

Aspectos histológicos da reparação tecidual por efeito do metotrexato em feridas cutâneas abertas: estudo experimental em ratas

Tissue reparation histology of open cutaneous wounds by metotrexate: experimental studies of female rats

Paulo Cesar Alves Carneiro¹, Teresa Cristina Ferreira Gutman², Onofre Ferreira de Castro^{3*}, Pedro Carvalho Rodrigues⁴, Juliano Moraes Pinheiro⁵, Dilon Pinheiro de Oliveira⁶

Resumo

Foi estudada a ação do metotrexato administrado por via intramuscular sobre a cicatrização de feridas cutâneas circulares abertas em ratas, do ponto de vista histológico. Foram operadas 36 ratas Wistar, com peso médio de 250,0 gramas. Nos 18 animais do grupo-controle (Grupo 1) foi injetado soro fisiológico 0,9% por via intramuscular, em volume equivalente ao necessário ao grupo tratado, no membro traseiro esquerdo, imediatamente após a confecção de uma ferida aberta de pele, provocada com vazador de 6 mm de diâmetro no dorso do animal, a cerca de 5 cm das bordas inferiores dos pavilhões auriculares. No grupo-experimento (Grupo 2) realizou-se o mesmo procedimento cirúrgico do grupo-controle e administrou-se metotrexato (1 mg/kg de peso corpóreo) por via intramuscular na mesma localização anatômica. Foram sacrificadas no 4º e 7º dias de pós-operatório. As alterações histológicas do efeito do metotrexato, evidenciado através da microscopia óptica, se fizeram predominantemente no 7º dia de pós-operatório, tais como: a redução da área de tecido de granulação e necrose ($p < 0,001$), do número de núcleos redondos ($p < 0,001$), do número de polimorfonucleares ($p < 0,001$), do número de fibroblastos e histiócitos em transformação (núcleos fusiformes/campo) ($p < 0,001$), da distância entre as bordas da ferida ($p < 0,001$) e do número de vasos/campo ($p < 0,005$). Concluem que o metotrexato atenua a resposta inflamatória, atuando nas fases iniciais e de fibroplasia, entretanto, acelerou o processo de reepitelização.

Unitermos: pele; cicatrização das feridas; histologia; metotrexato; efeitos adversos

Trabalho realizado no Serviço de Cirurgia Experimental do Hospital Central do Exército (HCE), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Professor Adjunto - UFRJ. Livre Docente em Clínica Cirúrgica pela Universidade do Rio de Janeiro (UNI-Rio). Livre Docente em Cirurgia Geral pela Universidade Gama Filho (UGF). Doutor e Mestre em Medicina (Cirurgia Geral) pela UFRJ. Especialista (CBC, PUC, CFM). Ex-Residente do INCa. TCBC.1, Mestre em Anatomia Patológica pela UFF. Patologista do INCa. 2, Professor Titular da UFF (Anatomia Patológica. Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do INCa. TCBC.3*, Professor Adjunto da UFF. Doutor em Experimentação e Estatística - USP.4, Médico Veterinário (HCE).5, Pós-graduando, a nível de doutorado da FM-UFJ, TCBC.6. Endereço para correspondência: Paulo Cesar Alves Carneiro - Rua Monsenhor Alves da Rocha, 140, sala 714 - Penha - 21070-540 - Rio de Janeiro - RJ.

Abstract

The authors have studied the action of methotrexate applied intramuscularly on healing of cutaneous circular open wound on female rats from the macroscopic and histological point of view. 36 Wistar female rats scaling 250.0 grams on an average. On the 18 animals of the control group (Group 1) sodium chloride was injected intramuscularly into the left back member in an equivalent to the amount required for the group treated, immediately after making a skin open wound with a 6 mm diameter punch on the back of the animal at about 5 cm from the lower edges of the external ears. The same surgical procedure of the control group was carried out in the experimental group (Group 2), and methotrexate (1 mg/kg of body weight) was applied intramuscularly into the same anatomic location. They were killed on the 4th and 7th days after operation. The histologic alterations of the effect of methotrexate evidenced through optical microscopy, such as reduction of tissue area of granulation and necrosis ($p < 0.001$), the number of round nuclei ($p < 0.001$), in the number of fibroblasts and histiocytes in transformation (fusiform nuclei field) ($p < 0.001$), in the distance between the edges of the wound ($p < 0.001$) and in the number of vessels/field ($p < 0.05$), were predominant on the 4th and 7th days. It is concluded that, the methotrexate attenuates the inflammatory answer actuating in the initial and fibroplasia phases, however, this has accelerated the reepitelization process.

