

ANDRÉ RICARDO DALL'OGGIO TOLAZZI

**EFEITO DO INIBIDOR DE LEUCOTRIENO MONTELUCASTE NA CICATRIZAÇÃO
CUTÂNEA EM RATOS: AVALIAÇÃO TENSIOMÉTRICA,
DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL E DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Ligocki Campos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA

2007

Aos meus pais, João Carlos e Vânia Maria, e à minha irmã, Karine.

Pelo profundo amor que nos une.

Pelo apoio constante e incondicional.

Minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS LIGOCKI CAMPOS, por acreditar neste projeto, por orientar-me em todas as fases de sua realização, pelo relacionamento amigável e respeitoso e, principalmente, pela enorme contribuição para minha formação acadêmica e profissional.

Ao PROF. DR. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, pela seriedade e grande dedicação dispendida na coordenação do Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

À secretária do Departamento de Pós-graduação em Cirurgia da UFPR, REGINA SASS, pelas orientações e ajuda quanto aos compromissos e normas de funcionamento do Programa.

À patologista DR^a. DANIELE SAKAMOTO e ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, pela valiosa contribuição para as análises histológicas.

À amiga e residente em cirurgia plástica DR^a. MARIANA JORGE GARCIA, pelo auxílio em vários momentos da fase experimental deste estudo.

Ao amigo e cirurgião plástico DR. LUIZ ROBERTO REIS DE ARAÚJO, por colaborar e dividir sua experiência científica relacionada ao tema do presente estudo.

À minha prima DR^a. ANA LÚCIA TOLAZZI, pelo auxílio nas correções e impressão do texto, além do grande incentivo e pronta ajuda em inúmeras outras situações.

Ao PROF. DR. GILVANI AZOR DE OLIVEIRA E CRUZ, ao PROF. DR. RENATO DA SILVA FREITAS e à PROF^a. DR^a. RUTH MARIA GRAF, pela inestimável contribuição na minha formação médico-cirúrgica, pelas inúmeras oportunidades criadas, pela dedicação docente, pelo exemplo profissional e por nossa afetuosa amizade.

Ao DR. ODILON DE LOYOLA E SILVA FILHO, também, pelos valiosos ensinamentos transmitidos, pelas oportunidades proporcionadas desde meu tempo de acadêmico e pelo convívio respeitoso e amigável durante estes anos.

Finalmente, à MINHA AMÁVEL FAMÍLIA, razão principal do meu esforço e a quem dedico mais esta conquista. À minha irmã KARINE, minha profunda gratidão pela grande ajuda durante toda a fase experimental deste trabalho, sem a qual ele não seria factível. Além disso, por nossa forte união e companheirismo, acreditando no sucesso um do outro, sempre! Aos meus queridos pais VÂNIA MARIA e JOÃO CARLOS TOLAZZI, pelos ensinamentos de bem, pelos princípios morais transmitidos, pelo exemplo de conduta ética, pelo investimento incondicional na minha educação e formação, por quem sou, pelo que conquistei até então e pelo imenso amor que nos une. Minha eterna gratidão!

“O conhecimento amplia a vida.
Conhecer é viver uma realidade que a ignorância impede desfrutar”

Carlos Bernardo González Pecotche

RESUMO

Introdução: As contraturas cicatriciais podem ser bastante deformantes e desabilitantes. Estudos recentes têm sugerido efeito inibitório dos antagonistas do receptor de leucotrieno no processo de contração cicatricial. **Objetivo:** Este estudo objetivou avaliar a influência do inibidor de leucotrieno montelucaste no processo de contração e cicatrização cutânea de ratos submetidos à modelo experimental misto (excisional e incisional). **Método:** Sessenta ratos machos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (MK-7d, SF-7d, MK-14d e SF-14d) conforme a medicação fornecida (MK: montelucaste; SF: solução de cloreto de sódio 0,9%) e o dia de sacrifício (7d: 7º dia pós-operatório; 14d: 14º dia pós-operatório). A dose diária padronizada do montelucaste sódico (10 mg/kg/dia) foi administrado via sondagem orogástrica rígida aos animais dos grupos de estudo. Volume equivalente de solução de cloreto de sódio 0,9% foi administrado aos animais dos grupos controle. Sob anestesia inalatória com éter etílico, foi realizada ferida excisional (2 x 2 cm) e outra incisional de 5 cm no dorso de cada rato. As feridas excisionais foram deixadas cicatrizar espontaneamente e, mediante fotografias digitais obtidas em diferentes tempos pós-operatórios, as áreas cruentas e taxa de contração foram calculadas utilizando programa específico de computador. As feridas incisionais foram fechadas primariamente, tendo sido analisadas tensiometricamente nos respectivos dias de sacrifício. Ambas as feridas foram avaliadas histologicamente pelo método de densitometria do colágeno. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste “*t*” de Student, *Aspin-Welch* e *Mann-Whitney*, adotando nível de significância estatística de 5%. **Resultados:** Quanto aos cálculos de área das feridas excisionais, as taxas de contração foram semelhantes entre os grupos de estudo e controle ($p > 0,05$). A análise tensiométrica do grupo MK-7d evidenciou tensão máxima (kgf/cm²) semelhante ao grupo SF-7d ($1,53 \pm 0,18$ vs $1,98 \pm 0,17$; $p = 0,0877$), assim como os grupos MK-14d e SF-14d ($5,14 \pm 0,52$ vs $5,02 \pm 0,28$; $p = 0,8463$). Também não houve diferença significativa na variável força máxima (kgf) entre os grupos MK-7d e SF-7d ($0,61 \pm 0,07$ vs $0,79 \pm 0,06$; $p = 0,09$) bem como entre os grupos MK-14d e SF-14d ($2,05 \pm 0,2$ vs $2,01 \pm 0,11$; $p = 0,8455$). As feridas incisionais apresentaram porcentagem semelhante de fibras colágenas maduras no grupo MK-7d e SF-7d ($59,2 \pm 4,68\%$ vs $61,5 \pm 7,83\%$; $p = 0,8041$) e menor no grupo MK-14d em relação ao SF-14d ($44,8 \pm 6,17\%$ vs $64,8 \pm 6,9\%$; $p = 0,0394$). Na ferida excisional, a diferença na porcentagem média de fibras colágenas maduras foi marginalmente significativa entre o grupo MK-7d e SF-7d ($40,1 \pm 6,88\%$ vs $61,2 \pm 8,02\%$; $p = 0,0607$) e significativamente menor no grupo MK-14d em relação ao SF-14d ($26 \pm 5,66\%$ vs $68,3 \pm 7,76\%$; $p = 0,0001$). **Conclusões:** O montelucaste não altera a taxa de contração cicatricial espontânea em feridas cutâneas excisionais, bem como não reduz de forma significativa a resistência tênsil de feridas cutâneas incisionais. Entretanto, o montelucaste apresenta significativo e progressivo efeito inibitório no processo de maturação das fibras colágenas cicatriciais em modelos de feridas cutâneas incisionais e, principalmente, excisionais de ratos.

Palavras-chave: Antagonistas de leucotrieno. Montelucaste. Rato. Cicatrização de feridas. Resistência tênsil. Contração de feridas. Colágeno.

ABSTRACT

Background: Wound contractures can cause severe deformities and disabilities. Recent studies have suggested inhibitory effect of leukotriene receptor antagonists on healing contraction process. **Aim:** Evaluate the influence of the leukotriene inhibitor montelukast on cutaneous wound healing and contraction, in rats submitted to associate model of wound healing (excisional and incisional). **Method:** Sixty male rats were randomly divided in 4 groups (MK-7d, SF-7d, MK-14d and SF-14d), according to the drug used (MK: montelukast; SF: 0.9% sodium chloride solution) and the day of sacrifice (7d: 7th postoperative day; 14d: 14th postoperative day). Daily standard dose of montelukast (10 mg/kg/day) was given through a rigid orogastric tube to study group animals. Equivalent volume of 0.9% sodium chloride solution was administered to control group animals. Under inhalatory anesthesia with ethylic ether, excisional (2 x 2 cm) and incisional wound (5 cm) were created on the dorsum of each rat. The excisional wounds were left open to heal spontaneously and were documented by standard digital photographs in different postoperative days. Excisional wound contraction rates were calculated in the photos using specific software. Incisional wounds were closed primarily and used for tensiometric analysis right after the sacrifice. Both wounds were histologically evaluated for collagen densitometry. The results were submitted to statistical analysis using *Student "t"* test, *Aspin-Welch* and *Mann-Whitney* tests, assuming the significance level of 5%. **Results:** Regarding to the calculi of excisional wound areas, contraction rates were not statistically different between control and study groups in anytime ($p > 0.05$). Tensiometric analysis evidenced similar maximal tension (kgf/cm²) on group MK-7d and SF-7d ($1,53 \pm 0,18$ vs $1,98 \pm 0,17$; $p = 0,0877$), as well as on group MK-14d and SF-14d ($5,14 \pm 0,52$ vs $5,02 \pm 0,28$; $p = 0,8463$). There was no significant difference in the maximal tensile strength (kgf) between groups MK-7d and SF-7d ($0,61 \pm 0,07$ vs $0,79 \pm 0,06$; $p = 0,09$) and between MK-14d and SF-14d ($2,05 \pm 0,2$ vs $2,01 \pm 0,11$; $p = 0,8455$). Incisional wounds showed similar percentage of mature collagen on group MK-7d and SF-7d ($59,2 \pm 4,68\%$ vs $61,5 \pm 7,83\%$; $p = 0,8041$) and lower percentage on group MK-14d compared to SF-14d ($44,8 \pm 6,17\%$ vs $64,8 \pm 6,9\%$; $p = 0,0394$). In excisional wounds, difference on mature collagen percentage was marginally significant between group MK-7d and SF-7d ($40,1 \pm 6,88\%$ vs $61,2 \pm 8,02\%$; $p = 0,0607$). On group MK-14d this percentage was statistically lower than on SF-14d ($26 \pm 5,66\%$ vs $68,3 \pm 7,76\%$; $p = 0,0001$). **Conclusions:** Montelukast does not alter the contraction rate in excisional wounds, and does not significantly reduce the tensile resistance in incisional wounds. However, montelukast has significant and progressive inhibitory effect on collagen maturation in incisional wounds and, mostly, in excisional wounds of rats.

Key words: Leukotriene antagonists. Montelukast. Rat. Wound healing. Tensile strength. Wound contraction. Collagen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO MONTELUCASTE SÓDICO	35
FIGURA 2 – APARELHO DE TRAÇÃO <i>DL500MF</i> – <i>EMIC</i> [®] , UTILIZADO PARA OS TESTES TENSOMÉTRICOS DE RESISTÊNCIA TECIDUAL DAS FERIDAS INCISIONAIS	42
FIGURA 3 – MARCAÇÃO CUTÂNEA DA FERIDA EXCISIONAL (A) E INCISIONAL (B)	46
FIGURA 4 – MODELO EXCISIONAL DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA: (A) INCISÃO INICIAL COM LÂMINA DE BISTURI; (B) DISSECÇÃO EM PLANO AREOLAR SUPRAFASCIAL; (C e D) RESSECÇÃO DO SEGMENTO CUTÂNEO DEMARCADO	47
FIGURA 5 – MODELO INCISIONAL DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA: (A e B) INCISÃO LINEAR DA PELE EM ESPESSURA TOTAL, ATÉ O PLANO DA FÁSCIA MUSCULAR. (C e D) SÍNTESE DA FERIDA COM SETE PONTOS INTERROMPIDOS DE NYLON 4-0	48
FIGURA 6 – ANIMAL EM GAIOLA ISOLADA NO PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO	49
FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DIGITAL DA FERIDA EXCISIONAL, OBTIDA A 15 cm DA SUPERFÍCIE DE APOIO. UMA RÉGUA GRADUADA EM MILÍMETROS FOI POSICIONADA AO NÍVEL DA LESÃO, CONTENDO A IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL	50
FIGURA 8 – ADMINISTRAÇÃO DA DROGA: (A) APREENSÃO DO RATO SEDADO; (B) REALIZAÇÃO DE SONDAGEM OROGÁSTRICA COM CÂNULA METÁLICA RÍGIDA	52

FIGURA 9 – RESSECÇÃO DOS ESPÉCIMES APÓS EUTANÁSIA DO ANIMAL: (A) DEMARCAÇÃO DOS SEGMENTOS DE PELE A SEREM RESSECADOS; (B) REGIÃO DORSAL DO ANIMAL APÓS A RESSECÇÃO; (C) ESPÉCIMES CONTENDO A FERIDA EXCISIONAL (ESQUERDA), PORÇÃO SUPERIOR DA FERIDA INCISIONAL PARA ESTUDO HISTOLÓGICO (CENTRO) E SEGMENTO INFERIOR DA FERIDA INCISIONAL PARA TESTE DE TRAÇÃO (DIREITA); (D) ESPÉCIMES HISTOLÓGICOS FIXADOS EM PAPEL FILTRO E ARMAZENADOS EM FORMALINA 10%	53
FIGURA 10 – TESTE TENSIMÉTRICO DA FERIDA CUTÂNEA INCISIONAL: (A) FIXAÇÃO DO CORPO DE PROVA NO APARELHO; (B e C) TRAÇÃO PROGRESSIVA, ATÉ RUPTURA COMPLETA NA LINHA CICATRICIAL; (D) RESULTADOS OBTIDOS POR PROGRAMA DE COMPUTADOR ACOPLADO AO SISTEMA	54
FIGURA 11 – FERIDA EXCISIONAL CRIADA PELO ATO CIRÚRGICO (POI) E SUA EVOLUÇÃO ATÉ O 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO. OBSERVA-SE PROGRESSIVA CONTRAÇÃO DA ÁREA CRUENTA AO LONGO DE TEMPO	55
FIGURA 12 – TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL: (A) FERIDA EXCISIONAL CONTENDO A ÁREA CRUENTA A SER AVALIADA; (B) IMAGEM SENDO CALBRADA EM MILÍMETROS, UTILIZANDO RÉGUA ADJACENTE À FERIDA; (C) LINHA AMARELA E AZUL DEFININDO A TRANSIÇÃO PELE NORMAL-TECIDO CICATRICIAL; (D) ÁREA CRUENTA CALCULADA PELO SISTEMA (mm ²)	56
FIGURA 13 – ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO PELA COLORAÇÃO DE <i>PICROSIRIUS-RED</i> E TÉCNICA DE MICROSCOPIA COM LUZ POLARIZADA: (A) CORTES MACROSCÓPICOS DOS ESPÉCIMES CONTENDO A FERIDA EXCISIONAL (ESQUERDA) E INCISIONAL (DIREITA); (B) IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS MADURAS OU TIPO I (VERMELHO E LARANJA) E IMATURAS OU TIPO III (VERDE)	58

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – EVOLUÇÃO DAS ÁREAS CRUENTAS NOS DOIS GRUPOS AO LONGO DOS DIAS ESTUDADOS: ÁREA MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (mm^2) E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS DOIS GRUPOS (p).....	60
GRÁFICO 2 – ÁREA CRUENTA CONTRAÍDA NOS DIFERENTES TEMPOS PÓS-OPERATÓRIOS EM RELAÇÃO AO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO: ÁREA MÉDIA \pm ERRO PADRÃO (mm^2) E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS DOIS GRUPOS (p).....	61
GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO TENSOMÉTRICA, VARIÁVEL TENSÃO MÁXIMA, NO GRUPO DE ESTUDO (MK) E CONTROLE (SF), NO 7º E 14º DIAS PÓS-OPERATÓRIOS: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (kgf/cm^2) E VALORES ESTATÍSTICOS (p)	62
GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO TENSOMÉTRICA, VARIÁVEL FORÇA MÁXIMA, NO GRUPO DE ESTUDO (MK) E CONTROLE (SF), NO 7º E 14º DIAS PÓS-OPERATÓRIOS: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (kgf) E VALORES ESTATÍSTICOS (p)	63
GRÁFICO 5 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA INCISIONAL, NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p)	64
GRÁFICO 6 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA INCISIONAL, NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p)	65
GRÁFICO 7 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA EXCISIONAL, NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p)	66
GRÁFICO 8 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA EXCISIONAL, NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p)	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARLT – antagonista(s) do receptor de leucotrieno
CEP/SD – Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde
CNS – Conselho Nacional de Saúde
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CysLT – cisteinil-leucotrieno(s)
DP – desvio padrão
ed. – edição
Ed. – editor
EGF – fator de crescimento epidérmico
EP – erro-padrão
et al. – *et alli* (e outros)
FDA – *Food and Drug Administration*
FGF – fator de crescimento fibroblástico
IGF-1 – fator de crescimento *insulin-like* 1
IL – interleucina(s)
Inmetro – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
KGF – fator de crescimento derivado dos queratinócitos
kgf – quilograma-força
LT – leucotrieno(s)
M – média
MK-14d – animais do grupo de estudo, sacrificados no 14^o dia pós-operatório
MK-7d – animais do grupo de estudo, sacrificados no 7^o dia pós-operatório
p – nível de significância estatística
p. – página
p.o. – pós-operatório
PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas
PG – prostaglandina(s)

pH – potencial hidrogeniônico

PVPI - polivinilpirrolidona-iodo

SF-14d – animais do grupo controle, sacrificados no 14º dia pós-operatório

SF-7d – animais do grupo controle, sacrificados no 7º dia pós-operatório

S.l. – *sine loco* (sem local)

suppl. – suplemento

TGF – fator de crescimento transformador

TNF – fator de necrose tumoral

UFPR – Universidade Federal do Paraná

v. – volume

VEGF – fator de crescimento vascular endothelial

vs – *versus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	18
2.1.1 Fase inflamatória	19
2.1.1.1 Reepitelização	23
2.1.2 Fase proliferativa	24
2.1.2.1 Angiogênese	25
2.1.2.2 Contração da ferida	26
2.1.3 Fase de remodelamento	27
2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	28
2.3 ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE LEUCOTRIENO	33
2.3.1 Montelucaste	34
2.3.2 Efeitos dos ARLT na contração cicatricial	36
3 MATERIAL E MÉTODO	40
3.1 MATERIAL	40
3.1.1 Animais	40
3.1.2 Ambiente e alimentação	40
3.1.3 Drogas e soluções	41
3.1.4 Outros materiais	41
3.2 MÉTODO	43
3.2.1 Comissão de Ética em Pesquisa	43
3.2.2 Ambiente	43
3.2.3 Grupos	44
3.2.4 Manipulação	44
3.2.5 Anestesia	45
3.2.6 Pré-operatório	45
3.2.7 Controle de peso	45

3.2.8	Marcação da pele	46
3.2.9	Procedimento cirúrgico	47
3.2.10	Pós-operatório	49
3.2.11	Controle fotográfico	50
3.2.12	Diluição da medicação	51
3.2.13	Gavagem	51
3.2.14	Eutanásia	52
3.2.15	Teste tensiométrico	54
3.2.16	Avaliação da contração cicatricial	55
3.2.17	Análise qualitativa do colágeno	57
3.2.18	Análise estatística	58
4	RESULTADOS	59
4.1	PESO	59
4.2	MORBIDADE E MORTALIDADE	59
4.3	AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICAL	60
4.4	AVALIAÇÃO TENSIONOMÉTRICA	62
4.4.1	Tensão máxima	62
4.4.2	Força máxima	63
4.5	ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO	64
4.5.1	Ferida incisional	64
4.5.2	Ferida excisional	66
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	DOCUMENTOS CONSULTADOS	87
	ANEXOS	89

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização cutânea certamente é um dos processos fisiológicos mais estudados e ainda desperta grande interesse no meio científico. Recentemente, têm-se experimentado grande progresso com descobertas de eventos celulares e moleculares envolvidos na cicatrização das feridas. Com maior compreensão e controle do processo cicatricial cutâneo, melhores resultados estético-funcionais serão obtidos e novas opções terapêuticas surgirão.

A reparação cutânea inevitavelmente resulta em cicatriz, a qual pode ser desfigurante e pode causar disfunção e estigmas importantes. Não só feridas com cicatrização retardada desafiam cirurgiões e cientistas, mas também processos cicatriciais desregulados como cicatrizes hipertróficas, quelóides, contraturas cutâneas e contraturas capsulares de implantes mamários ou expansores de tecido (BRISSETT e SHERRIS, 2001; HUDSON e RENSHAW, 2006; BEHRANWALA *et al.*, 2006; HANDEL *et al.*, 2006).

De forma semelhante às contraturas capsulares, as bridas ou contraturas cutâneas constituem o resultado clínico-patológico de um processo de contração e cicatrização exacerbados. Elas se formam principalmente quando a ferida não segue a direção das linhas de força da pele, ou quando grandes áreas cruentas cicatrizam espontaneamente. Os exemplos mais típicos são representados por feridas e queimaduras que acometem regiões articulares e áreas nobres como face, pescoço, mãos e região perineal (BRISSETT e SHERRIS, 2001; SCHNEIDER *et al.*, 2006). As contraturas cicatriciais podem ser bastante deformantes e desabilitantes. Apesar de algumas medidas conservadoras como malhas compressivas, placas de silicone e atividades fisioterápicas ajudarem na recuperação do paciente, o tratamento mais eficaz continua sendo cirúrgico (HUDSON e RENSHAW, 2006; SCHWARZ, 2007).

Os antagonistas do receptor de leucotrieno (ARLT), classe relativamente nova de drogas antiinflamatórias, têm sido bastante estudados nas últimas décadas. Além de terem demonstrado grande eficácia clínica no tratamento da asma e rinite alérgica em adultos e crianças (NAYAK, 2004; CURRIE e MCLAUGHLIN, 2006), outros efeitos clínicos benéficos têm sido observados (BIGAL *et al.*, 2002; DANESHJOO e TALLEY, 2002; SCHLESINGER *et al.*, 2002; RACKAL e VENDER, 2004). O ARLT montelukaste também têm sido experimentalmente testado no controle de outros

processos patológicos. Têm sido demonstrados efeitos antiinflamatórios e protetores contra lesão oxidativa mediada por neutrófilos em diversos órgãos, como pele (SENER *et al.*, 2005a), pulmão (YUKSEL *et al.*, 2003; SENER *et al.*, 2005b), fígado (SENER *et al.*, 2005a e 2005c), rim (SENER *et al.*, 2005a) e sistema gastrointestinal (KABASAKAL *et al.*, 2005; SENER *et al.*, 2005a, 2005b e 2005c). Outros estudos experimentais também evidenciaram efeito protetor do montelukaste na isquemia cerebral focal (YU *et al.*, 2005) e lesão isquêmica miocárdica (CHEN *et al.*, 2003).

O montelukaste, um dos inibidores de leucotrieno mais prescritos clinicamente, constitui um antagonista potente e seletivo do receptor de leucotrieno D₄. Juntamente com o zafirlucaste, eles também têm sido foco de estudos clínicos e experimentais que sugeriram efeitos inibitórios no fenômeno de contração cicatricial e, por conseguinte, melhora na contratatura capsular de implantes e expansores mamários. A partir de 1998, após relatos de pacientes evidenciando melhora no aspecto e textura de cicatrizes e nas contraturas capsulares de implantes mamários com o uso de ARLT, Schlesinger *et al.* (2002) começaram a prescrever empiricamente o zafirlucaste para pacientes que evoluíam com contratatura capsular e não desejavam tratamento cirúrgico, observando melhora clínica importante.

Gryskiewicz (2003) revisou o possível efeito inibitório do zafirlucaste e montelukaste na contratatura capsular de implantes mamários, bem como as complicações até então reportadas aos fabricantes e ao *Food and Drug Administration* (FDA). Nesta revisão, embora muitos cirurgiões tenham notado melhora da contratatura capsular com o uso dos ARLT na prática clínica, as indicações dessas drogas foram feitas de forma empírica, com evidências científicas insuficientes e metodologicamente não confiáveis. Além disso, o número de complicações relacionadas ao uso dos ARLT, principalmente o zafirlucaste, foi elevado e muitas vezes grave.

Em estudo clínico prospectivo, Reid, Greve e Casas (2005) evidenciaram melhora em 75% dos casos de contratatura capsular em implantes mamários de silicone após uso regular do zafirlucaste por 3 a 6 meses. Scuderi *et al.* (2006) também observaram eficácia do zafirlucaste no tratamento da contratatura capsular após mamoplastia de aumento, demonstrando melhora da complacência, da dor e da deformidade mamária com 3 e 6 meses de tratamento.

Recentemente, Bastos *et al.* (2005 e 2007) realizaram estudo experimental, placebo-controlado, avaliando a influência do zafirlucaste na contratatura capsular de

mini-próteses de silicone, lisas e texturizadas, implantadas no subcutâneo de 20 ratas. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos implantes de silicone lisos, porém os implantes texturizados do grupo de estudo apresentaram cápsula fibrosa mais fina, com menor densidade de fibras colágenas, menor número de vasos sanguíneos, mastócitos e eosinófilos em relação ao grupo controle.

Baseado nas propriedades antiinflamatórias e de inibição da contração cicatricial sugeridas aos ARLT, reascendeu-se a possibilidade de este vir a ser uma opção preventiva e terapêutica clínica também para as contraturas cicatriciais cutâneas. Contudo, tendo em vista a escassez de estudos experimentais nesta linha e antes mesmo de qualquer aplicação clínica empírica destas drogas para este fim, fazem-se necessárias pesquisas laboratoriais e estudos experimentais, a fim de se avaliar os potenciais riscos, compreender os mecanismos de ação envolvidos, bem como comprovar os benefícios sugeridos pela utilização empírica dessas drogas no fenômeno de contração cicatricial.

