

Diferenciação de miofibroblastos em feridas após uso tópico do metronidazol: estudo experimental.

Differentiation of myofibroblasts in wounds after topical use of metronidazole: an experimental study.

LILIAN CRISTINE TEIXEIRA TRINDADE¹; JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, ACBC-PR¹; CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO^{1,†}; ROGÉRIO ESTEVAM FARIAS²; MARIA DE LOURDES PESSOLE BIONDO-SIMÕES, TCBC-PR¹

R E S U M O

Objetivo: avaliar os efeitos da administração tópica do metronidazol na diferenciação de fibroblastos e na contração da ferida durante cicatrização experimental por segunda intenção em ratos. **Métodos:** cento e oito animais foram submetidos a uma ferida circular no dorso, com 2cm de diâmetro e divididos em seis grupos: grupo controle, com aplicação de solução salina sobre a ferida e cinco grupos experimentais divididos de acordo com a concentração da solução do metronidazol utilizada (4%, 6%, 8%, 10% e 12%). Curativos foram realizados diariamente durante todo o período do experimento, que foi subdividido em três momentos de análise: três, sete e 14 dias. A contração da ferida foi avaliada por planimetria digital e os miofibroblastos e protomiofibroblastos foram identificados usando técnicas de imuno-histoquímica CD34 e α -SMA. **Resultados:** a contração da ferida não apresentou diferença entre os grupos e o controle. Os protomiofibroblastos foram significativamente mais numerosos aos sete dias ($p=0,022$) nos grupos metronidazol de 4%, 6% e 8%. Após 14 dias, nos mesmos grupos, os miofibroblastos predominaram significativamente ($p=0,01$). **Conclusão:** a administração tópica de solução de metronidazol em feridas de pele com cicatrização por segunda intenção foi capaz de melhorar a diferenciação de fibroblastos. A fase de contração da cicatrização de feridas permaneceu inalterada, sem redução significativa da contração avaliada pela planimetria digital. Estes resultados podem ser utilizados em favor do processo de cicatrização de feridas.

Descritores: Cicatrização. Metronidazol. Administração Tópica. Fibroblastos. Miofibroblastos.

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas é alvo de pesquisas há séculos, mas nas últimas quatro décadas, intensificaram-se os trabalhos sobre fibroplasia, com interesse em reabilitação funcional ou cosmética¹⁻³.

Após trauma de pele, acidental ou cirúrgico, os fatores relacionados com a reparação tecidual são ativados, evoluindo por fases: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Mas estas fases podem ser alteradas em diversas situações, como ocorre quando há infecção, que perpetua o processo inflamatório propiciando a cronificação de uma lesão de pele, como na úlcera de perna ou, ao contrário, quando se usa cremes tópicos e curativos especiais que aceleram o processo de fibroplasia, em procedimentos estéticos⁴.

O fenômeno de contração da ferida, ou seja, a relação entre o tamanho da ferida e a taxa de redução durante a cicatrização, completou 100 anos de sua descrição⁵. Entretanto, a principal célula responsável por este fenômeno, o miofibroblasto, só foi descrita após décadas. Em 1971, Gabbiani⁶ descreveu fibroblastos presentes no tecido de granulação que possuíam características em seus citoplasmas semelhantes às encontradas em células musculares lisas, descrevendo, assim, o miofibroblasto. Em 1990, estudo experimental com feridas abertas em pele de ratos demonstrou que o miofibroblasto era proveniente do fibroblasto local, após desenvolver bandas de fibrilas musculares, denominadas *alpha smooth muscle actin* (α -SMA), característica que identifica o miofibroblasto através de imuno-histoquímica⁷.

1 - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Curitiba, PR, Brasil. 2 - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Geral, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Trabalhos recentes^{8,9} afirmam que o conhecimento dos fatores ativadores e bloqueadores dos miofibroblastos são possíveis chaves de tratamento e controle de neoplasias de origem estromal, como sarcomas.

