

Avaliação macro e microscópica da cicatrização de lesões experimentalmente provocadas em pele de coelhos tratadas com secreção mucoglicoproteica do escargot *Achatina fulica*

Evaluation of the *Achatina fulica* snail mucoglycoproteic secretion in surgical injury done in rabbits

Maria de Fátima MARTINS¹;
Flávia Aparecida Macedo
CAETANO¹;
Otávio José SÍRIO¹;
Mamie Mizusaki YIOMASA²;
Cristina Ioshie MIZUSAKI³;
Larissa Deadame de
FIGUEIREDO²;
Pedro PACHECO¹

1- Helicário Experimental Prof^a. Dr^a. Lor Cury do Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, Pirassununga - SP
2- Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto - SP
3- Faculdade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC

Resumo

Os escargots são animais capazes de produzir através de glândulas localizadas em toda superfície do seu corpo, uma secreção glicoproteica com um poder antibacteriano que participa na própria imunidade inata¹. O poder antimicrobiano de determinadas substâncias pode auxiliar nos processos de reparação de feridas de origens diversas. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar macroscopicamente e histologicamente, os efeitos reparadores do muco do escargot *Achatina fulica*, em lesões provocadas por instrumento cortante na pele de coelhos. Incisões de 10cm de comprimento foram realizadas na pele de 15 coelhos. Estes foram divididos em três grupos e submetidos aos respectivos tratamentos: 1) tratamento com o muco na forma pura, 2) tratamento com o muco sob a forma de pomada e 3) um grupo sem receber o tratamento (controle). As características macroscópicas da lesão foram registradas diariamente e para a análise histológica, uma biópsia foi realizada após 72 horas de tratamento. Os fragmentos processados rotineiramente e corados com Tricrômio de Masson. Histologicamente, a epiderme dos coelhos tratados mostrou uma camada basal de células cúbicas, enquanto os do grupo controle apresentaram uma camada basal de células cilíndricas com áreas desorganizadas e a derme apresentou um estágio mais avançado no processo de reparo quando comparado ao controle. A evolução macroscópica no processo de cicatrização ocorreu num menor espaço de tempo nos coelhos do grupo pomada, em relação aos demais tratamentos.

Palavras-chave:

Escargot.
Muco.
Cicatrização.
Coelhos.

Correspondência para:
MARIA DE FÁTIMA MARTINS
Departamento de Nutrição e Produção Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP
Av. Duque de Caxias Norte, 225
13630-000 - Pirassununga - SP
fmartins@usp.br

Recebido para publicação: 18/12/2002
Aprovado para publicação: 19/02/2004

Introdução

Os escargots são caracóis comestíveis, invertebrados, pertencentes ao grupo dos

moluscos da classe dos gastrópodes e mais especificamente da ordem dos pulmonados, sendo considerados a mais diversificada classe do Filo Mollusca.¹ A helicicultura ou

criação no Brasil de caracóis comestíveis, nos últimos anos, tem despertado grande interesse por parte de criadores e pesquisadores devido às suas características nutricionais e farmacêuticas, de produtos derivados destes moluscos. Além das pesquisas relativas à nutrição, várias outras linhas de pesquisa estão sendo desenvolvidas em diferentes áreas, tais como: seleção genética, genética molecular, zooterapia, educação e propriedades farmacológicas do muco cutâneo de caracóis junto ao Helicário Experimental (Prof^ª. Dr^ª. Lor Cury) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. É de conhecimento comum que a maioria dos fármacos de importância terapêutica provêm da natureza, dentre eles os produtos de origem animal como os venenos de ofídios e aracnídeos; própolis, mel, lanolina, etc., merecendo destaque a secreção mucoglicoprotéica do escargot.²

A secreção do escargot é comumente denominada de muco cutâneo e o conhecimento de suas aplicações terapêuticas e cosméticas remonta aos primórdios da humanidade. Assim sendo, nos países europeus, são produzidos xaropes expectorantes e diversos cosméticos gerados com o uso do muco do escargot, baseando-se em receitas milenares.