Key words: skin; wound healing; histology; methotrexate; drug effects

Introdução

O processo de reparação tecidual constitui um tema de elevada importância em Medicina e Cirurgia. Sabe-se da literatura, que esta reparação é um fenômeno constatado nos seres vivos, seguindo um padrão sistemático e bastante complexo de eventos, de grande relevância para sua sobrevivência, quando ocorrem lesões cirúrgicas, iatrogênicas ou acidentais, podendo sofrer influência de múltiplos fatores locais e sistêmicos^(8, 21).

É de fundamental importância, o estudo do efeito de cada droga antineoplásica isolada ou em protocolos associativos e se exercem ou não um efeito adverso sobre a cura de ferimentos cirúrgicos⁽⁸⁾.

Os vários efeitos das drogas citotóxicas no processo de cicatrização das feridas cirúrgicas de pele, têm sido investigados sob diversos aspectos em Medicina, especialmente em Cirurgia Geral e Experimental^(4, 8, 9, 26).

O metotrexato (MTX, ametropterina) é uma substância antagonista do ácido fólico, classificada no grupo das drogas antineoplásicas como antimetabólito, conforme nos ensina Calabresi e Parks Jr.⁽³⁾. Possui atividades antitumorais⁽¹⁹⁾, antiinflamatórias, imunossupressoras⁽²²⁾ e

teratogênicas⁽¹⁰⁾; entretanto, até o presente não existe evidência que o MTX, seja uma droga carcinogênica⁽²⁹⁾.

É um agente terapêutico empregado no manuseio de leucemias, câncer de mama, câncer das vias biliares extra-hepáticas, câncer de bexiga, câncer de pulmão, linfomas, câncer colorretal, tumores experimentais, psoríase, artrite reumatóide, dermatomiosite, lúpus eritematoso sistêmico, gravidez tubária e outras afecções^(17, 27, 31).

O objetivo desta pesquisa é o de estudar alguns aspectos histológicos na fase inflamatória e início da fase de fibroplasia da reparação tecidual de feridas cutâneas circulares abertas, sob efeito de quimioterapia com metotrexato, administrado por via intramuscular (IM) em ratos Wistar.

Método

Foram utilizadas 36 ratas, brancas, adultas (*rattus norvegicus albinus, rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, sadias e bem nutridas, com peso médio de 250 gramas.

Os animais provieram do Biotério Central da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Ministério da Saúde no Rio de Janeiro - RJ e foram mantidos por quatro semanas em adaptação no Biotério do Ser-

viço de Cirurgia Experimental do HCE. As idades variaram de quatro a seis meses.

As ratas foram mantidas em gaiolas apropriadas com iluminação, ventilação e temperatura ambiente, na proporção de duas ratas por gaiola no período pré-operatório e uma no pós-operatório, sendo alimentadas com dieta padronizada e balanceada por via oral.

As 36 ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos abaixo especificados:

- *Grupo 1* (Controle, Não tratado, NT₁ e NT₂): constituído de 18 animais com nove em cada subgrupo, os quais receberam por IM, injeção única de soro fisiológico (SF) a 0,9%, em volume correspondente ao necessário para uma dose equivalente aos do Grupo 2 (experimento), no membro traseiro esquerdo, administrada imediatamente após o ato operatório, ou seja, logo após a confecção de uma ferida cutânea circular com vazador ("punch") com 6 mm de diâmetro no dorso dos referidos animais, a aproximadamente 5 cm abaixo do limite inferior dos pavilhões auriculares.

- *Grupo 2* (Experimento, Tratado, T₁ e T₂): formado de 18 ratas com nove em cada subgrupo. Foi executado procedimento cirúrgico idêntico ao Grupo 1. Em seguida, similarmente ao grupo-controle, as mesmas foram submetidas à quimioterapia com metotrexato em dose única (1 mg/kg de peso corpóreo), por via IM na mesma localização anatômica.

As ratas permaneceram em jejum de 12 horas para alimentos sólidos, sendo fornecido água "ad libitum".

Utilizou-se como droga o metotrexato, em frasco-ampola de 50 mg-LSP, contendo 2 ml (Methotrexate®).

A referida substância foi diluída em SF-0,9% e a solução resultante foi administrada na dose de 1 mg/kg de peso corporal do animal em dose única, imediatamente após o ato cirúrgico, por via IM, ainda sob efeito da anestesia superficial com éter sulfúrico.

As ratas foram submetidas individualmente à anestesia inalatória em campânula de vidro hermeticamente fechada, contendo em seu interior compressas umedecidas com éter sulfúrico, sendo mantidas por máscaras de éter sulfúrico e ar ambiente, em respiração espontânea.