1.1 OBJETIVOS

Avaliar a influência do ARLT montelukaste no processo de contração e cicatrização cutânea de ratos, analisando a factibilidade do modelo experimental misto (excisional e incisional) para este propósito. Os objetivos específicos consistem em:

- Avaliar os efeitos do montelukaste no processo de contração cicatricial de feridas cutâneas excisionais.
- Determinar os efeitos do montelukaste na resistência tênsil de feridas cutâneas incisionais.
- Estudar os efeitos do montelukaste no padrão de maturação das fibras colágenas cicatriciais em ambos os modelos de feridas cutâneas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Uma das principais funções da pele é servir como barreira mecânica ao meio externo. A perda em grandes proporções da sua integridade pode levar a importantes alterações da homeostase ou mesmo à morte do indivíduo. O principal objetivo no tratamento das feridas cutâneas é promover rápida restauração da lesão, com cicatrizes satisfatórias do ponto de vista funcional e estético. Recentes avanços na biologia celular e molecular têm expandido sobremaneira a compreensão do complexo e ordenado processo de cicatrização das feridas (CLARK, 1996). Não obstante represente um antigo desafio, a completa compreensão e controle deste evento, indispensável para a sobrevivência humana, constitui ainda sonho de muitos. Embora o processo de cicatrização cutânea seja mais bem compreendido, ainda falta muito a ser elucidado, o que pode proporcionar novas e melhores formas terapêuticas (SINGER e CLARK, 1999).

O processo de cicatrização constitui resposta imediata e dinâmica do organismo à lesão tecidual, com o objetivo de restaurar a continuidade anatômica e funcional do tecido (BARDUL, 1990; THORNTON, SCHAFFER e BARBUL, 1997). Sob o ponto de vista histológico, pode ser definido como a substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo fibroso que, no seu estado permanente, formará uma cicatriz, restaurando a estrutura e preservando a função do tecido normal (DIEGELMANN, 1997). Consiste em processo dinâmico e interativo, que envolve células inflamatórias e do parênquima lesado, complexa cadeia de mediadores solúveis, bem como a matriz extracelular (GILLITZER e GOEBELER, 2001; EFRON, 2001). Apesar dos eventos ocorrerem de forma dinâmica e se sobreporem no tempo, sob o ponto de vista morfológico é possível classificá-los seqüencialmente em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelamento (WITTE e BARDUL, 1997).

2.1.1 Fase inflamatória

A fase inflamatória representa a primeira fase de qualquer processo de cicatrização e caracteriza-se pela participação ativa de inúmeras células e fatores do sistema imunológico. Pode ser didaticamente subdividida em resposta vascular e celular. Uma vez que o sangramento ocorre imediatamente após a lesão tecidual, o primeiro evento do processo de cicatrização é a hemostasia, a qual se faz pela agregação plaquetária, ativação da cascata de coagulação e formação da rede de fibrina (KIRSNER e EAGLSTEIN, 1993). Além do controle do sangramento, o coágulo sanguíneo formado constitui suporte para a intensa migração celular local. As plaquetas são as primeiras células a apresentarem-se no sítio da lesão e, além da propriedade hemostática, secretam vários mediadores envolvidos na cicatrização. O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), dentre outras funções, atrai e ativa macrófagos e fibroblastos no sítio da lesão. Inúmeros mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos também são produzidos pela cascata da coagulação, pela ativação do sistema complemento e por células do parênquima lesado, recrutando também inúmeras células inflamatórias para a ferida (CLARK, 1996; LI, CHEN e KIRSNER, 2007).

A resposta celular na fase inflamatória é caracterizada principalmente pelo influxo de leucócitos para a área da lesão. Nas primeiras 24 horas, os neutrófilos constituem as células predominantes na ferida. Eles caracterizam a primeira linha de defesa celular, eliminando partículas estranhas e destruindo microorganismos por fagocitose e pela liberação de enzimas. Posteriormente, o número de neutrófilos diminui e o de monócitos e macrófagos predomina (LI, CHEN e KIRSNER, 2007). Os neutrófilos e monócitos são recrutados por fatores quimiotáticos liberados durante a fase de hemostasia (calicreína, fibrinopeptídeos derivados do fibrinogênio e produtos de degradação da fibrina) e pelos mastócitos (fator de necrose tumoral, histamina, proteases, leucotrienos e interleucinas) (NOLI e MIOLO, 2001). Fatores de crescimento como PDGF e fator de crescimento transformador β (TGF- β) também são potentes fatores quimiotáticos para leucócitos. Os receptores de integrina encontrados na superfície das células aumentam a interação célula-matriz extracelular e, por conseguinte, potencializam sua função fagocitária (SIMPSON e ROSS, 1972).

Além desses fatores quimiotáticos, os monócitos são atraídos para o sítio da lesão por substâncias monócito-específicas como a proteína quimioatrativa de monócitos 1 (KUNKEL *et al.*, 1991) e a proteína inflamatória de macrófagos 1 (SHERRY *et al.*, 1988). Produtos de degradação da matriz extracelular, fibronectina e trombina também são quimiotáticas para os monócitos (POSTLETHWAITE e KANG, 1976). Ao migrarem para a ferida, os monócitos transformam-se em macrófagos ativos, constituindo as células predominantes na fase inflamatória.

Os macrófagos são considerados as células regulatórias mais importantes do processo cicatricial. Animais com depleção de macrófagos têm demonstrado deficiência na reparação tecidual (LEIBOVICH e ROSS, 1975). Por meio dos receptores de integrina, os macrófagos ligam-se a proteínas específicas da matriz extracelular, o que estimula a fagocitose de microorganismos e de fragmentos da matriz (BROWN, 1995). Eles também produzem uma série de fatores de crescimento, incluindo PDGF, fator de crescimento fibroblástico, fator de crescimento endotelial, TGF- β , TGF- α , e o fator de crescimento *insulin-like* 1 (FALANGA, 1993). Estas substâncias são importantes indutoras da migração e proliferação celular, da angiogênese, e da formação da matriz extracelular. Desta forma os macrófagos parecem exercer função singular na transição inflamação-reparo (SINGER e CLARK, 1999).

Inúmeras substâncias químicas agonistas e antagonistas da inflamação estão envolvidas de forma harmônica no processo de cicatrização. Dentre os mediadores derivados dos mastócitos (histamina, serotonina, heparina e bradicinina) a histamina representa a principal substância liberada pelos grânulos, sendo responsável pela dilatação de arteríolas e aumento na permeabilidade das vênulas (NOLI e MIOLO, 2001).

As prostaglandinas e leucotrienos são potentes substâncias biológicas derivadas do ácido araquidônico. São produzidas a partir de fosfolípidos da membrana celular, por praticamente todas as células envolvidas na lesão. As prostaglandinas D₂, E₂ e F_{2 α} têm importante ação vasodilatadora, contribuindo para formação do edema local. A prostaglandina E₂ também tem atividade quimiotática e parece agir em sinergia com outras substâncias inflamatórias como a bradicinina, sensibilizando neuroreceptores de dor, causando estados de hiperalgesia. Quanto aos leucotrienos (LT), o LTB₄ caracteriza um potente agente quimiotático, induzindo

agregação de neutrófilos. Já o LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam vasoconstrição e aumentam a permeabilidade vascular (SAPIRSTEIN e BONVENTRE, 2000).

O sistema complemento, constituído por mais de 30 proteínas, representa outra grande classe de substâncias envolvidas no processo inflamatório. Inúmeros produtos resultantes da ativação do sistema complemento estão envolvidos na estimulação da fagocitose por neutrófilos e macrófagos, na aglutinação e destruição de toxinas e microorganismos, e na ativação de outras células inflamatórias como mastócitos e basófilos, liberando inúmeras outras substâncias vasoativas (SCHMIDT e COLTEN, 2000).

Os fatores de crescimento também desempenham papel fundamental no processo de reparo tecidual. O PDGF é um importante e potente fator de crescimento, agindo principalmente no início da fase inflamatória como fator quimiotático para macrófagos (HOSGOOD, 1993) neutrófilos (DEUEL *et al.*, 1982) e como fator mitogênico para fibroblastos e células musculares lisas (KATZ *et al.*, 1991). Muitos fatores de crescimento secretados por macrófagos influenciam a proliferação celular, angiogênese e síntese da matriz extracelular. O TGF- α exerce forte influência na migração de queratinócitos e reepitelização. O TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 promovem forte estímulo na migração de fibroblastos e células endoteliais, bem como na deposição da matriz extracelular pelos fibroblastos durante a formação do tecido de granulação (LI, CHEN e KIRSNER, 2007). O QUADRO 1 resume os principais mediadores químicos e suas ações envolvidos no processo de cicatrização cutânea.

Mediadores químicos	Ação principal
<u>Aminas vasoativas:</u> Histamina Serotonina	Quimiotaxia, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Quimiotaxia.
<u>Proteínas plasmáticas:</u> Bradicnina Sistema complemento	Vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, dor e contração da ferida. Aglutinação de toxinas e microorganismos, quimiotaxia, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e estímulo fagocitário.
<u>Cascata da coagulação:</u> Fibrinopeptídeos Heparina	Quimiotaxia e aumento da permeabilidade vascular. Anticoagulação e fibrinólise.
<u>Metabólitos do ácido aracdônico:</u> PG LT	Quimiotaxia, vasodilatação, dor e febre. Quimiotaxia, vasoconstrição e aumento da permeabilidade vascular.
<u>Citocinas e fatores de crescimento:</u> PDGF TGF (α , β) TNF FGF EGF e KGF VEGF IGF-1 IL Endostatina e angiopoetina 2	Quimiotaxia, proliferação celular, angiogênese, formação da matriz extracelular e contração da ferida. Quimiotaxia, proliferação celular, angiogênese, formação da matriz extracelular, diferenciação dos miofibroblastos e contração da ferida. Quimiotaxia. Quimiotaxia, proliferação celular, angiogênese, formação da matriz extracelular. Proliferação celular, diferenciação e migração de queratinócitos. Quimiotaxia, proliferação celular, angiogênese e formação da matriz extracelular. Quimiotaxia, proliferação celular, angiogênese e formação da matriz extracelular. Quimiotaxia. Inibição da angiogênese.
<u>Proteínas da matriz extracelular:</u> Fibronectina Trombina Laminina Trombospondina (1, 2)	Quimiotaxia, migração e suporte de células inflamatórias e fibroblastos, contração da ferida. Quimiotaxia e coagulação. Angiogênese e suporte de novos capilares. Inibição da angiogênese.

QUADRO 1 – MEDIADORES QUÍMICOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; PDGF: fator de crescimento derivado das plaquetas; TGF (α , β): fator de crescimento transformador α e β ; TNF: fator de necrose tumoral; FGF: fator de crescimento fibroblástico; EGF: fator de crescimento epidérmico; KGF: fator de crescimento derivado dos queratinócitos; IGF-1: fator de crescimento *insulin-like*; IL: interleucinas.

2.1.1.1 Reepitelização

A reepitelização das feridas é um fenômeno precoce, que se inicia algumas horas após a lesão (HELL e LAWRENCE, 1979). Primeiramente, os queratinócitos respondem ao defeito epidérmico migrando das bordas íntegras do epitélio em direção ao centro da lesão. Para isso, intensas alterações fenotípicas são necessárias, incluindo achatamento e alongamento dos queratinócitos, retração de tonofilamentos intracelulares, dissolução da maioria dos desmossomas intracelulares que promovem conexões físicas entre as células e formação de filamentos de actina no citoplasma periférico que permitem a movimentação celular (GABBIANI, CHAPONNIER e HUTTNER, 1978; GOLIGER e PAUL, 1995; PALADINI *et al.*, 1996). Devido à dissolução dos hemidesmossomas, as células epidérmicas não mais se aderem à membrana basal.

Além das alterações intrínsecas, outros elementos têm sido implicados no processo de migração dos queratinócitos. Matriz extracelular provisória formada por fibrina, fibronectina e colágeno tipo V permite a migração e dissecação das células entre a crosta sobrejacente e o tecido cicatricial (CLARK *et al.*, 1982). Os queratinócitos interagem com a matriz provisória rica em fibronectina através de receptores de integrina na superfície das células, o que também direciona o processo de migração. A dissociação destas ligações queratinócito-matriz provisória por metaloproteinases e pela ativação da plasmina permite a migração progressiva das células sobre o tecido de granulação (PARKS, 1999).

Um a dois dias após a lesão inicial, as células epidérmicas adjacentes às células ativas em migração começam a se proliferar. Os estímulos para proliferação e migração das células epidérmicas ainda não estão definidos. A ausência de células vizinhas nas margens da ferida, a liberação local de fatores de crescimento – sendo os principais o fator de crescimento epidérmico, o TGF- α e o fator de crescimento derivado dos queratinócitos – associado ao aumento na expressão de receptores dos fatores de crescimento poderiam estimular o processo de proliferação e migração das células epidérmicas (WERNER *et al.*, 1994; NANNEY e KING, 1996). Com a reepitelização, proteínas da membrana basal reaparecem de forma ordenada, da periferia para o centro da lesão. As células epidérmicas readquirem as

características fenotípicas originais, aderindo-se firmemente à membrana basal e derme neoformadas (CLARK *et al.*, 1982).

2.1.2 Fase proliferativa

Esta fase, também conhecida como fibroplasia, caracteriza-se por intensa migração e proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e outras proteínas da matriz extracelular, os quais contribuem para a formação do tecido de granulação (PHILIPS, 2000). Nesta fase, macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos estão presentes no tecido de granulação ao mesmo tempo. Logo após a lesão, os fibroblastos das margens da ferida começam a se proliferar, atingindo o pico de proliferação no 7º dia pós-trauma. Uma vez ativados, os fibroblastos sofrem alterações fenotípicas e potencializam a produção de proteínas (WELCH, ODLAND e CLARK, 1990). Em torno do 4º dia, migram para a matriz provisória e iniciam a síntese protéica, transformando-a em matriz rica em colágenos, proteoglicanos e elastina (KURKINEN *et al.*, 1980; WOODLEY, O'KEEFE e PRUNIERAS, 1985). Alguns fibroblastos adquirem características fenotípicas de miofibroblastos e participam do processo de contração cicatricial (WELCH, ODLAND e CLARK, 1990).

A maioria dos fatores quimiotáticos para fibroblastos são derivados dos macrófagos presentes na ferida. Fatores de crescimento, especialmente o PDGF (HELDIN e WESTERMARK, 1996) e o TGF- β 1 (ROBERTS e SPORN, 1996), em conjunto com moléculas da matriz extracelular, estimulam os fibroblastos em torno da ferida a se proliferarem, a expressarem receptores de integrina e a migrarem para a área cruenta (GRAY *et al.*, 1993; XU e CLARK, 1996;). O fator de crescimento epidérmico e fibroblástico, bem como a diminuição do pH e da pressão parcial de oxigênio na ferida também modulam a migração e proliferação dos fibroblastos (LI, CHEN e KIRSNER, 2007). Além desses fatores, moléculas estruturais da matriz extracelular provisória também contribuem sobremaneira para formação do tecido de granulação nesta fase. A fibronectina, uma importante glicoproteína desta matriz, exerce função de estímulo e suporte para os fibroblastos e para o colágeno produzido, mediando também o fenômeno de contração (PEARLSTEIN, 1976). Quando abundante matriz colágena é produzida, os fibroblastos cessam a síntese

protéica e sofrem apoptose, tornando a matriz extracelular, anteriormente rica em fibroblastos, em uma cicatriz relativamente acelular (DESMOULIÈRE *et al.*, 1995).

2.1.2.1 Angiogênese

Angiogênese refere-se ao processo de formação de novos vasos sanguíneos, a fim de prover nutrientes e oxigênio ao tecido cicatricial, além de permitir a migração de células inflamatórias para a ferida. Em resposta à lesão inicial, as células endoteliais da microcirculação iniciam o processo angiogênico, que consiste na ativação destas células, degradação da sua membrana basal, proliferação celular, formação da estrutura capilar tubular e reconstituição da membrana basal (SINGER e CLARK, 1999).

As células endoteliais emitem pseudópodos citoplasmáticos após o segundo dia da lesão e, estimuladas pela secreção de metaloproteinases na matriz extracelular, invadem o espaço perivascular (KALEBIC *et al.* 1983). De forma semelhante às lingüetas das células epidérmicas em regeneração, as células endoteliais próximo ao coto vascular seccionado migram para o interior da ferida, sem ainda proliferarem-se de forma ativa (FOLKMAN, 1982).

Para que as alterações fenotípicas, migração e proliferação das células endoteliais ocorram, vários estímulos angiogênicos são necessários. As citocinas liberadas pelos macrófagos, a baixa concentração de oxigênio, o aumento da concentração de ácido láctico e a presença de aminas produzidas na ferida estimulam o processo de angiogênese (DETMAR *et al.*, 1997). Vários fatores humorais também exercem importante papel neste processo, incluindo o fator de crescimento fibroblástico, TGF- β , angiopoetinas e, sobretudo, o fator de crescimento vascular endotelial (FOLKMAN e D'AMORE, 1996; RISAU, 1997). Nos primeiros três dias após a lesão, o principal fator estimulador da angiogênese é o fator de crescimento fibroblástico, enquanto do 4º ao 7º dia, durante a formação do tecido de granulação, o fator de crescimento vascular endotelial torna-se mais importante (NISSEN *et al.*, 1998).

A matriz extracelular também tem importante participação neste processo, seja atuando como fator de suporte para os novos capilares, ou como reservatório

de inúmeros fatores de crescimento. Têm-se demonstrado que as lamininas são as proteínas mais importantes da matriz para o processo angiogênico (LI, ZHANG e KIRSNER, 2003). Quando o espaço da ferida é completamente preenchido por tecido de granulação, a angiogênese cessa e muitos dos vasos sanguíneos formados desintegram-se por apoptose (ILAN, MAHOOTI e MADRI, 1998). Essa morte programada provavelmente é regulada por uma variedade de moléculas da matriz extracelular, como trombospondina 1 e 2 (GUO, *et al.* 1997), além de fatores antiangiogênicos como endostatina e angiopoetina 2 (FOLKMAN, 1997).

2.1.2.2 Contração da ferida

A contração das feridas cutâneas inicia-se logo após o trauma e se intensifica na segunda semana. O grau de contração varia dependendo da profundidade da lesão. Em feridas cutâneas de espessura total, o fenômeno de contração é parte importante do processo de cicatrização, reduzindo em até 40% a extensão da ferida. Em lesões de espessura parcial, a contração é menor, porém diretamente proporcional à profundidade da ferida (LI, CHEN e KIRSNER, 2007). Diferentemente do fenômeno fisiológico de contração, a contratura cicatricial representa a seqüela clínica de um fenômeno de contração exacerbado. Está comumente associada a cicatrizes hipertróficas e forma-se a partir de forças contráteis do tecido de granulação (DAVIDSON, 2001).

A contração da ferida é um fenômeno complexo que se faz por interação ordenada de células, matriz extracelular e fatores estimulantes. Devido às propriedades contráteis, o miofibroblasto é a principal célula envolvida na contração cicatricial, tendo sido descrito como uma célula com características intermediárias entre o fibroblasto e a célula muscular lisa. (DESMOULIÈRE e GABBIANI, 1996). Durante a formação do tecido de granulação alguns fibroblastos são gradualmente transformados em miofibroblastos. A diferenciação do miofibroblasto é um processo ordenado, regulado por citocinas específicas, dentre elas o TGF- β 1, por componentes da matriz extracelular e pela presença de forças mecânicas na ferida. Estas células apresentam microfilamentos contráteis ao longo da membrana citoplasmática, similares aos observados em células de músculo liso e normalmente

não encontrados nos fibroblastos da pele normal (WELCH, ODLAND e CLARK, 1990; DESMOULIÈRE e GABBIANI, 1996). Observa-se aumento na expressão de marcadores característicos de fibras musculares lisas – actina, miosina e desmina – a partir do 6º dia do trauma, atingindo o maior nível no 15º dia, e regredindo progressivamente nos dias subseqüentes (DARBY, SKALLI e GABBIANI, 1990).

Além da diferenciação fenotípica dos miofibroblastos, a contração da ferida também é mediada por uma série de fatores inflamatórios, incluindo TGF- β 1 e β 2, PDGF, 5-hidroxitriptamina, angiotensina, vasopressina, bradicininas, epinefrina e norepinefrina; bem como por interações célula-célula e célula-matriz (MONTESANO e ORCI, 1988; CLARK *et al.*, 1989; MUDERA *et al.*, 2002). Os miofibroblastos formam pseudópodos e, através dos receptores de integrina da membrana, promovem conexão dos filamentos de actina citoplasmáticos com a fibronectina da matriz. Estas se ligam às fibras colágenas e, com a contração dos microfilamentos citoplasmáticos, causam a compactação do tecido conjuntivo cicatricial e conseqüente retração da ferida (SINGER *et al.*, 1984; SCHIRO *et al.*, 1991). Assim, a taxa de contração é diretamente proporcional ao número de miofibroblastos da ferida e inversamente relacionada à concentração de colágeno na matriz (BELL *et al.*, 1981).

2.1.3 Fase de remodelamento

Esta é a última e mais longa fase do processo de cicatrização. Sua duração depende de variáveis como idade, estado nutricional do indivíduo, local da ferida, tipo de lesão e duração do processo inflamatório e proliferativo (STADELMANN, DIGENIS e TOBIN, 1998). Consiste na substituição gradual do colágeno imaturo (tipo III) da matriz extracelular, por colágeno maduro (tipo I), bem como na redução do número de células inflamatórias e de vasos sanguíneos neoformados (WELCH, ODLAND e CLARK, 1990).

Na derme humana normal, as fibras colágenas constituem aproximadamente 80% do peso dérmico seco e representam a principal proteína estrutural, fornecendo suporte, resistência e rigidez à pele (BOOTH, POLAK e UITTO, 1980). Na derme de indivíduos adultos saudáveis, as fibras tipo I constituem 80% do colágeno total,

enquanto as fibras tipo III representam somente 10%. Durante as primeiras semanas do processo cicatricial em humanos, no entanto, o colágeno tipo III é o principal tipo de colágeno produzido pelos fibroblastos. Começa a ser produzido após as primeiras 48 a 72 horas do trauma, atingindo o pico máximo de produção entre 5 e 7 dias. Assim, a quantidade total de colágeno aumenta progressivamente, atingindo seu máximo entre a segunda e terceira semana de cicatrização. Durante o período de 1 ano ou mais, a derme cicatrizada gradualmente reassume características prévias à lesão, constituindo-se basicamente de colágeno tipo I. Com um mês, a força tênsil readquire 40% do estado original e pode continuar aumentando por um ano, atingindo até 70% da resistência da pele normal (SINGER e CLARK, 1999; LI, CHEN e KIRSNER, 2007).

Com o fechamento da ferida, o remodelamento gradual do colágeno se faz por degradação das fibras tipo III e produção de colágeno tipo I, o qual apresenta maior alinhamento e ligações cruzadas entre as fibrilas (EHRlich e KRUMMEL, 1996). Isso é regido por um processo bastante controlado que envolve metaloproteinases secretadas por macrófagos, células epidérmicas, endoteliais e fibroblastos da matriz cicatricial (MIGNATTI *et al.*, 1996; VISSE e NAGASE, 2003). Estas enzimas geralmente são indetectáveis ou encontradas em concentrações mínimas na pele normal, sendo então estimuladas durante o processo de cicatrização por citocinas, fatores de crescimento e pelo contacto célula-matriz. Inibidores teciduais também exercem importante função na modulação da atividade dessas enzimas, sendo o equilíbrio entre ativação e inibição das metaloproteinases fundamental para o correto processo de reparo e remodelamento cicatricial (MADLENER, PARKS e WERNER, 1998; VISSE e NAGASE, 2003).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Tendo em vista a enorme variabilidade clínica, riscos e limitações ético-legais encontradas nas pesquisas com seres humanos, no último século os cientistas têm utilizado animais experimentais para estudar o complexo processo de cicatrização, com menor variabilidade de fatores genéticos e ambientais. Embora persistam consideráveis variações biológicas na resposta cicatricial mesmo em espécies

geneticamente iguais, elas reduzem-se bastante, permitindo que resultados e conclusões confiáveis possam ser obtidos (DAVIDSON, 2001). Além disso, os modelos animais de cicatrização cutânea são importantes para avaliar de forma científica a eficácia de novas técnicas e substâncias terapêuticas (GOTTRUP, AGREN e KARLSMARK, 2000; MOGFORD e MUSTOE, 2001)

Geralmente os modelos animais procuram reproduzir problemas encontrados no processo de cicatrização humana, como deiscências, isquemias, ulcerações, infecções, cicatrizes hipertróficas e contraturas cicatriciais. Na seleção do modelo experimental, deve-se optar pelo modelo que mais se aproxima da situação clínica a ser estudada (GOTTRUP, AGREN e KARLSMARK, 2000; LINDBLAD, 2000). Devido à maior elasticidade, redundância e mobilidade cutânea em relação à pele humana, os ratos têm sido descritos como animais de “pele frouxa” (“*loose-skinned animals*”) (CROSS *et al.*, 1995; DAVIDSON, 1998; MOGFORD e MUSTOE, 2001). A derme é a principal estrutura estudada nos modelos agudos de cicatrização cutânea. No subcutâneo, os ratos também possuem o panículo carnoso, constituído por fibras musculares firmemente aderidas à base da derme. Estas características permitem maior contração cicatricial, tendo importante participação no fechamento de feridas nos ratos, o que reduz o tempo de cicatrização em relação aos humanos (DAVIDSON, 1998; GOTTRUP, AGREN e KARLSMARK, 2000; MOGFORD e MUSTOE, 2001). Tendo em vista diferenças evidentes de arquitetura tecidual, fisiologia, resposta imune e outros fenômenos, os pesquisadores até certo ponto consentem aproximações dos problemas experimentados nos animais com os evidenciados na prática clínica (DAVIDSON, 2001).

