AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA DEPOSIÇÃO DE COLÁGENO PELA TÉCNICA DE POLARIZAÇÃO COM PICROSIRIUS EM FERIDAS CUTÂNEAS DE RATAS OOFORECTOMIZADAS TRATADAS COM ÓXIDO DE ZINCO NANOENCAPSULADO

Joaldo Alves Teixeira (PIBIC/CNPq/FA/UEPG), Adriana Yuriko Koga, Bruna Carletto, Vivian Missima Jecohti, Keizi Dayane de Lima, Aryadyne Bueno Rocha Szesz, Leandro Cavalcante Lipinski (Orientador), e-mail: leandrolipinski@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Medicina.

Ciências da Saúde/Cirurgia Experimental.

Palavras-chave: Cicatrização, Nanopartículas, Ooforectomia.

Resumo

O processo de cicatrização possui etapas de grande complexidade e que podem ser alteradas por inúmeras circunstâncias. Uma delas, que afeta mulheres pós menopausa, é a deficiência de estrógeno. O presente estudo tem como objetivo específico a avaliação da deposição de fibras colágeno tipo I e tipo III em feridas cutâneas de ratas ooforectomizadas tratadas com óxido de zinco nanoencapsulado por meio do método da polarização com picrosirius. Foram utilizados 45 ratos Wistar fêmea ooforectomizadas, nas quais foram realizadas feridas cutâneas na região cervico-lombar, na sequência, foram separados em 3 grupos: G0 sem tratamento, G1 e G2 tratados por 7 dias, com óxido zinco não nanoencapsulado e com óxido zinco nanoencapsulado, respectivamente. Foram fotografadas as lesões no dia de suas realizações e nos dias 7, 14 e 21 após as suas confecções, quando os animais foram eutanasiados e as lesões biopsiadas. Na retração macroscópica, o óxido de zinco nanoencapsulado se demonstrou tóxico devido alta biodisponibilidade. A pesquisa encontra-se sem resultados quanto a deposição de colágeno, estando ainda na fase de coloração e leitura das lâminas a partir do material das biópsias.

Introdução

A cicatrização de feridas é um fenômeno que se inicia a partir da perda da integridade da pele, gerando uma solução de continuidade que atinge os planos subjacentes em diversos graus e depende de uma série de reações químicas. O processo de reparação é dividido em três fases: inflamação, proliferação e remodelação (BALBINO *et al*, 2005).

A cicatrização é um processo muito complexo, importante e que envolve vários fatores, estudos demonstram que a deficiência de estrógeno é uma das principais causas de retardo desse processo. O principal local de síntese de estrógeno nas mulheres pré-menopausa são os ovários (BRUFANI *et al*, 2017). No estudo em ratas ooforectomizadas, foi observado que os baixos níveis de estrógeno levam a um atraso na cicatrização e sua reposição sistêmica, além de melhorar a cicatrização, aumenta a síntese, maturação e renovação de colágeno, principalmente colágeno tipo III (NICOLAU *et al*, 2014).

O óxido de zinco (ZnO), muito utilizado topicamente no tratamento de feridas, melhora a reepitelização, reduz a inflamação e o crescimento bacteriano. O uso de uma tecnologia com capacidade de entrega aumentada pode contribuir no processo cicatricial, otimizando a resposta no tratamento tópico de feridas. As nanopartículas oferecem essa tecnologia, dessa forma as nanopartículas de óxido de óxido de zinco podem ser uma alternativa viável para o tratamento de feridas complexas (MEHNERT & MÄDER *et al*, 2001).

Clinicamente a fase mais importe da cicatrização é a de remodelação. Nela ocorre a substituição do colágeno imaturo (colágeno tipo III), por um mais espesso (colágeno tipo I). A avaliação da deposição de colágeno é importante em estudos que avaliem meios para melhorar a cicatrização em populações que possuam deficiência nesse processo. Devido à disposição das fibras de colágenos ser em paralelo e possuírem alta reatividade com corantes ácidos, a utilização do corante ácido picrosirius red permite o aumento da birrefringência dessas fibras, o que torna possível serem distinguidas as fibras de colágeno tipo I e tipo III pela técnica de polarização com picrosirius, pois diferentes tipos de fibras emitem diferentes cores (JUNQUEIRA *et al*, 1982).