A metodização da técnica cirúrgica, obedeceu às seguintes etapas:

a - Animal em decúbito ventral: depilação ampla de parte do pescoço e anti-sepsia da região posterior do pescoço e do tórax com álcool iodado a 2%;

b - com auxílio de um vazador nº 6, o qual foi posicionado em sentido perpendicular à linha mediana dorsal, a mais ou menos 5 cm das bordas inferiores dos pavilhões auriculares, demarcando a pele da região dorsal, em seguida girando-o para a direita e para a esquerda, até a secção completa e circunferencial da pele e conseqüente exérese da mesma e da tela subcutânea da região demarcada, expondo-se a fáschia muscular dorsal;

c - hemostasia exclusivamente por compressão manual com auxílio de gaze esterilizada e umedecida em SF 0,9%, durante alguns segundos;

d - após limpeza com SF-0,9%, a ferida cutânea foi deixada descoberta.

Subseqüentemente à total recuperação anestésica, as ratas tiveram livre acesso à ração e água. Não se fez uso de analgésicos ou antibióticos.

Foram sacrificadas individualmente em campânula fechada com éter sulfúrico em alta concentração, até a parada dos sinais vitais.

As ratas foram mortas no 4º dia (NT₁ e T₁) e no 7º dia de pós-operatório (NT₂ e T₂). A seguir, procedeu-se à exérese do segmento de pele e tela subcutânea, contendo a ferida cutânea em cicatrização através de uma incisão de forma retangular de aproximadamente 6 cm x 3 cm e exposição da fáschia muscular dorsal.

Após a retirada de cada peça, realizou-se lavagem mecânica da mesma com soro fisiológico, sendo estirada sobre uma haste de madeira e fixada com alfinetes em suas extremidades cranial e caudal.

Os espécimes foram fixados em formalina a 10% tamponada (pH = 7,4), por um período de 18 a 24 horas, sendo realizado quatro cortes de 3,0 mm paralelamente ao plano sagital para processamento histológico e inclusão em parafina. Os cortes histológicos foram de quatro micrômetros.

As secções histológicas foram coradas em hematoxilina-eosina (H-E) e pela coloração especial tricrômico de Gomori.

Foram avaliados através da microscopia óptica os seguintes parâmetros: distância borda-borda da ferida cirúrgica cutânea (reepitelização); área de tecido de granulação (mm^2); área de tecido de necrose (mm^2); substância amorfa (estudo semiquantitativo); média do número de núcleos redondos (monócitos, polimorfonucleares, eosinófilos, plasmócitos e células epitelíoides)/campo; média do número de polimorfonucleares/campo; média do número de núcleos fusiformes (fibroblastos e histiócitos e transformação)/campo; média do número de vasos/campo.

A distância entre as bordas da ferida cirúrgica cutânea foi medida com lupa graduada em milímetros (Marca Rainbow).

Através da coloração de HE, as áreas de tecido de granulação e de necrose foram medidas com a ocular milimetrada e calibrada no microscópio (Spencer fabricado pela "American Optical Corporation"), usando objetiva de 20X e ocular de 10X. Foram calculadas as referidas áreas, multiplicando-se o comprimento pela altura em milímetros.

Quanto à presença de substância amorfa, a mesma foi avaliada através de estudo semiquantitativo em leve (+), moderada (++) e acentuada (+++).

A presença de substância amorfa, a média do número de núcleos redondos, a média do número de polimorfonucleares, a média do número de núcleos fusiformes, a média do número de vasos foram observadas e contadas em 10 campos com Objetiva 40X e Ocular 10X.

Os dados obtidos no presente estudo foram analisados utilizando-se os testes F de Brieger, Turkey, Friedman e Wilcoxon, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade ($p < 0,05$), para verificação de diferenças significativas, de acordo com Campos⁽⁶⁾ e Pimentel-Gomes⁽²⁵⁾.

Resultados

Estudo histológico:

1. Distância borda-borda (mm)

O grupo tratado com metotrexato (T_1 e T_2), apresentou-se com valores menores em relação ao grupo-controle. Portanto, o processo de reepitelização foi mais acentuado nos subgrupos tratados.

Pode-se observar na Tabela 1, que tanto no 4º quanto no 7º dias de pós-operatório, a distância borda-borda foi menor no Grupo 2 do que no grupo-controle, estudada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, cuja significância estatística foi ao nível de 0,1%. Essa diferença foi mais evidente no 7º dia.

Dia 4 - Distância borda-borda		Dia 7 - Distância borda-borda	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0,45	0,34	0,36	0,0
0,51	0,35	0,44	0,4
0,51	0,39	0,40	0,0
0,49	0,33	0,42	0,0
0,52	0,37	0,38	0,0
0,57	0,40	0,48	0,3
0,48	0,39	0,45	0,0
0,52	0,37	0,43	0,0
0,48	0,40	0,39	0,0

Tabela 1 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a distância borda-borda (mm) da ferida cirúrgica cutânea (reepitelização) de cada animal.