O metronidazol tópico tem sido usado para controle de odor em feridas tumorais fungoides. As características destas feridas, elevadas acima da pele como um cogumelo, com grandes áreas de dobras, similares a vilosidades e criptas, que propiciam proliferação acentuada de bactérias anaeróbicas, são causas do odor fétido destas lesões¹⁰. O presente estudo teve como objetivo avaliar, em modelo experimental de cicatrização cutânea por segunda intenção, a influência da aplicação tópica de solução de metronidazol em diferentes concentrações, sobre a quantidade de protomiofibroblastos e miofibroblastos e seu potencial papel na fase de contração da cicatrização das feridas.

MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - CEUA PUCPR, sob o protocolo nº 655.

O estudo experimental utilizou 108 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia*) da linhagem *Wistar*, adultos jovens com idades de 110 dias e com peso médio entre 300g e 315g. Foram mantidos em gaiolas apropriadas individuais para a espécie, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e à ração-padrão para a espécie. O tamanho da amostra foi estimado através dos estudos realizados na literatura pesquisada^{4,11}, e o projeto seguiu as orientações da Lei 11.794/2008 regulamentada pelo decreto número 6899 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos. Com exceção dos animais do grupo controle (GC), todos os outros dos grupos experimentais I a V (GE) foram submetidos a curativos com o uso de metronidazol em solução tópica a 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, com frequência de uma vez ao dia. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos de seis animais para avaliação em três, sete e 14 dias após a lesão na pele (Tabela 1).

Tabela 1. Divisão dos animais em grupos e dias de avaliação.

Grupos	Número de ratos	Dias de avaliação
GC*	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE**I (4%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE**II (6%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE**III (8%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE**IV (10%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE**V (12%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias

* GC: grupo controle; ** GE: grupo experimental.

Os animais foram anestesiados com ketamina 80mg/kg e xilazina 8mg/kg e realizada tricotomia na região dorsal de área de aproximadamente 24cm². Após antissepsia com Polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e delimitação da área operatória com campo esterilizado fenestrado, foi realizada ressecção de segmento de pele circular com *punch* metálico com 2cm de diâmetro, até expor a fáscia muscular dorsal.

Todos os animais tiveram as feridas limpas com solução salina. Em seguida, no Grupo controle (GC) foi aplicado curativo com gazes secas, e nos cinco grupos experimento (GE) foram aplicados curativos com gazes embebidas em metronidazol solução (benzoilmetronidazol) em veículo q.s.p., sendo GE I na concentração de 40mg/ml (4%), GE II de 60mg/ml (6%), GE III de 80mg/ml (8%), GE IV de 100mg/ml (10%) e GE V de 120mg/ml (12%). Após o término do ato operatório os animais receberam dipirona na dose de 10mg/Kg, por via intramuscular para analgesia.

A ferida permaneceu ocluída até a recuperação anestésica. Após este período, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, as quais foram colocadas em prateleiras à igual distância da fonte de luz, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*. Nos demais dias, sempre no período da manhã, as feridas eram limpas com solução salina e na sequência, o GC recebia 0,3ml da mesma solução e os GEs 0,3ml de metronidazol solução, correspondendo a 12mg/dia no GE I (4%, 40mg/kg/peso), 18mg/dia no GE II (6%, 60mg/kg/peso), 24mg/dia no GE III (8%, 80mg/kg/peso), 30mg/dia no GE IV (10%, 100mg/kg/peso) e 36mg/dia no GE V (12%, 120mg/kg/peso).

No terceiro, sétimo e 14^o dias de tratamento, seis animais dos GE I, II, III, IV, V e GC sofreram eutanásia por dose letal de tiopental sódico intraperitoneal (120mg/Kg), sendo este o método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, de 20 de junho de 2002.

Cada animal foi colocado sobre prancha cirúrgica e fotografado por câmera digital, modelo Cyber-Shot P71, Sony®, resolução de 3.2M pixels, mantida em tripé a uma distância constante de 34cm.

Este procedimento foi efetuado na realização da ferida (momento zero) e após eutanásia no terceiro, sétimo e 14^o dia. A imagem obtida foi importada para o programa de computador *VeV MDmeasurement Documentation®*, para avaliar a contração da ferida por planimetria digital. Para o cálculo da área real, foi utilizado como referência um gabarito fornecido pelo fabricante do programa, quadrado, de 3x3cm, posicionado ao lado direito da ferida no momento da fotografia, que permitiu a conversão da imagem eletrônica para uma escala em centímetros.

