

## EFEITO DO LEITE BOVINO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM RATOS.<sup>1</sup>

EFFECT OF MILK CATTLE IN THE HEALING OF SKIN WOUNDS IN RATS

Walmirton Thadeu D'ALESSANDRO<sup>2</sup>, Elizabeth Pereira MENDES<sup>3</sup>, Emmanuel Bezerra D'ALESSANDRO<sup>4</sup>, Vanessa Roriz FERREIRA<sup>5</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** verificar o efeito do leite bovino cru congelado e do leite pasteurizado e resfriado na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Métodos:** Foram usados 30 ratos adultos, machos da linhagem Wistar, distribuídos em 03 grupos com 10 animais cada: o grupo 01 foi tratado com solução salina a 0,9%; o grupo 02 tratado com leite bovino cru congelado e o grupo 03 com leite bovino pasteurizado e resfriado. Usou-se topicamente na ferida, 0,1ml da solução a 0,9% e nos dois tipos de leites estudados, três vezes ao dia. A avaliação da lesão foi realizada no 3º, 7º e 11º dia do pós-operatório. Diariamente era observado de forma macroscópica, o crescimento ou não de pelos ao redor das feridas. **Resultados:** As medidas digitais da área da injúria e as do paquímetro revelaram que o leite bovino cru, apresentou efeito estatisticamente significativa na retração da lesão e no crescimento de pelos. **Conclusão:** O uso tópico de leite bovino cru congelado cicatriza, mais rapidamente, feridas cutâneas em ratos e o leite bovino pasteurizado e resfriado não apresenta este efeito. O leite bovino cru influencia a recuperação da pelagem de ratos machos Wistar.

**DESCRITORES:** cicatrização, feridas, leite, pele, ratos.

### INTRODUÇÃO

A cicatrização é um processo fisiológico que reconstitui um tecido lesado sendo, portanto importante para a sobrevivência<sup>1</sup>. São várias as substâncias<sup>2,3</sup> e os extratos fitoterápicos testados e usados no processo de cicatrização de feridas cutâneas. A *Aloe Vera* (babosa) foi eficaz neste tratamento em ratos diabéticos e normais<sup>4</sup>. O uso tópico da solução de Papaína a 2% também apresentou bons resultados<sup>5</sup>. Uma forma de aplicação clínica freqüente do leite humano consiste no uso tópico para tratar infecções e inflamações cutâneas<sup>15</sup>.

O leite bovino possui a maioria dos elementos essenciais à saúde do homem como micronutrientes, aminoácidos e ácidos graxos em quantidades maiores do que em qualquer outro produto isolado. Apresenta ainda substâncias bioativas como enzimas, fatores de crescimento,

hormônios, citocinas e proteínas de alta qualidade sendo muito rico em minerais importantes para a vida como o cálcio. Apesar dessa significativa constituição, não foram identificados estudos científicos na revisão da literatura e na consulta realizada nas bases de dados da Medline e Lilacs que avaliam a possível eficácia do leite bovino cru congelado e do leite bovino pasteurizado integral e resfriado, na cicatrização de feridas cutâneas em ratos.

O Brasil é um país de dimensões continentais e principalmente nas regiões interioranas a população, em muitos casos, possui deficiência na área da saúde para tratamento de infecções e inflamações cutâneas, dentre outras. O Estado de Goiás é predominantemente agropecuário e um dos aspectos mais importantes da sua economia consiste na produção de leite bovino sendo, portanto, fácil e comum encontra-lo nos diversos municípios da região.

<sup>1</sup>Trabalho realizado no Depto. de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás

<sup>2</sup>Docente titular de Fisiologia, Depto. Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás

<sup>3</sup>Docente adjunta de Fisiologia, Depto. Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás

<sup>4</sup>Biólogo, especialista em planejamento e gerenciamento de recursos hídricos

<sup>5</sup>Graduanda do curso de nutrição da Universidade Federal de Goiás

## OBJETIVO

Avaliar a cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos, tratados com uso tópico de leite bovino cru congelado e de leite bovino pasteurizado e integral resfriado, através da observação macroscópica da evolução pós-operatória, tendo em vista, um possível efeito no processo cicatricial.