A liberação do muco em moluscos pulmonados ocorre por secreção apócrina³, sendo esta composta por uma mistura de materiais provenientes de várias glândulas cutâneas.⁴ As glândulas pediosas são as principais produtoras de muco.⁵

A principal função do muco cutâneo dos escargots é a da proteção, porém a sua viscosidade auxilia em diversas funções, tais como locomoção, captura de alimentos, reprodução e proteção a desidratação. Relatos encontrados na literatura afirmam que os escargots são resistentes às infecções por microorganismos, devido à presença de um fator antimicrobiano no muco cutâneo.⁶

Kubota et al.⁷, descreveram a presença de uma proteína ou um polipeptídeo, sendo mais provavelmente a mucina, com poder

antimicrobiano para bactérias gram-positivas (*Bacilos subtilis* e *Staphilococcus aureus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), ocorrendo no muco dos escargots e inibindo os crescimentos bacterianos quando em presença desta. Otsuka-Fuchino et al.⁸ purificaram a glicoproteína “achacin” do escargot gigante africano, a qual tem alto peso molecular e relatam que esta proteína destrói a superfície do *Staphilococcus aureus*, não causando nem deslocamento e nem destruição de células eucarióticas. O poder antimicrobiano de determinadas substâncias pode auxiliar nos processos de reparação de feridas de origens diversas, pois quanto menor a infecção mais rápida será a cicatrização.

Logo o objetivo deste trabalho foi avaliar, macroscopicamente e histologicamente, os efeitos reparadores do muco cutâneo do escargot *Achatina fulica*, usado sob as formas pura e de pomada, em lesões geradas por instrumentos cortantes na pele do dorso de coelhos.

Materiais e Métodos

Para a presente pesquisa foi utilizado o muco de 30 escargots *Achatina fulica* obtidos no Helicário Experimental da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, junto ao Campus de Pirassununga, SP.

Tratamento dos escargots para obtenção do muco

Foram utilizados exemplares adultos dos escargots *A. fulica* com aproximadamente 1 ano de vida para a coleta do muco. Os animais foram mantidos em caixas de madeira, sendo alimentados a cada 2 dias com uma ração básica, desenvolvida com componentes descritos em alguns trabalhos.^{9,10,11,12,13,14} O muco cutâneo foi coletado através de estimulação manual da superfície corporal dos escargots.

Análise da propriedade do muco dos escargots no reparo de lesões cutâneas

Para este propósito, foram utilizados 15 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) machos e fêmeas, os quais foram divididos em grupos experimentais denominados: T₀ (grupo controle), T₁ (grupo tratado com muco puro), T₂ (grupo tratado com pomada à base de muco). Para cada tratamento foram utilizados 5 animais, sendo 3 machos e 2 fêmeas.

Indução da lesão

Os coelhos foram submetidos a jejum durante 12 horas, tricotomizados no dorso e anestesiados (com Ketamina, 30mg/Kg). Após a assepsia foram realizadas, na região dorsal torácica, incisões longitudinais na pele dos coelhos tendo 10 cm de comprimento, seguidas de pontos simples e separados, utilizando fio de algodão estéril número zero. Estas cirurgias foram realizadas da forma mais asséptica possível. Imediatamente após a lesão, os animais dos grupos experimentais (T1 e T2) receberam, diariamente, seus tratamentos (respectivamente, o muco puro e pomada à base de muco). A pomada foi preparada a partir do veículo de acetato de glicerol.

Análise macroscópica

Todos os coelhos foram pesados diariamente e mantidos em unidades experimentais sob condições controladas do ambiente e da sanidade e tratados com ração convencional e água *ad libitum*. Para este estudo, os animais foram acompanhados diariamente através de observações clínicas do reparo da lesão, referindo-se às alterações fenotípicas manifestadas, tais como: presença ou não de edema, exudato e crosta, coloração da ferida e peso dos animais). Todas as variáveis foram registradas em protocolos e fotografadas durante todo o período de tratamento. Além destas análises, os experimentos foram avaliados estatisticamente por delineamento inteiramente casualizado; tratamentos por repetições e testes de comparação de médias de Tukey com nível de 5% de significância.

