# AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE COLÁGENO PELA TÉCNICA DE PICROSIRIUS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS TRATADAS TOPICAMENTE COM NANOPARTÍCULAS DE ZINCO EM RATAS DIABETIZADAS E OOFORECTOMIZADAS

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

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Medicina.

**Ciências da saúde/ cirurgia.**

**Palavras-chave:** Nanotecnologia, inflamação, reparo tecidual.

## Resumo

A pesquisa de novos produtos com propriedades cicatrizantes é de grande relevância quando se considera o tempo prolongado de tratamento de úlceras por pressão, a necessidade de serviços de enfermagem e o uso de curativos especiais que juntos elevam significativamente o custo para sistema de saúde. Para o estudo foram utilizados 45 ratos Wistar (fêmeas) com peso entre 200 e 250g. Os animais foram distribuídos em 3 grupos (n=15): grupo controle (não tratado), grupo 1 tratado com Zn e grupo 2 tratado com Zn nanopartículado. Uma lesão cutânea, de aproximadamente 4 cm², foi produzida na região cervico-lombar de cada animal. Os pertencentes aos grupos que foram tratados receberam solução tópica de zinco (grupo 1) e solução tópica de zinco nanopartículado (grupo 2) uma vez ao dia durante sete dias. Foram realizadas eutanásia e biópsia de cinco animais de cada grupo nos dias 7, 14 e 21 após as lesões. A partir dessas amostras foi efetuada a análise histológica por meio da técnica de picrosirius red e as imagens obtidas foram analisadas utilizando o programa Image J que avalia a concentração dos subtipos de colágeno.

## Introdução

A pele é o maior órgão do corpo humano, exercendo sua função como barreira entre o meio externo e interno. Quando esta barreira é lesionada um complexo evento fisiológico é desencadeado para restaurar a sua função e manter a sua homeostase, para reduzir os riscos de infecções e demais complicações decorrentes (GAINZA *et al.,* 2015).

O cuidado com feridas tem se tornado cada vez mais importante devido ao aumento de feridas crônicas e à morbidade associada a elas. Devido aos altos impactos econômicos e assistenciais a pesquisa de novos produtos com propriedades cicatrizantes é de grande relevância (HAN; CEILLEY, 2017).

Uma excelente possibilidade de tratamento para lesões cutâneas complexas é a administração tópica de medicamentos e compostos nanoencapsulados, pois oferece vantagens como: possuir taxa constante de liberação do ativo, fácil aplicação, baixa toxicidade e não sofrer metabolismo de primeira passagem (TOCCO et al., 2012). Estudos revelam êxito no tratamento de feridas cutâneas com o uso de nanoparticulas de óxido de zinco devido ao estímulo da epitelização e suas

propriedades antimicrobianas (MISHRA et al., 2017).

O zinco (Zn) é um oligoelemento essencial para crescimento, proliferação e reparação celular (SHAOQIANG *et al*., 2009), é um mineral essencial necessário para a atividade catalítica de várias enzimas, que contribui para a síntese de proteína e DNA, atuando também na função imune e proliferação celular (CEREDA *et al*.,2015).

O diabetes prejudica significativamente a homeostase de Zn, levando a deficiência sistêmica do mesmo, o que está associado à cicatrização da ferida (SHAOQIANG *et al*., 2009). Em um estudo realizado por SHAOQIANG *et al*., (2009) foi observado um benefício significativo da aplicação tópica de Zn com ou sem outros componentes na cicatrização de feridas diabéticas ou não diabéticas. Os efeitos benéficos da aplicação tópica de Zn incluem não apenas a correção da deficiência de Zn nos tecidos da ferida, mas também o aumento da angiogênese, a diminuição da resposta inflamatória e do crescimento bacteriano, bem como o aumento de antioxidantes contra danos epiteliais e vasculares causados por diabetes, além de ser capaz de ampliar as funções do fator de crescimento de fibroblastos (FGF).

O método histológico da polarização com picrosirius é de excelente utilidade para avaliação da cicatrização, principalmente por possibilitar a análise e diferenciação tecidual dos tipos de colágeno, sendo este o principal componente do tecido conjuntivo em fase de cicatrização (CAMPOS et al., 2007).

## Material e Métodos

Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) de acordo com o protocolo 12393/2017.

Foram utilizados 45 ratos Wistar (fêmeas) com peso entre 200 e 250g, todos passaram por procedimento cirúrgico para ooforectomia bilateral e posteriormente foram diabetizados com duas aplicações intraperitoneais de estreptozotocina (50 mg/Kg), com intervalo de 24h entre doses. Os animais foram distribuídos em 3 grupos (n=15): a) grupo controle (não tratado), b) grupo 1 tratado com zinco e c) grupo 2 tratado com zinco nanopartículado.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (40mg/kg) e cloridrato de xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal e, em seguida, foi produzida uma lesão na pele da região cervico-lombar, medindo 4 cm², em cada animal.

Após a produção das lesões, os animais de todos os grupos receberam citrato de fentanila (2mg/kg), para minimizar o desconforto pós-operatório. Após cessado o efeito anestésico, receberam água e ração comercial ad libitum. Todos permaneceram em gaiolas individuais, com temperatura, luminosidade e umidade controlada.