Apesar de algumas diferenças histológicas e fisiológicas limitarem a comparação com humanos, a maioria dos modelos de cicatrização cutânea ainda utiliza o rato como animal de experimentação (DAVIDSON, 2001). Vários fatores práticos acabam influenciando sobremaneira a escolha do rato como modelo experimental, incluindo maior disponibilidade, baixo custo, poucas necessidades específicas de bioterismo, pequeno porte, tempo de vida curto, comportamento dócil e fácil manuseio, bem como a possibilidade de se retirar amostras do tecido em estudo para testes e análises laboratoriais (CROSS *et al.*, 1995; MOGFORD e MUSTOE, 2001). Após vários anos de pesquisa com estes animais, outro aspecto que favorece a escolha de rato como modelo experimental é o amplo conhecimento sobre seu padrão genético e processo de cicatrização (DORSETT-MARTIN, 2004).

Os ratos podem ser classificados em duas linhagens genéticas básicas: *inbred* e *outbred*. Linhagens *inbred* são desenvolvidas após pelo menos 20 cruzamentos familiares (irmão-irmã). Os ratos *outbred* são mantidos dentro da mesma colônia de animais por pelo menos quatro gerações e têm menos de 1% das características *inbred* a cada nova geração (SHARP e LAREGINA, 1998). As duas linhagens de ratos *outbred* mais utilizadas em pesquisas experimentais são *Sprague-Dawley* e *Wistar* (KOHN e CLIFFORD, 2002). Não parecem existir dados que demonstrem superioridade de alguma linhagem de rato em relação às outras no que se refere ao processo de cicatrização de feridas (DORSETT-MARTIN, 2004).

Davidson (2001), em artigo de revisão, classificou os modelos animais de cicatrização cutânea em agudos e crônicos. Os modelos agudos reproduzem os procedimentos cirúrgicos ou feridas traumáticas em humanos. Caracterizam-se por rápida injúria tecidual, seguida por um tempo relativamente curto de cicatrização. As formas de injúria são bastante variáveis, sendo as mais comuns: incisional, excisional, queimaduras e de espaço morto. A forma incisional se faz por corte regular na pele com lâminas cirúrgicas afiadas, causando ruptura da integridade tecidual e mínimo dano aos tecidos circunvizinhos. As feridas incisionais podem fechar primária ou secundariamente. A ferida incisional fechada primariamente é excelente para análises biomecânicas de resistência tênsil, sendo menos adequadas para estudos histológicos e bioquímicos, tendo em vista a menor quantidade de tecido cicatricial em atividade.

Já o modelo excisional caracteriza-se por ressecção de um segmento variável de pele e subsequente fechamento espontâneo (secundário) do defeito. Vários métodos podem ser utilizados para criar este tipo de lesão, como biópsias tipo *punch*, lâminas, tesouras, dermatomos e *laser*. Além de drogas com ação sistêmica, diferentes tipos de curativos e soluções tópicas podem ser testados na área cruenta. Em ratos, os modelos excisionais de espessura total são realizados retirando-se toda a espessura da pele, até o nível da fáscia muscular, o que inclui epiderme, derme e pânículo carnosos. Isso permite avaliações histológicas e bioquímicas seriadas da ferida, bem como estudos do fenômeno de contração cicatricial. Parâmetros de cicatrização podem ser avaliados e monitorados baseando-se no volume ou na área excisional preenchida por tecido de granulação, na taxa de reepitelização, na organização histológica, angiogênese, no conteúdo bioquímico e de colágeno presentes no tecido de granulação (DAVIDSON, 2001).

A literatura mostra grande heterogeneidade de modelos experimentais no que se refere às características do animal utilizado, da ferida cutânea realizada, da técnica cirúrgica e anestésica empregadas, bem como dos métodos e parâmetros do processo de cicatrização avaliados. Dorsett-Martin (2004) realizou revisão bibliográfica sobre os modelos experimentais de cicatrização cutânea em ratos, a qual incluiu 55 artigos. Ratos machos foram mais utilizados que fêmeas. O peso médio dos animais foi de 250 a 300 g. Os modelos de cicatrização mais freqüentemente descritos foram o incisional e o excisional (38% cada). Somente um estudo descreveu o modelo misto, associando uma ferida incisional e outra excisional (LIU *et al.*, 2000). Quanto à localização das feridas, 78% dos estudos continham ferida no dorso do rato e 18% na região ventral. Houve grande variação quanto à dimensão das feridas. Estudos que utilizaram feridas excisionais circulares realizaram-na com diâmetros variando de 6 mm a 2 cm (NAGAPPA e CHERIYAN, 2001; PIRILA *et al.*, 2002). As feridas incisionais variaram de 5 mm a 8 cm de extensão (YARON *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 2000).

A dimensão e profundidade das feridas são detalhes importantes no estudo do processo de cicatrização. A forma e extensão da área cruenta criada quase sempre diferem do planejamento inicial, devido às propriedades elásticas e características intrínsecas da pele dos ratos (MONTANDON, D'ANOIRAN e GABBIANI, 1977; CROSS *et al.*, 1995). Montandon, D'Anoiron e Gabbiani (1977) observaram que as feridas excisionais circulares apresentavam menor taxa de contração, sugerindo a realização de feridas quadrangulares com pelo menos 4 cm² de área cruenta para se estudar o fenômeno de contração cicatricial.

Quanto aos métodos e drogas anestésicas relatadas nos estudos revisados por Dorsett-Martin (2004), os anestésicos injetáveis, como pentobarbital ou associações de quetamina e xilazina, foram mais usados que os anestésicos inalatórios. O éter foi utilizado em 11 estudos e o halotano em 2. Somente 3 dos 55 estudos revisados utilizaram agentes analgésicos no período pós-operatório.

Uma das principais vantagens dos modelos experimentais animais é a possibilidade de retirada de amostras de tecido para análises e testes laboratoriais. Inúmeras avaliações têm sido realizadas nos tecidos em estudo, incluindo observações macroscópicas, análises histológicas, dosagens bioquímicas, testes biomecânicos, além da utilização de modernos marcadores celulares e outros fatores

bioquímicos envolvidos no processo de cicatrização (CROSS *et al.*, 1995; JORGENSEN, 1997; GOTTRUP, AGREN e KARLSMARK, 2000).

Os métodos histológicos de análise da cicatrização, em geral, avaliam o grau de epitelização, inflamação, neovascularização, espessura das camadas da pele, formação e maturação do colágeno. Como visto, o colágeno é o principal responsável pelo desenvolvimento da resistência mecânica na ferida cirúrgica. Utilizando a coloração com *picrosirius-red*, o colágeno pode ser avaliado através da intensificação de sua birrefringência, diferenciando-o em subtipos maduro (tipo I) e imaturo (tipo III) através do método de densitometria (DAVIDSON, 2001).

Com dispositivo eletromecânico de precisão, testes biomecânicos de resistência tênsil da ferida podem ser realizados. Os parâmetros geralmente avaliados incluem a força máxima, a força de ruptura e a tensão máxima do corpo de prova (DAVIDSON, 2001). Na revisão realizada por Dorsett-Martin (2004), a maioria dos trabalhos realizou testes de resistência da ferida utilizando aparelhos tensiométricos. Kullander e Olsson (1962) demonstraram que a resistência mecânica de feridas incisivas na região dorsal de ratos diminuiu quanto mais caudal forem realizadas as feridas, ressaltando a importância de se comparar estudos contendo feridas cirúrgicas com localizações semelhantes.

A contração das feridas é um fenômeno visto predominantemente em roedores e coelhos. A excisão em espessura total da pele frouxa resulta em rápida e progressiva retração das margens da lesão, presumivelmente uma característica adaptativa, a fim de reduzir a dimensão do defeito. Este processo de contração pode ser quantificado por diferentes técnicas morfométricas não-invasivas. Davidson (2001) referiu o estudo de Alexis Carrel (1910) como o primeiro a introduzir o conceito de medidas de área para avaliar o índice de contração das feridas. Embora originalmente desenhado para feridas em humanos, seus princípios têm sido aplicados para estudos em animais. Diferentes métodos de quantificação da área cruenta têm sido descritos na literatura: traços em papel celofane ou plásticos transparentes, planimetria, e mais modernamente, análise digital em computador (DAVIDSON, 2001).

2.3 ANTAGONISTAS DO RECEPTOR DE LEUCOTRIENO

Os ARLT constituem uma nova classe de drogas para tratamento da asma, cujo mecanismo de ação resulta da combinação do efeito antiinflamatório e broncodilatador (LIPWORTH, 1999; DRAZEN, ISRAEL e O'BYRNE, 1999). O caminho que levou à descoberta dos antagonistas dos receptores cisteinil-leucotrienos (cysLT) iniciou com a identificação da “substância anafilática de reação lenta” e sua capacidade de desenvolver contração lenta e prolongada de fibras musculares lisas, de forma distinta à histamina (BROCKLEHURST, 1960). Em 1979, a “substância anafilática de reação lenta” foi reconhecida como pertencendo à família dos mediadores lipídicos, os leucotrienos. Este nome é derivado das suas células produtoras (leucócitos) e da sua estrutura química conjugada (trieno: três ligações duplas conjugadas) (MURPHY, HAMMARSTRÖM e SAMUELSSON, 1979). Três tipos de leucotrienos, o LTC₄, LTD₄ e LTE₄, coletivamente classificados como cysLT, são os responsáveis pela bioatividade original da “substância anafilática de reação lenta”.

Os leucotrienos constituem produtos derivados do ácido araquidônico e gerados pela via enzimática da 5-lipoxigenase. Estão particularmente envolvidos em processos inflamatórios, aumentando a permeabilidade vascular e atuando como potentes agentes quimiotáxicos. Os cysLT são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos, e exercem inúmeras ações que reforçam sua importância como elementos fisiopatogênicos dos processos inflamatórios e alérgicos. Produzem também contração e proliferação da musculatura lisa da árvore brônquica, sendo o LTC₄ e LTD₄ aproximadamente 1000 vezes mais potentes que a histamina na contração da musculatura brônquica (DAHLEN *et al.*, 1980; LIPWORTH, 1999). Os CysLT têm sido associados à fisiopatologia da asma e rinite alérgica. Na asma, seus efeitos incluem broncoconstrição, secreção de muco, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de eosinófilos (DAHLEN *et al.*, 1980; O'BYRNE, 1997).

Os cysLT produzem seus efeitos biológicos ligando-se e ativando receptores específicos localizados na membrana celular das células-alvo. Dois subtipos de receptores dos cysLT foram caracterizados farmacologicamente (COLEMAN *et al.*, 1995). Os receptores cysLT₁ têm sido identificados em células de animais

experimentais e humanas, incluindo células musculares lisas e macrófagos das vias aéreas, entre outras células inflamatórias. Os receptores cysLT₂ foram encontrados somente em células musculares lisas das vias aéreas dos humanos. Todos os antagonistas de receptores cysLT atualmente disponíveis inibem seletivamente os receptores de subtipo cysLT₁. Estes agentes apresentam características bastante semelhantes *in vitro* e *in vivo*, diferindo em termos de potência relativa e biodisponibilidade oral (AHARONY, 1998).

2.3.1 Montelukaste

Farmacologicamente conhecido como MK-0476, o montelukaste sódico é um antagonista potente, seletivo e reversível do receptor LTD₄, com afinidade aproximadamente duas vezes maior que o ligante natural (HAY, 1997). Esta droga tem sido objeto de vários estudos experimentais e clínicos nas últimas décadas. O foco das pesquisas tem sido, principalmente, sua ação inibitória na broncoconstrição e processos alérgico-inflamatórios. Como resultado, doenças do aparelho respiratório como asma e rinite alérgica têm-se beneficiado sobremaneira com sua aplicação clínica (JONES *et al.*, 1995; LIPWORTH, 1999; DEMPSEY, 2000).

O montelukaste é um potente composto ativo por via oral, tendo sido utilizado no tratamento da asma em doses únicas diárias de 10 mg/dia (0,14 mg/kg/dia). Sua fórmula química é o sal monossódico do ácido [R-(E)]-1-[[[1-[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil) etenil] fenil]-3-[2-(1-hidróxi-1-metiletil) fenil] propil] tio] metil] ciclopropanoacético. Sua fórmula empírica é C₃₅H₃₅ClINNaO₃S₁ e seu peso molecular é de 608,18 (SINGULAIR, 2007; MARKHAM e FAULDS, 1998). Sua fórmula estrutural está ilustrada na FIGURA 1.

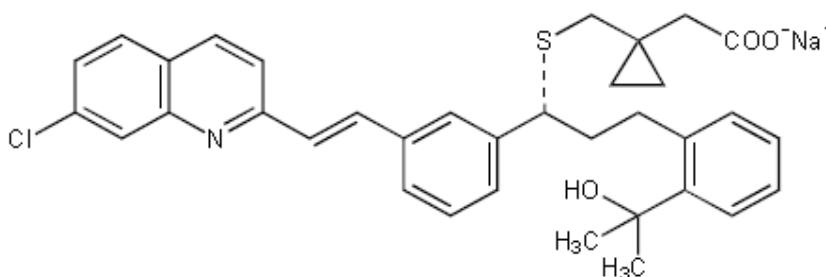


FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DO MONTELUCASTE SÓDICO
 FONTE: SINGULAIR (2007).

Segundo informações técnicas do medicamento comercial *Singulair*[®] (SINGULAIR, 2007), o montelucaste sódico é um pó branco, higroscópico, opticamente ativo, livremente solúvel em etanol, metanol e água. O perfil farmacocinético e a biodisponibilidade oral de uma dose única de 10 mg são similares em jovens e idosos, sendo rapidamente e quase completamente absorvido após a administração. A biodisponibilidade oral e concentração plasmática máxima não são influenciadas pela refeição, nem pelo horário de ingestão dos alimentos. Não houve diferença na farmacocinética entre doses administradas pela manhã ou à noite. A droga é metabolizada no fígado e seus metabólitos são excretados quase que exclusivamente através da bile. A tolerabilidade do montelucaste tem sido semelhante ao placebo em ensaios clínicos placebo-controlados, tanto em adultos quanto em crianças, sendo a cefaléia o efeito colateral mais comum (SCHOORS *et al.*, 1995; SINGULAIR, 2007). Suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas em humanos estão representadas no QUADRO 2.

Dose utilizada nos ensaios clínicos	10 mg (adultos); 5 mg (crianças)
Via de administração	Oral
Freqüência de administração	Dose única diária
Pico de concentração plasmática	602,8 µg/L
Tempo para o pico da concentração plasmática	2,7 h
Biodisponibilidade oral	64%
Taxa de ligação às proteínas plasmáticas	> 99%
<i>Clearance</i>	45,5 ml/min
Tempo de meia vida	2,7 – 5,5 h

QUADRO 2 - PROPRIEDADES FARMACODINÂMICAS E FARMACOCINÉTICAS DO MONTELUCASTE EM HUMANOS
 FONTE: MARKHAM e FAULDS (1998)

O montelucaste, juntamente com o zafirlucaste, são os dois ARLT mais frequentemente prescritos (DEMPSEY, 2000). Nos últimos anos, além do uso no tratamento da asma e rinite alérgica, outros estudos experimentais têm evidenciado efeitos benéficos destas drogas no controle de diferentes processos patológicos. No trato gastrointestinal, o montelucaste tem evidenciado melhora no dano à mucosa gástrica induzido por etanol e outras substâncias deletérias (SENER *et al.*, 2005b) bem como na mucosa colônica em colites experimentais (HOLMA *et al.*, 2001) e lesões ileais e hepáticas induzidas por sepse (SENER *et al.*, 2005c). O montelucaste também mostrou reduzir a lesão pulmonar induzida pelo tabagismo (YUKSEL *et al.*, 2003). No sistema nervoso central, observou-se efeito protetor da droga na isquemia cerebral focal (YU *et al.*, 2005) e na isquemia miocárdica induzida por isoproterenol (CHEN *et al.* 2003). Em estudos experimentais com queimaduras cutâneas, por mecanismo neutrófilo-dependente, o montelucaste tem apresentado efeitos antiinflamatórios e protetores contra lesão oxidativa da pele e de órgãos à distância (KABASAKAL *et al.* 2005; SENNER *et al.*, 2005a).

Por sua ação antiinflamatória e, possivelmente, de inibição da contração cicatricial, os ARLT têm sido implicados também na prevenção e tratamento de contraturas capsulares de implantes de silicone após mamoplastias de aumento e reconstruções mamárias. A ação inibitória destas drogas sobre os receptores cysLT, bem como um possível efeito supressor sobre os miofibroblastos poderiam explicar estas evidências clínicas (SCHLESINGER *et al.*, 2002; GRYSKIEWICZ, 2003; REID, GREVE e CASAS, 2005; BASTOS *et al.*, 2005; SCUDERI *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2007).

2.3.2 Efeitos dos ARLT na contração cicatricial

Inúmeros acasos contribuíram para a descoberta dos efeitos dos ARLT no fenômeno de contração cicatricial, principalmente na contratura capsular de implantes mamários. Schlesinger *et al.* (2002) relataram que em 1996 um paciente notou melhora significativa no aspecto e coloração das suas cicatrizes hiperpigmentadas após iniciar tratamento com nova medicação antiinflamatória para asma, o zafirlucaste. Com a finalidade de minimizar a hiperpigmentação observada

em pacientes com pele escura, Schlesinger começou a prescrevê-la após rejuvenescimento facial com *laser*. Em 1998, uma de suas pacientes desenvolveu contratura capsular (Baker III), dois meses após mamoplastia de aumento. Após falha do tratamento clínico com vitamina E, a paciente não quis se submeter à correção cirúrgica do problema. Sem outras opções terapêuticas comprovadamente eficazes, Schlesinger iniciou tratamento empírico com zafirlucaste. Após três meses, a paciente apresentou melhora completa da contratura capsular (Baker I). A partir de então, o autor começou a prescrever este ARLT para pacientes que evoluíam com contratura capsular e não desejavam tratamento cirúrgico. Coincidentemente, o co-autor Ellenbogen, antes de tomar conhecimento e começar a indicar o zafirlucaste para este mesmo propósito, recebeu relatos de grande melhora clínica da contratura capsular mamária (Baker IV) em uma paciente fazendo uso do ARLT e já com indicação de tratamento cirúrgico (SCHLESINGER *et al.*, 2002).

Gryskiewicz (2003) revisou o possível efeito inibitório do zafirlucaste (*Accolate*[®]) e do montelucaste (*Singulair*[®]) na contratura capsular de implantes mamários, bem como as complicações até então reportadas aos fabricantes e ao FDA. Estas duas drogas estão aprovadas pelo FDA para tratamento de doenças respiratórias como asma, porém não para prevenção e tratamento de contraturas capsulares de implantes mamários. Na sua revisão, Gryskiewicz (2003) ressaltou que, embora muitos cirurgiões tenham notado melhora dos sinais e sintomas clínicos associados à contratura capsular após tratamento empírico com estas drogas, as evidências científicas foram insuficientes e metodologicamente não confiáveis.

Gryskiewicz (2003) relatou as complicações reportadas aos fabricantes e ao FDA desde o início da comercialização destas medicações. Um total de 867 efeitos adversos relacionados ao zafirlucaste (*Accolate*[®]) foram reportados entre novembro de 1997 e outubro de 2002. Houve 66 casos de hepatite e insuficiência hepática em pacientes que estavam recebendo doses regulares de zafirlucaste, dos quais 13 não estavam tomando nenhuma outra medicação. Dois pacientes foram submetidos a transplante hepático. Vinte e três pacientes morreram, dos quais 8 não estavam tomando nenhuma outra medicação, e 12 apresentaram insuficiência hepática prévia. Todos estes casos não incluíram pacientes que apresentaram somente elevação dos níveis séricos das enzimas hepáticas. Nesta revisão, nenhum caso de insuficiência hepática foi relatado com o uso do montelucaste. Síndrome de Churg-Strauss (vasculite eosinofílica sistêmica) foi reportada em pacientes recebendo

zafirlucaste e montelucaste. Somente pacientes com asma sob tratamento com os ARLT apresentaram as complicações relatadas (GRYSKIEWICZ, 2003).

Ao tomar conhecimento dos 8 casos de óbito por insuficiência hepática conseqüente ao uso isolado do zafirlucaste, Gryskiewicz (2003) interrompeu seu estudo clínico após 2 meses de tratamento das contraturas capsulares com essa droga. Dos 5 pacientes incluídos no estudo, 1 paciente havia dobrado a dose da medicação sem consentimento médico, referindo melhora clínica da contratura logo após o aumento da dose, seguido por recidiva do endurecimento mamário antes mesmo da interrupção da medicação. Após o segundo mês de tratamento com zafirlucaste, a medicação foi trocada por montelucaste e mantida por mais 2 meses. Um destes pacientes interrompeu a medicação devido à queda de cabelo e outro devido à cefaléia e náusea recorrentes. Apesar do tratamento com ARLT, 2 dos 5 pacientes foram submetidos à capsulotomia, e somente 1 paciente apresentou melhora clínica durante avaliações seriadas pelo examinador cego.

Após esta publicação, dois casos de hepatotoxicidade relacionada ao montelucaste foram relatados na literatura (SASS, CHOPRA e WU, 2003; ACTIS *et al.*, 2007). No caso mais recente, a paciente também fazia uso de suplementos alimentares possivelmente hepatotóxicos, tendo-se sugerido efeito sinérgico entre eles e o montelucaste (ACTIS *et al.*, 2007). Tendo em vista as complicações relacionadas a estas drogas após início da comercialização, foram realizadas modificações e complementações nas informações técnicas dos medicamentos pelos respectivos fabricantes (SINGULAIR, 2007; ACCOLATE, 2003). Também reportadas ao FDA, as informações adicionais referiram-se ao risco de hepatotoxicidade e insuficiência hepática, principalmente relacionados ao zafirlucaste (*Accolate*[®]) e de condições eosinofílicas sistêmicas, muitas das quais condizentes com síndrome de Churg-Strauss, atribuídas a ambas as medicações. Quanto às alterações eosinofílicas, contudo, nenhuma relação causal direta com os ARLT foi comprovada, tendo sido associada, na maioria dos casos, com a redução na dose do corticóide em uso pelos pacientes asmáticos. Até novembro de 2007, ambas as medicações encontravam-se liberadas para comercialização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e pelo FDA.

Reid, Greve e Casas (2005) realizaram estudo clínico prospectivo, a fim de avaliar a eficácia do zafirlucaste no tratamento de contraturas capsulares precoces, em pacientes submetidas a mamoplastia de aumento com implantes salinos, lisos,

submusculares. Quarenta e uma mamas apresentaram contratura capsular, a maioria de grau leve a moderado (95,1%). Doses regulares de zafirlucaste (20 mg via oral, de 12/12 h) foram prescritas por 3 a 6 meses. Melhora parcial ou completa foi observada em 75,7% dos casos ($p < 0,05$), com tempo de seguimento médio de 16,5 meses.

Em estudo preliminar com 20 mulheres, Scuderi *et al.* (2006) evidenciaram que o zafirlucaste foi efetivo no tratamento da contratura capsular de implantes mamários de silicone. Os resultados demonstraram melhora da complacência mamária com 3 e 6 meses de tratamento, bem como diminuição da dor e deformidade mamária.

Bastos *et al.* (2005 e 2007) realizaram estudo experimental placebo-controlado, avaliando a influência do zafirlucaste na contratura capsular de pequenas próteses de silicone, lisas e texturizadas, implantadas no subcutâneo de 20 ratas. Duas concentrações diferentes da droga (1,25 e 5 mg/kg/dia) foram administradas diariamente por via intraperitoneal, por 90 dias, e comparadas com a utilização de solução salina isotônica. Os implantes texturizados nos grupos que receberam a droga apresentaram menor pressão interna, cápsula fibrosa mais fina, com menor densidade de fibras colágenas, menor número de vasos sanguíneos, mastócitos e eosinófilos em relação ao grupo controle. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos com implantes de silicone lisos. Por conseguinte, o zafirlucaste reduziu a ocorrência de fatores direta ou indiretamente relacionados à contratura capsular de implantes de silicone texturizados.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais

Neste estudo experimental foram utilizados 60 ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*, *Roentia mammalia*) adultos, machos, provenientes do biotério de criação do Instituto Politécnico da Universidade Federal do Paraná (UFPR). O peso médio inicial dos animais foi 359 g (DP \pm 25,11), variando de 280 g a 413 g.