Material e Métodos

Foram utilizados 45 ratos Wistar fêmeas com idade superior a quatro meses e peso de aproximadamente 350g, que serão distribuídos em 3 grupos (n=15): G0 (grupo controle não tratado – n=15); G1 (tratado com óxido de zinco não nanoparticulado – n=15); e G2 (tratado com nanopartículas de óxido de zinco - n=15).

Os animais, após jejum hídrico e alimentar de 2 horas, foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal. As retiradas das gônadas foram feitas seguindo técnica padrão de ooforectomização. Para analgesia no pós-operatório imediato, os animais receberam citrato de fentanila (2 mg/kg) logo após o procedimento e retorno anestésico; 40 dias após a ooforectomia os animais foram novamente anestesiados e, em seguida, foi produzida uma lesão na pele da região cervico-lombar, medindo aproximadamente 4 cm^2, em cada animal. Após a produção da lesão os animais de todos os grupos receberam analgesia. Os animais dos grupos tratados receberam diariamente por 7 dias 1mL cada de solução tópica de ZnO não nanoparticulado (G1) e de Zno nanoparticulado (G2). Todas as lesões foram fotografadas no dia da confecção da lesão, nos dias 7, 14 e 21, com mesma luminosidade e a uma distância padrão (utilizando-se suporte de distância fixa para a câmera), as áreas foram calculadas utilizando o programa ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EUA). Para o cálculo da retração macroscópica, primeiro foi feita a diferença entre a área da ferida no dia em que a lesão foi realizada e a área no dia da eutanásia, a razão entre essa diferença e a área da ferida no dia da lesão gerou a porcentagem de quanto as feridas retraíram por período de 7, 14 e 21 dias.

Foram realizadas as eutanásias e biopsias das áreas das feridas nos dias 7, 14 e 21 após a realização da lesão. Cada biópsia foi acomodada em cassete histológico e fixada em paraformaldeído a 10% para processamento rotineiro para microscopia de luz. Após a fixação, foi iniciado o preparo das lâminas: desidratação em concentrações crescentes de etanol, inclusão em parafina, cortes com 5µm de espessura e coloração com picrosirius red para análise histológica de colágeno tipo I e III do material coletado; as imagens serão obtidas com uso de câmera acoplada a

ISSN 1676-0093

microscópiode polarização Olympus LG-PS2 e para evitar variações relacionadas ao processo de captura, as configurações da câmera e intensidade de luz serãoidênticas para todas as amostras; as imagens serão analisadas utilizando o programa ImageJ que reconhece as regiões coradasem vermelho (tipo I) e verde (tipo III) calculando a concentração destes subtipos de colágeno; serão analisados 4 campos por lâmina para ampliar a fidelidade do resultado.

Todas as etapas foram realizadas com técnicas padronizadas, e seguindo métodos que protegem a integridade dos animais, protocolados e autorizados pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, cujo número de processo CEUA é 038/2017 e de protocolo UPEG é 12393/2017.

Resultados e Discussão

Todo o cronograma da pesquisa transcorreu, apesar de imprevistos, de acordo com o cronograma até a fase de realização das biópsias. A partir dessa fase, não foi mais possível segui-lo devido uma sucessão de imprevistos que culminaram no atraso da fase final do experimento: o preparo, coloração e leitura das lâminas. Desta forma a presente pesquisa tem apenas resultados de caracterização das nanopartículas e retração macroscópica das lesões.

O tamanho médio das nanopartículas, a polidispersidade e o potencial zeta foram medidos a 25°C usando um aparelho Zetasizer Nanoseries ZS903600. A análise morfológica foi realizada por microscopia eletrônica de varredura em campo (FEG-SEM) (MIRA3 LM, Tescan Orsay Holding, República Tcheca) a uma voltagem de aceleração de 5,0 kV, e as imagens mostraram que as nanoesferas não apresentaram poros, tendo aspecto esférico com uma superfície lisa e regular.