Após os registros fotográficos, as feridas foram ressecadas com margem de 1cm de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato. O segmento destinado à histologia foi estendido sobre filtro de papel identificado e fixado em formol a 10% por 24 horas. Após este período, foi submetido ao preparo histológico convencional, incluso em bloco de parafina e cortes de 5µm.

Para a imuno-histoquímica foi utilizado o método *tissue array*. Do bloco de parafina, da área superficial central da ferida foi retirado um fragmento com um *punch* número 3. As amostras retiradas foram depositadas em um cassete, conforme determinação do mapa previamente elaborado. O material foi encaminhado, na sequência, para processamento imuno-histoquímico, utilizando anticorpo a-SMA e CD34. O método *tissue array* permitiu a análise completa da área central da ferida, com uma média de 14 campos avaliados na ampliação 400x, considerando-se somente as células nucleadas, alvo da pesquisa, ou seja, protomiofibroblasto e miofibroblasto.

Para a comparação dos grupos em cada momento de avaliação e para a comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo, foi considerado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional IBM SPSS v.20.0.

RESULTADOS

Com relação à contração das feridas, observou-se que as áreas diminuiram significativamente com o decorrer do tempo no GC ($p=0,001$), nos GE I ($p=0,001$), GE II ($p=0,001$), GE III ($p=0,001$), GE IV ($p=0,002$) e GE V ($p=0,002$). Houve redução progressiva da ferida no terceiro, sétimo e 14º dia em todos os grupos analisados. Na comparação entre os grupos experimento e o grupo controle, não houve diferença significativa nos períodos avaliados.

A imuno-histoquímica CD34, utilizada para identificar neovascularização, marcou células estromais na matriz, não relacionadas a neovasos, a-SMA negativas, sugestivas de serem protomiofibroblastos. A utilização do método *tissue array* permitiu a comparação das lâminas com anticorpos a-SMA e CD34, certificando que não se tratavam das mesmas células. Na avaliação do terceiro dia, nenhum dos grupos examinados apresentou protomiofibroblastos nas feridas. No 14º dia não houve diferença entre os grupos. No sétimo dia houve diferença entre os grupos ($p=0,022$), conforme tabela 2.

Tabela 2. Número de protomiofibroblastos nas feridas dos grupos controle e experimento no sétimo dia de avaliação.

	Grupos	n	Médias	Desvio padrão	Valor de p
Dia 7	Controle	6	0,612	0,853	0,022
	4%	6	1,602	1,469	
	6%	6	2,355	1,602	
	8%	6	1,589	2,052	
	10%	6	0,140	0,310	
	12%	6	0,481	0,407	

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Comparando-se os grupos dois a dois em relação à presença de protomiofibroblasto, no sétimo dia, diferença significativa ocorreu, conforme a tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre os grupos dois a dois em relação à presença de protomiofibroblasto no sétimo dia.

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,096
Controle x 6%	0,014
Controle x 8%	0,286
Controle x 10%	0,258
Controle x 12%	0,898
4% x 6%	0,388
4% x 8%	0,532
4% x 10%	0,007
4% x 12%	0,122
6% x 8%	0,142
6% x 10%	0,001
6% x 12%	0,020
8% x 10%	0,033
8% x 12%	0,346
10% x 12%	0,210

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Com a imuno-histoquímica a-SMA, na avaliação do terceiro dia, nenhum dos grupos examinados apresentou miofibroblastos nas feridas. No sétimo dia, a diferença não foi significativa. No 14º dia houve diferença entre os grupos ($p < 0,010$), conforme tabela 4.

Tabela 4. Número de miofibroblastos nas feridas dos grupos controle e experimento no 14º dia de avaliação.

	Grupos	n	Médias	Desvio padrão	Valor de p
Dia 14	Controle	6	0,186	0,288	0,010
	4%	6	1,061	1,136	
	6%	6	2,530	1,718	
	8%	6	1,287	1,139	
	10%	6	0,981	0,417	
	12%	6	0,235	0,231	

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

Comparando-se os grupos dois a dois em relação à presença de miofibroblasto no 14º dia, diferença significativa ocorreu, conforme a tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre os grupos dois a dois em relação a presença de miofibroblasto no 14º dia.