$W = 45,0^{***}$ ($p < 0,001$)

$W = 48,5^{***}$ ($p < 0,001$)

Teste de Friedman ($X^2_R = 24,73^{**}$; $p < 0,01$)

2. Área de tecido de granulação (ATG) (mm²)

As médias aritméticas do grupo-controle (T₁ e T₂) foram de menor valor, sendo evidenciado o efeito antiinflamatório do MTX.

A Tabela 2 registra o estudo estatístico realizado pelo teste de Wilcoxon da área de tecido de granulação (ATG), no 4º e 7º dias pós-operatório (significativo ao nível de 0,1%).

3. Área de tecido de necrose (ATN) (mm²)

O subgrupo-experimento (T₁ e T₂) apresentou valor inferior ao exibido pelo grupo-controle.

Registrou-se um menor (ATN) no grupo experimento, tanto no 4º como no 7º dias de pós-operatório, com resultado estatisticamente significativo (p < 0,001). Essa constatação foi maior no Grupo 2 nos animais mortos no 7º dia de observação, pois em 5/9 animais não ocorreu necrose (Tabela 3).

4. Substância amorfa

Houve maior quantidade de substância amorfa no grupo tratado com 4º dia de pós-operatório (++: moderado - oito ratas) do que no grupo-controle (+: leve - nove ratas). No 7º dia assinala-se maior evidência de substância amorfa no grupo-controle (++: seis ratas; +++: três ratas) do que no grupo tratado com MTX (+: leve - nove ratas).

A análise da Tabela 4, quanto à variável presente, semiquantitativamente comenta-se que ocorreu aumento da substância amorfa no grupo-controle do 4º dia (+: leve - nove ratas) para o 7º dia (++: moderada - oito ratas), enquanto no grupo tratado ocorreu uma redução no 4º dia (moderada - seis ratas; acentuada - três ratas) para o 7º dia de pós-operatório (+: leve - nove ratas).

5. Média do número de núcleos redondos (NR)/campo

As médias do grupo-experimento foram menores do que as do grupo-controle. Houve redução da média do número redondos/

campo, tanto no grupo-controle quanto no experimento no 4º dia (p < 0,05) e 7º dia de pós-operatório (p < 0,001). conforme observa-se na Tabela 5. Essa redução foi mais acentuada no 7º dia do subgrupo tratado com MTX.

6. Média do número de polimorfonucleares (PMN)/campo

O grupo-experimento apresentou valores menores em relação ao grupo-controle.

Dia 4 - ATG		Dia 7 - ATG	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0,59	0,50	0,62	0,50
0,55	0,51	0,61	0,51
0,57	0,53	0,64	0,50
0,55	0,50	0,66	0,51
0,58	0,49	0,68	0,53
0,60	0,50	0,67	0,51
0,53	0,43	0,67	0,52
0,56	0,51	0,60	0,50
0,58	0,56	0,63	0,54

Tabela 2 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo área de tecido de granulação (ATG) em mm de cada animal.

$W = 49,0^{**} (p < 0,001)$ $W = 45,0^{***} (p < 0,01)$
*Teste F de Brieger (F = 64,00**; p < 0,01)*

Dia 4 - ATN		Dia 7 - ATN	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
0,50	0,36	0,30	0,0
0,43	0,31	0,38	0,1
0,47	0,34	0,39	0,0
0,38	0,37	0,36	0,0
0,40	0,35	0,38	0,0
0,49	0,32	0,39	0,09
0,41	0,34	0,42	0,0
0,41	0,33	0,41	0,08
0,43	0,36	0,40	0,05

Tabela 3 - Distribuição das ratas utilizadas, e acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a área de tecido de necrose (ATN) e mm de cada animal.

$W = 45,0^{***} (p < 0,001)$ $W = 45,0^{***} (p < 0,001)$
*Teste de Friedman (X²_R = 23,23***; p < 0,01)*

Dia	Grupo	Grau de intensidade		
		+	++	+++
4	Grupo 1	9	-	-
4	Grupo 2	1	8	-
7	Grupo 1	-	6	3
7	Grupo 2	9	-	-

Tabela 4 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a presença de substância amorfa por grau de intensidade em cada animal.

+ (leve); ++ (moderada); +++ (acentuada)

Dia 4 - NR		Dia 7 - NR	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
60	60	73	47
58	55	70	43
59	54	76	40
60	50	75	43
62	61	74	50
61	59	77	41
60	52	72	51
59	56	70	47
62	64	68	52

Tabela 5 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a média do número de núcleos redondos (NR)/campo em cada animal.

$W = 67,0^*$ ($p < 0,05$)

$* = 45,0$ ($p < 0,01$)

Teste F de Brieger ($F = 89,83^{**}$; $p < 0,01$)

Dia 4 - PMN		Dia 7 - PMN	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
56	30	51	9
54	36	49	10
54	34	50	7
51	29	45	9
56	28	53	12
57	33	49	10
54	35	50	13
51	32	48	10
55	30	47	14

Tabela 6 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a média do número de polimorfonucleares (PMN)/campo em cada animal.