## MÉTODOS

### Amostragem

As amostras foram constituídas de ratos, machos, adultos, da linhagem Wistar, pesando entre 200 a 300g. A ração industrial própria para ratos e a água, eram fornecidas "ad libitum". Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa conforme protocolo n.º.101/2008.

Os roedores foram distribuídos aleatoriamente, em 3 grupos de 10 animais cada (n=10). O Grupo 1 considerado controle, recebia o tratamento tópico de solução salina a 0,9%. O Grupo experimental número 2, recebeu tratamento com leite bovino cru congelado, obtido a partir de vacas ½ Holandesas X Zebú pertencentes a fazendas próximas a cidade de Goiânia, Goiás. O Grupo 3 por sua vez, era tratado com leite integral pasteurizado e resfriado, obtido no comércio da cidade. As amostras de leite utilizadas na pesquisa encontravam-se no estado líquido. Os períodos de observação macroscópica ocorreram no 3º, 7º e 11º dias de experimento.

### Anestesia e ato operatório

Após anestesia com pentobarbital sódico, os animais posicionados em decúbito ventral, foram imobilizados em prancha de madeira e submetidos à depilação por tração manual na região dorso costalis, em área de aproximadamente 5cm<sup>2</sup>. No centro da área depilada marcaram-se os pontos e excisou-se um fragmento de pele com cerca de 2,0cm<sup>2</sup>, até a exposição da fáscia muscular dorsal (Figura 1). Quando necessário a hemostasia era feita por compressão digital usando algodão durante alguns segundos.



**FIGURA 1** - ilustração da ferida cutânea inicial com exposição da fáscia muscular dorsal de rato.

### Macroscopia e tratamento da ferida

Após a cirurgia, os animais despertados da anestesia, foram recondicionados nas gaiolas específicas. No dia seguinte aplicou-se no local da ferida, utilizando um micropipetador, 0,1ml de solução salina a 0,9% no grupo controle e 0,1ml de leite bovino cru ou leite bovino pasteurizado, nos outros grupos, três vezes ao dia. Este procedimento foi repetido diariamente até a data da cicatrização completa da ferida. Durante os dias de tratamento, os animais eram examinados quanto a sua mobilidade, ingestão de alimento e de água, secreções, crostas da cicatriz e também quanto ao processo de necrose da pele e da reconstituição da pelagem.

### Medida da ferida

Para a medida do tamanho da área da lesão usou-se um paquímetro com resolução de 0,05mm, no sentido crânio-caudal e látero-lateral. As lesões foram ainda fotografadas por câmara digitalis modelo "Power Shot AS100", 1,3 mega pixels, zoom de 3,2 e mantida no 7º e 11º dias a distância de cerca de 30 cm do animal. Os dados obtidos da retração da área da ferida, no 3º, 7º e 11º dias, foram gravados em protocolo no computador para comparação posterior utilizando o programa Autocad/2005. Através desse *software*, o contorno da ferida foi delimitado pelo aplicativo poliline que marca o perímetro da

lesão. A formatação da figura geométrica em que o ferimento se transformou foi expressa em medida decimal.

#### **Linhagem, depilação e região escolhida**

Os ratos selecionados nesse estudo foram adultos para dificultar a influência do fator de crescimento epidérmico no processo cicatricial. A linhagem Wistar foi escolhida devido à facilidade de manuseio e acomodação, resistência à manipulação, agressões cirúrgicas e a processos infecciosos. A depilação do dorso dos animais foi feita através de método manual e não mecânico, pelo fato de que a tração manual dos pelos dificilmente causa lesões na pele, ao contrário do que acontece com o uso de aparelhos laminados. A região dorsal do rato, escolhida para produzir a lesão, teve por finalidade evitar que o próprio animal conseguisse atingi-la<sup>13</sup>.