3.1.2 Ambiente e alimentação

O experimento foi realizado no Centro de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR, o qual conta com ambiente apropriado para manipulação dos animais e execução dos procedimentos cirúrgicos. Durante todo o período de estudo os animais foram agrupados em número de 5, em gaiolas coletivas de aproximadamente 0,022 m³ (41,4 cm x 34,4 cm x 16 cm). As gaiolas, em número total de 12, foram identificadas e acomodadas sobre estantes horizontais.

Durante todo o período de aclimação e de estudo, os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, padrão *Nuvilab CR1*[®], produzido pela empresa Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil (ANEXO 1).

3.1.3 Drogas e soluções

A droga utilizada no grupo de estudo, montelucaste sódico (*Singulair*[®]), é produzida pela indústria farmacêutica Merck Sharp & Dohme (Whitehouse Station, NJ, EUA) e foi adquirida comercialmente (ANEXO 2). No grupo controle, para o procedimento de gavagem, utilizou-se solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (Baxter, São Paulo, SP, Brasil).

3.1.4 Outros materiais

Luvas de látex foram utilizadas para manipulação diária dos animais (anestesia, documentação fotográfica e procedimentos de gavagem). Para anestesia e eutanásia dos animais foi utilizado éter etílico em campânula de vidro.

A pesagem dos animais foi feita em balança modelo *AM 500 Marte*[®], regulada nos padrões do Inmetro.

A documentação fotográfica foi realizada com câmera digital *Sony*[®] modelo *Cyber-shot DSC-W1* (Sony, Tokyo, Japão), com resolução de 5.1 megapixels. A avaliação digital das áreas cruentas fotografadas, correspondentes às feridas excisionais, foi feita com auxílio do *software Mirror 6.0*[®] (Canfield Imaging Systems, Fairfield, NJ, EUA).

O procedimento de gavagem foi feito através de sonda metálica desenhada e desenvolvida para este fim, de acordo com o tipo e tamanho médio dos animais. Apresentava 11,5 cm de extensão e extremidade esférica atraumática de 1,4 mm de diâmetro. As soluções foram dosadas em seringas de 3 ml, de acordo com o peso dos animais.

Para realização do procedimento cirúrgico foi utilizado material estéril: cabo de bisturi número 3, tesoura de Mayo reta, tesoura de Metzemaum curva, pinça de Adson e porta-agulha Derf, todos da marca *Edlo*[®]. Os materiais descartáveis consistiram de lâminas de bisturi número 15 (*Solidor*[®]), fios de nylon monofilamentar 4-0 (*Shalon*[®]) e gazes. Como medidas antissépticas, foi utilizada solução tópica de

polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e campos estéreis. Para marcação da pele foi usada caneta preta, de ponta fina, modelo *Sharpie*[®].

Os espécimes ressecados para estudo histológico foram armazenados em solução de formalina 10% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Os testes tensiométricos dos corpos de prova foram realizados em equipamento eletromecânico universal para ensaios de tração (*DL500MF – EMIC*[®], São José dos Pinhais, PR, Brasil), com *software* próprio (*Tesc 2.0*[®]), como ilustrado na FIGURA 2.



FIGURA 2 – APARELHO DE TRAÇÃO *DL500MF – EMIC*[®], UTILIZADO PARA OS TESTES TENSOMÉTRICOS DE RESISTÊNCIA TECIDUAL DAS FERIDAS INCISIONAIS.

3.2 MÉTODO

3.2.1 Comissão de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa do presente estudo experimental esteve de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O projeto foi apresentado, analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em 22 de novembro de 2006, sob o registro CEP/SD: AN.004.SM 007-06-11 FR: animais (ANEXO 3).

3.2.2 Ambiente

Durante o experimento, os animais permaneceram em ambiente com controle de temperatura ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), ruído e luminosidade (ciclos claro-escuro de 12 horas – *Cronomat*[®], Mallory do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As condições de higiene foram mantidas com troca diária das forrações de cepilho que acumulavam dejetos.

O período de adaptação foi de 5 dias, durante o qual os ratos foram agrupados em número de 5 em cada gaiola e receberam água e ração *ad libitum*.

3.2.3 Grupos

Após o período de aclimatação, os animais foram pesados e divididos aleatoriamente em 4 grupos de 15 ratos, conforme a medicação utilizada e o dia do sacrifício:

- **Grupo MK-7d (grupo de estudo):** constituído por animais que receberam montelucaste sódico e foram sacrificados no 7^o dia pós-operatório.
- **Grupo SF-7d (grupo controle):** constituído por animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% e foram sacrificados no 7^o dia pós-operatório.
- **Grupo MK-14d (grupo de estudo):** constituído por animais que receberam montelucaste sódico e foram sacrificados no 14^o dia pós-operatório.
- **Grupo SF-14d (grupo controle):** constituído por animais que receberam solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% e foram sacrificados no 14^o dia pós-operatório.

3.2.4 Manipulação

Para realização da anestesia, pesagem e documentação fotográfica, os animais foram apreendidos pela cauda, a fim de evitar trauma e possíveis interferências na cicatrização das feridas cirúrgicas do dorso. Em seguida, para o procedimento de gavagem, os ratos ainda sedados foram contidos com a mão esquerda do pesquisador, através da região dorsal do animal. Imobilização adequada e atraumática foi conseguida apoiando-se o segundo e terceiro dedos do pesquisador entre a cabeça e os membros anteriores do rato, e o primeiro e quarto dedos entre os membros posteriores e tronco anterior.

3.2.5 Anestesia

Para realização do procedimento cirúrgico inicial, da documentação fotográfica e do procedimento de gavagem diários, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com éter etílico. Individualmente, cada rato foi colocado em campânula de vidro fechada, a qual continha divisória fenestrada que isolava o animal (superiormente) do anestésico e dejetos (inferiormente). Através da campânula de vidro, o plano anestésico foi monitorado pelos movimentos voluntários e respiratórios do animal, sendo o mesmo retirado da campânula assim que apresentasse parada dos movimentos voluntários, preservando ainda os movimentos ventilatórios.

Durante o procedimento cirúrgico, o plano anestésico foi mantido pela inalação de algodão umedecido em éter etílico e criteriosamente monitorado pelo cirurgião e auxiliar.

3.2.6 Pré-operatório

Após ser anestesiado, o animal foi submetido à tricotomia da região dorsal com lâmina fria.

3.2.7 Controle de peso

Os animais foram pesados antes de serem submetidos ao procedimento cirúrgico e logo após a eutanásia. O peso inicial foi usado para calcular a dose da medicação em estudo. O peso final permitiu avaliar diferenças na perda de peso entre os grupos.

3.2.8 Marcação da pele

Depois de anestesiado e tricotomizado, o animal foi posicionado sobre o campo operatório, em decúbito ventral, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. As marcações da pele foram realizadas com caneta preta e situaram-se na linha média dorsal do animal. No dorso anterior, a ferida excisional foi demarcada utilizando-se um molde plástico de 2 cm x 2 cm (4 cm²) mantendo a borda anterior do quadrado localizado ao nível do ângulo das escápulas. No dorso posterior, com auxílio de uma régua, a ferida incisional foi marcada longitudinalmente, medindo 5 cm de extensão e iniciando 2 cm caudalmente à borda posterior da ferida excisional (FIGURA 3). Em seguida, antissepsia da região dorsal foi feita com PVPI tópico.

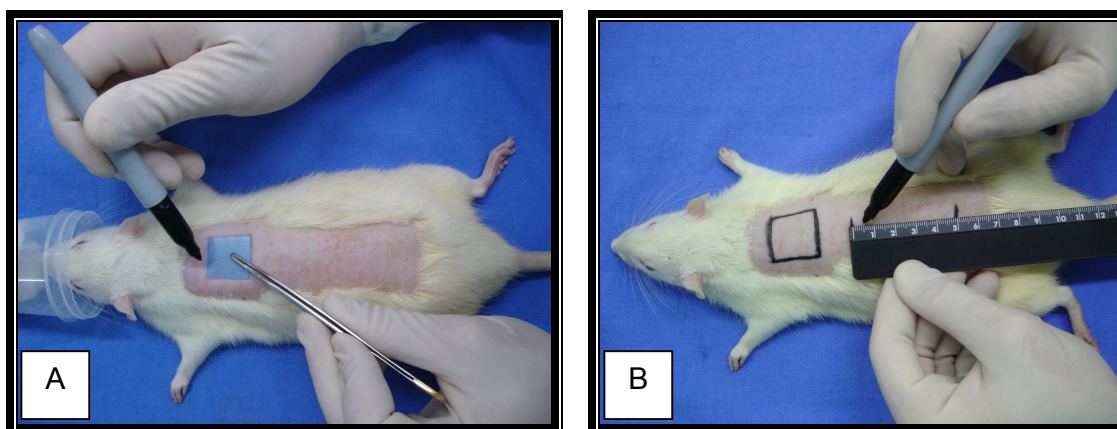


FIGURA 3 – MARCAÇÃO CUTÂNEA DA FERIDA EXCISIONAL (A) E INCISIONAL (B).

3.2.9 Procedimento cirúrgico

A equipe foi composta de um único cirurgião (o pesquisador) e um auxiliar responsável pelo monitoramento do plano anestésico do animal. Iniciou-se o procedimento cirúrgico pelo modelo excisional, incidindo com bisturi a porção lateral direita do quadrado demarcado (FIGURA 4A). A dissecação do segmento de pele a ser ressecado foi feita com tesoura de Metzembraum, em plano anatômico areolar, em nível suprafascial, (FIGURA 4B). As outras bordas foram seccionadas com tesoura de Mayo reta, sempre na margem interna da marcação (FIGURAS 4C e 4D).

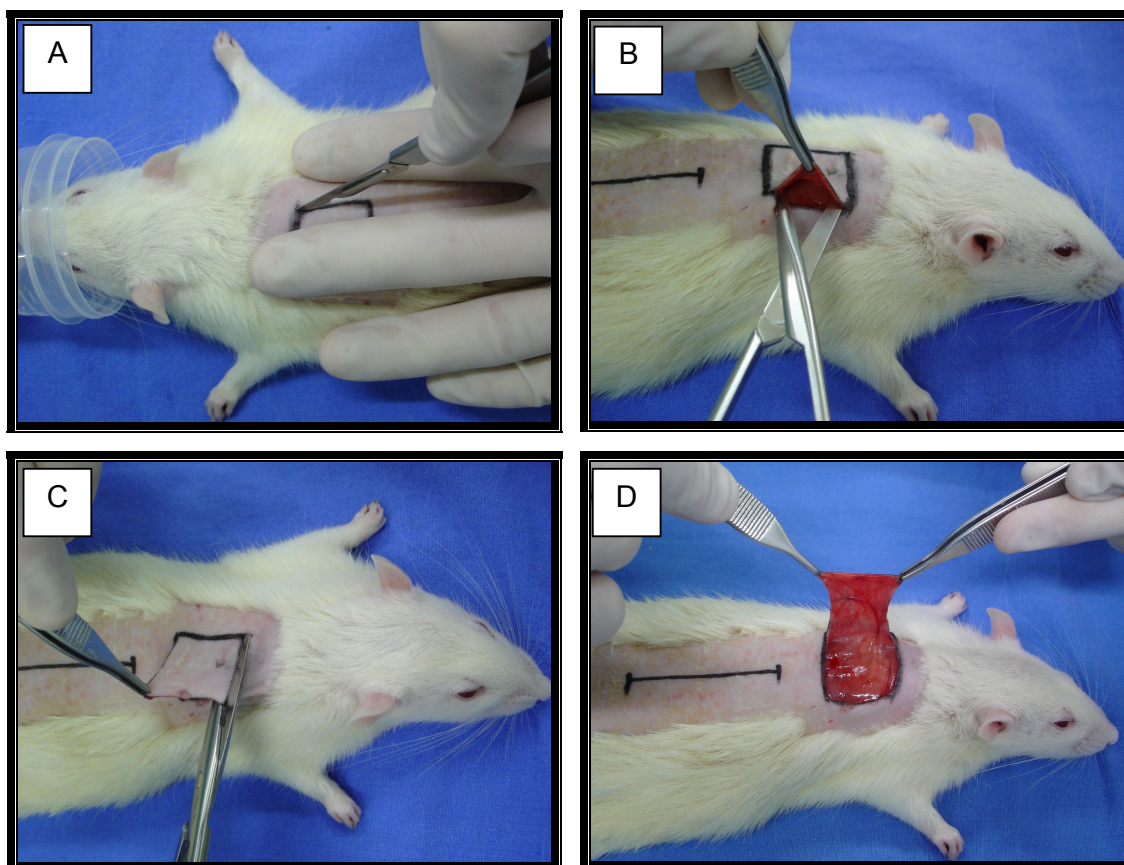


FIGURA 4 – MODELO EXCISIONAL DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA: (A) INCISÃO INICIAL COM LÂMINA DE BISTURI; (B) DISSECÇÃO EM PLANO AREOLAR SUPRAFASCIAL; (C e D) RESSECÇÃO DO SEGMENTO CUTÂNEO DEMARCADO.

Na ferida posterior, a pele foi linearmente incisada com lâmina fria (modelo incisional) em espessura total, até o nível da fáscia muscular (FIGURAS 5A e 5B). A síntese desta foi feita com sete pontos interrompidos de nylon 4-0, igualmente distribuídos pela ferida (FIGURAS 5C e 5D).

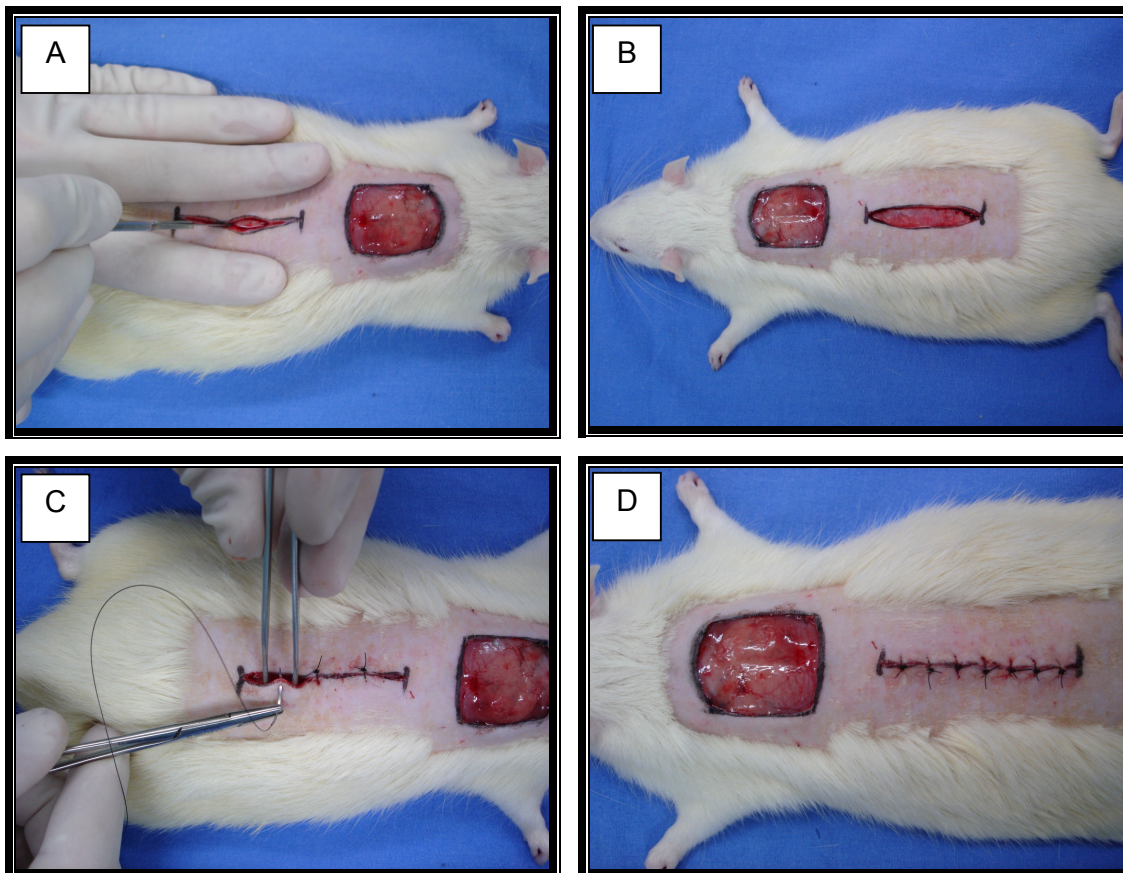


FIGURA 5 – MODELO INCISIONAL DE CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA: (A e B) INCISÃO LINEAR DA PELE EM ESPESSURA TOTAL, ATÉ O PLANO DA FÁSCIA MUSCULAR. (C e D) SÍNTESE DA FERIDA COM SETE PONTOS INTERROMPIDOS DE NYLON 4-0.

3.2.10 Pós-operatório

Ao fim do procedimento cirúrgico, o frasco contendo anestésico inalatório foi retirado e o rato mantido em ar ambiente até completa recuperação. Com o intuito de evitar possíveis interferências dos outros animais ainda não operados, como mordeduras na área cruenta, ao término do ato operatório cada rato foi colocado em gaiola isolada até completa recuperação anestésica (FIGURA 6).



FIGURA 6 – ANIMAL EM GAIOLA ISOLADA NO PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO.

Durante todo o período pós-operatório, até o dia da eutanásia, foi realizada avaliação clínica diária das feridas cirúrgicas, a fim de monitorar complicações locais como deiscências, infecções e hematomas.

3.2.11 Controle fotográfico

Com técnica padronizada, as feridas excisionais foram fotografadas no período pós-operatório imediato e no 1º, 3º, 5º, 7º, 10º e 14º dias pós-operatórios. Quando anestesiados, ao apresentarem completo relaxamento muscular, os animais foram posicionados sobre superfície plana, em decúbito ventral, com os quatro membros estendidos e a cabeça alinhada ao tronco. Nesta posição, a ferida excisional foi fotografada a uma distância padronizada, apoiando-se a câmera fotográfica sobre uma régua de 15 cm (FIGURA 7). As fotos foram tiradas em ambiente iluminado com luz fluorescente, sem *flash*, com dispositivo macrofotográfico ativado.

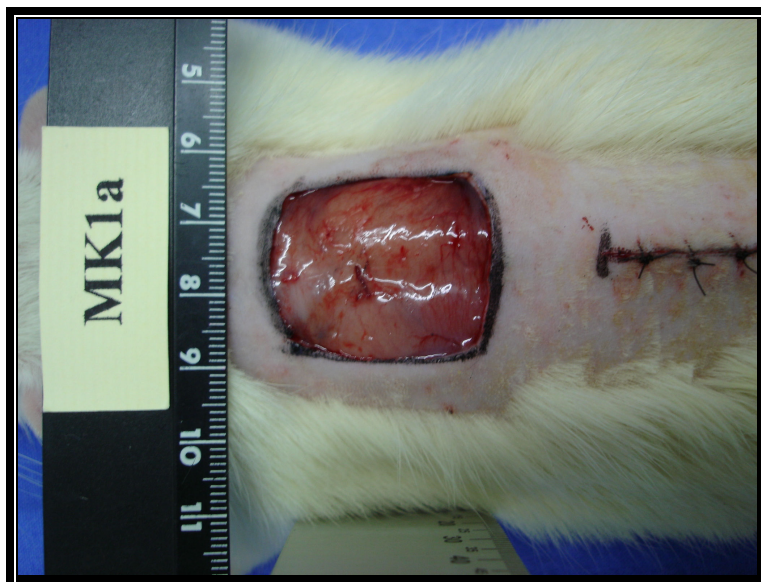


FIGURA 7 – FOTOGRAFIA DIGITAL DA FERIDA EXCISIONAL, OBTIDA A 15 cm DA SUPERFÍCIE DE APOIO. UMA RÉGUA GRADUADA EM MILÍMETROS FOI POSICIONADA AO NÍVEL DA LESÃO, CONTENDO A IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL.

3.2.12 Diluição da medicação

Comprimidos de montelucaste sódico 10 mg (*Singulair*[®]) foram triturados até atingirem a forma física de pó. Em seguida, a medicação foi diluída em solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% à concentração de 2 mg/ml. Dose padronizada de 10 mg/kg/dia foi fornecida via sondagem orogástrica rígida aos animais dos grupos de estudo (MK-7d e MK-14d).

3.2.13 Gavagem

A fim de administrar a solução de montelucaste sódico diluído (grupos MK) e a solução salina isotônica de cloreto de sódio 0,9% (grupos SF), todos os animais foram submetidos à sondagem orogástrica com sonda metálica rígida quando ainda estavam sedados. Conforme técnica descrita, o rato foi contido com a mão esquerda do pesquisador (FIGURA 8A), enquanto na mão direita a sonda acoplada a uma seringa de 3 ml contendo a dose apropriada da solução foi introduzida até o ponto correspondente à distância entre a boca e o apêndice xifóide do animal (FIGURA 8B). Os volumes infundidos variaram de acordo com o peso corpóreo, de 1,4 ml a 2,06 ml, com média de 1,79 ml (DP \pm 0,12) e sem diferença de volume estatisticamente significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Após lenta infusão da solução e retirada da sonda, a fim de diminuir o risco de regurgitação, o rato foi mantido com a porção cefálica mais elevada que a caudal até recuperar-se da anestesia.

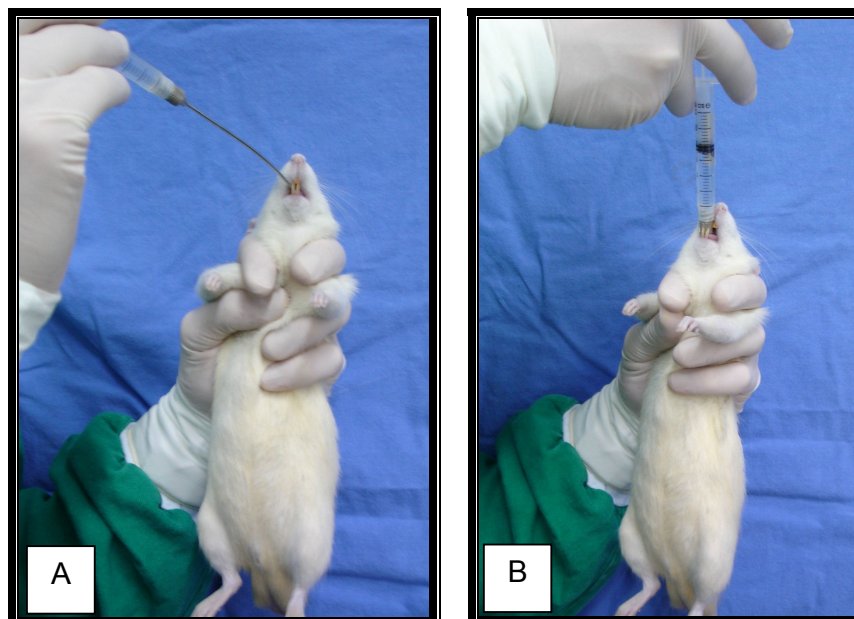


FIGURA 8 – ADMINISTRAÇÃO DA DROGA: (A) APREENSÃO DO RATOS SEDADO; (B) REALIZAÇÃO DE SONDAGEM OROGÁSTRICA COM CÂNULA METÁLICA RÍGIDA.

3.2.14 Eutanásia

No 7º dia pós-operatório, 15 animais do grupo de estudo (MK-7d) e 15 do grupo controle (SF-7d) foram submetidos à eutanásia por dose letal de éter etílico inalatório. Logo em seguida o rato foi posicionado em decúbito ventral, fotografado e devidamente marcado para ressecção dos espécimes cirúrgicos (FIGURA 9A).

Após retirada cuidadosa dos pontos da ferida incisional, segmentos padronizados de pele foram ressecados para o teste tensiométrico e estudo histológico, tendo sido desprezado 5 mm das extremidades da ferida. O corpo de prova do teste tensiométrico consistiu de um segmento de pele de espessura total, contendo a ferida cirúrgica no centro, medindo 2 cm de largura por pelo menos 6 cm de comprimento. Esta maior extensão tinha por finalidade proporcionar melhor fixação do tecido ao aparelho de tração. Para estudo histológico, foi ressecado 2 cm da porção superior da ferida incisional (pele de espessura total).

A ferida cirúrgica excisional também foi totalmente ressecada. A fim de assegurar que o tecido de granulação subjacente não fosse alterado pela ressecção do espécime, incluiu-se 5 mm de pele normal nas margens da lesão e tecido muscular sob a área cruenta (FIGURAS 9B e 9C). Os dois espécimes foram identificados e fixados em formalina 10% (FIGURA 9D).