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,045
Controle x 6%	0,001
Controle x 8%	0,021
Controle x 10%	0,008
Controle x 12%	0,776
4% x 6%	0,084
4% x 8%	0,726
4% x 10%	0,464
4% x 12%	0,081
6% x 8%	0,162
6% x 10%	0,304
6% x 12%	0,001
8% x 10%	0,701
8% x 12%	0,039
10% x 12%	0,016

Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

Entre os autores que fizeram trabalhos experimentais em ratos com ferida aberta no dorso, com cicatrização por segunda intenção e avaliaram contração da ferida por planimetria, Prasad *et al.*¹², com o uso do metronidazol por via oral na dose de 160mg/kg/dia, e Rao *et al.*¹³, com o uso da medicação

tópica na dose de 180mg/kg/dia, referiram aumento da contração da ferida. Entretanto, Borden *et al.*¹⁴, que fizeram uso de metronidazol intraperitoneal na dose de 20mg/kg/dia, e Trindade *et al.*⁴, com uso tópico na dose de 50mg/kg/dia, não encontraram diferença significativa na contração da ferida aberta na comparação dos grupos estudados.

Wrobel *et al.*¹⁵, em trabalho realizado com cultura de fibroblastos e miofibroblastos humanos em substrato passível de contração, produziram força contráteis similares, sugerindo que na ausência da expressão de α -SMA, o fibroblasto poderia produzir força contrátil suficiente para o fechamento de uma ferida aberta. Ibrahim *et al.*¹⁶ avaliaram contração de feridas abertas em cicatrização por segunda intenção em humanos e ratos machos e fêmeas sem interferência medicamentosa. Os autores demonstraram que a expressão da α -SMA dos fibroblastos, ou seja, os miofibroblastos no tecido de granulação contribuíram, mas não foram obrigatórios para a contração da ferida, e concluíram que os fibroblastos *in vivo* podem gerar força contrátil.

Berry *et al.*¹⁷ referiram que houve contração efetiva das feridas amplas na ausência de alta densidade de miofibroblastos. Sugeriram que a unidade contrátil possa ser a organização que os fibroblastos promovem das fibrilas colágenas finas na fibra colágena espessa e a compactação do tecido conjuntivo dentro do tecido de granulação, retraindo a derme e o tecido adiposo ao redor da ferida.

Em nosso trabalho, observou-se que as feridas dos grupos experimento e controle diminuíram sua área de modo significativo com o evoluir do tempo. Porém, quando os grupos foram comparados entre si, não houve diferença em nenhum dos momentos, demonstrando que o metronidazol nas doses de 40mg/kg/dia, 60mg/kg/dia, 80mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 120mg/kg/dia, em uso tópico, não alterou a velocidade da contração da ferida com cicatrização por segunda intenção. Portanto, a taxa de redução do tamanho da ferida durante a cicatrização por segunda intenção demonstrou não ser influenciada pelo metronidazol em uso tópico, independe das doses utilizadas.

Na matriz extracelular há fibroblastos que apresentam em seus citoplasmas bandas de microfilamentos conhecidas como fibras contráteis que expressam actina, porém são α -SMA negativos e podem ser marcadas por CD34^{1,18,19}. Nas fases precoces de formação do tecido de granulação da ferida em cicatrização por segunda intenção, os fibroblastos ao redor da ferida migram para o centro da lesão e adquirem em seus citoplasmas bandas de microfilamentos similares às fibras contráteis beta e gama actina, tornando-se protomiofibroblastos, que iniciam a síntese dos componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina, colágeno tipo I e III^{18,20}. Estas células, miofibroblastos imaturos, aparecem no tecido de granulação entre o quinto e o sexto dia após a confecção da ferida²¹.

Os protomiofibroblastos secretam uma forma de fibronectina denominada ED-A fibronectina que demonstra ser importante na ferida para expressão do fenótipo miofibroblasto^{5,20}. A transformação do fibroblasto em protomiofibroblasto parece depender da mudança da tensão mecânica da ferida quando comparada com o aumento da rigidez da pele normal. Entretanto, a diferenciação completa em miofibroblastos só ocorrerá com a estimulação do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) na presença da ED-A fibronectina^{5,20}.

O Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o Fator de necrose tumoral- α demonstram ter ação na formação do protomiofibroblasto, mas estas citocinas isoladas não conseguem induzir a expressão do α -SMA e diferenciação em miofibroblasto *in vitro* ou *in vivo*^{1,21}.

Hinz *et al.*²², em experimento com substrato de silicone e matriz colágena tratada com TGF- β , e cultivo de fibroblastos de subcutâneo de ratos, conseguiram aumento da expressão da α -SMA, demonstrando a ação deste fator sobre a atividade contrátil dos fibroblastos. O TGF- β possui a ação sobre a proliferação e diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, ativação dos queratinócitos, deposição da matriz e angiogênese²³.

Há fatores inibidores da expressão da α -SMA, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), que demonstram antagonizar o TGF- β ²⁴. O Interferon- γ produzido pelas células T suprime a expressão da α -SMA, deposição de colágeno e contração em modelos animais²⁵. O TGF β -3 altera a expressão α -SMA, mas depende da cultura das células aplicadas²⁶. A Interleucina-1 demonstra antagonizar o TGF- β e após, este bloqueio induz o miofibroblasto à apoptose²⁷. A relação entre a matriz extracelular e TGF- β determina uma cicatrização normal ou um processo de fibrose^{21,23}.

Em nosso estudo, os grupos experimento com aplicação de metronidazol solução a 4% (40mg/kg/dia), 6% (60mg/kg/dia), 8% (80mg/kg/dia) apresentaram maior número de protomiofibroblastos nas feridas. Os grupos experimento 10% (100mg/kg/dia) e 12% (120mg/kg/dia) apresentaram menor densidade destas células que o grupo controle. Isto sugere que a ação do metronidazol tópico para induzir na ferida a diferenciação do fibroblasto em protomiofibroblasto é dose dependente.

Conhecer os fatores de recrutamento dos fibroblastos e células mesenquimais, diferenciação, proliferação e apoptose dos miofibroblastos são fundamentais para compreender a reparação tecidual normal e patológica⁵. No que diz respeito aos miofibroblastos, estudos com imunofluorescência marcada com anticorpos para detectar todas as isoformas de actina afirmaram que estas células são provenientes dos fibroblastos que migraram para ferida⁷. Nestes estudos, os miofibroblastos apareceram no sexto dia de avaliação das feridas, e estavam positivamente presentes do 12^o ao 15^o dia. Do 16^o ao 20^o dia houve declínio intenso da presença dos miofibroblastos e, no 30^o dia, já não havia nenhuma destas células nas feridas. Observaram ainda que figuras apoptóticas nos fibroblastos apareceram entre o 20^o e o 25^o dia da lesão, sugerindo haver morte programada destas células nos casos de cicatrização de feridas. Os autores enfatizaram que a primeira fase de contração da ferida independe do fenótipo do miofibroblasto⁷.

Os miofibroblastos são células que possuem em seu citoplasma bandas de microfilamentos de α -SMA organizadas. Mas outros marcadores de fibras musculares miosina de cadeia pesada, desmina, h-caldesmon e smoothelin são negativos^{3,8,28}. Tomasek *et al.*¹ afirmaram que o miofibroblasto tem ação na síntese da matriz extracelular e na geração de força responsáveis pela reorganização da matriz e contração da ferida. Com o aumento dos estudos de linhagem celular e ferramentas genéticas tem sido possível identificar outros precursores de miofibroblastos além dos fibroblastos provenientes da derme intacta adjacente. Tem-se proposto precursores como células da musculatura lisa vascular, pericitos, células mesenquimais, fibrócitos, células hepáticas estreladas, células da medula óssea entre outras^{8,27-29}.

Segundo Hinz *et al.*²¹, os miofibroblastos são caracterizados pelo desenvolvimento de fibras contráteis α -SMA e aumento da produção de proteínas da matriz extracelular. Estas células se conectam por meio da adesão focal na matriz e entre as células por junções aderentes (Figura 1). A principal célula para originar o miofibroblasto, após uma lesão dos diferentes tecidos, parece ser o fibroblasto residente na derme ao redor da lesão, diferenciando-se inicialmente em protomiofibroblasto, caracterizado por ser α -SMA negativo.