#### **Análise estatística**

Para a análise dos dados usou-se o programa SAEG e a variável numérica relativa à área cirúrgica (cm<sup>2</sup>), foi avaliada pelo teste t de Student. O nível de significância usado para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%  $P < 0,05$

### **RESULTADOS**

#### **Exame da ferida**

A cirurgia foi efetuada a contento. Não houve óbitos, com exceção de um rato que faleceu no 2º dia. Logo após a recuperação da anestesia os animais apresentaram atividade física e disposição para alimentação e ingestão de líquido. A ferida nos três grupos mostrou exsudação e formação de crostas até cerca do 5º dia de pesquisa. A partir de então, havia espessamento da crosta que se destacava espontaneamente. A epiteliação completa da ferida ocorreu no 13º dia (FIGURA 2) e o crescimento de pelos ao redor da lesão apresentou-se de forma diferente nos três grupos

. O Quadro I mostra a quantidade de animais que apresentaram a cicatrização completa, pelagem recuperada e não recuperada, conforme os dias estudados. Observa-se a recuperação mais rápida da pelagem, nos ratos tratados com leite bovino em relação ao grupo controle. O tratamento

com leite cru evidenciou superioridade neste aspecto, quando comparado com os demais tratamentos.



**FIGURA 2** – Fotos comparativas da epiteliação completa no 13º dia de experimentação em ratos. A – Leite cru; B – controle; C – leite pasteurizado

**QUADRO I:** Quantidade de animais com cicatrização completa e com pelagem recuperada e por recuperar (CP= pelagem recuperada; PR= pelagem recuperando)

Variáveis		Dias de Estudo	
		7°	13°
Controle	CP*	1	1
	PR	1	8
Leite Cru	CP*	3	5
	PR	1	5
Leite Pasteurizado	CP	1	3
	PR	0	7

FONTE: Protocolo de pesquisa

\*  $P > 0,05$  (Teste t *Student*)

### Área da ferida

Observou-se diminuição rápida e gradativa da área da lesão quando se considerou os dias estabelecidos para as medidas. O Quadro II ilustra os valores

**QUADRO II:** Valores médios da área da lesão ( $\text{cm}^2$ ) obtida por medida digital

Variáveis	Dias de Estudo			
	início	3°	7°	11°
Controle*	2,12±0,39	1,17±0,31	0,23±0,05	0,015±0,017
Leite Cru*	2,34±0,42	0,95±0,24	0,23±0,04	0,004±0,008
Leite Pasteurizado	2,10±0,56	1,23±0,52	0,18±0,08	0,031±0,062

FONTE: Protocolo de pesquisa.  $\pm$  = desvio padrão

\*  $P > 0,05$  (Teste t *Student*)

### DISCUSSÃO

As imunoglobulinas mais concentradas do leite bovino que protegem o organismo contra bactérias e possíveis vírus patogênicos, são: imunoglobulina G (IgG), beta-lactoglobulina (b-Ig),  $\mu$ -lactalbumina ( $\mu$ -La) e a albumina de soro bovina (BSA)<sup>6</sup>. A lactoferrina inibe o crescimento de bactérias, fungos e protozoários seqüestrando o ferro disponível no ambiente. A lactoperoxidase oxida tiocianatos, na presença de peróxido de hidrogênio, tornando-se bactericida<sup>7</sup>. Alguns peptídeos originados da hidrólise enzimática da b-lactoglobulina e da  $\mu$ -lactalbumina, possuem seqüências de aminoácidos que apresentam atividade bactericida sugerindo que essas proteínas podem exercer efeito de antibiótico no

médios obtidos das áreas ( $\text{cm}^2$ ), nos grupos controle e experimentais. A comparação dos valores obtidos na medida digital com aqueles provenientes do paquímetro, não revelou diferença estatisticamente significativa.

Quando se comparou os valores médios obtidos a partir das áreas das feridas dos ratos tratados com leite bovino cru congelado, àqueles tratados com solução salina 0,9%, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $P > 0,05\%$ ), no 11° dia de tratamento. Não se obteve nenhum outro resultado idêntico quando se comparou os grupos nos demais dias de observação. Não ocorreram diferenças estatísticas significantes quando foram realizadas analogias entre o grupo controle e o grupo tratado com leite pasteurizado resfriado e nem quando os grupos foram comparados entre si.

organismo<sup>8,9</sup>.