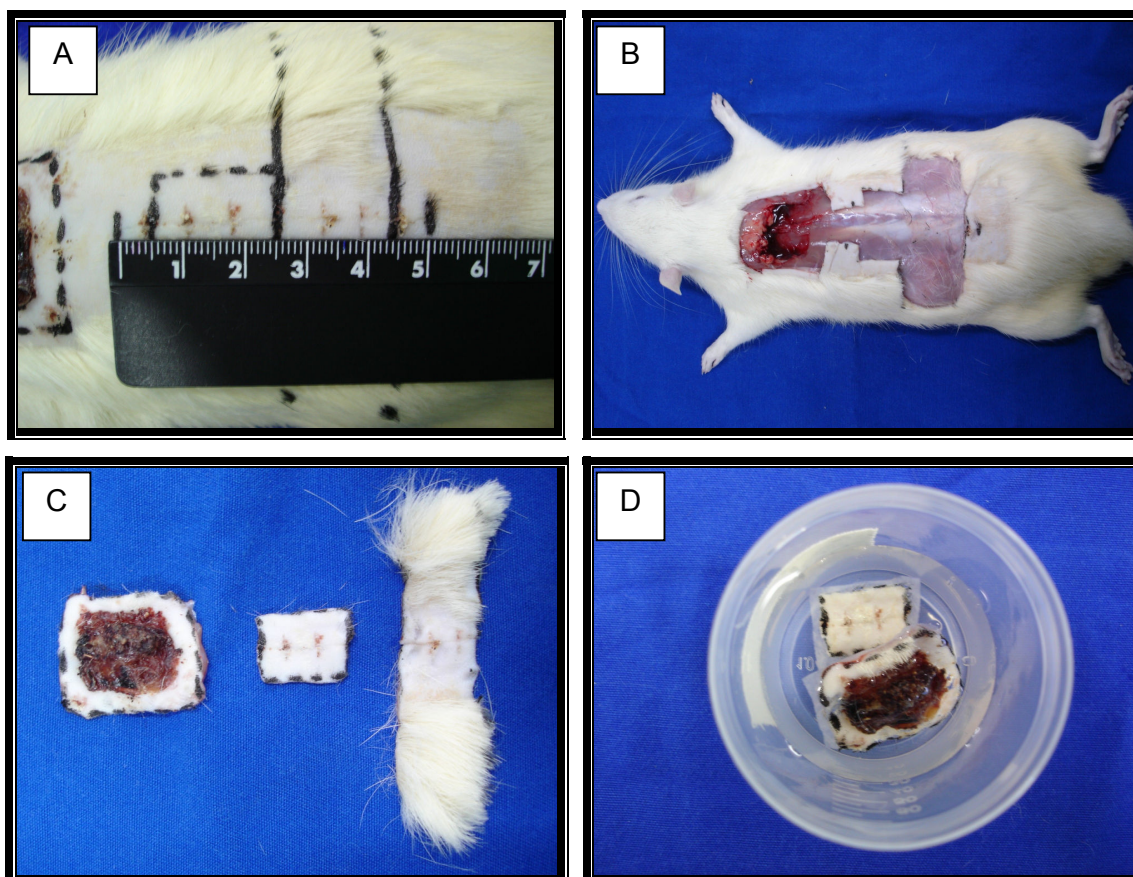


FIGURA 9 – RESSECÇÃO DOS ESPÉCIMES APÓS EUTANÁSIA DO ANIMAL: (A) DEMARCAÇÃO DOS SEGMENTOS DE PELE A SEREM RESSECADOS; (B) REGIÃO DORSAL DO ANIMAL APÓS A RESSECÇÃO; (C) ESPÉCIMES CONTENDO A FERIDA EXCISIONAL (ESQUERDA), PORÇÃO SUPERIOR DA FERIDA INCISIONAL PARA ESTUDO HISTOLÓGICO (CENTRO) E SEGMENTO INFERIOR DA FERIDA INCISIONAL PARA TESTE DE TRAÇÃO (DIREITA); (D) ESPÉCIMES HISTOLÓGICOS FIXADOS EM PAPEL FILTRO E ARMAZENADOS EM FORMALINA 10%.

3.2.15 Teste tensiométrico

Para realização do teste de tração, as extremidades de cada segmento de pele (corpo de prova) foram fixadas na presilha superior e inferior do aparelho tensiométrico, mantendo a cicatriz da ferida incisional entre as porções fixadas (FIGURA 10A). Todos os testes foram feitos até no máximo 2 horas após ressecção dos corpos de prova. O ensaio foi comandado automaticamente pelo aparelho e a obtenção dos resultados se fez por programa de computador específico acoplado ao sistema. A tração desenvolveu-se com velocidade de 50 mm/min, com limite de força de 4.500 kgf, até o colapso da linha cicatricial do corpo de prova (FIGURAS 10B e 10C). As variáveis tensão máxima e força máxima foram obtidas para cada corpo de prova testado (FIGURA 10D).

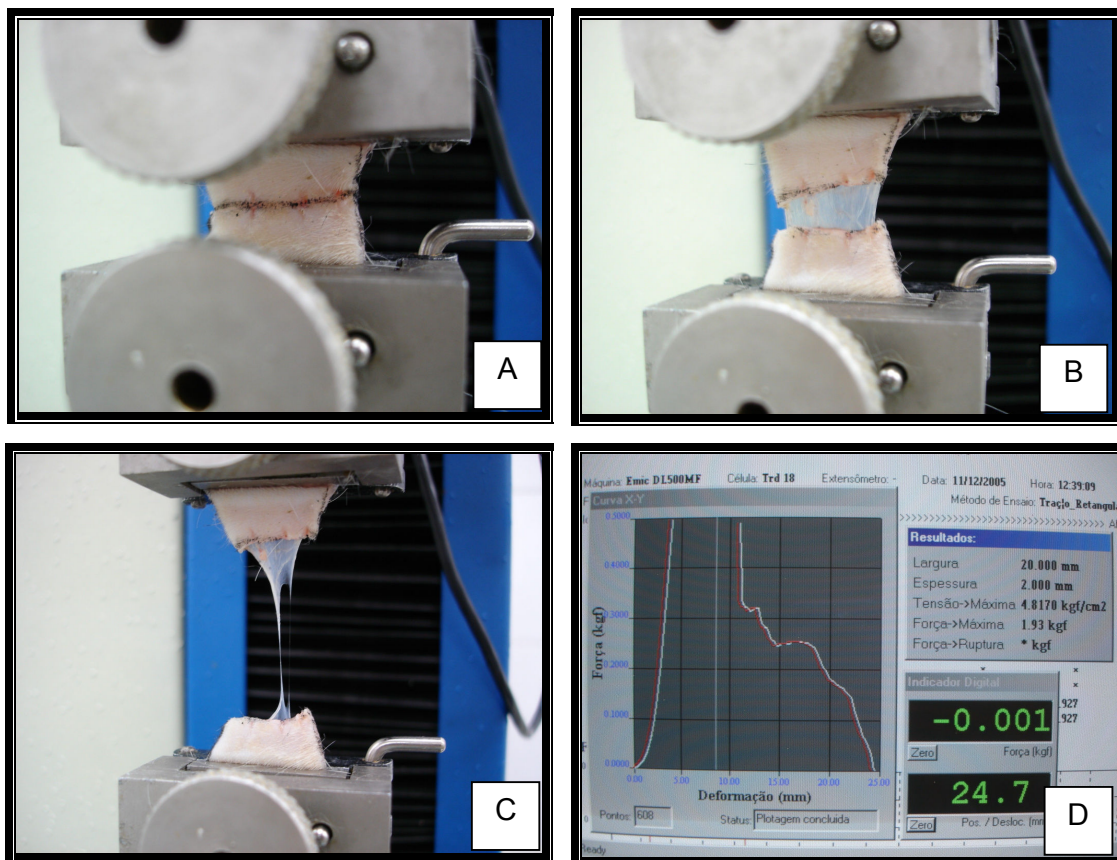


FIGURA 10 – TESTE TENSIO MÉTRICO DA FERIDA CUTÂNEA INCISIONAL: (A) FIXAÇÃO DO CORPO DE PROVA NO APARELHO; (B e C) TRAÇÃO PROGRESSIVA, ATÉ RUPTURA COMPLETA NA LINHA CICATRICIAL; (D) RESULTADOS OBTIDOS POR PROGRAMA DE COMPUTADOR ACOPLADO AO SISTEMA.

Tensão máxima foi definida como a quantidade máxima de força suportada pelo tecido, por unidade de área de secção (kgf/cm^2). Assim, esta variável foi dependente das dimensões de tecido ressecado, as quais foram padronizadas em 2 cm para a largura e 2 mm para a espessura. Força máxima consistiu na maior força suportada pelo tecido durante todo o tempo de teste (kgf).

3.2.16 Avaliação da contração cicatricial

A documentação fotográfica foi feita logo após o procedimento cirúrgico e em diferentes tempos do pós-operatório (p.o.): 24 h (1º p.o.), 48 h (2º p.o.), 72 h (3º p.o.), 120 h (5º p.o.), 168 h (7º p.o.), 240 h (10º p.o.) e 336 h (14º p.o.) (FIGURA 11). Até o 7º dia pós-operatório, 29 animais do grupo MK e 30 do grupo SF foram fotografados e avaliados. Após eutanásia dos animais dos grupos MK-7d e SF-7d, os 15 animais restantes do grupo de estudo (MK-14d) e controle (SF-14d) continuaram sendo fotografados até o 14º dia pós-operatório.

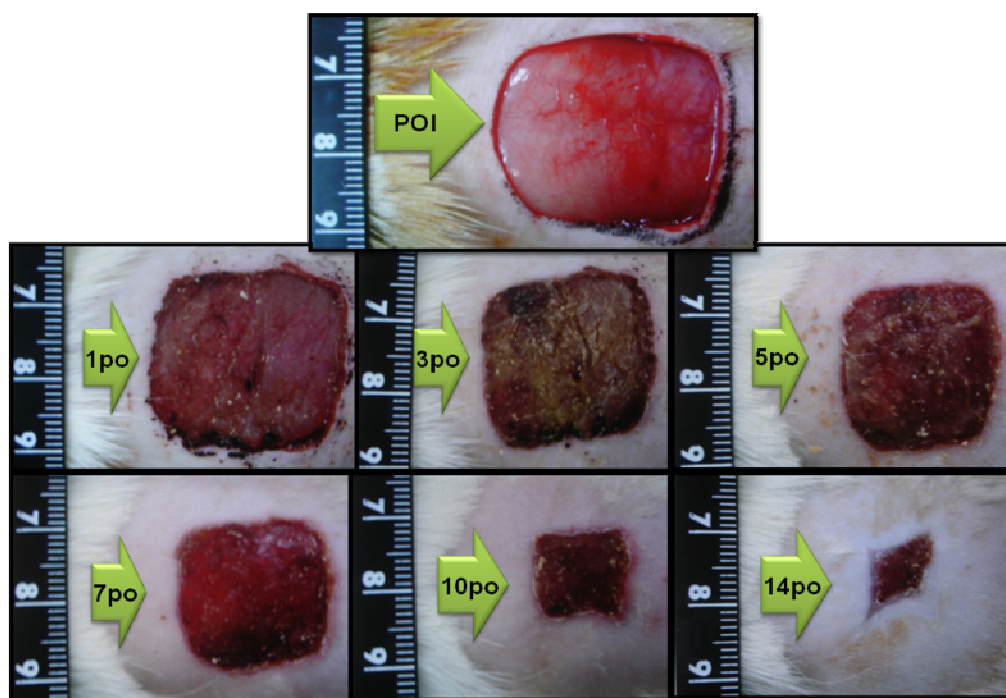


FIGURA 11. FERIDA EXCISIONAL CRIADA PELO ATO CIRÚRGICO (POI) E SUA EVOLUÇÃO ATÉ O 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO. OBSERVA-SE PROGRESSIVA CONTRAÇÃO DA ÁREA CRUENTA AO LONGO DE TEMPO.

O efeito da contração cicatricial foi avaliado na ferida excisional através da análise computadorizada de fotos digitais padronizadas. As fotos foram obtidas a 15 cm da superfície em que o animal sedado foi posicionado. Uma régua graduada em milímetros foi posicionada no mesmo nível do ferimento em estudo, sobre o dorso do animal (transição cabeça-tronco) a qual continha também a identificação do rato (FIGURA 12A). As imagens foram analisadas em programa computadorizado específico para edição e formatação de imagens (*Mirror 6.0*[®], Canfield Imaging, Fairfield, NJ, EUA). A fim de corrigir possíveis diferenças na distância câmera fotográfica-ferida, bem como para padronizar uma unidade de medida universal (mm) para as áreas cruentas, cada imagem avaliada foi calibrada pelo programa utilizando 10 mm da régua adjacente à ferida (FIGURA 12B). Em seguida, com ferramenta específica do *software*, calculou-se a área cruenta das feridas excisionais contornando toda a transição pele normal-tecido cicatricial (FIGURAS 12C e 12D).

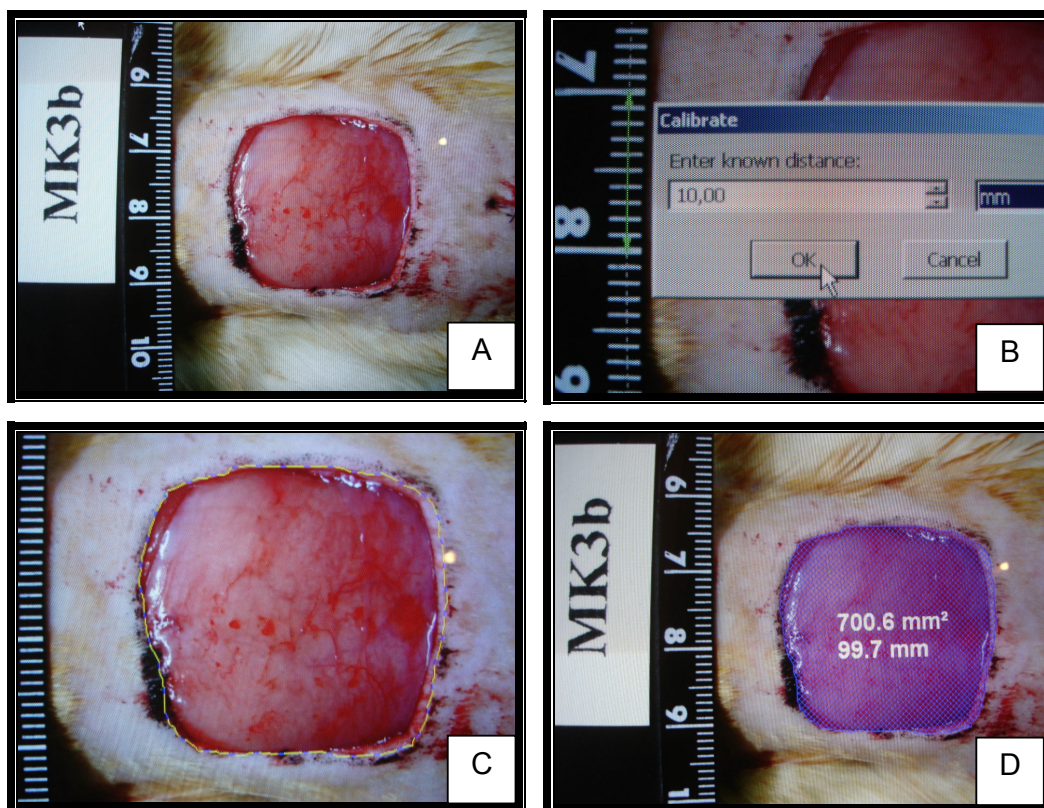


FIGURA 12. TÉCNICA DE AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICAL. (A) FERIDA EXCISIONAL CONTENDO A ÁREA CRUENTA A SER AVALIADA; (B) IMAGEM SENDO CALIBRADA EM MILÍMETROS, UTILIZANDO RÉGUA ADJACENTE À FERIDA; (C) LINHA AMARELA E AZUL DEFININDO A TRANSIÇÃO PELE NORMAL-TECIDO CICATRICAL; (D) ÁREA CRUENTA CALCULADA PELO SISTEMA (mm²).

3.2.17 Análise qualitativa do colágeno

Uma vez obtidos os segmentos de tecido das feridas excisionais e incisionais, os espécimes foram mantidos em formalina 10% para posterior estudo histológico, o qual foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR. O método consistiu na identificação e quantificação das fibras colágenas maduras (tipo I) e imaturas (tipo III) por técnica de microscopia óptica com luz polarizada e análise morfométrica computadorizada. As amostragens macroscópicas foram padronizadas para todos os espécimes, realizando-se cortes transversais na porção média da ferida incisional e excisional (FIGURA 12A). Após desidratação, diafanização e emblocamento dos tecidos em parafina, foram realizadas microtomias (4 μ m) e subsequente coloração com *picrosirius-red F3BA*.

Analisaram-se os cortes histológicos através de microscópio óptico *Olympus*[®] (Olympus, Tokyo, Japão) com fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por uma câmera fotográfica *Sony*[®] *CCD Íris* (Sony, Tokyo, Japão), transmitidas a monitor colorido *Triniton Sony*[®], congeladas e digitalizadas por meio de placas *Oculus TCX*[®]. Finalmente, as imagens foram analisadas pelo aplicativo *Image Pro-Plus*[®] versão 4.5 (Mídia Cibernética, São Paulo, SP, Brasil). Em aumento de 400 vezes, a calibração do sistema foi realizada pela leitura de área cicatricial considerada normal pelo examinador. No sistema RGB (*Red, Blue, Green*) considerou-se valores para as tons de vermelho e laranja (colágeno maduro tipo I) e para os tons de verde (colágeno imaturo tipo III) (FIGURA 12B). Todas as análises histológicas foram realizadas no mesmo período, de forma aleatória, sob as mesmas condições de regulação e calibração do aparelho.



FIGURA 13. ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO PELA COLORAÇÃO DE *PICROSIRIUS-RED* E TÉCNICA DE MICROSCOPIA COM LUZ POLARIZADA: (A) CORTES MACROSCÓPICOS DOS ESPÉCIMES CONTENDO A FERIDA EXCISIONAL (ESQUERDA) E INCISIONAL (DIREITA); (B) IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS MADURAS OU TIPO I (VERMELHO E LARANJA) E IMATURAS OU TIPO III (VERDE).

Na análise histológica de cada área cicatricial, 3 campos de grande aumento (400 vezes) foram aleatoriamente selecionados para a quantificação dos tipos de colágeno. A média destas 3 análises foi considerada como valor final para cada ferida. Em cada campo analisado foi calculada a porcentagem somente das áreas ocupadas por fibras de colágeno maduro (tipo I) e imaturo (tipo III), desconsiderando outras tonalidades e espaços escuros entre as fibras. Assim, a soma da porcentagem de fibras maduras e imaturas em cada amostra totalizou 100%.

3.2.18 Análise estatística

Todos os dados foram tabulados em planilha do programa *Microsoft Office Excel*[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) (ANEXOS 4-13), obtendo-se os valores médios (M), mediana, desvio padrão (DP) e erro padrão (EP) para cada variável nos diferentes tempos estudados.

Para as variáveis quantitativas, testou-se a Gaussianidade das variáveis comparadas pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para as amostras que apresentaram distribuição Gaussiana com mesma variância, utilizou-se o teste “*t*” de *Student*. Para aquelas com distribuição Gaussiana com variâncias diferentes, o teste “*t*” aplicado foi o de *Aspin-Welch*. Para os dados não-Gaussianos, ou seja, que não seguiram a distribuição normal de probabilidade utilizou-se o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* (DAWSON e TRAPP, 2003). Em todos os testes estatísticos o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 PESO

O peso pré-operatório e no dia da eutanásia foi semelhante entre os grupos de estudo e controle ($p > 0,05$). A perda de peso média dos animais do grupo de estudo e controle submetidos à eutanásia no 7º dia pós-operatório foi de 16,08 g e 15,74 g, respectivamente ($p = 0,588$). Já nos animais mortos no 14º dia pós-operatório, esses valores foram de 25,2 g para o grupo de estudo e 13,9 g para o controle ($p = 0,045$) (TABELA 1).

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS NO PRÉ-OPERATÓRIO E NO DIA DA EUTANÁSIA, BEM COMO A PERDA DE PESO DURANTE ESTE PERÍODO: VALORES MÉDIOS, DE ERRO PADRÃO E ESTATÍSTICOS.

<i>Grupos</i>	<i>Peso pré-op. (g)</i>	<i>Peso eutanásia (g)</i>	<i>Perda peso (g)</i>
	<i>M ± EP</i>	<i>M ± EP</i>	<i>M ± EP</i>
MK-7d	359 ± 5,8	340 ± 6,2	18,1 ± 4
<i>p (MK-7d x SF-7d)</i>	<i>0,830*</i>	<i>0,942*</i>	<i>0,588**</i>
SF-7d	357 ± 5,8	341 ± 5,4	15,7 ± 1,7
MK-14d	359 ± 7,8	334 ± 7,4	25,2 ± 4,6
<i>p (MK-14d x SF-14d)</i>	<i>0,875*</i>	<i>0,214*</i>	<i>0,045**</i>
SF-14d	360 ± 6,9	346 ± 6,9	13,9 ± 2,6

M ± EP: média ± erro padrão; *p*: comparações estatísticas; (*) resultado do teste estatístico *t* de student; (**) resultado do teste estatístico de Aspin-Welch.

4.2 MORBIDADE E MORTALIDADE

Segundo avaliação clínica, nenhuma ferida incisional apresentou complicações como deiscência, infecção ou hematoma. A maioria das feridas excisionais mostrou-se seca e com crosta sobre a área cruenta. Por vezes, ausência de crosta e pequena serosidade foi observada na área cruenta.

Dos 60 animais que constituíam a universo inicial, somente um rato do grupo de estudo (MK1a-7d) morreu. O óbito ocorreu devido à depressão respiratória pelo anestésico inalatório durante o procedimento cirúrgico inicial.

4.3 AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CICATRICIAL

A área cruenta da ferida excisional foi avaliada em diferentes tempos pós-operatórios. A ferida criada no ato cirúrgico foi bastante semelhante entre os dois grupos (MK = 728 mm²; SF = 719 mm²), não apresentando diferença significativamente estatística entre os grupos controle e de estudo ($p = 0,5314$). Em todas as avaliações pós-operatórias, no entanto, o grupo MK apresentou área cruenta média maior que o grupo SF. Estas diferenças foram estatisticamente significativas no 5º ($p = 0,032$), 7º ($p = 0,016$) e 14º ($p = 0,011$) dias pós-operatórios (GRÁFICO 1).

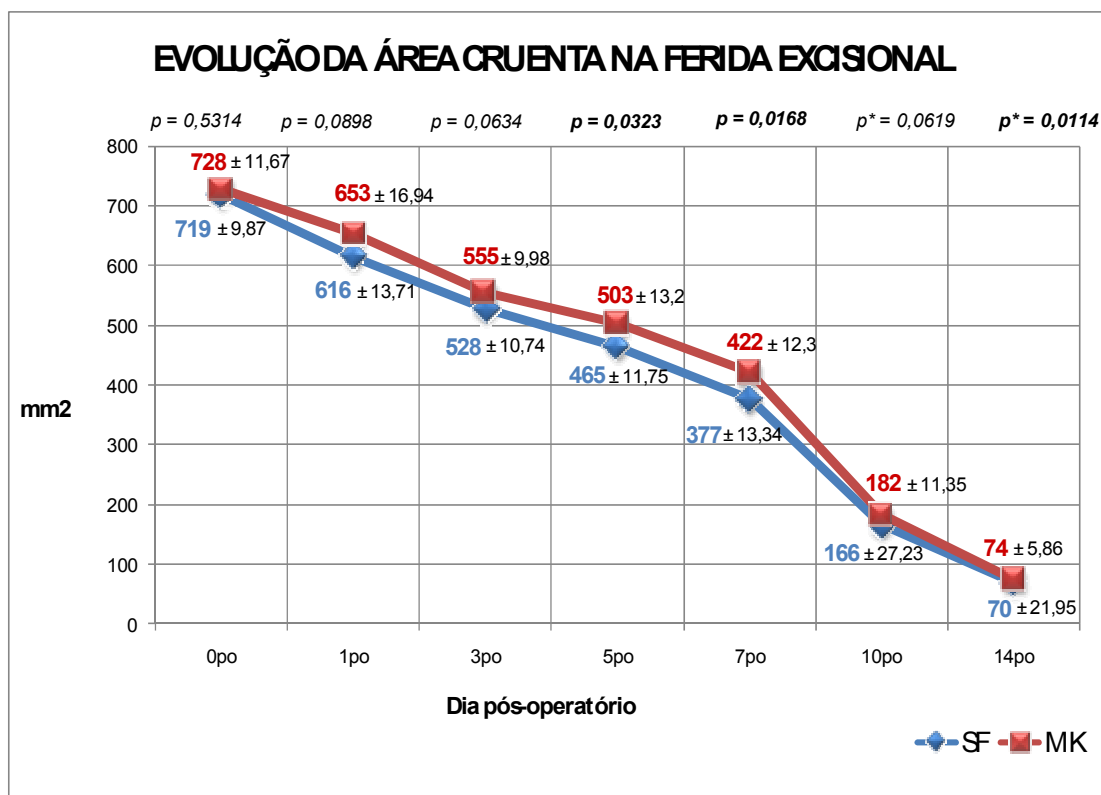


GRÁFICO 1 – EVOLUÇÃO DAS ÁREAS CRUENTAS NOS DOIS GRUPOS AO LONGO DOS DIAS ESTUDADOS: ÁREA MÉDIA ± ERRO PADRÃO (mm²) E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS DOIS GRUPOS (p).

0po: pós-operatório imediato; 1po ao 14po: dias de pós-operatório; p : teste estatístico *t de Student*; p^* : teste estatístico de *Mann-Whitney*.