Estudos recentes afirmam que a matriz extracelular desenvolve e mantém a homeostase tecidual, e a sua disfunção favorece o aparecimento de doenças fibróticas e neoplasias estromais^{5,23,30}. A degeneração tecidual em malignidade pode ser proveniente de casos de doenças fibróticas, tais como cirrose hepática, fibrose pulmonar e renal, caracterizadas por hiperproliferação de fibroblastos, suas diferenciações em miofibroblastos e acúmulo anormal de colágeno^{9,21,30}. O conhecimento do processo complexo de produção, modificação e remodelação da matriz extracelular é a chave para atuar nas respostas celulares e terapias antifibróticas e antineoplásicas^{2,5,9,19,30,31}. Hinz e Gabbiani³² afirmaram que o miofibroblasto é a principal célula envolvida em doenças fibróticas, e a estratégia terapêutica seria interferir na diferenciação desta célula controlando o TGF- β 1 e ED-A fibronectina.

Há relatos de que a tensão mecânica existente na matriz extracelular na ferida seria a responsável pela manutenção da presença dos miofibroblastos^{33,34}. Considerando os possíveis precursores dos miofibroblastos, Hinz³⁵, em seu estudo, levanta a hipótese de que os miofibroblastos não possuem igual resposta aos fatores mecânicos das lesões, e que provavelmente há outros fatores para a manutenção do fenótipo miofibroblasto além da mudança na tensão da ferida.