$W = 45,0^{***}$ ($p < 0,001$)

$W = 45,0^{***}$ ($p < 0,001$)

Teste de Friedman ($X^2_R = 27,00$; $p < 0,01$)

Conforme demonstrado na Tabela 6, existe uma redução da média do número de polimorfonucleares, estatisticamente significativo no grupo tratado com MTX ($p < 0,001$), tanto no 4º dia quanto no 7º dia de pós-operatório. Tal diminuição foi acentuada nesse último tempo de observação.

7. Média do número de núcleos fusiformes (NF)/campo

Para estudo comparativo dos valores da média do número de NF/campo, empregou-se o teste F de Brieger que apresentou diferença estatisticamente significativa ao nível de 1%.

As médias aritméticas do grupo experimento foram de valor menor.

A redução da média do número de NF/campo ocorreu no grupo tratado com metotrexato em relação ao grupo-controle, tanto no 4º dia ($p < 0,001$), quanto no 7º dia de pós-operatório (PO), com diferença estatisticamente significativa ao nível de 0,1 (Tabela 7).

Os fibroblastos mostraram-se com citoplasma menor, mais denso, núcleo vesiculoso quando comparado com os do grupo-controle (7º dia de PO).

8. Média do número de vasos/campo

Houve diferença significativa entre a média aritmética X_T^1 (grupo controle - sete dias) e as demais variáveis.

A Tabela 8 mostra um aumento da média do número de vasos no grupo tratado em relação ao grupo-controle no 4º dia de PO, com nível de significância ao nível de 0,1%. Entretanto, no 7º dia de observação no Grupo 2 (tratado) ocorreu diminuição do número de vasos/campo ($p < 0,05$).

Discussão

O animal de experimentação selecionado para uso nesta pesquisa, foi o rato, tendo em vista a sua elevada resistência à infecção e ao trauma cirúrgico. É de fácil acomodação, manuseio, baixo custo de manutenção, boa disponibilidade em nosso meio^(7,8).

Foram utilizados apenas animais adultos, do sexo feminino, apesar do conhecimento de publicações, de que estes apresentam maiores variações de ordem hormonal, quando comparados aos machos⁽¹⁶⁾, que poderiam interferir no processo de cicatrização, todavia esse assunto é controverso.

Em 1982, Modolin e col.⁽²³⁾ em São Paulo, utilizando ratos adultos jovens, alimentados com uma dieta aprotéica por um período de três semanas, observaram diminuição do processo inflamatório e da fibroplasia.

O metotrexato é um ácido orgânico bicarboxílico fraco, possuindo peso molecular de 454 daltons, negativamente carregado com pH neutro e com solubilidade em lipídeos limitada^(2, 19).

Evans e Christensen⁽¹²⁾ afirmaram que geralmente o MTX é transportado ativamente para dentro das células, exceto em altas concentrações.

É um quimioterápico específico para a fase S do ciclo celular, promovendo a inibição da síntese de ADN, podendo ter efeitos mais amplos no ARN e na síntese protéica^(2, 19). Inibe a quimiotaxia dos neutrófilos induzidos pelos leucotrienos B₄ e complemento C_{5a}⁽³⁰⁾ e também dos produtos da ativação dos macrófagos, tais como interleucina-1 e prostaglandina E₂⁽¹⁸⁾.

Pode ser empregado através de distintas vias de administração. No presente estudo, optou-se pela via IM com injeção da solução de MTX no membro traseiro esquerdo do animal. É sabido que a opção por outra via de administração como a oral, muito utilizada no estudo dos efeitos de drogas antiinflamatórias, às vezes requer entubação gástrica, além da necessidade de medições dos níveis plasmáticos do agente quimioterápico, o que leva a maior complexidade no referido experimento.

Freeman-Narro e col.⁽¹⁴⁾ e Campbell e col.⁽¹⁵⁾ relataram que a absorção do MTX seguida à administração por via IM parece ser mais rápida e complexa com níveis máximos atingidos em aproximadamente duas horas após a sua injeção.

Dia 4 - NF		Dia 7 - NF	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
210	68	157	98
211	75	163	111
213	71	165	110
200	70	160	108
198	72	158	113
200	73	162	101
212	69	156	113

Tabela 7 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a média do número de núcleos fusiformes (NF)/campo em cada animal.