As taxas de contração cicatricial das feridas excisionais foram obtidas subtraindo-se a área cruenta inicial (pós-operatório imediato) em cada animal, pela área cruenta dos dias pós-operatórios subsequentes. A área contraída nos diferentes tempos pós-operatórios em relação ao pós-operatório imediato foi semelhante entre os dois grupos (GRÁFICO 2). Em nenhum tempo avaliado, as diferenças na taxa de contração entre o grupo de estudo e controle foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

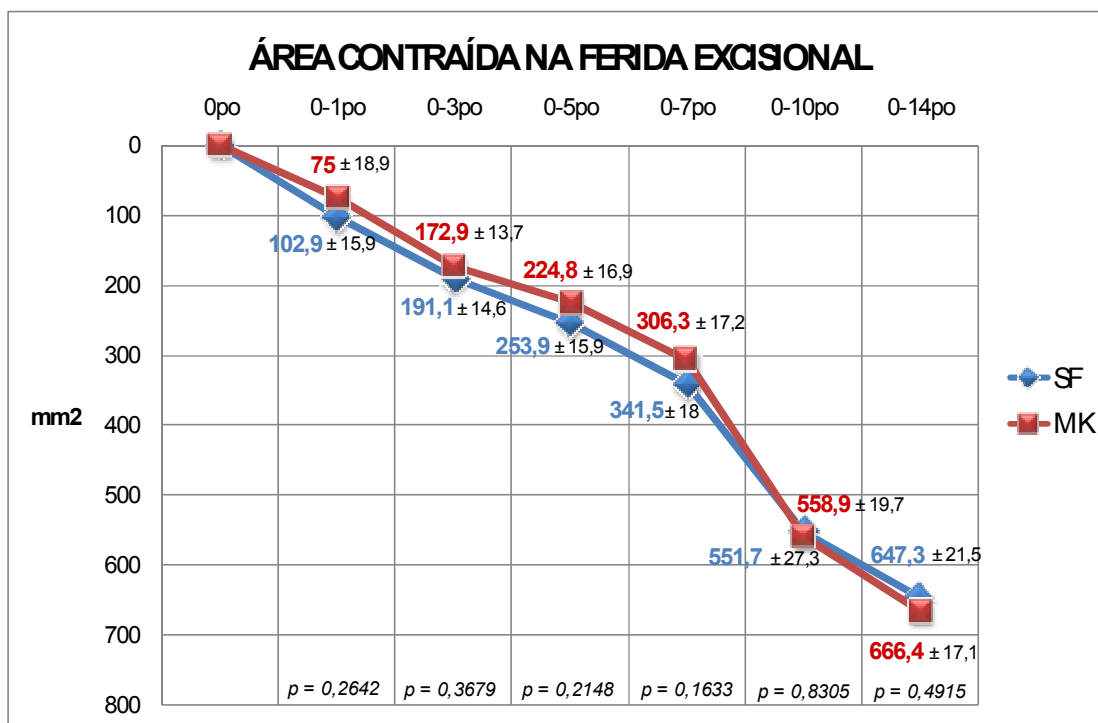


GRÁFICO 2 – ÁREA CRUENTA CONTRAÍDA NOS DIFERENTES TEMPOS PÓS-OPERATÓRIOS EM RELAÇÃO AO PÓS-OPERATÓRIO IMEDIATO: ÁREA MÉDIA ± ERRO PADRÃO (mm²) E COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE OS DOIS GRUPOS (p).

Opo: pós-operatório imediato; 0-1po ao 0-14po: período pós-operatório em que foi avaliada a área contraída; p: teste estatístico *t de Student*.

4.4 AVALIAÇÃO TENSÍOMÉTRICA

4.4.1 Tensão máxima

O valor médio e de erro padrão da variável “tensão máxima” nos animais mortos no 7º dia pós-operatório foi de $1,53 \pm 0,18$ kgf/cm² no grupo MK e $1,98 \pm 0,17$ kgf/cm² no grupo SF, não apresentando diferença significativamente estatística ($p = 0,0877$). No 14º dia pós-operatório, os valores foram de $5,14 \pm 0,52$ kgf/cm² no grupo MK e $5,02 \pm 0,28$ kgf/cm² no SF, também sem valor estatístico significativo ($p = 0,8463$). Os resultados desta avaliação tensiométrica estão demonstrados no GRÁFICO 3.

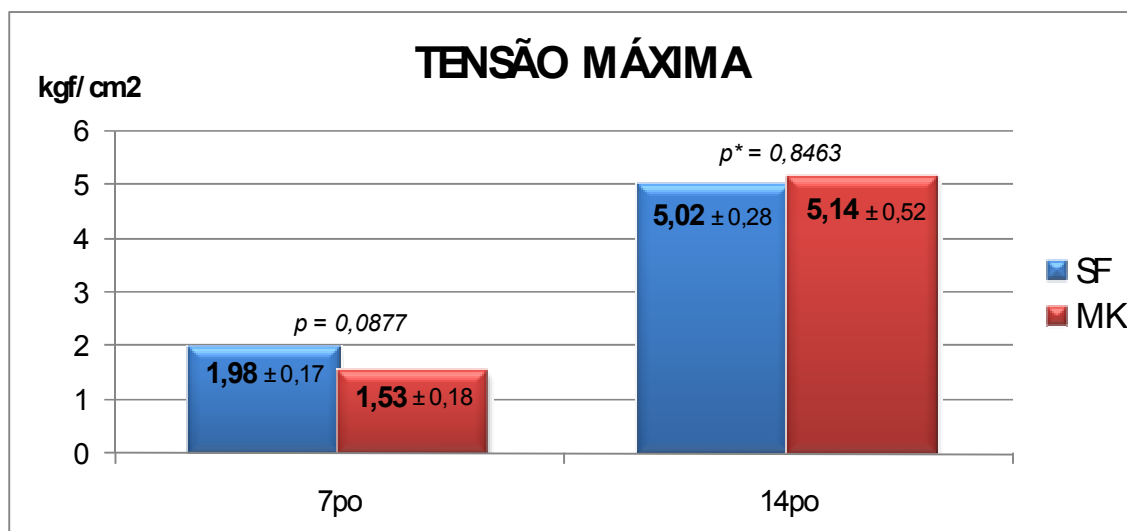


GRÁFICO 3 – AVALIAÇÃO TENSÍOMÉTRICA, VARIÁVEL TENSÃO MÁXIMA, NO GRUPO DE ESTUDO (MK) E CONTROLE (SF), NO 7º E 14º DIAS PÓS-OPERATÓRIOS: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (kgf/cm²) E VALORES ESTATÍSTICOS (p).

p : teste estatístico t de Student; p^* : teste estatístico t de Aspin-Welch.

4.4.2 Força máxima

Quanto à variável “força máxima”, os valores médios e de erro padrão no 7º dia pós-operatório foram $0,61 \pm 0,07$ kgf no grupo MK e $0,79 \pm 0,06$ kgf no grupo SF, sem diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,09$). No 14º dia pós-operatório, os valores foram $2,05 \pm 0,2$ kgf no grupo MK e $2,01 \pm 0,11$ kgf no SF, também sem valor estatístico significativo ($p = 0,8455$). O GRÁFICO 4 ilustra estes resultados obtidos.

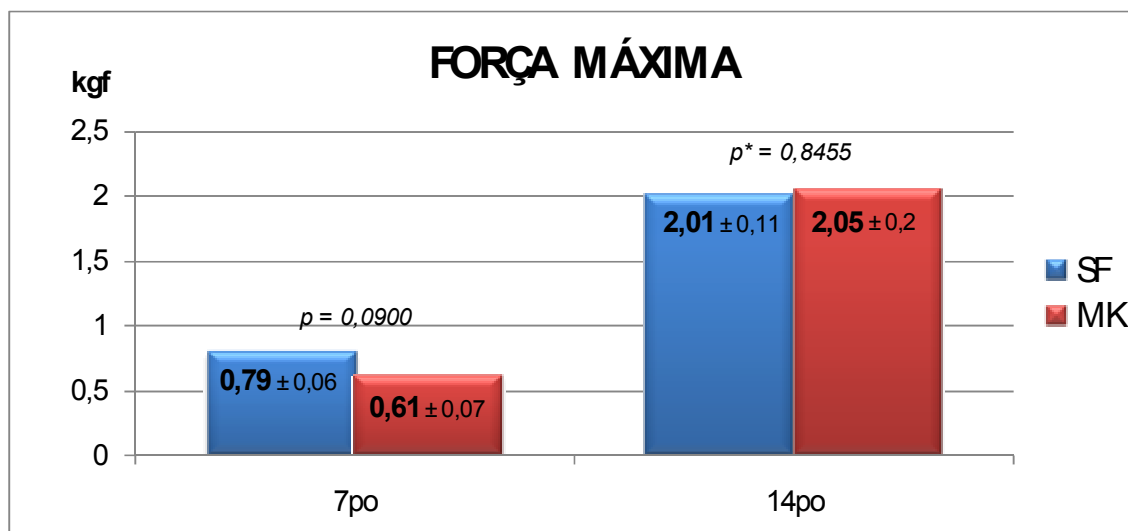


GRÁFICO 4 – AVALIAÇÃO TENSIMÉTRICA, VARIÁVEL FORÇA MÁXIMA, NO GRUPO DE ESTUDO (MK) E CONTROLE (SF), NO 7º E 14º DIAS PÓS-OPERATÓRIOS: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (kgf) E VALORES ESTATÍSTICOS (p).

p : teste estatístico t de Student; p^* : teste estatístico t de Aspin-Welch.

4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO

4.5.1 Ferida incisional

A densitometria das fibras colágenas na ferida incisional foi realizada em dois tempos pós-operatórios. No 7º dia, o grupo MK apresentou média de $40,8 \pm 4,68\%$ de fibras colágenas imaturas e $59,2 \pm 4,68\%$ de fibras maduras, enquanto no grupo SF estes valores foram de $38,5 \pm 7,83\%$ e $61,5 \pm 7,83\%$, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,8041$) (GRÁFICO 5).

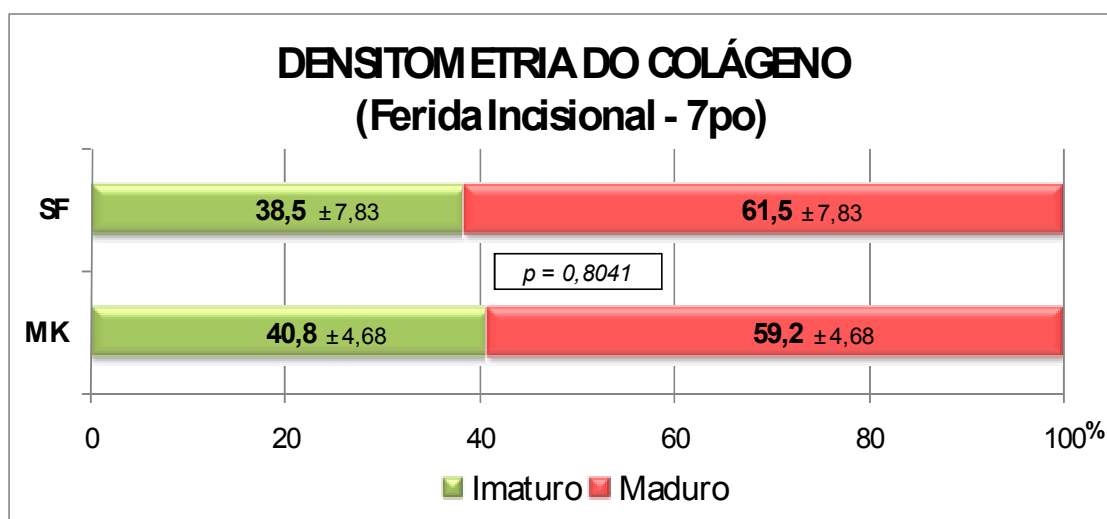


GRÁFICO 5 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA INCISIONAL, NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p).

p : teste estatístico *t de Student*.

No 14º dia pós-operatório, a avaliação da densidade das fibras colágenas no grupo MK evidenciou média de $55,2 \pm 6,17\%$ de fibras imaturas e $44,8 \pm 6,17\%$ de fibras maduras, enquanto no grupo SF estes valores foram de $35,2 \pm 6,9\%$ e $64,8 \pm 6,9\%$, respectivamente. A diferença entre os dois grupos na maturação das fibras colágenas foi estatisticamente significativa ($p = 0,0394$) (GRÁFICO 6).

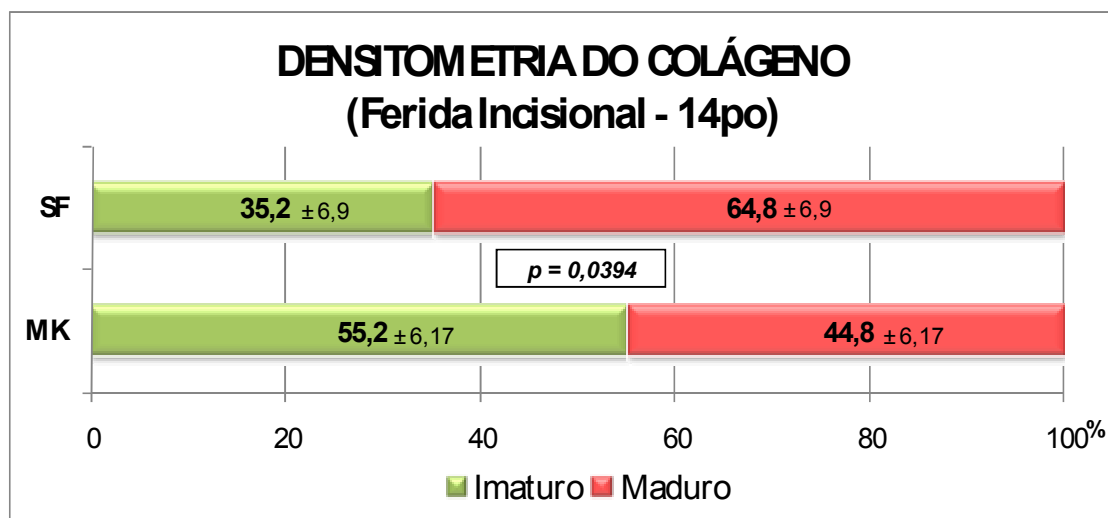


GRÁFICO 6 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA INCISIONAL, NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p).

p : teste estatístico *t de Student*.

4.5.2 Ferida excisional

A densitometria das fibras colágenas na área cruenta também foi realizada em dois tempos pós-operatórios. No 7º dia, o grupo MK apresentou média de $59,9 \pm 6,88\%$ de fibras imaturas e $40,1 \pm 6,88\%$ de fibras maduras, enquanto no grupo SF estes valores foram de $38,8 \pm 8,02\%$ e $61,2 \pm 8,02\%$, respectivamente. O valor estatístico foi marginalmente significativo para as diferenças de maturação entre os dois grupos ($p = 0,0607$) (GRÁFICO 7).

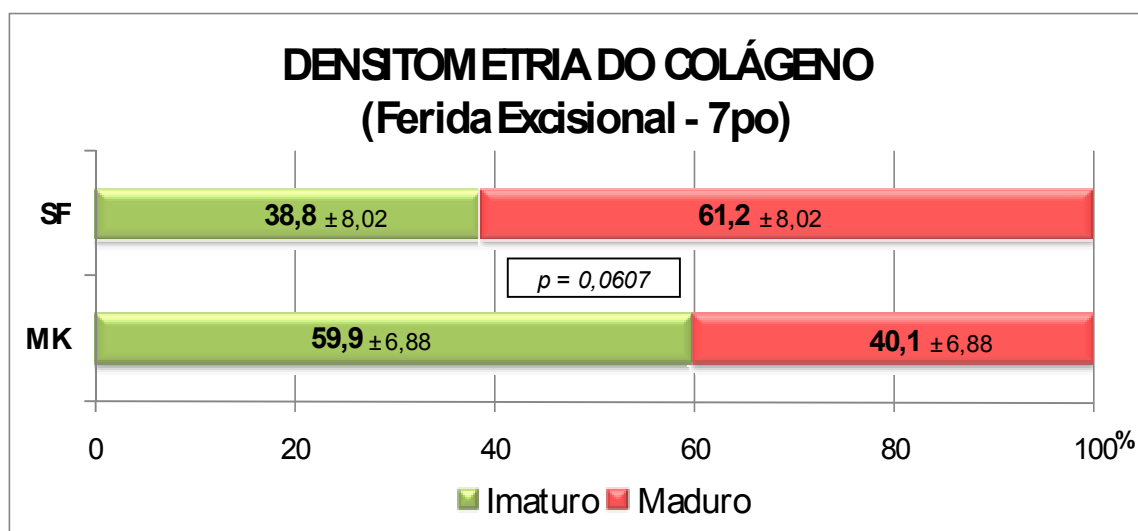


GRÁFICO 7 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA EXCISIONAL, NO 7º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p).

p : teste estatístico *t de Student*.

No 14º dia pós-operatório, a avaliação da densidade das fibras colágenas no grupo MK evidenciou média de $74 \pm 5,66\%$ de fibras imaturas e $26 \pm 5,66\%$ de fibras maduras, enquanto no grupo SF estes valores foram de $31,7 \pm 7,76\%$ e $68,3 \pm 7,76\%$, respectivamente. A diferença entre os dois grupos na maturação das fibras colágenas foi estatisticamente significativa ($p = 0,0001$) (GRÁFICO 8).

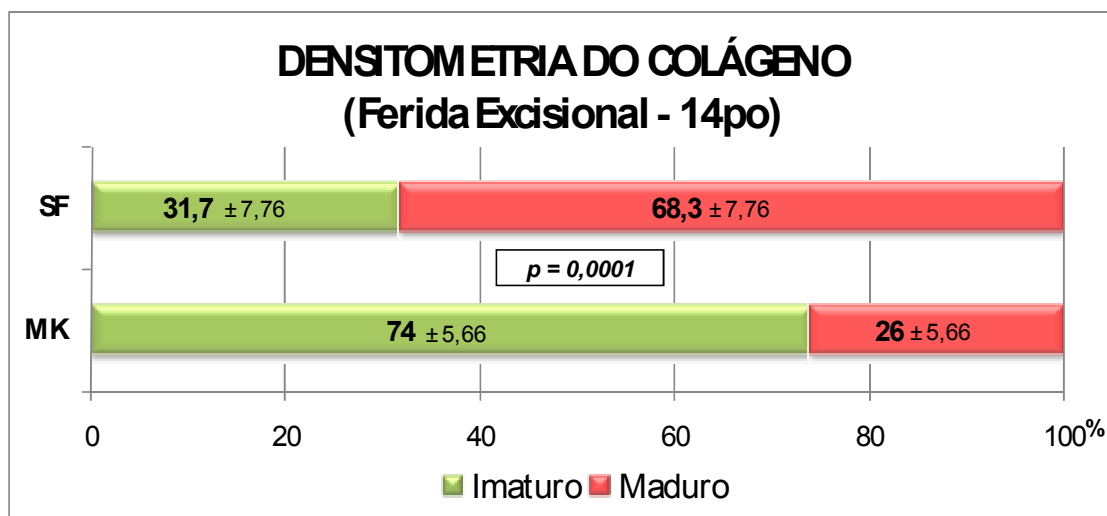


GRÁFICO 8 – DENSITOMETRIA DAS FIBRAS COLÁGENAS NA FERIDA EXCISIONAL, NO 14º DIA PÓS-OPERATÓRIO: VALORES MÉDIOS \pm ERRO PADRÃO (%) E VALOR ESTATÍSTICO (p).

p : teste estatístico *t de Student*.

5 DISCUSSÃO

As bridas ou contraturas cutâneas têm representado grande desafio para cirurgiões e pacientes. Algumas medidas preventivas como fisioterapia e compressão mecânica ajudam, embora de forma discreta, na prevenção e melhora das contraturas cutâneas. O tratamento cirúrgico, no entanto, através de enxertos e retalhos cutâneos, permanece ainda como a melhor opção para esta deformidade (SCHWARZ, 2007). Tendo em vista as propriedades antiinflamatórias e de inibição do fenômeno de contração recentemente evidenciados com o uso dos ARLT, a possibilidade de prevenção e tratamento clínico também para as bridas ou contraturas cutâneas surge como uma hipótese a ser pesquisada.

No presente estudo, investigou-se a interferência do ARLT montelucaste no processo de contração e cicatrização cutânea em ratos. Tendo em vista a comprovada eficácia e biodisponibilidade desta droga quando utilizada em dose única diária por via oral (JONES *et al.*, 1995; MARKHAM e FAULDS, 1998; SINGULAIR, 2007), realizou-se diluição da apresentação comercialmente disponível (*Singulair*[®], comprimidos de 10 mg) e administração única diária através de sondagem orogástrica, sob sedação inalatória. Este método garantiu completa administração da dose diária calculada para cada animal. Revisando a literatura, observou-se grande variação posológica da droga em diferentes estudos experimentais, tanto em relação à via de administração, quanto à dosagem utilizada. No presente estudo, utilizou-se uma das posologias mais freqüentemente encontradas nas publicações (SENER *et al.*, 2005b; SENNER *et al.*, 2005c; ROCHA *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2003; HOLMA *et al.*, 2001), incluindo a utilizada em modelos de intervenção cutânea (KABASAKAL *et al.*, 2005; SENNER *et al.*, 2005a).

Embora os modelos experimentais de cicatrização cutânea mais freqüentemente utilizados sejam o incisional e o excisional isolados (DOSETT-MARTIN, 2004) optou-se pelo modelo misto, a fim de melhor avaliar, em um único animal, os efeitos da droga no fenômeno de contração (ferida excisional) e resistência cicatricial (ferida incisional). O modelo excisional esteve de acordo com a maioria dos estudos reportados na literatura. A ferida de espessura total permitiu avaliar o fenômeno de contração com maior intensidade, visto que em modelos de espessura parcial a reepitelização assume maior importância que a contração no

fechamento da ferida (DAVIDSON, 1998; MOGFORD e MUSTOE, 2001; DOSETT-MARTIN, 2004). Montandon, D'Anoiran e Gabbiani (1977) recomendaram que os modelos excisionais tivessem forma quadrada, de pelo menos 2 cm x 2 cm, visto que, segundo o autor, modelos excisionais circulares apresentavam menor taxa de contração. No presente estudo, a ferida excisional com estas dimensões criou área cruenta média de $728 \pm 11,67 \text{ mm}^2$ no grupo MK e $719 \pm 9,87 \text{ mm}^2$ no grupo SF, sem valor estatisticamente significativo para esta diferença. Com este modelo, observou-se nítida e progressiva taxa de contração da ferida excisional em todos os tempos avaliados, sem apresentar fechamento completo da área cruenta ao final do estudo (14º dia pós-operatório). Assim, tendo em vista algumas propriedades peculiares da pele dos ratos que, supostamente aumentariam a taxa de contração – animais de “pele frouxa” – (MOGFORD e MUSTOE, 2001) associado às características do desenho excisional realizado neste estudo, potencializou-se o fenômeno de contração cicatricial, aumentando a sensibilidade a possíveis diferenças na taxa de contração entre os grupos.

Apesar de adequado para análise do processo de contração cicatricial, o modelo excisional não é ideal para avaliação do ganho de resistência mecânica pela ferida, principalmente em modelos experimentais agudos (DAVIDSON, 2001). Em vista disso, associou-se também uma ferida incisional na porção mais caudal do dorso do rato, descontínua com a área cruenta anterior, a qual foi fechada primariamente. Este modelo misto de cicatrização cutânea (excisional e incisional), apesar de pouco utilizado na literatura (DORSETT-MARTIN, 2004), mostrou-se bastante versátil e eficaz para avaliar os diferentes parâmetros cicatriciais estudados. Ele permitiu utilizar o modelo mais adequado para cada parâmetro analisado. O modelo excisional foi utilizado para avaliar o fenômeno de contração cicatricial, o modelo incisional permitiu a análise tensiométrica e ambos os modelos puderam ser usados no estudo histológico do colágeno. Se comparado aos modelos de feridas cutâneas isoladas, a escolha do modelo misto também permitiu diminuir o número de animais utilizados no experimento, sem, contudo, reduzir ou limitar o número de parâmetros cicatriciais estudados.

Quanto aos testes utilizados neste estudo para se calcular a taxa de contração das feridas, determinar a resistência tênsil da cicatriz e quantificar a maturação do colágeno, procurou-se utilizar métodos precisos, objetivos e quantitativos de avaliação, limitando ao máximo o julgamento subjetivo do

pesquisador ou examinador. Para quantificação da área cruenta da ferida excisional e, por conseguinte, do fenômeno de contração cicatricial, ao invés da transferência manual em papéis semi-transparentes e cálculo da área por meio de tabelas planimétricas (DAVIDSON, 2001), utilizou-se método fotográfico-computadorizado. As fotos digitais das feridas foram realizadas à distância-padrão em todos os animais, nos diversos dias avaliados. Ainda, a fim de corrigir pequenas diferenças de distância câmera-objeto, todas as imagens continham uma régua graduada em milímetros ao nível da ferida. As áreas cruentas foram então medidas em computador, através de programa específico para este fim, com alto grau de precisão.