A síntese de proteínas teciduais é estimulada pelas proteínas do soro do leite que são degradadas pela digestão e os aminoácidos e peptídeos resultantes são absorvidos pelo intestino. Os aminoácidos sulfurados, como a cisteína, são capazes de promover elevação da síntese de glutatona que é importante na proteção dos tecidos epiteliais. A lactoferrina e vários polipeptídeos como os fatores de crescimento semelhantes à insulina IGF-I e IGF-II, fatores ácidos e básicos de crescimento de fibroblastos (aFGF, bFGF), fatores de transformação dos tecidos (TGF-b1 e TGF-b2)<sup>10,11</sup>, estimulam a mitogênese de células. Essas substâncias consideradas em conjunto, podem ser inclusive comercializadas com esse propósito<sup>12</sup>. Elas, possivelmente, auxiliaram na reparação

cicatricial das feridas cutâneas estudadas nesta pesquisa.

Alguns autores<sup>14</sup> atestaram que a densidade dos fibroblastos que atuam na síntese do colágeno para a reconstituição do tecido alcança o máximo entre 07 e 14 dias após a lesão, sob a influência de potentes fatores de crescimento tecidual. Os resultados dessa investigação indicando recuperação completa da lesão, no 13º dia, coincidem com o intervalo de tempo publicado para a reconstituição do tecido.

A observação macroscópica (Quadro I) mostrou que no 13º dia de experimento somente 01 rato do grupo controle havia recuperado a pelagem, enquanto no grupo tratado com leite cru, havia 05 com a pelagem recuperada completamente. Resultados semelhantes foram encontrados por alguns autores que trabalharam com a cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando leite humano<sup>15</sup>.

Os resultados (Quadro II) permitiram presumir ainda que a pasteurização influencia o mecanismo de ação das substâncias contidas no leite. O leite resfriado não afetou de maneira estatisticamente significativa a velocidade

de retração da injúria.

Outras pesquisas e modelos experimentais por desenvolver, seriam necessários para confirmar os resultados aqui obtidos, como: aspectos histológicos dos tecidos; composição físico química do leite utilizado, alimentação do gado, número de tratamentos, testes sobre a exposição à luz da área lesada, isolamento dos componentes do leite responsáveis pelo efeito positivo, dosagens dos RNAs no tecido em recuperação, dentre outros.

### Conclusão

O uso tópico de leite bovino cru congelado promoveu cicatrização mais rápida nas feridas cutâneas de ratos, quando comparado ao grupo controle tratado com solução salina 0,9%. As amostras do leite bovino pasteurizado e resfriado não apresentaram efeito significativo na cicatrização de feridas abertas na região dorso costal da pele de ratos. O leite bovino cru influenciou a recuperação da pelagem de ratos machos *Wistar*.

## SUMMARY

### EFFECT OF MILK CATTLE IN THE HEALING OF SKIN WOUNDS IN RATS

Walmirton Thadeu D'ALESSANDRO<sup>2</sup>, Elizabeth Pereira MENDES<sup>3</sup>, Emmanuel Bezerra D'ALESSANDRO<sup>4</sup>, Vanessa Roriz FERREIRA<sup>5</sup>.

**Objective:** To determine the effect of frozen raw bovine milk and pasteurized milk and cooled in the healing of skin wounds in rats. **Methods:** We used 30 adult rats, male Wistar strain, divided into 03 groups with 10 animals in each: group 01 was treated with saline solution to 0.9%, the group 02 was treated with raw frozen bovine milk and group 03 was treated with bovine pasteurized and cooled milk. It was used topically in the wound, 0.1 ml of a 0.9% saline solution and the two types of milk studied during three times a day. The evaluation of the lesion was performed at 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> days post-operatively. Daily it was observed in a macroscopic way, the absence or not of hair growth around the wound. **Results:** The measures of the digital area of injury and the caliper showed that raw bovine milk showed statistically significant effect on the shrinkage of the lesion and the growth of hair. **Conclusion:** The topical use of raw frozen bovine milk heals faster the skin wounds in rats, and pasteurized and cooled bovine milk it has no the same effect. The raw bovine milk influences the recovery of hair of male Wistar rats.