$W = 45,0*** (p < 0,001)$ $W = 45,0*** (p < 0,001)$
 Teste F de Brieger ($F = 1376,24; p < 0,01$)

Dia 4 - Vasos		Dia 7 - Vasos	
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
33	40	36	31
31	36	33	31
30	35	35	30
31	41	32	28
32	33	29	29
32	37	30	27
31	32	30	29
34	38	30	29
35	39	28	30

Tabela 8 - Distribuição das ratas utilizadas, de acordo com os subgrupos com e sem metotrexato (MTX), as quais foram sacrificadas com quatro e sete dias de pós-operatório, segundo a média do número de vasos/campo em cada animal.

$W = 52,0*** (p < 0,001)$ $W = 65,5* (p < 0,05)$
 Teste F de Brieger ($F = 15,01**; p < 0,01$)

A administração do MTX por via intramuscular, ao invés da via oral, é empregada ocasionalmente em pacientes portadores de psoríase, levando-se em consideração os efeitos colaterais no aparelho digestivo. Tal via permite a obtenção de concentrações séricas maiores e de efeitos mais prolongados em relação à administração oral.

Wang e col.⁽³²⁾ relataram uma maior distribuição e eliminação de MTX em pacientes mais jovens portadores de osteossarcoma

após injeção intravenosa, portanto esta droga apresenta uma farmacocinética dependente da idade.

Bender⁽¹⁾ verificou que a dose e a via de administração do MTX empregado para uma indução particular é dependente da cinética da população-alvo com uma concentração de metotrexato ótima para cada neoplasia maligna responsiva.

Bleyer⁽²⁾ assinalou que 50,0 a 70,0% do metotrexato é ligado às proteínas, especialmente a albumina.

Nesta pesquisa experimental, empregou-se uma dose única de MTX (1 mg/kg de peso corpóreo), dose símile à usada por via oral e por injeção intra-arterial em humanos com toxicidade tolerável⁽⁴⁾.

O MTX apresenta múltiplos e variados efeitos colaterais para a medula óssea (leucopenia), tracto gastrintestinal (mucosite, ulcerações, náuseas, vômitos, diarreia, fibrose e cirrose hepática), pele (alopécia, queda de cabelo, capilarite, erupção macular, necrólise, fotossensibilidade e reações alérgicas) rins (diminuição da taxa de filtração glomerular e da liberação de creatinina, lesão do epitélio tubular), sistema nervoso (aracnoidite, cefaléias, paraplegia, quadriplegia e outros), olhos (queimação ocular, prurido, diminuição do lacrimejamento e outros efeitos)^(2, 3, 5, 10, 18, 19, 32).

Primordialmente, a base e as margens do ferimento são recobertas com tecido de granulação. Ocorre proliferação fibroblástica e o brotamento capilar, mesmo na presença de inflamação. À proporção que os leucócitos retiram o exsudato inflamatório, surge no ferimento tecido de granulação, tendo como ponto de partida as suas margens. Outro mecanismo envolvido na reparação e desencadeado precocemente a partir das margens da ferida é a epitelização.

Simões e col.⁽²⁸⁾ na Escola Paulista de Medicina, realizaram um estudo dos aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos, no processo de reparação da pele de 12 ratos Wistar, em ferimento com

6 mm de diâmetro, os quais utilizaram instrumento similar a um furador de rolha.

Atualmente, a cicatrização das feridas sob efeito de quimioterapia com agentes antineoplásicos constitui um amplo campo para investigações científicas^(7, 8).

As alterações no processo cicatricial de feridas cutâneas, observadas em associação com a quimioterapia antineoplásica, estão na dependência do tipo de agente citostático, da dosagem, da via e do tempo de administração usados^(7, 11, 13, 15, 24).

Calnan e Davies (1965)⁽⁴⁾ em Londres, analisaram o efeito do metotrexato em doses variáveis, administrado por via intraperitoneal em ratos Wistar jovens, sob a cicatrização de feridas cirúrgicas de pele, avaliadas exclusivamente através da medida da força tênsil no 3º, 5º e 7º dias de pós-operatório e concluíram que:

- quanto maior for a dose do MTX menor será o valor da força tênsil, conseqüentemente maior a inibição do processo cicatricial;
- o retardo da cicatrização foi mais evidente quando o MTX foi administrado no período pós-operatório.

Os aspectos histológicos dos efeitos do metotrexato no processo de reparação tecidual da ferida cutânea com perda de substância na presente pesquisa, se fizeram em maior intensidade no 7º dia de pós-operatório nas áreas de tecido de granulação próximas à epiderme. Essas alterações constaram da diminuição do número de núcleos redondos/campo, do número de polimorfonucleares/campo, da redução da quantidade de substância amorfa e do número de núcleos fusiformes/campo através da microscopia óptica (Tabelas 5, 6, 7 e 8).

O processo de reepitelização se fez com mais intensidade no grupo tratado com metotrexato, cobrindo completamente a ferida cirúrgica, enquanto que o grupo-controle, mostrou área de necrose.