Obtenção das amostras e estudos ao microscópio de luz

Os animais foram imobilizados após 72 horas de tratamento, sendo a seguir anestesiados e biopsiados na área de reparo da lesão cutânea. As amostras foram mergulhadas em fixador de Bouin por 12 horas e processadas rotineiramente para a inclusão em parafina. Cortes de 6mm obtidos, foram corados com tricrômio de Masson e analisados seguindo o protocolo pré-estabelecido concernente às alterações microscópicas. Essas, decorrentes dos tratamentos feitos, tais como: neoangiogênese; presença de fibroblastos, macrófagos e neutrófilos, presença ou aumento relativo de fibras colágenas e fibrinas, observadas em microscópio de luz e documentada com o uso de fotomicroscópio Jenaval - Carl Zeiss Jena®.

Resultados

Observações macroscópicas

Macroscopicamente a área da lesão observada nos três grupos de coelhos estudados, sendo: (A) controle, (B) tratados com pomada e (C) tratados com o muco puro, apresentaram características morfológicas de reparos da ferida cirúrgica, porém em diferentes estágios, após 72 horas de tratamento (Figura 1).

A evolução macroscópica no processo de cicatrização ocorreu num espaço menor de tempo nos coelhos do grupo pomada, em relação aos demais tratamentos. Logo, a velocidade do processo cicatricial pôde ser apresentada comparativamente da seguinte forma: no grupo em que se utilizou a pomada verificou-se maior velocidade cicatricial. No grupo em que foi utilizado o muco puro verificou-se velocidade intermediária e, no grupo controle, menor velocidade. Todos os animais utilizados não apresentaram estresse aparente, alimentando-se normalmente e tendo ganho de peso no decorrer do experimento.

Observações histológicas

Microscopicamente, a amostra controle de epiderme de coelho revelou a camada basal da epiderme com áreas desorganizadas e a interface dermo-epidérmica, com muitas projeções epiteliais digitiformes e longas (Figura 2A). A derme mostrou uma extensa área de proliferação vascular e muitas células inflamatórias (Figura 2B).

No grupo tratado com pomada, a camada basal da epiderme mostrou-se mais organizada e o limite entre a epiderme e a derme mostrou papilas dérmicas mais curtas e arredondadas (Figura 3A). A derme papilar apresentou pequena área subepitelial com vasos sanguíneos em proliferação e mostrou ainda pouco infiltrado inflamatório (Figura 3B).

Nos espécimes tratados com muco de caracol, notou-se a camada basal da epiderme organizada e as papilas dérmicas curtas e arredondadas em menor quantidade (Figura 4A). Na camada reticular da derme evidenciou-se um tecido conjuntivo denso, com proliferação celular intensa e praticamente sem células inflamatórias, bem como a presença abundante de fibras colágenas delgadas (Figura 4B).

Discussão

De acordo com Santos¹⁵ a formação de “crosta” em uma ferida cutânea favorece o processo de reparação e o exudato promove a desagregação desta e o desenvolvimento de microorganismos. Neste trabalho, a presença de crosta foi observada nas lesões provocadas na pele de todos os coelhos, sendo mais evidente no grupo controle, nele permanecendo por um tempo maior quando comparado com os demais grupos experimentais de coelhos.

Os coelhos do grupo pomada apresentaram uma reação diferente do resultado apresentado por Martinset al.¹⁶, pois identificaram uma hiperemia aqui não notada. Histologicamente, foram evidenciados muitos

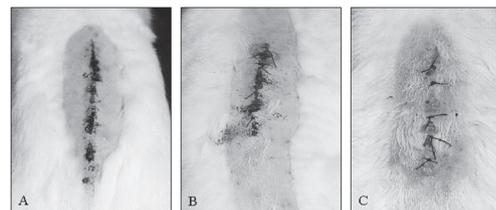


Figura 1

Fotografia das lesões após 72 horas de tratamento. A) Grupo controle; B) Grupo pomada; C) Grupo muco puro



Figura 2

Fotomicrografia da área de reparo de pele de coelho no grupo controle após 72 horas. A - Evidencia uma extensa área de reparo tomada por proliferação vascular (100x). B - Em maior aumento a área de reparo, mostrando muitos vasos sanguíneos e células inflamatórias na derme da área em questão (400x)