**KEY WORDS:** wound healing, wounds, milk, skin, rats.

## REFERÊNCIAS

1. SANCHES, NR.; BARONE, B.; TEVES, DC.; SIMÕES, MJ.; NOVO, NF.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas em ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cir. Brás.*, v. 8, p. 18-23, 1993.
2. TEVES, DC.; CABRAL, ACV.; SIMÕES, MJ.; KULAY, JR. L. Biologia da reparação tecidual. *J.Bras. Méd.*; v. 50, p. 39-44, 1986.
3. AZULAY, RD.; AZULAY, DR. *Dermatologia*. 2<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, 1999.
4. CONTRERA, A.; BERNARDI, AC.; POZETTI, GL.; LOPES, RA.; CONTRERA, MGD. Ação da tintura-mãe de *Lichnophora ericoides*, *Aristolochia esperanzae* e *Solidago microglossa*, em feridas cutâneas de ratos. *Rev Esc Farm Odont.*; v. 11, p.157-60, 1985.
5. SANCHEZ, NR.; BARONE, B.; TEVES, DC.; SIMÕES, MJ.; NOVO, NF.; JULIANO, Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2 por cento. *Acta Cir Brás* v. 8 (1), p. 18-23, 1993.
6. VALDEMIRO, CS. Propriedades Fisiológicas funcionais das Proteínas do Soro de Leite. *Revista de Nutrição*. v. 17, n. 4, 2004.
7. NABET, P. ; LINDEN, G. Constituents bioactifs in lait, nutrition et santé. *Tec. & Doc.* p.169-87, 2001
8. PELLEGRINI, A.; DETTLING, C.; THOMAS, U.; HUNZIKER, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine b-lactoglobulin. *Bioch Biophys Acta*. v. 1526, p.131-40, 2001.
9. PELLEGRINI, A.; THOMAS, U.; BRAMAZ, N.; HUNZIKER, P.; VON FALLENBERG, R. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine  $\mu$ -lactalbumin molecule. *Bioch Biophys Acta*. v. 1426, p. 439-48, 1999.
10. WALZEM, RL; DILLARD, CJ.; GERMAN, JB. Whey components: Millenia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit Rev Food Sci Nutr*. v. 42, p. 353-75, 2002.
11. BELFORD, DA.; ROGERS, ML.; REGESTER, GO.; FRANCIS, GL.; SMITHERS, GW.; LIEPE, IJ.; et al. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. *In Vitro. Cell Dev Biol*. v. 31, p. 752-60, 1995.
12. REGESTER, GO.; BELFORD, DA.; GODDARD, C.; HOWARTH, GS.; SMITHERS, GW.; COPELAND, AC.; et al. Prospective clinical application for a growth factor extract from whey: Gut disease and wound repair. In: Proceedings of the 3rd International Whey. *International Dairy Federation*; p. 333-6, 1998.
13. MODOLIN, M.; BEVILACQUA, RG.; RUY, G. Cicatrização das feridas. Síntese das aquisições recentes. *Rev Bras Clin Terap*. v. 14(6), p. 208-13, 1985.
14. GARROS, IC.; CAMPOS, ACL.; TÂMBARA, EM.; TENÓRIO, SB.; TORRES, OJM.; AGULHAM, MA.; et. al. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras*. v. 21(3), p. 55-65, 2006.
15. AMARAL, MLG.; CARNEIRO, LM.; ARAÚJO, SMRM. Efeito do leite Humano na cicatrização de feridas abertas em ratos. *Rev. Para. Med.* v..20(4), p.13-18, 2006

**Endereço para correspondência:**

Walmirton Thadeu D'Alessandro  
Rua J-19 Quadra 75 Lote no.06, Setor Jaó  
Goiânia – GO  
CEP: 74673340  
Fone (062) 39427560 e-mail: wtdicb@hotmail.com