A ausência de mortalidade pós-operatória, até as datas preestabelecidas para

sacrifício dos animais nos referidos grupos, resultaram da alta resistência às infecções da espécie estudada, do correto manuseio dos animais, dos cuidados adequados pré e pós-operatórios, do domínio das técnicas anestésica e cirúrgica empregadas, bem como do conhecimento dos aspectos farmacológicos e farmacocinéticos do agente citotóxico.

A ferida cutânea utilizada neste trabalho constitui um exemplo de cicatrização por segunda intenção (ou cicatrização secundária), onde ocorreu perda de substância (28, 26 mm²). Isso resulta em um processo mais prolongado para a cura das mesmas, tendo em vista a necessária remoção do tecido e o restabelecimento do defeito tissular com células vivas.

Simões e col. (1986)⁽²⁸⁾ estudando alguns aspectos histológicos da cicatrização de feridas cutâneas com perda de substância (6 mm de diâmetro), em ratas Wistar não submetidas à administração de drogas, relataram que aos sete dias de pós-operatório, houve aparecimento de fibroblastos, com retículo endoplasmático granular e complexo de Golgi bastante desenvolvidos, mostrando grandes quantidades de vesículas intracitoplasmáticas, contendo fibrilas colágenas. Verificaram também grande concentração de neutrófilos e macrófagos (contendo vesículas eletrolúcidas no seu interior). A substância intercelular continha fibrilas colágenas tipos I e III.

Kaiser e col. (1961)⁽²⁰⁾ estudando as alterações histológicas em feridas cutâneas de cães submetidos à quimioterapia antineoplásica com mostarda nitrogenada (mecloretamina) sacrificados no 3º dia de pós-operatório, observaram fibroblastos anormais, similares aos encontrados em tecidos irradiados.

Atualmente, tornam-se necessários novos trabalhos experimentais, relacionando diferentes dosagens, intervalos e via de administração do metotrexato, isolado ou em associação com o ácido fólico (leucovorin) e outras drogas citotóxicas, bem como sua conexão com procedimentos cirúrgicos, sobre a cicatrização das feridas em várias espécies animais.

Conclusões

A avaliação dos resultados permite concluir que:

1. O metotrexato na dose de 1 mg/kg de peso corpóreo, administrado por via intramuscular em ratas Wistar, promoveu atenuação da resposta inflamatória, atuando nas fases iniciais e de fibroplasia dos ferimentos tratados no período estudado;
2. a reepitelização da ferida cutânea, no presente modelo experimental, foi acelerada pelo metotrexato.

Agradecimentos

Ao Dr. Evaldo Motta Moura (Gen. Bda. Med.), Diretor do HCE, Dr. Adjelton Soares e Silva (Cel. Med.), Dr. Natálio de Souza Maria (Ten. Cel. Dent.), pela colaboração e facilidades oferecidas.

Referências Bibliográficas

1. Bender, R.A. - Membrane transport of methotrexate (NSC-740) in human neoplastic cells. *Cancer Chemother Rep*, 6(Part 3): 73-82, 1975.
2. Bleyer, W.A. - The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*, 41: 36-51, 1978.
3. Calabresi, P, Parks Jr., R.E. - Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; Murad, F. (Eds.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 7ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 813-56, 1987.
4. Calnan, J.; Davies, A. - The effect of methotrexate (amethopterin) on wound healing: an experimental study. *Br J Cancer*, 19: 505-12, 1965.
5. Campbell, M.A.; Perrier, D.G.; Dorr, R.T. - Methotrexate: bioavailability and pharmacokinetics. *Cancer Treat Rep*, 69: 833-8, 1985.
6. Campos, H. - *Estatística Experimental não Paramétrica*. 4ª ed., Piracicaba, SP, Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ, USP, 1983.