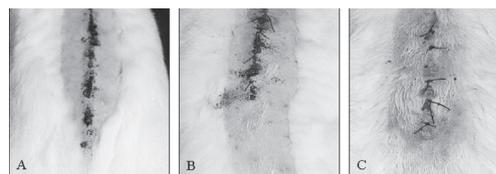


Figura 3

Fotomicrografia da área de reparo da epiderme do grupo tratado com a pomada após 72 horas. A - Mostra pequena área subepitelial contendo vasos sanguíneos (100X) e B - Evidencia algumas células inflamatórias e proliferação celular (400X)

mastócitos, sugerindo uma reação alérgica. Entretanto, este fato não prejudicou o processo de reparo da ferida cutânea. Pode ter ocorrido em resposta à suscetibilidade dos animais ao veículo da pomada, posto que nos animais do grupo tratado com o muco puro tal reação não foi observada.

A epiderme de todos os grupos na área de reparo, apresentou-se mais espessa quando comparada à pele adjacente, devido à proliferação epitelial que se dá como resultado da intensa atividade mitótica das células basais

neste período.¹⁷ As características epiteliais após 72 horas de tratamento em todas as amostras confirmaram que esta resposta epitelial (epidermal) é surpreendentemente rápida, e a continuidade epidérmica é restabelecida de 24 a 48 horas como relataram Cotran, Kumar e Robbins.¹⁷

Na derme da área de reparo, as amostras tratadas com muco puro e pomada revelaram a presença de fibras colágenas 72 horas após o tratamento, apesar de Cotran, Kumar e Robbins¹⁷ destacarem que a colagenização é demonstrada apenas no final da primeira semana.

Ottori et al.¹⁸ estudando reparação do epitélio da mucosa sinusal de coelhos, atribuíram à lectina uma função protetora do epitélio. O mecanismo pelo qual o muco dos escargots diminui a contaminação bacteriana nas feridas, seria talvez devido à presença de lectina em sua composição.¹⁹ Além disso, Iguchi, Aikawa e Matsumoto⁶; Kubota et al.⁷ e Otsuka-Fuchino et al.⁸ relataram em seus trabalhos a presença de diferentes tipos de fatores antibacterianos no muco do escargot que poderiam ser responsáveis pela baixa proliferação bacteriana das feridas provocadas no experimento.

Abstract

Escargots are animals capable to produce a glycoproteic secretion by glands located in all the surface of their bodies which among other functions presents anti-bacterial power and participation in the own immunity. The antimicrobioan power of certain substances may aid of repair of wounds with several origins. Thus, the aim of the present study was to evaluate macroscopic and histologically the reparative effects of the mucus of *Achatina fulica* escargots on lesions made in the skin of rabbits. Incisions were performed in the skin of 15 rabbits, separated in three groups according to the treatment received. Immediately after the lesion, the respective treatments with pure mucus form and in ointment form were supplied, while the other group received no treatment (control group). The macroscopic characteristics of the lesion were registered daily and a biopsy was performed 72 hours after the treatments. The fragments were processed and stained with Masson's trichrome. The macroscopic evolution in the cicatrization process occurred in a shorter period of time in rabbits from the ointment group, comparativity with the other groups. Histologically, the epidermis of the treated rabbits showed a basal layer of cubic cells, while rabbits of the control group presented a basal layer of cylindrical cells with cutaneous debris.

De qualquer forma, os coelhos tratados com a pomada, apresentaram uma recuperação da ferida mais eficiente, tanto clinicamente quanto histologicamente. Contudo, deve-se levar em conta a forma sob a qual o muco foi empregado (puro ou em pomada), uma vez que o muco puro, por ser viscoso, apresenta dificuldade de ser mantido sobre a ferida, dificultando, portanto, o controle da quantidade a ser administrada nos tratamentos.

Conclusão

Verificou-se que o muco do escargot influenciou o processo de reparo de lesões provocadas em pele de coelhos por meio de instrumento cortante. O reparo cutâneo ocorreu em menor tempo nas lesões tratadas, quando comparadas com aquelas do grupo controle. Concernente aos grupos tratados, a pomada produzida com o muco do escargot *Achatina fulica* apresentou melhor reparação tecidual, tanto clinicamente quanto histologicamente, sendo portanto, uma alternativa aparentemente viável para o tratamento de feridas em pele de animais.