MYOFIBROBLAST PROGENITORS

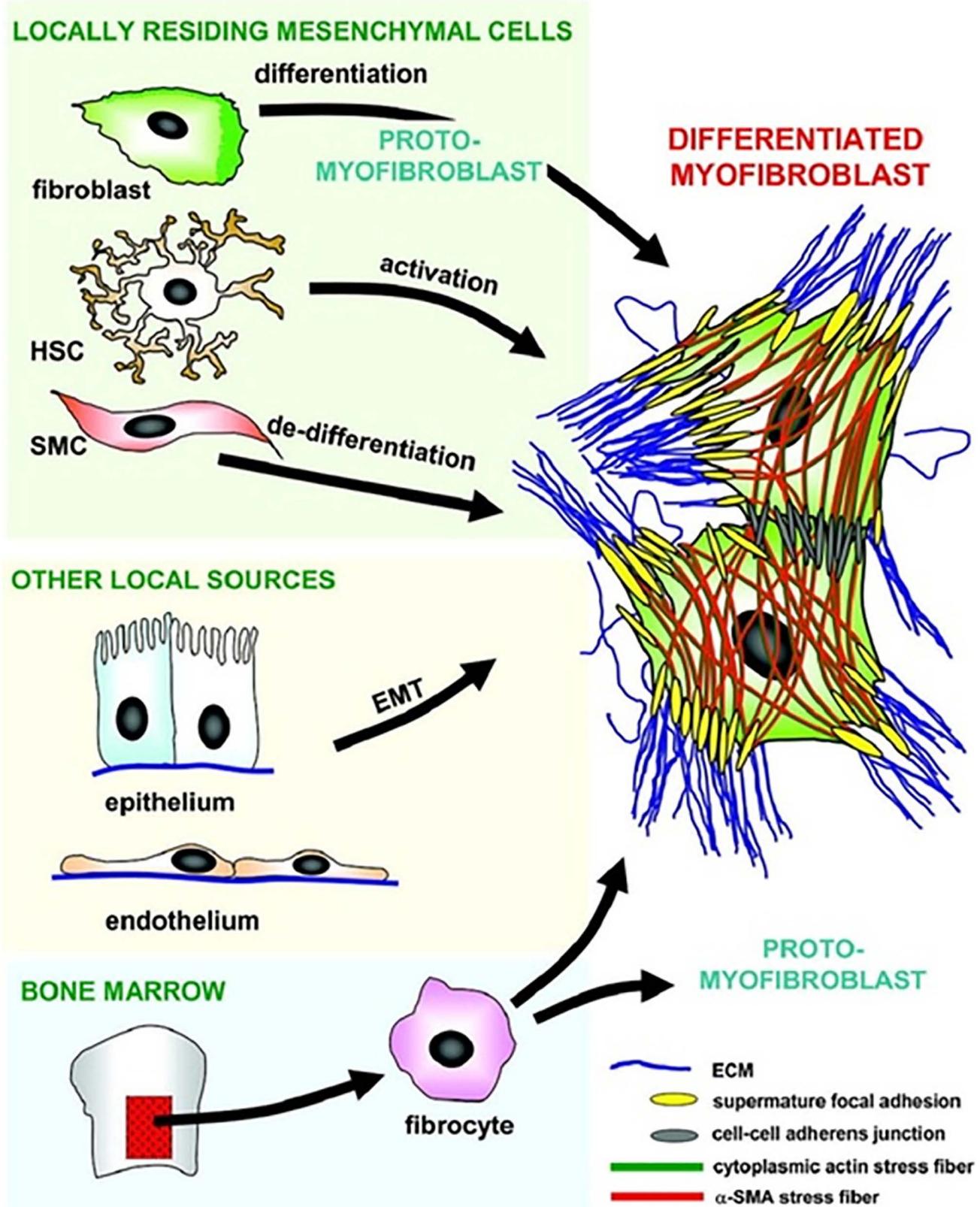


Figura 1. Uma célula, múltiplas origens. Fonte: Imagem obtida sob licença nº 3927950953808 de publicação da Elsevier em The American Journal of Pathology, artigo The Myofibroblast, volume 170, edição 6, de junho de 2007 em concordância do autor Dr. Boris Hinz.

Protomiofibroblastos e miofibroblastos podem ser encontrados em tecidos normais, como septo alveolar e criptas intestinais, onde a tensão tecidual está estável²⁰.

Na presente pesquisa os grupos experimento com aplicação tópica do metronidazol solução a 4% (40mg/kg/dia), 6% (60mg/kg/dia) e 8% (80mg/kg/dia) apresentaram maior densidade de miofibroblastos nas feridas, sugerindo que a diferenciação do protomiofibroblasto em miofibroblasto, ou seja, a expressão da α -SMA, depende da dose utilizada do metronidazol. Uma hipótese plausível seria que o metronidazol tópico entre 40 e 80 mg/kg/dia apresentaria um aumento da ação do TGF- β na ferida, mas em doses altas, acima 100mg/kg/dia, levaria ao bloqueio desta citocina necessária para expressão do fenótipo miofibroblasto, conforme demonstrado em outros estudos²¹⁻²⁴. Entretanto, a ação aparentemente tóxica do metronidazol tópico em doses acima de 100mg/kg/dia, em cicatrização de feridas por

segunda intenção, passa a ser desejável como terapia antifibrótica em tratamento de cicatriz hipertrófica de pele ou prevenção de formação de queloide.

Fazem-se necessários novos estudos para avaliar a ação do metronidazol em altas doses sobre a expressão do fenótipo miofibroblasto, em uso via oral ou endovenoso, para determinar se doses acima de 100mg/kg/dia, por estas vias de administração, apresentariam igual bloqueio da expressão da α -SMA, constituindo assim uma forma de terapia antifibrótica de ação sistêmica, como sugeriram Hinz e Gabbiani³² como estratégia terapêutica.

Concluimos que a aplicação tópica de metronidazol em diferentes concentrações sobre feridas cutâneas em cicatrização por segunda intenção induz a proliferação significativa de protomiofibroblastos e miofibroblastos com efeito máximo na concentração de 6%, porém, sem influenciar significativamente a fase de contração da ferida.

ABSTRACT

Objective: to assess the effects of topical administration of metronidazole on fibroblast differentiation and on wound contraction during experimental secondary intention wound healing in rats. **Methods:** we submitted 108 rats to a circular wound on the back, 2cm in diameter, and divided them into six groups: control group, with application of saline solution on the wound and five experimental groups, divided according to the concentration of metronidazole solution used (4%, 6%, 8%, 10% and 12%). We changed the dressings daily throughout the trial period, which comprised three stages of analysis: three, seven and 14 days. We evaluated wound contraction by digital planimetry, and identified myofibroblasts and protomyofibroblasts using CD34 and α -SMA immunohistochemistry techniques. **Results:** wound contraction was not different between the experimental and the control groups. Protomyofibroblasts were significantly more numerous at seven days ($p=0.022$) in the 4%, 6% and 8% metronidazole groups. After 14 days, in the same groups, myofibroblasts predominated significantly ($p=0.01$). **Conclusion:** the topical administration of metronidazole solution in skin wounds healing by secondary intention was able to improve the differentiation of fibroblasts. The contraction phase of wound healing remained unchanged, without significant reduction of the contraction evaluated by digital planimetry. These results can be used in favor of the wound healing process.

