leite colostro otimizou a reparação de feridas cutâneas experimentais em ratos, visto que os fatores de defesa e de crescimento presentes em sua constituição influenciaram positivamente na cicatrização, acelerando o processo inflamatório, além de ter induzido a formação de tecido de granulação que estimulou a deposição de colágeno por fibroblastos e a maior organização da matriz extracelular.

Referências

- Modolin M, Bevilacqua RG. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. Revista Brasileira Clínica, São Paulo. 1985;14(6):208-14.
- Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. AnBrasDermatol, Rio de Janeiro. 2004;78(5):525-42.
- Hopkins JT, McLoda TA, Seegmiller JG, Baxter GD. Low-level laser therapy facilitates superficial wound healing in humans: a triple-blind, sham-controlled study. J AthlTrain. 2004;39(3):223-9.
- Brito NMB, Silva PRF, Silva GCF, Casella SFM, Sampaio ARS, Carvalho RA. Avaliação macroscópica de feridas cutâneas abertas em ratos tratadas com óleo de andiroba. Rev Para Med. 2001;15(2):17-22.
- Castelo Branco Neto M, Ribas Filho JM, Malafaia O, Oliveira Filho MA, Czezko NG, Aoki S. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius Raddi*) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. Acta Cir Bras. 2006;21(2):17-22.
- Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA et al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta CirBras. 2006;21(3):55-65.
- Schirato GV, Monteiro FMF, Silva FO, Lima Filho JL, Leão AMAC, Porto ALF. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. Santa Maria Ciênc rural. 2006;36(1):149-54.
- Hatanaka E, Curi R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. Rev Bras Farm. 2007;88:53-8.
- Servio EML, Araujo KS, Nascimento LRS, Costa CLS, Mendes LMS, Maia Filho, ALM, Santos, IMSP. Cicatrização de feridas com a utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides (mastruz)* e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. ConScientiae Saúde. 2011;10(3):441-48.
- Amaral MLG, Carneiro LMA, Santo MRM, Brito NMB, Brito MVH, Andrade MC. Efeito do leite humano na cicatrização de feridas abertas em ratos. Rev Para Med. 2006;20(4):13-8.
- Lacerda EMA, Accioly E, Faria IG, Da Costa VM. Práticas de nutrição pediátrica. São Paulo (SP): Atheneu; 2002.
- Feferbaum R, Falcão MC. Nutrição do recém-nascido. São Paulo (SP): Atheneu; 2003.
- Ministério da Saúde (Brasil). Normas gerais para bancos de leite humano. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1993.
- Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. Acta Cir Bras. 2004;19(4):441-7.
- Massone, F. Anestesiologia veterinária. Farmacologia e técnicas. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. Early Hum Dev. 1997;49(1):7-28.
- Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – parte II. Na Bras Dermatol. 2003;78(5):525-40.
- Santos Junior RQ, et al. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platoniainsignis* Mart.) Revista ConScientiae Saúde. 2010;9(4):575-81.
- Silver FH, Freeman JW, Devore D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. Skin Res. Technol. 2001;7(1):18-23.
- Carvalho KC, Nicolau RA, Maia Filho ALM, Barja PR, Pereira de Sá H, Santo LAE, Rocha GM. Estudo da resistência cicatricial cutânea de ratos tratados com fototerapia a laser. ConScientiae Saúde. 2010;9(2):179-86.
- Peitersen B, Bohn L, Andresen H. Quantitative determination of immunoglobulins, lysozyme, and certain electrolytes in breast milk during the entire period of lactation, during a 24-hour period, and in milk from the individual mammary gland. Acta Pediatr Scand. 1975;64(5):709-17.