Key-words:

Escargot.
Mucus.
Cicatrization.
Rabbits.

Referências

1. STORER, T. I. Filo Mollusca: moluscos. In: _____. **Zoologia Geral**. 6. ed. São Paulo: Companhia Editorial Nacional, 1991. p. 416-443.
2. LOBÃO, V. L. **Helicicultura**: criação comercial de escargot, 2001. Apostila. p. 1-4.
3. OLSEN, D.; LUCHETEL, D. L. Secretion of mucus granules and others membrane bond strutures: a look beyond exocytosis. **Int. Vet. Cytol.**, v. 183, p. 95-141, 1998.
4. SIMKISS, K.; WILBUR, K. M. The molluscan epidermis and its secretions. **Symp. Zool. Soc.**, Lond., v. 39, p. 35-76, 1977.
5. FRETER, V. The genital ducts of some British stenoglossan prosobranchs. **J. Mar. Biol. Ass.**, U.K., v. 25, p. 173-211, 1941.
6. IGUCHI, S. M. M.; AIKAWA, T.; MATSUMOTO, J. J. Atividade antibacteriana do muco mucina de caracóis. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.27, n. 3, p. 571-574, 1982.
7. KUBOTA, Y. et al. Purificação e caracterização do fator antibacteriano do muco de escargots. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 82c, n 2, p. 345-348, 1985.
8. OTSUKA-FUCHINO, H. O. et al. Morphological aspects of achacin-treated bacteria. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 104C, n. 1, p. 37-42, 1993.
9. PACHECO, P. Desempenho ponderal do escargot *Achatina* sp. frente a diferentes formulações de ração. In: CONG. BRAS. DE MED. VET., 1996, Goiânia, GO. **Anais...** p. 184.
10. PACHECO, P.; MARTINS, M. F.; SPERS, A. E. Influência de diferentes níveis de carbonato de cálcio no desempenho ponderal do escargot Gigante *Achatina*. In: CONG. PAN. DE CIÊNC. VET., 1996b, Campo Grande. **Anais...** p. 365.
11. PACHECO, P.; MARTINS, M. F.; SPERS, A. E. Diferentes níveis de suplemento vitamínico-mineral no desempenho ponderal do escargot Gigante *Achatina*. In: CONG. PAN. DE CIÊNC. VET., 1996c, Campo Grande. **Anais...** p. 350.
12. PACHECO, P. et al. Diferentes formas de cálcio na dieta do escargot gigante africano (*Achatina fulica*) e seu efeito no crescimento e rendimento da carcaça. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 43-46, 1998.
13. PACHECO, P. et al. Efeitos da granulometria do fubá de milho e farelo de soja no desempenho ponderal do escargot *Achatina fulica*. In: CONG. BRAS. DE ZOOL., 2000, Cuiabá. **Anais...** p.67.
14. FLAUZINO, F. et al. Estudo nutricional e reprodutivo de matrizes do escargot *Achatina fulica* - Resultados preliminares. In: ENC. DE PESQ. AGROP. FZEA/USP, 1997, Pirassununga. **Resumos...** p. 62.
15. SANTOS, J. A. **Patologia especial dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986. 576 p.
16. MARTINS, M. F. et al. Efeito da secreção mucoglicoprotéica do escargot gigante africano *Achatina fulica* sobre a cicatrização em ratos. In: Panvet, 15., CONGRESSO PAN-AMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...**
17. COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
18. OTTORI, N.; CRLÖÖ, B.; STIERNIA, P. Lectin expression during wound ealing of the rabbit sinus mucosa: a study of regeneration epithelium and early polyp formation. **J. ORL.**, v. 60, p. 339-345, 1998.
19. IGUCHI, S. M. M. et al. An N-acetylneuraminic acid-specific lectin from the body surface mucus of african giant snail. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 81b, n. 4, p. 897-900, 1985.
20. BISWAS C.; SINHA, D.; MANDAL, C. Investigation on interaction of Achatinin, a 9-O - acetyl sialic acid binding lectin, with lipopolysaccharide in the innate immunity of *Achatina fulica* snails. **Molecular immunology**, v. 37, p. 745-754, 2000.