O resultado encontrado na primeira semana evidenciou área cruenta média progressivamente maior no grupo MK em relação ao SF, com diferença estatisticamente significativa no 5º e 7º dias pós-operatórios. Na segunda semana, esta diferença entre os grupos diminuiu, porém ainda se manteve maior no grupo MK, apresentando diferença estatisticamente significativa no 14º dia pós-operatório. A taxa de contração das feridas, entretanto, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando se comparou a redução da área cruenta nos diversos dias pós-operatórios com a área cruenta inicial. Com isso, apesar da área cruenta média mostrar-se estatisticamente maior no grupo MK em relação ao SF em vários tempos pós-operatórios, não foi encontrada diferença na taxa de contração das feridas entre os dois grupos.

A ação dos ARLT no fenômeno de contração cicatricial foi sugerida após observações clínicas de melhora na contratura capsular de implantes mamários de silicone (SCHLESINGER *et al.*, 2002; GRYSKIWICZ, 2003; REID, GREVE e CASAS, 2005; SCUDERI *et al.*, 2006). Corroborando com estes relatos clínicos, Bastos *et al.* (2005 e 2007) realizaram estudo experimental avaliando a ação do ARLT zafirlucaste na contração capsular de mini-próteses de silicone implantadas no subcutâneo de ratas. Noventa dias após a implantação, evidenciou-se redução significativa na pressão interna das próteses texturizadas no grupo que recebeu o ARLT, sugerindo efeito inibitório desta droga na contratura capsular deste tipo de implante. Assim, confrontando os resultados do presente trabalho com os achados clínicos e o estudo experimental que evidenciaram diminuição da contratura capsular com o uso de ARLT, observa-se que o efeito inibitório destas drogas no fenômeno de contração provavelmente seja influenciado pela presença do corpo estranho, o

implante de silicone. De forma semelhante, a eficácia dos ARLT no controle de processos alérgico-inflamatórios nas vias aéreas, como asma e rinite alérgica, está relacionada à inibição do processo inflamatório gerada em resposta aos fatores estimulantes ou alergênicos utilizados (LEICK-MALDONADO, 2004; SAITO, 2004). No presente experimento, o processo de contração cicatricial nas feridas excisionais se fez de forma espontânea, ou seja, nenhum estímulo externo como substâncias alergênicas foi aplicado nas áreas cruentas, bem como nenhum material aloplástico foi implantado nas feridas estudadas. Estas evidências reforçam a hipótese de que o mecanismo de ação dos ARLT na inibição do fenômeno de contração seja intermediado por fatores estimulantes da resposta inflamatória, não mostrando atividade inibitória no processo de contração cicatricial espontânea.

Quanto ao tipo de teste realizado para avaliar a resistência mecânica das cicatrizes, o método tensiométrico, freqüentemente descrito na literatura (GOTTRUP, AGREN e KARLSMARK, 2000; DOSETT-MARTIN, 2004) foi utilizado no 7º e 14º dias pós-operatórios. Apesar da menor quantidade de fibras colágenas maduras presentes nas feridas incisionais dos grupos de estudo, nenhuma variável do teste de resistência à tração mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de estudo e controle.

A análise qualitativa do colágeno pela coloração de *picrosirius-red* e método de densitometria sob luz polarizada, devido às características próprias da técnica, também minimizou a interferência do examinador na avaliação das lâminas histológicas. O patologista identificou, de forma padronizada, o campo histológico a ser analisado. Em seguida, com auxílio de programa específico de computador, a maturação do colágeno cicatricial foi quantificada quanto à porcentagem de fibras maduras (tipo I) e imaturas (tipo III). A avaliação das feridas incisional e excisional não evidenciou diferença significativamente estatística quanto ao grau de diferenciação colágena no 7º dia pós-operatório. No 14º dia, contudo, o grau de maturação das fibras colágenas foi significativamente menor no grupo MK em relação ao SF, em ambos os modelos de ferida cutânea. Isto sugere que as propriedades antiinflamatórias do ARLT montelucaste exercem significativo efeito inibitório no processo de maturação colágena. Estes efeitos parecem ser progressivos, haja vista a maior diferença encontrada no grupo submetido à eutanásia mais tardiamente. Além disso, as diferenças na maturação colágena encontrada no 7º e 14º dias pós-operatórios foram maiores na ferida excisional,

provavelmente devido ao processo cicatricial mais intenso nas áreas cruentas sob cicatrização espontânea, em relação às feridas incisadas fechadas primariamente. Bastos *et al.* (2007), dentre outros parâmetros analisados no seu estudo com mini-implantes de silicone em ratas, realizaram avaliação histológica das cápsulas fibrosas das próteses implantadas. Utilizando coloração de hematoxilina-eosina e *picrosirius-red*, os autores evidenciaram cápsulas fibrosas mais finas e com menor densidade colágena em torno das próteses texturizadas implantadas nos grupos que receberam o ARLT.

Por conseguinte, os efeitos dos ARLT no processo de contração e cicatrização, de forma geral, permanecem indefinidos, porém encorajadores e estimuladores para novas pesquisas. Os dados do presente estudo sugerem efeito inibitório do montelucaste no processo de maturação colágena em feridas cutâneas de ratos. Embora valores pouco significativos tenham sido encontrados na redução da resistência tênsil e no processo de contração cicatricial, outros estudos nesta linha devem ser desenvolvidos, a fim de se comprovar os reais efeitos desta nova classe de drogas antiinflamatórias na cicatrização cutânea. Perspectivas futuras apontam para possível aplicação clínica dos ARLT na prevenção e tratamento de processos cicatriciais exacerbados ou desregulados, como as contraturas cicatriciais cutâneas, contribuindo ou mesmo substituindo outras formas terapêuticas atualmente disponíveis, muitas das quais pouco eficazes, dolorosas e de maior risco.

6 CONCLUSÕES

O modelo experimental misto de cicatrização cutânea em ratos é bastante factível e permite adequada avaliação de diferentes parâmetros cicatriciais em uma única amostra de animais.

O presente estudo evidenciou que o ARLT montelukaste não altera a taxa de contração cicatricial espontânea em feridas cutâneas excisionais de ratos.

O montelukaste também não reduz de forma significativa a resistência tênil de feridas cutâneas incisionais nos ratos.

Todavia, o montelukaste apresenta significativo e progressivo efeito inibitório no processo de maturação das fibras colágenas cicatriciais em modelos de ferida cutânea incisional e, principalmente, excisional de ratos.

REFERÊNCIAS

- AHARONY, D. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, Philadelphia, v. 157 (suppl.), p. 214-218, 1998.
- ACCOLATE/zafirlukast: tablets. Wilmington, DE, USA. AstraZeneca Pharmaceuticals, 2003. 1 prescribing information.
- ACTIS, G. C.; BUGIANESI, E.; OTTOBRELLI, A.; RIZZETTO, M. Fatal liver failure following food supplements during chronic treatment with montelukast. **Dig. Liver Dis.**, Amsterdam, v. 39, p. 953-955, 2007.
- BARBUL, A. Immune aspects of wound repair. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, v. 17, p. 433-442, 1990.
- BASTOS, E. M. **Efeito do zafirlukast na contratura capsular de implantes de silicone, em ratas**. 87 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Plástica Reparadora) – Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica Reparadora, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 2005.
- BASTOS, E. M.; NETO, M. S.; ALVES, M. T.; GARCIA, E. B.; SANTOS, R. A.; HEINK, T.; PEREIRA, J. B.; FERREIRA, L. M. Histologic analysis of zafirlukast's effect on capsule formation around silicone implants. **Aesthetic Plast. Surg.**, New York, v. 31, p. 559-565, 2007.
- BEHRANWALA, K. A.; DUA, R. S.; ROSS, G. M.; WARD, A.; A'HERN, R.; GUI, G. P. The influence of radiotherapy on capsule formation and aesthetic outcome after immediate breast reconstruction using bidimensional anatomical expander implants. **J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.**, Amsterdam, v. 59, p. 1043-1051, 2006.
- BELL, E.; EHRLICH, H. P.; BUTTLE, D. J.; NAKATSUJI, T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. **Science**, Washington, v. 211, p. 1052-1054, 1981.
- BIGAL, M. E.; RAPOPORT, A. M.; SHEFTELL, F. D.; TEPPER, S. J. New migraine preventive options: an update with pathophysiological considerations. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo**, São Paulo, v. 57, p. 293-298, 2002.

BOOTH, B. A.; POLAK, K. L.; UITTO, J. Collagen biosynthesis by human skin fibroblasts: I. Optimization of the culture conditions for synthesis of type I and type III procollagens. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 607, p. 145-160, 1980.

BRISSETT, A. E.; SHERRIS, D. A. Scar contractures, hypertrophic scars, and keloids. **Facial Plast. Surg.**, New York, v. 17, p. 263-272, 2001.

BROCKLEHURST, W. E. The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. **J. Physiol.**, Oxford, v. 151, p. 416-435, 1960.

BROWN, E. J. Phagocytosis. **Bioessays**, New York, v. 17, p. 109-117, 1995.

CHEN, S.; JIN, G.; SHAN, J.; ZHANG, M.; MEN, Q.; XU, L. Cardioprotective effect and influence on NOS expression of Montelukast sodium in rats. **Yao Xue Xue Bao**, Zhongguo, v. 38, p. 821-825, 2003.

CLARK, R. A. F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996.

CLARK, R. A. F.; FOLKVORD, J. M.; HART, C. E.; MURRAY, M. J.; MCPHERSON, J. M. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 84, p. 1036-1040, 1989.

CLARK, R. A. F.; LANIGAN, J. M.; DELLAPELLE, P.; MANSEAU, E.; DVORAK, H. F.; COLVIN, R. B. Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. **J. Invest. Dermatol.**, New York, v. 79, p. 264-269, 1982.

COLEMAN, R. A., EGLIN, R. M.; JONES, R. L.; NARUMIYA, S.; SHIMIZU, T.; SMITH, W. L.; DAHLÉN, S-E.; DRAZEN, J. M.; GARDINER, P. J.; JACKSON, W. T.; JONES, T. R.; KRELL, R. D.; NICOSIA, S. Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. **Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.**, New York, v. 23, p. 283-285, 1995.

CROSS, S. E.; NAYLOR, I. L.; COLEMAN, R. A.; TEO, T. C. An experimental model to investigate the dynamics of wound contraction. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 48, p. 189-197, 1995.

CURRIE, G. P.; MCLAUGHLIN, K. The expanding role of leukotriene receptor antagonists in chronic asthma. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, McLean, v. 97, p. 731-741, 2006.

DAHLEN, S. E.; HEDQVIST, P.; HAMMARSTROM, S.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. **Nature**, Basingstoke, v. 288, p. 484-486, 1980.

DANESHJOO, R.; J TALLEY, N. Eosinophilic gastroenteritis. **Curr. Gastroenterol. Rep.**, Philadelphia, v. 4, p. 366-372, 2002.

DARBY, I.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. **Lab. Invest.**, Hagerstown, v. 63, p. 21-29, 1990.

DAVIDSON, J. M. Animal models for wound repair. **Arch. Dermatol. Res.**, Berlin, v. 290 (suppl.), p. 1-11, 1998.

DAVIDSON, J. M. Experimental animal wound models. **Wounds**, [S.I.], v. 13, p. 9-23, 2001.

DAWSON, B.; TRAPP, R. G. **Bioestatística básica e clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana do Brasil, 2003.

DEMPSEY, O. J. Leukotriene receptor antagonist therapy. **Postgrad. Med. J.**, London, v. 76, p. 767-773, 2000.

DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of the myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 391-423.

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

DETMAR, M.; BROWN, L. F.; BERSE, B.; JACKMAN, R. W.; ELICKER, B. M.; DVORAK, H. F.; CLAFFEY, K. P. Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. **J. Invest. Dermatol.**, Baltimore, v. 108, p. 263-268, 1997.

DEUEL, T. F.; SENIOR, R. M.; HUANG, J. S.; GRIFFIN, G. L. Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 69, p. 1046-1049, 1982.

DIEGELMANN, R. F. Cellular and biochemical aspects of normal and abnormal wound healing: an overview. **J. Urol.**, Hagerstown, v. 157, p. 298-302, 1997.

DORSETT-MARTIN, W. A. Rat models of skin wound healing: a review. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 12, p. 591-599, 2004.

DRAZEN, J. M.; ISRAEL, E.; O'BYRNE, P. M. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 340, p. 197-206, 1999.

EFRON, D. T.; MOST, D.; SHI, H. P.; TANTRY, U. S.; BARBUL, A. A novel method of studying wound healing. **J. Surg. Res.**, New York, v. 98, p. 16-20, 2001.

EHRlich, H. P.; KRUMMEL, T. M. Regulation of wound healing from a connective tissue perspective. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 4, p. 203-210, 1996.

FALANGA V. Growth factors and wound healing. **J. Dermatol. Surg. Oncol.**, New York, v. 19, p. 711-714, 1993.

FOLKMAN, J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. **EXS**, Birkhäuser, v. 79, p. 1-8, 1997.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: initiation and control. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 401, p. 212-227, 1982.

FOLKMAN, J.; D'AMORE, P. A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, Cambridge, v. 87, p. 1153-1155, 1996.

GABBIANI, G.; CHAPONNIER, C.; HUTTNER, I. Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 76, p. 561-568, 1978.

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v. 69, p. 513-521, 2001.

GOLIGER, J. A.; PAUL, D. L. Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. **Mol. Biol. Cell.**, Bethesda, v .6, p. 1491-1501, 1995.

GOTTRUP, F.; AGREN, M. S.; KARLSMARK, T. Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 8, p. 83-96, 2000.

GRAY, A. J.; BISHOP, J. E.; REEVES, J. T.; LAURENT, G. J. Aa and Bb chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. **J. Cell. Sci.**, Cambridge, v. 104, p. 409-413, 1993.

GRYSKIEWICZ, J. M. Investigation of Accolate and Singulair for treatment of capsular contracture yields safety concerns. **Aesthetic Surg. J.**, St. Louis, v. 23, p. 98-102, 2003.

GUO, N.; KRUTZSCH, H. C.; INMAN, J. K.; ROBERTS, D. D. Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 57, p. 1735-1742, 1997.

HANDEL, N.; CORDRAY, T.; GUTIERREZ, J.; JENSEN, J. A. A long-term study of outcomes, complications, and patient satisfaction with breast implants. **Plast. Reconstr. Surg.**, Hagerstown, v. 117, p. 757-767, 2006.

HAY, D. W. P. Pharmacology of leukotriene receptor antagonists: more than inhibitors of bronchoconstriction. **Chest**, Northbrook, 1997; v. 111 (suppl. 2), p. 35-45.

HELDIN, C-H.; WESTERMARK, B. Role of platelet-derived growth factor *in vivo*. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 249-273.

HELL, E.; LAWRENCE, J. C. The initiation of epidermal wound healing in cuts and burns. **Br. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 60, p. 171-179, 1979.

HOLMA, R.; SALMENPERA, P.; RIUTTA, A.; VIRTANEN, I.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Acute effects of the cys-leukotriene-1 receptor antagonist, montelukast, on experimental colitis in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 429, p. 309-318, 2001.

HOSGOOD, G. Wound healing. The role of platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta. **Vet. Surg.**, Philadelphia, v. 22, p. 490-495, 1993.

HUDSON, D. A.; RENSHAW, A. An algorithm for the release of burn contractures of the extremities. **Burns**, Oxford, v. 32, p. 663-668, 2006.

ILAN, N.; MAHOOTI, S.; MADRI, J. A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v. 111, p. 3621-3631, 1998.

JONES, T. R.; LABELLE, M.; BELLEY, M.; CHAMPION, E.; CHARETTE, L.; EVANS, J.; FORD-HUTCHINSON, A. W.; GAUTHIER, J. Y.; LORD, A.; MASSON, P.; et al. Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 73, p. 191-201, 1995.

JORGENSEN, P. H. Growth hormone, skin and wound healing: experimental studies in the rat. **APMIS**, Copenhagen, v. 72 (suppl. 105), p. 1-54, 1997.

KABASAKAL, L.; SENER, G.; CETINEL, S.; CONTUK, G.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Burn-induced oxidative injury of the gut is ameliorated by the leukotriene receptor blocker montelukast. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 72, p. 431-440, 2005.

KALEBIC, T.; GARBISA, S.; GLASER, B.; LIOTTA, L. A. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. **Science**, Washington, v. 221, p. 281-283, 1983.

KATZ, M. H.; ALVAREZ, A. F.; KIRSNER, R. S.; EAGLSTEIN, W. H.; FALANGA, V. Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 25, p. 1054-1058, 1991.

KIRSNER, R. S.; EAGLSTEIN, W. H. The wound healing process. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 11, p. 629-640, 1993.

KOHN, D. F.; CLIFFORD, C. B. Biology and diseases of rats. In: Fox, J. G.; Anderson, L. C.; Loew, F. M.; Quimbly, F. W. (Ed.). **Laboratory animal medicine**. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2002, p. 121-165.

KULLANDER, S.; OLSSON, A. On the tensile strength of healing cutaneous wounds in pregnant rats. **Acta Endocrinol.**, Copenhagen, v. 41, p. 314–320, 1962.

KUNKEL, S. L.; STANDIFORD, T.; KASAHARA, K.; STRIETER, R. M. Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein–1 (MCP-1) gene expression. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 305, p. 65-71, 1991.

KURKINEN, M.; VAHERI, A.; ROBERTS, P. J.; STENMAN, S. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. **Lab. Invest.**, New York, v. 43, p. 47-51, 1980.

LEIBOVICH, S. J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair: a study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 78, p. 71-100, 1975.

LEICK-MALDONADO, E. A.; KAY, F. U.; LEONHARDT, M. C.; KASAHARA, D. I.; PRADO, C. M.; FERNANDES, F. T.; MARTINS, M. A.; TIBERIO, I. F. Comparison of glucocorticoid and cysteinyl leukotriene receptor antagonist treatments in an experimental model of chronic airway inflammation in guinea-pigs. **Clin. Exp. Allergy**, Oxford, v. 34, p. 145-152, 2004.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 25, p. 9-18, 2007.

LI, J.; ZHANG, Y. P.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 60, p. 107-114, 2003.

LINDBLAD, W. Animal models in wound healing research: do we need more? **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 8, p. 81–82, 2000.

LIPWORTH, B. J. Leukotriene-receptor antagonists. **Lancet**, London, v. 353, p. 57-62, 1999.

LIU, W.; MEHRARA, B.J.; CHIN, G.S.; HSU, M.; PELED, Z.; LONGAKER, M.T. The use of newborn rats and an adenoviral gene delivery vector as a model system for wound-healing research. **Ann. Plast. Surg.**, Boston, v. 44, p. 543-551, 2000.

MADLENER, M.; PARKS, W.C.; WERNER, S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 242, p. 201-210, 1998.

MARKHAM, A.; FAULDS, D. Montelukast. **Drugs**, Auckland, v. 2, p. 251-256, 1998.

MIGNATTI, P.; RIFKIN, D. B.; WELGUS, H. G.; PARKS, W. C. Proteinases and tissue remodeling. In: CLARK, R.A.F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 427-474.

MOGFORD, J. E.; MUSTOE, T. A. Experimental models of wound healing. In: FALANGA, V. (Ed.). **Cutaneous wound healing**. London: Martin Dunitz, 2001, p. 109-122.

MONTANDON, D.; D'ANOIRAN, G.; GABBIANI, G. The mechanism of wound contraction and epithelialization: clinical and experimental studies. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, v. 4, p. 325-346, 1977.

MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor-*b* stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 85, p. 4894-4897, 1988.

MUDERA, V.; EASTWOOD, M.; MCFARLAND, C.; BROWN, R. A. Evidence for sequential utilization of fibronectin, vitronectin, and collagen during fibroblast-mediated collagen contraction. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 10, p. 397-408, 2002.

MURPHY, R. C.; HAMMARSTRÖM, S.; SAMUELSSON, B. Leukotriene C₄, a slow reacting substance (SRS) from mouse mastocytoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 76, p. 4275-4279, 1979.

NAGAPPA, A. N.; CHERIYAN, B. Wound healing activity of the aqueous extract of *Thespesia populnea* fruit. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 72, p. 503-506, 2001.

NANNEY, L. B.; KING, L. E. Jr. Epidermal growth factor and transforming growth factor-*a*. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 171-194.

NAYAK, A. A review of montelukast in the treatment of asthma and allergic rhinitis. **Expert. Opin. Pharmacother.**, London, v. 5, p. 679-686, 2004.

NISSEN, N. N.; POLVERINI, P. J.; KOCH, A. E.; VOLIN, M. V.; GAMELLI, R. L.; DIPIETRO, L. A. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 152, p. 1445-1452, 1998.

NOLI, C.; MIOLO, A. The mast cell in wound healing. **Vet. Dermatol.**, Oxford, v. 12, p. 303-313, 2001.

O'BYRNE, P. M. Leukotrienes in the pathogenesis of asthma. **Chest**, Northbrook, v. 111, (suppl. 2), p. 27-34, 1997.

PALADINI, R. D.; TAKAHASHI, K.; BRAVO, N. S.; COULOMBE, P. A. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. **J. Cell. Biol.**, v. 132, p. 381-397, 1996.

PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases in repair. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 7, p. 423-432, 1999.

PEARLSTEIN, E. Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. **Nature**, Basingstoke, v. 262, p. 497-500, 1976.

PHILLIPS, S. J. Physiology of wound healing and surgical wound care. **ASAIO J.**, Hagerstown, v. 46, p. 2-5, 2000.

PIRILA, E.; PARIKKA, M.; RAMAMURTHY, N. S.; MAISI, P.; MCCLAIN, S.; KUCINE, A.; TERVAHARTIALA, T.; PRIKK, K.; GOLUB, L. M.; SALO, T.; SORSA, T. Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: effects on matrix metallo-proteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 gamma2-chain. **Wound Repair Regen.**, Malden, v. 10, p. 38-51, 2002.

POSTLETHWAITE, A. E.; KANG, A. H. Collagen- and collagen peptide-induced chemotaxis of human blood monocytes. **J. Exp. Med.**, New York, v. 143, p. 1299-1307, 1976.

RACKAL, J. M.; VENDER, R. B. The treatment of atopic dermatitis and other dermatoses with leukotriene antagonists. **Skin Therapy Lett.**, Vancouver, v. 9, p. 1-5, 2004.

REID, R. R.; GREVE, S. D.; CASAS, L. A. The effect of Zafirlukast (Accolate) on early capsular contracture in the primary augmentation patient: a pilot study. **Aesthetic Surg. J.**, St. Louis, v. 25, p. 26-30, 2005.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, Basingstoke, v. 386, p. 671-674, 1997.

ROBERTS, A. B.; SPORN, M. B. Transforming growth factor-*b*. In: CLARK, R. A. F. (Ed.). **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York: Plenum, 1996, p. 275-308.

ROCHA, F. A. da; TEIXEIRA, M. M.; ROCHA, J. C. GIRAIO, V. C.; BEZERRA, M. M.; RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. Blockade of leukotriene B4 prevents articular incapacitation in rat zymosan-induced arthritis. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 497, p. 81-86, 2004.

SAITO, H.; MORIKAWA, H.; HOWIE, K.; CRAWFORD, L.; BAATJES, A. J.; DENBURG, E.; CYR, M. M.; DENBURG, J. A. Effects of a cysteinyl leukotriene receptor antagonist on eosinophil recruitment in experimental allergic rhinitis. **Immunology**, Oxford, v. 113, p. 246-252, 2004.

SAPIRSTEIN, A.; BONVENTRE, J. V. Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A(2) as defined by gene knockouts. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1488, p. 139-148, 2000.

SASS, D. A.; CHOPRA, K. B.; WU, T. A case of montelukast-induced hepatotoxicity. **Am. J. Gastroenterol.**, New York, v. 98, p. 704-5, 2003.

SCHIRO, J. A.; CHAN, B. M.; ROSWIT, W. T.; KASSNER, P. D.; PENTLAND, A. P.; HEMLER, M. E.; EISEN, A. Z.; KUPPER, T. S. Integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2) mediates reorganization and contraction of collagen matrices by human cells. **Cell**, Cambridge, v. 67, p. 403-410, 1991.

SCHLESINGER, S. L.; ELLENBOGEN, R.; DESVIGNE, M. N.; SVEHLAK, S.; HECK, R. Zafirlukast (Accolate): a new treatment for capsular contracture. **Aesthetic Surg. J.**, St. Louis, v. 22, p. 329-336, 2002.

SCHMIDT, B. Z.; COLTEN, H. R. Complement: a critical test of its biological importance. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 178, p. 166-76, 2000.

SCHNEIDER, J. C.; HOLAVANAHALLI, R.; HELM, P.; GOLDSTEIN, R.; KOWALSKE, K. Contractures in burn injury: defining the problem. **J. Burn Care Res.**, Hagerstown, v. 27, p. 508-514, 2006.

SCHOORS, D. F.; DE SMET, M.; REISS, T.; MARGOLSKEE, D.; CHENG, H.; LARSON, P.; AMIN, R.; SOMERS, G. Single dose pharmacokinetics, safety and tolerability of MK-0476, a new leukotriene D4-receptor antagonist, in healthy volunteers. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, Oxford, v. 40, p. 277-280, 1995.

SCHWARZ, R. J. Management of postburn contractures of the upper extremity. **J. Burn Care Res.**, Hagerstown, v. 28, p. 212-219, 2007.

SCUDERI, N.; MAZZOCCHI, M.; FIORAMONTI, P.; BISTONI, G. The effects of zafirlukast on capsular contracture: preliminary report. **Aesthetic Plast. Surg.**, New York, v. 30, p. 513-520, 2006.