7. Carneiro, P.C.A. - Efeito da Quimioterapia Antineoplásica com Cisplatina (cis-diaminodicloroplatina-II) na Cicatrização de Anastomoses do Intestino Delgado: Estudo Experimental em Ratos. Rio de Janeiro, UFRJ, 140, 1990. (Tese-Doutorado-Faculdade de Medicina-Universidade Federal do Rio de Janeiro).
8. Carneiro, P.C.A. - Aspectos Macroscópicos e Histológicos da Reparação Tecidual de Feridas Cutâneas Abertas sob Efeito de Quimioterapia com Metotrexato: Estudo Experimental em Ratas. Rio de Janeiro, UGF, 75, 1992. (Tese Livre Docência - Universidade Gama Filho).
9. Cohen, S.C.; Gabelnick, H.L.; Johnson, R.K.; Goldin, A. - Effects of cyclophosphamide and adriamycin on the healing of surgical wounds in mice. *Cancer*, 36: 1277-81, 1975.
10. Desesso, J.M.; Goering, G.G. - Amelioration by leucovorin of methotrexate development toxicity in rabbits. *Teratology* 43: 201-15, 1991.
11. Desprez, J.D., Kiehn, C.L. - The effect of cytoxan (cyclophosphamide) on wound healing. *Plast Reconstr Surg*, 26: 301-8, 1960.
12. Evans, W.E.; Christensen, M.L. - Drug interactions with methotrexate. *J Rheumatol*, 12(Suppl 12): 15-20, 1985.
13. Ferguson, M.K. - The effect of antineoplastic agents on wound healing. *Surg Gynecol Obstet* 154: 421-9, 1982.
14. Freeman-Narrood, M.; Gerstley, B.J.; Engstrom, P.F. - Comparison of serum concentrations of methotrexate after various route of administration. *Cancer*, 36: 1619-24, 1975.
15. Hardesty, W.H. - The effect of cytotoxic drugs on wound healing in rats. *Cancer Res*, 18: 581-4, 1985.
16. Hoff, M.B.; Chang, W.W.L.; Mak, K.M. - Effect of estrogen on cell-proliferation in colonic mucosa of the mouse, *Virchows Arch (Cell Pathol)*, 35: 263-73, 1981.
17. Hughes, G.R.; Abdulla, M. - Methotrexate treatment of Felty's syndrome (letter). *Ann Rheum Dis*, 49: 202, 1990.
18. Jeurissen, M.E.C.; Boerbooms, A.M.T.; Van de Putte, L.B.A. - Methotrexate therapy in connective tissue diseases: a review of the literature. *Netherlands J Med*, 35: 44-58, 1989.
19. Jolivet, J.; Cowan, K.H.; Curt, G.A. - The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309: 1094-104, 1983.
20. Kaiser, G.A.; Herter, F.P.; Malm, J.R.; Demetz, A.; Campione, M.P. - Effects of chemotherapeutic agents administered by isolated perfusion upon wound healing. *Surgery*, 49: 745-50, 1961.
21. McMurry Jr., J.F. - Wound healing with diabetes mellitus: better wound healing in diabetes. *Surg Clin North Am*, 64: 769-78, 1984.
22. Mitchell, M.S.; Wade, M.E.; DeConti, R.C.; Bertino, J.R.; Calabresi, P. - Immunosuppressive effects of cytosine arabinoside and methotrexate in man. *Ann Intern Med*, 70: 535-40, 1969.
23. Modolin, M.; Bevilacqua, R.G.; Margarido, N.F.; Lima-Gonçalves, E. - Effects of protein depletion and repletion on experimental open wound contraction. *Ann Plast Surg*, 15: 123-6, 1985.
24. Newcome, J.F.; Chir, M. - Effect of intra-arterial nitrogen mustard infusion on wound healing in rabbits: formation of granulation tissue and wound contraction. *Ann Surg*, 163: 319-29, 1966.
25. Pimentel-Gomes, F. - Curso de Estatística Experimental. 12ª ed., Rio de Janeiro, Livraria Nobel, 467, 1989.
26. Shamberger, R.C.; Devereux, D.F.;

- Brennan, M.F. - The effect of chemotherapeutic agents on wound healing. *Int Adv Surg Oncol*, 4: 15-58, 1981.
27. Shiner, R.J.; Nunn, A.J.; Chung, K.F.; Geddes, D.M. - Randomised double-blind, placebo-controlled trial of methotrexate in steroid-dependent asthma. *Lancet*, 336: 137-40, 1990.
28. Simões, M. de J.; Cabral, A.C.V.; Boyaciyan, K.; Kulay Júnior, L.; Sasso, W.S - Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação de pele de ratos. *Rev Paul Med*, 104: 1986; 132-5.
29. Stern, R.S.; Zierler, S.; Parrisch, J.A. - Methotrexate used for psoriasis and the risk of monocutaneous or cutaneous malignancy. *Cancer*, 50: 869-72, 1982.
30. Suarez, C.R.; Pickett, W.C.; Bell, D.H.; McLintock, D.K.; Oronsky, A.L.; Kerwar, S.S. - Effect on low dose methotrexate on neutrophil chemotaxis induced by leukotriene B₄ and complement C_{5a}. *J Rheumatol*, 14: 9-11, 1987.
31. Vokes, E.E.; Dimery, I.W.; Jacobs, C.D.; Karp, D.; Molina, A.; Collier, M.A.; Eble, M.L.; Clendeninn, N.J. - A phase II study of piritrexim in combination with methotrexate in recurrent and metastatic head and neck cancer. *Cancer*, 67: 2253-7, 1991.
32. Wang, Y.M.; Stuwow, W.W.; Romsdahl, M.M. - Age-related pharmacokinetics of high-dose methotrexate in patients with osteosarcoma. *Cancer Treat Rep*, 63: 405-10, 1979.