Nos 7 primeiros dias, as retrações macroscópicas das feridas do grupo G1 foram significativamente mais que o grupo G0, nesse mesmo período não houve diferenças significativas entre os demais grupos. Entre os 7º e 14º dias, o grupo G2 retraiu significativamente mais que os outros; para os grupos G0 e G2 esse foi o período em que ocorreu a maior retração, já para para o grupo G1, a maior retração ocorreu entre o dia de confecção da lesão e o 7º dia. No 21º dia, não houve diferenças significativas entre os grupos, todos exceto o grupo G0 tiveram retração maior ou igual a 90% da área original.

A cicatrização de feridas cutâneas tem grandes vantagens para o uso de nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs), pois requererem entrega tópica e o agente terapêutico é usado por tempo limitado até a cura da região lesada, minimizando assim os possíveis efeitos tóxicos delas. Quando comparadas com materiais micrométricos, as nanopartículas (NPs) são detentoras de maior potencial para atravessar barreiras biológicas e podem ser biologicamente mais ativas, devido sua grande área de superfície quando comparadas com as partículas em tamanho de mícrons (ZHOU *et al*, 2014). Devido a isso, tais nanopartículas podem apresentar efeitos tóxicos, que ocorrem possivelmente devido a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que causam inflamação com suas consequências sobre as proteínas, membranas e DNA. Como consequência dessa toxicidade pode ocorrer a morte celular, provocada pela alteração de processos celulares (SHARMA *et al*, 2009). Isso explica, congruente congruentemente à literatura, os resultados piores, na retração macroscópica das feridas dos animais do grupo G2 nos primeiros 7 dias quando comparado ao do grupo G1. Pois ocorreu contração significativamente maior, no mesmo período, no grupo tratado com ZnO não nanoparticulado que no

grupo sem tratamento, dessa forma fica evidenciado que óxido de zinco acelera o processo cicatricial.

Conclusão/ões

A pesquisa permanece sem conclusão quanto à deposição de colágeno, devido a atrasos ocorridos durante a sua realização. Encontrando-se na fase de preparação, coloração e leitura das lâminas a partir do material das biópsias feitas nas ratas ooforectomizadas.

Macroscopicamente, notou-se que as nanopartículas de óxido de zinco apresentaram, possivelmente, efeitos tóxicos decorrentes das altas concentrações de nanopartículas de óxido de zinco no intracelular, pois as nanopartículas possuem melhor potencial de atravessar membranas biológicas quando comparadas às partículas micrométricas, como óxido de zinco não nanoparticulado.

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, por disponibilizar todo o aparato necessário para a realização da pesquisa. Ao meu orientador, professo Dr Leandro Lipinski, à minha coorientadora, Ms Adriana Koga e aos demais participantes dessa pesquisa.

Referências

BALBINO, C. A.; et al. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, 2005.

BRUFANI, M,; et al. Novel Locally Active Estrogens Accelerate Cutaneous Wound Healing-Part 2. **Scientific Reports**, v. 7, p. 2510, 2017.

JUNQUEIRA L.C.U.; et al. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization Method. **Histochemistry**. v.74, n. , p.153-156, 1982.

Mehnert, W.; et al. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.47, n.2, p.165-169.

NICOLAU, J.; et al. Análise do efeito do estradiol e progesterona tópicos na cicatrização de feridas em ratos. **Surgical&cosmeticdermatology**, v.6, n.2, p. 129, 2014.

SHARMA, V.; et al. DNA damaging potencial of zinc oxide nanoparticles in human epidermical cells. **Toxicol Left**., v. 185, n.3, p. 211-218, 2009.

ZHOU, E.H.; et al. Assessing the impact of engineered nanoparticles on wound healing using a novel in vitro bioassay. **Nanomedicine**, v.9, n.18, p. 2803-2815, 2014.