SENER, G.; KABASAKAL, L.; CETINEL, S.; CONTUK, G.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. **Burns**, Oxford, v. 31, p. 587-596, 2005a.

SENER, G.; KAPUCU, C.; CETINEL, S.; CIKLER, E.; AYANOGLU-DULGER, G. Gastroprotective effect of leukotriene receptor blocker montelukast in alendronat-induced lesions of the rat gastric mucosa. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 72, p. 1-11, 2005b.

SENER, G.; SEHIRLI, O.; CETINEL, S.; ERCAN, F.; YUKSEL, M.; GEDIK, N.; YEGEN, B. C. Amelioration of sepsis-induced hepatic and ileal injury in rats by the leukotriene receptor blocker montelukast. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, Edinburgh, v. 73, p. 453-462, 2005c.

SHARP, P.E.; LAREGINA, M.C. **The laboratory rat**. Boca Raton: CRC, 1998, p. 2.

SHERRY, B.; TEKAMP-OLSON, P.; GALLEGOS, C.; BAUER, D.; DAVATELIS, G.; WOLPE, S. D.; MASIARZ, F.; COIT, D.; CERAMI, A. Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. **J. Exp. Med.**, New York, v. 168, p. 2251-2259, 1988.

SIMPSON, D. M.; ROSS, R. The neutrophilic leukocyte in wound repair: a study with antineutrophil serum. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 51, p. 2009-2023, 1972.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 341, p. 738-746, 1999.

SINGER, I. I.; KAWKA, D. W.; KAZAZIS, D. M.; CLARK, R. A. In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. **J. Cell Biol.**, New York, v. 98, p. 2091-2106, 1984.

SINGULAIR/montelukast sodium: tablets. Whitehouse Station, NJ, USA. Merck & Co., 2007. 1 prescribing information.

STADELMANN, W. K.; DIGENIS, A. G.; TOBIN, G. R. Impediments to wound healing. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v. 176 (suppl. 2A), p. 39-47, 1998.

THORNTON, F. J.; SCHAFFER, M. R.; BARBUL, A. Wound healing in sepsis and trauma. **Shock**, Augusta, v. 8, p. 391-401, 1997.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 92, p. 827-839, 2003.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. F. Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. **J. Cell Biol.**, New York, v. 110, p. 133-145, 1990.

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**, Washington, v. 266, p. 819-822, 1994.

WITTE, M. B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 77, p. 509-528, 1997.

WOODLEY, D. T.; O'KEEFE, E. J.; PRUNIERAS, M. Cutaneous wound healing: a model for cell-matrix interactions. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 12, p. 420-433, 1985.

XU, J.; CLARK, R. A. F. Extracellular matrix alters PDGF regulation of fibroblast integrins. **J. Cell Biol.**, New York, v. 132, p. 239-249, 1996.

YARON, M.; ERIN, M. H.; HUFFER, W.; CAIRNS, C. Efficacy of tissue glue for laceration repair in an animal model. **Acad. Emerg. Med.**, Philadelphia, v. 2, p. 259-263, 1995.

YU, G. L.; WEI, E. Q.; ZHANG, S. H.; XU, H. M.; CHU, L. S.; ZHANG, W. P.; ZHANG, Q.; CHEN, Z.; MEI, R. H.; ZHAO, M. H. Montelukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, dose- and time-dependently protects against focal cerebral ischemia in mice. **Pharmacology**, Basel, v. 73, p. 31-40, 2005.

YUKSEL, H.; OZBILGIN, K.; COSKUN, S.; TUGLU, I. Protective effect of leukotriene receptor antagonist montelukast on smoking-induced lung injury in Wistar rats. **Acta Med. Okayama**, Okayama, v. 57, p. 13-19, 2003.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 2: Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 3: Citações e notas de rodapé.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 4: Referências.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 9: Redação e editoração.

MICHAELIS moderno dicionário inglês-português, português-inglês. 5. ed. São Paulo: Companhia Melhoramentos, 2000.

PUBMED: a service of the National Library of Medicine and the National Institutes of Health. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>>. Último acesso em: 05/11/2007.

DeCS-BVS: Descritores em Ciências da Saúde – Biblioteca Virtual em Saúde. Disponível em: <<http://www.decs.bvs.br/>>. Último acesso em: 19/11/2007.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/index.asp>>. Último acesso em: 05/11/2007.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/>>. Último acesso em: 05/11/2007.

FDA: U.S. Food and Drug Administration. Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Último acesso em: 05/11/2007.

SINGULAIR: msd. Disponível em:
<http://www.singulair.com.br/secure/about/about_singulair.html> e <
http://www.singulair.com/montelukast_sodium/singulair/hcp/asthma/index.jsp?WT.svl=1>. Último acesso em: 05/11/2007.

AZ-AIR: AstraZeneca. Disponível em: <http://www.az-air.com/phy_prod/accolate.asp>. Último acesso em: 05/11/2007.

ANEXOS

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO BÁSICA DA RAÇÃO BALANCEADA FORNECIDA AOS RATOS (NUVILAB CR1®)

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral vitamínico, aminoácidos (DL-metionina e lisina).
Umidade (máximo): 12,5%
Proteína bruta (mínimo): 22%
Cálcio (máximo): 1,4%
Fósforo (mínimo): 0,8%
Etrato etéreo (mínimo): 4%
Material mineral (máximo): 10%
Matéria fibrosa (máximo): 8%
Vitaminas: A, D3, E, K3, B1, B2, B6, B12, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina.
Microelementos: ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio, cobalto.

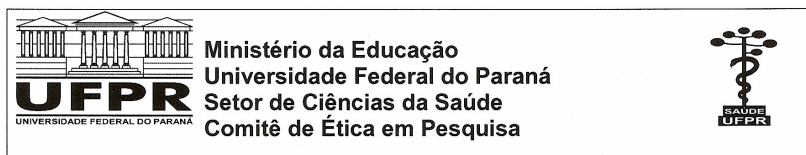
FONTE: Nuvital Nutrientes, Colombo, PR, Brasil

ANEXO 2 – COMPONENTES ATIVOS E INATIVOS DO MEDICAMENTO COMERCIAL SINGULAIR®

INGREDIENTES ATIVOS: Montelucaste sódico 10,4 mg (equivalente molar a 10,0 mg do ácido livre)
INGREDIENTES INATIVOS: Celulose microcristalina Lactose monoidratada Croscarmelose sódica Hidroxiopropilcelulose Estearato de magnésio <u>Revestimento:</u> Hidroxiopropilmetilcelulose Hidroxiopropilcelulose Dióxido de titânio Óxido vermelho de ferro Óxido amarelo de ferro Cera de carnaúba

FONTE: SINGULAIR (2007)

ANEXO 3 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPR.



Curitiba, 23 de novembro de 2007.

Ilmo (a) Sr. (a)
André Ricardo Dall'Oglio Tolazzi
Nesta

Prezado(a) Senhor(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Efeito do inibidor de leucotrieno montelucaste na cicatrização cutânea em ratos: avaliação tensiométrica, da contração cicatricial e da deposição de colágeno**” obedece os Princípios Éticos da Experimentação Animal, estabelecidos e aprovados em documento orientados, expedido pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião realizada no dia 01 de novembro de 2006 e apresentou pendências. Documentos analisados, depois de atendidas as pendências, e projeto aprovado em 22 de novembro de 2006.

Registro **CEP/SD**: AN.004.SM 007-06-11 FR: animais

Atenciosamente

Prof. Dr. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª. Dra. Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

ANEXO 4 – DADOS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DE ESTUDO (MK-7d e MK-14d).

RATO	Peso pré-op. (g)	Volume MK (ml)	Peso pós-op. (g)	Perda de peso (g)
MK1a-7d	óbito	óbito	óbito	óbito
MK1b-7d	330	1,65	305	-25
MK1c-7d	358	1,79	354	-4
MK1d-7d	370	1,85	377	7
MK1e-7d	328	1,64	318	-10
MK3a-7d	342	1,71	338	-4
MK3b-7d	342	1,71	322	-20
MK3c-7d	390	1,95	377	-13
MK3d-7d	338	1,69	328	-10
MK3e-7d	389	1,94	364	-25
MK5a-7d	346	1,73	327	-19
MK5b-7d	363	1,81	345	-18
MK5c-7d	372	1,86	316	-56
MK5d-7d	368	1,84	336	-32
MK5e-7d	390	1,95	365	-25
MK2a-14d	329	1,64	325	-4
MK2b-14d	413	2,06	394	-19
MK2c-14d	362	1,81	328	-34
MK2d-14d	280	1,4	275	-5
MK2e-14d	351	1,75	346	-5
MK4a-14d	361	1,8	352	-9
MK4b-14d	350	1,75	337	-13
MK4c-14d	348	1,74	330	-18
MK4d-14d	375	1,87	361	-14
MK4e-14d	394	1,97	370	-24
MK6a-14d	373	1,86	323	-50
MK6b-14d	362	1,81	311	-51
MK6c-14d	384	1,92	333	-51
MK6d-14d	360	1,8	325	-35
MK6e-14d	345	1,72	299	-46

Volume MK: volume da solução da droga em estudo (montelucaste sódico 2 mg/ml) administrada na concentração de 10 mg/kg/dia via orogástrica.

ANEXO 5 – DADOS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (SF-7d e SF-14d).

RATO	Peso pré-op. (g)	Volume SF (ml)	Peso pós-op. (g)	Perda de peso (g)
SF7a-7d	373	1,86	355	-18
SF7b-7d	385	1,92	378	-7
SF7c-7d	323	1,61	315	-8
SF7d-7d	346	1,73	342	-4
SF7e-7d	341	1,7	330	-11
SF9a-7d	370	1,85	355	-15
SF9b-7d	379	1,89	352	-27
SF9c-7d	325	1,62	310	-15
SF9d-7d	386	1,93	365	-21
SF9e-7d	347	1,73	333	-14
SF11a-7d	321	1,6	302	-19
SF11b-7d	380	1,9	356	-24
SF11c-7d	359	1,79	346	-13
SF11d-7d	352	1,76	334	-18
SF11e-7d	371	1,85	349	-22
SF8a-14d	362	1,81	359	-3
SF8b-14d	389	1,94	357	-32
SF8c-14d	385	1,92	367	-18
SF8d-14d	333	1,66	321	-12
SF8e-14d	394	1,97	397	3
SF10a-14d	345	1,72	338	-7
SF10b-14d	370	1,85	345	-25
SF10c-14d	381	1,9	351	-30
SF10d-14d	325	1,62	315	-10
SF10e-14d	371	1,85	352	-19
SF12a-14d	360	1,8	353	-7
SF12b-14d	355	1,77	344	-11
SF12c-14d	350	1,75	329	-21
SF12d-14d	300	1,5	290	-10
SF12e-14d	392	1,96	385	-7

Volume SF: volume correspondente da solução placebo (cloreto de sódio 0,9%) administrada via orogástrica.

ANEXO 6 – ÁREA CRUENTA MÉDIA (mm²) DA FERIDA EXCISIONAL DE CADA ANIMAL DO GRUPO DE ESTUDO, NOS DIFERENTES TEMPOS PÓS-OPERATÓRIOS.

RATO	Área po-0 (mm ²)	Área po-1 (mm ²)	Área po-3 (mm ²)	Área po-5 (mm ²)	Área po-7 (mm ²)	Área po-10 (mm ²)	Área po-14 (mm ²)
MK1a-7d	óbito	óbito	óbito	óbito	óbito	óbito	óbito
MK1b-7d	728,6	711,7	596,5	519,4	432,4	--	--
MK1c-7d	695,4	614,2	599,5	533	446,5	--	--
MK1d-7d	626,6	677	586,3	576,7	465,1	--	--
MK1e-7d	693	562,1	568,5	521,5	372,3	--	--
MK2a-14d	703,9	535,1	472,1	442,3	403,6	216,7	98,9
MK2b-14d	844,5	694,7	611,6	567,4	405,7	200,5	67,4
MK2c-14d	711,3	644,9	527,8	455,5	360,5	141,1	56,7
MK2d-14d	750,5	535,3	501,3	421,1	347,8	113,9	41
MK2e-14d	697,3	601,4	591,4	527,4	459,5	227,2	99,3
MK3a-7d	722,8	607,7	494,1	410,7	365,2	--	--
MK3b-7d	689,7	633,1	556,7	498,4	482,4	--	--
MK3c-7d	622,4	668,8	553,1	461,2	417,7	--	--
MK3d-7d	821,2	632,7	557,5	439,2	373,8	--	--
MK3e-7d	773	584,1	517,6	382,4	361,2	--	--
MK4a-14d	827,8	626,6	534,4	501,5	423,3	157,1	73,6
MK4b-14d	777,3	761	527,5	519,2	375,7	146	56,2
MK4c-14d	666,5	758,2	594,3	568	467,2	239,5	75,5
MK4d-14d	718,6	729	541,5	503,2	377,5	140,9	53,5
MK4e-14d	818,8	705,5	578,5	510,4	505,5	194,6	57,1
MK5a-7d	808,6	749,1	602,2	580,7	426,6	--	--
MK5b-7d	748,4	535,2	524,3	427,3	336,1	--	--
MK5c-7d	780,1	727	582,8	613,9	474	--	--
MK5d-7d	640,6	552,5	502,9	433,2	357	--	--
MK5e-7d	662,4	740,3	563,9	595,9	582,6	--	--
MK6a-14d	798,1	662,9	596,7	509,4	451,2	182	96,8
MK6b-14d	678	595,4	504,6	474,9	406	189,8	87,2
MK6c-14d	749,6	649,4	587,7	576,7	529,5	250,7	112,1
MK6d-14d	658,5	524,1	430,4	380,8	303,8	118,1	47,5
MK6e-14d	719,2	937,5	712,6	661	539,4	217	99,8

po-0: pós-operatório imediato; po-1 ao po-14: 1º ao 14º dia pós-operatório.

ANEXO 7 – ÁREA CRUENTA MÉDIA (mm²) DA FERIDA EXCISIONAL DE CADA ANIMAL DO GRUPO CONTROLE, NOS DIFERENTES TEMPOS PÓS-OPERATÓRIOS.

RATO	Área po-0 (mm ²)	Área po-1 (mm ²)	Área po-3 (mm ²)	Área po-5 (mm ²)	Área po-7 (mm ²)	Área po-10 (mm ²)	Área po-14 (mm ²)
SF7a-7d	771,7	590,4	527,1	476,8	330,9	--	--
SF7b-7d	798	624,5	480,8	392,4	284,6	--	--
SF7c-7d	720,3	543	515,4	513,8	371,5	--	--
SF7d-7d	695,6	589,2	471,3	417,7	302,3	--	--
SF7e-7d	849,3	684	549,1	498,2	407,1	--	--
SF8a-14d	763,5	687,8	520,9	373,1	340,1	123,5	32,4
SF8b-14d	692,6	719,8	594,6	476,9	378,9	148,9	44,1
SF8c-14d	718	664,1	560,3	435,2	340	121,7	20,2
SF8d-14d	774	632,9	455,1	437,3	275,6	117,7	25,1
SF8e-14d	686,8	632,5	543,7	442,6	349,8	93,5	29,4
SF9a-7d	714,1	594,7	576,4	519,1	482,9	--	--
SF9b-7d	670,3	779,9	605,6	548,7	525,4	--	--
SF9c-7d	661,4	590,7	549,7	479,2	459,7	--	--
SF9d-7d	711,5	702,3	584,3	489,3	463,2	--	--
SF9e-7d	733,2	573,2	556,2	477,5	408,7	--	--
SF10a-14d	687,5	517,1	425,1	461,1	348,9	124,7	40,5
SF10b-14d	705,1	681,7	597,1	593,2	491,9	409,3	211
SF10c-14d	814,6	650,5	592,7	532,5	464,9	424,8	328,2
SF10d-14d	641	548,5	509,1	489,4	390,6	160	44,6
SF10e-14d	777,4	561	480,7	465,1	333,7	163,7	59,2
SF11a-7d	649	525,2	453,5	349,5	271,4	--	--
SF11b-7d	658,9	614,6	537,3	455,6	342,9	--	--
SF11c-7d	711,6	657	540,2	427,5	404	--	--
SF11d-7d	686,8	625	588,3	539,9	429	--	--
SF11e-7d	769,4	670,8	577,7	448,8	399,9	--	--
SF12a-14d	668,7	617,2	517,3	473,7	368,9	123,4	39,1
SF12b-14d	712,7	577,1	499,2	450,4	388	153,8	66,3
SF12c-14d	780,9	590,6	536,3	470,3	299,3	100,6	30,5
SF12d-14d	715,6	379,3	341,3	270,8	222,8	66,3	22
SF12e-14d	633,8	661,1	553,7	549,1	451,1	164,5	69,2

po-0: pós-operatório imediato; po-1 ao po-14: 1º ao 14º dia pós-operatório.

ANEXO 8 – DADOS DA ANÁLISE TENSOMÉTRICA REALIZADA NOS ANIMAIS DOS GRUPOS DE ESTUDO (MK-7d e MK-14d).

RATO	TENSÃO MÁXIMA (kgf/cm²)	FORÇA MÁXIMA (kgf)
MK1a-7d	óbito	óbito
MK1b-7d	1,9978	0,8
MK1c-7d	1,4335	0,57
MK1d-7d	0,7887	0,32
MK1e-7d	1,4661	0,59
MK3a-7d	1,9278	0,77
MK3b-7d	1,2097	0,48
MK3c-7d	2,4226	0,97
MK3d-7d	1,7692	0,71
MK3e-7d	2,9685	1,19
MK5a-7d	0,7338	0,29
MK5b-7d	1,0033	0,4
MK5c-7d	1,4938	0,6
MK5d-7d	1,8387	0,74
MK5e-7d	0,497	0,2
MK2a-14d	6,1071	2,44
MK2b-14d	11,2924	4,52
MK2c-14d	3,8642	1,55
MK2d-14d	4,5253	1,81
MK2e-14d	4,521	1,81
MK4a-14d	4,5764	1,83
MK4b-14d	3,6426	1,46
MK4c-14d	4,7388	1,9
MK4d-14d	7,4569	2,98
MK4e-14d	5,9273	2,37
MK6a-14d	4,4742	1,79
MK6b-14d	4,8539	1,94
MK6c-14d	4,0859	1,63
MK6d-14d	3,8843	1,55
MK6e-14d	3,1483	1,26

ANEXO 9 – DADOS DA ANÁLISE TENSÍOMÉTRICA REALIZADA NOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (SF-7d e SF-14d).

RATO	TENSÃO MÁXIMA (kgf/cm²)	FORÇA MÁXIMA (kgf)
SF7a-7d	0,9957	0,4
SF7b-7d	1,6937	0,68
SF7c-7d	1,9278	0,77
SF7d-7d	1,9593	0,78
SF7e-7d	2,0869	0,83
SF9a-7d	2,9066	1,16
SF9b-7d	3,5937	1,44
SF9c-7d	2,3536	0,94
SF9d-7d	1,7746	0,71
SF9e-7d	1,2863	0,51
SF11a-7d	1,7464	0,7
SF11b-7d	1,1619	0,46
SF11c-7d	2,6182	1,05
SF11d-7d	1,8143	0,73
SF11e-7d	1,8642	0,75
SF8a-14d	6,1913	2,48
SF8b-14d	3,3053	1,32
SF8c-14d	4,6861	1,87
SF8d-14d	6,7741	2,71
SF8e-14d	6,3238	2,53
SF10a-14d	5,7578	2,3
SF10b-14d	3,8675	1,55
SF10c-14d	4,4895	1,8
SF10d-14d	3,9213	1,57
SF10e-14d	6,0848	2,43
SF12a-14d	5,4303	2,17
SF12b-14d	4,817	1,93
SF12c-14d	5,4123	2,16
SF12d-14d	3,471	1,39
SF12e-14d	4,8257	1,93

ANEXO 10 – DADOS DA ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO NA FERIDA INCISIONAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DE ESTUDO (MK-7d e MK-14d).

RATO	COLÁGENO IMATURO (%)	COLÁGENO MADURO (%)
MK1a-7d	óbito	óbito
MK1b-7d	44,2	55,79
MK1c-7d	21,4	78,59
MK1d-7d	33,83	66,16
MK1e-7d	0	100
MK3a-7d	36,82	63,17
MK3b-7d	60	40
MK3c-7d	35,67	64,32
MK3d-7d	40,14	59,85
MK3e-7d	56,27	43,72
MK5a-7d	53,38	46,61
MK5b-7d	28,68	71,31
MK5c-7d	60,11	39,88
MK5d-7d	36,09	63,9
MK5e-7d	64,24	35,75
MK2a-14d	76,86	23,13
MK2b-14d	46,11	53,88
MK2c-14d	42,87	57,12
MK2d-14d	12,53	87,46
MK2e-14d	54,92	45,07
MK4a-14d	90,82	9,17
MK4b-14d	71,21	28,78
MK4c-14d	86,35	13,64
MK4d-14d	27,96	72,03
MK4e-14d	54,27	45,72
MK6a-14d	54,82	45,17
MK6b-14d	21,55	78,44
MK6c-14d	66,4	33,59
MK6d-14d	38,72	61,27
MK6e-14d	82,04	17,95

ANEXO 11 – DADOS DA ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO NA FERIDA INCISIONAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (SF-7d e SF-14d).

RATO	COLÁGENO IMATURO (%)	COLÁGENO MADURO (%)
SF7a-7d	36,03	63,96
SF7b-7d	91,29	8,7
SF7c-7d	47,51	52,48
SF7d-7d	8,63	91,36
SF7e-7d	5,35	94,64
SF9a-7d	11,49	88,5
SF9b-7d	44	56
SF9c-7d	12,16	87,83
SF9d-7d	11,77	88,22
SF9e-7d	4,84	95,15
SF11a-7d	96,56	3,43
SF11b-7d	37,79	62,2
SF11c-7d	70,77	29,22
SF11d-7d	55,48	44,51
SF11e-7d	43,01	56,98
SF8a-14d	2	97,99
SF8b-14d	48,66	51,33
SF8c-14d	12,96	87,03
SF8d-14d	5,21	94,78
SF8e-14d	49,73	50,26
SF10a-14d	15,94	84,05
SF10b-14d	59,88	40,11
SF10c-14d	7,27	92,72
SF10d-14d	26,49	73,5
SF10e-14d	17,9	82,09
SF12a-14d	75,65	24,34
SF12b-14d	72,25	27,74
SF12c-14d	50,69	49,3
SF12d-14d	12,5	87,49
SF12e-14d	70,09	29,9

ANEXO 12 – DADOS DA ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO NA FERIDA EXCISIONAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS DE ESTUDO (MK-7d e MK-14d).

RATO	COLÁGENO IMATURO (%)	COLÁGENO MADURO (%)
MK1a-7d	óbito	óbito
MK1b-7d	86,73	13,26
MK1c-7d	63,48	36,51
MK1d-7d	19,42	80,57
MK1e-7d	41,33	58,66
MK3a-7d	88,4	11,59
MK3b-7d	36,96	63,03
MK3c-7d	80,93	19,07
MK3d-7d	38,72	61,27
MK3e-7d	85,3	14,69
MK5a-7d	33,1	66,89
MK5b-7d	62,92	37,07
MK5c-7d	91,16	8,83
MK5d-7d	50,25	49,74
MK5e-7d	86,73	13,26
MK2a-14d	31,05	68,94
MK2b-14d	100	0
MK2c-14d	76,78	23,21
MK2d-14d	98,62	1,37
MK2e-14d	83,74	16,25
MK4a-14d	81,69	18,3
MK4b-14d	66,13	33,86
MK4c-14d	77,18	22,85
MK4d-14d	75,68	24,31
MK4e-14d	48,62	51,37
MK6a-14d	98,23	1,76
MK6b-14d	59,06	40,96
MK6c-14d	74,77	25,22
MK6d-14d	100	0
MK6e-14d	38,72	61,27

ANEXO 13 – DADOS DA ANÁLISE QUALITATIVA DO COLÁGENO NA FERIDA EXCISIONAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE (SF-7d e SF-14d).

RATO	COLÁGENO IMATURO (%)	COLÁGENO MADURO (%)
SF7a-7d	1	99
SF7b-7d	80,18	19,81
SF7c-7d	46,19	53,8
SF7d-7d	97,65	2,34
SF7e-7d	19,86	80,13
SF9a-7d	7,06	92,93
SF9b-7d	69,51	30,48
SF9c-7d	17,69	82,31
SF9d-7d	0	100
SF9e-7d	8,42	91,57
SF11a-7d	72,08	27,91
SF11b-7d	50,32	49,67
SF11c-7d	48,55	51,44
SF11d-7d	21,02	78,97
SF11e-7d	43,01	56,98
SF8a-14d	31,66	68,33
SF8b-14d	10,12	89,87
SF8c-14d	64,89	35,1
SF8d-14d	31,29	68,7
SF8e-14d	19	80
SF10a-14d	10,89	89,1
SF10b-14d	0	100
SF10c-14d	49,84	50,15
SF10d-14d	6,47	93,52
SF10e-14d	77,61	22,38
SF12a-14d	48,63	51,36
SF12b-14d	0,67	99,32
SF12c-14d	96,35	3,64
SF12d-14d	0	100
SF12e-14d	27,12	72,87