Keywords: Wound Healing. Metronidazole. Administration, Topical. Fibroblasts. Myofibroblasts.

REFERÊNCIAS

1. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-63.
2. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012;180(4):1340-55.
3. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:301-11.
4. Trindade LC, Biondo-Simões Mde L, Sampaio CP, Farias RE, Pierin RJ, Netto MC. Evaluation of topical metronidazole in the healing wounds process: an experimental study. *Rev Col Bras Cir.* 2010;37(5):358-63.
5. Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmoulière A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(6):1145-57.

6. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia*. 1971;27(5):549-50.
7. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest*. 1990;63(1):21-9.
8. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res*. 2016;142:56-70.
9. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech*. 2011;4(2):165-78.
10. Da Costa Santos CM, De Mattos Pimenta CA, Nobre MR. A systematic review of topical treatments to control the odor of malignant fungating wounds. *J Pain Symptom Manage*. 2010;39(6):1065-76.
11. Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Inflammatory alterations provoked by metronidazole in wounds: an experimental study in rats. *J Vasc Bras*. 2009;8(3):232-7.
12. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. *Indian J Exp Biol*. 1995;33(11):845-7.
13. Rao CM, George KM, Bairy KL, Somayaji SN. An appraisal of the healing profiles of oral and external (GEL) metronidazole on partial thickness burn wounds. *Indian J Pharmacol*. 2000;32(5):282-7.
14. Borden EB, Sammartano RJ, Dembe C, Boley SJ. The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgery*. 1985;97(3):331-6.
15. Wrobel LK, Fray TR, Molloy JE, Adams JJ, Armitage MP, Sparrow JC. Contractility of single human dermal myofibroblasts and fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2002;52(2):82-90.
16. Ibrahim MM, Chen L, Bond JE, Medina MA, Ren L, Kokosis G, et al. Myofibroblasts contribute to but are not necessary for wound contraction. *Lab Invest*. 2015;95(12):1429-38.
17. Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg*. 1998;102(1):124-31.
18. Chitturi RT, Balasubramaniam AM, Parameswar RA, Kesavan G, Haris KT, Mohideen K. The role of myofibroblasts in wound healing, contraction and its clinical implications in cleft palate repair. *J Int Oral Health*. 2015;7(3):75-80.
19. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Díaz-Flores L Jr, Gómez MG, Sáez FJ, Madrid JF. Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;55:50-61.
20. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Res*. 2016 Apr 26;5. pii: F1000 Faculty Rev-752.
21. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170(6):1807-16.
22. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell*. 2001;12(9):2730-41.
23. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: tale of a strained relationship. *Matrix Biol*. 2015;47:54-65.
24. Cushing MC, Mariner PD, Liao JT, Sims EA, Anseth KS. Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells. *FASEB J*. 2008;22(6):1769-77.
25. Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A, Mertens PR. Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J Biol Chem*. 2006;281(3):1784-95.
26. Huang T, Schor SL, Hinck AP. Biological activity differences between TGF- β 1 and TGF- β 3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers. *Biochemistry*. 2014;53(36):5737-49.
27. Duffield JS, Lupher M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2013;8:241-76.
28. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol*. 2007;127(3):526-37.
29. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol*. 2013;229(2):298-309.

30. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014;15(12):1243-53.
31. Yu H, Mouw JK, Weaver VM. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol.* 2011;21(1):47-56.
32. Hinz B, Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 Biol Reports.* 2010;2:78.
33. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol.* 2001;159(3):1009-20.
34. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(5):538-46.
35. Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *J Biomech.* 2010;43(1):146-55.

Recebido em: 27/12/2018

Aceito para publicação em: 22/01/2019

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

† in-memoriam

Endereço para correspondência:

Lilian Cristine Teixeira Trindade

E-mail: lct.trindade@hotmail.com