Os animais dos grupos tratados receberam solução tópica de zinco (grupo 1) e solução tópica de zinco nanopartículado (grupo 2) uma vez ao dia durante sete dias.

Foram realizadas eutanásia e biópsia de cinco animais de cada grupo nos dias 7, 14 e 21 após as lesões. A partir dessas amostras foi realizada a análise histológica das fibras colágenas (tipo I e III), os tecidos das lesões foram desparafinizados, hidratados e corados utilizando *picrosirius red* em solução aquosa saturada de ácido pícrico. As imagens foram obtidas com microscópio de polarização Olympus LG-PS2 e para evitar variações relacionadas ao processo de

captura, as configurações da câmera e intensidade de luz foram idênticas para todas as amostras. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image J que reconhece as regiões coradas em vermelho (tipo I) e verde (tipo III) calculando a concentração destes subtipos de colágeno. Foram analisados 4 campos por lâmina e os resultados expressos em pixel.

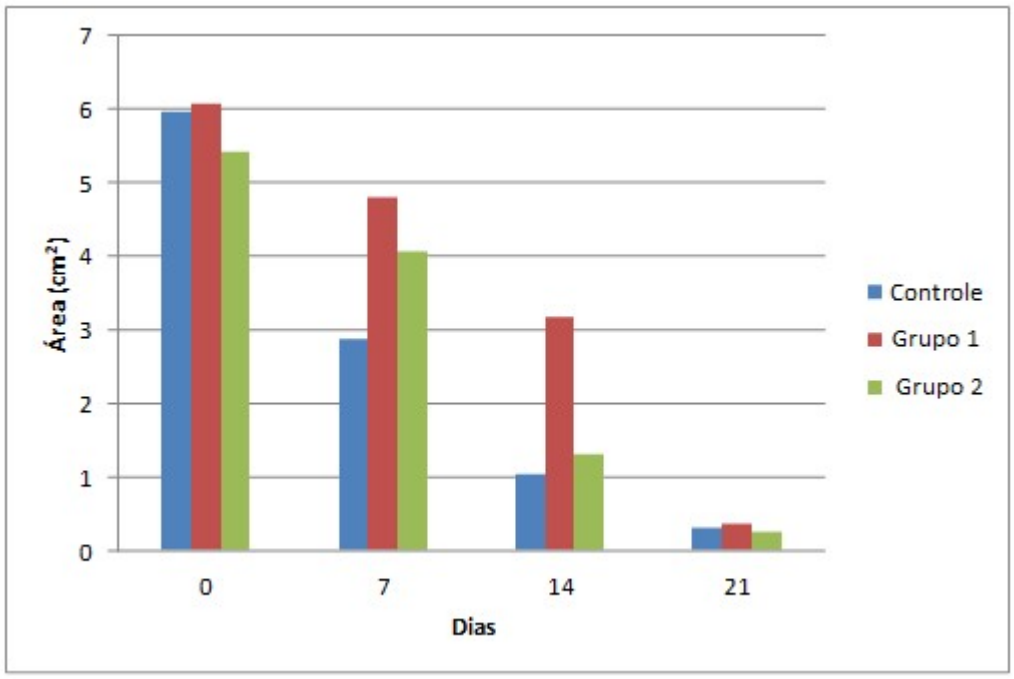
Todos os procedimentos foram realizados respeitando-se o bem-estar do animal.

## Resultados e Discussão

ÁREA DE RETRAÇÃO DA FERIDA

As lesões dos animais sem tratamento apresentaram no 7º dia uma retração significativamente maior em relação aos grupos tratados com zinco convencional e nanoestruturado ($p < 0,05$). No 14º dia as áreas das feridas do controle foram estatisticamente iguais as do grupo 2 ($p < 0,05$). Já no 21º dia todas as lesões apresentaram áreas estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

**Figura 1** – Área média das feridas operatórias dos três grupos de animais estudados no 7º, 14º e 21º dias pós-lesão inicial.




Macroscópicamente não foi encontrada diferença significativa na retração da área da ferida entre os três grupos estudados, o que vai de encontro com a hipótese de que o zinco nanoparticulado melhoraria o processo de reparo tecidual através de suas propriedades como: maior potencial para atravessar barreiras biológicas e capacidade de disponibilizar pequenas concentrações de fármaco no local de ação de maneira controlada e prolongada (TOCCO *et al*., 2012).

## Conclusão/ões

Os resultados da avaliação histológica não comprovaram potencialização no processo de cicatrização, pois não apresentaram superioridade estatística sobre os demais grupos testados.

O objetivo seguinte era quantificar a produção de colágeno para assim comprovarmos a cicatrização eficaz, porém a pesquisa foi desenvolvida conforme o previsto até a fase de realização das biópsias, porém houve um imprevisto na preparação das lâminas histológicas a partir disso ocorreu um atraso em todo o processo, visto que a leitura das lâminas e a realização das imagens no microscópio de polarização é um trabalho minucioso que requer tempo.

A padronização do corante também está apresentando dificuldades devido aos testes de proporção, visto que precisa atingir a fluorescência para a análise ser realizada.

Pedimos nossas sinceras desculpas e informamos que a pesquisa está em seus trâmites finais e todos esforços estão concentrados para que esteja concluída a tempo de sua mostra no EAIC.

## Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Leandro Cavalcante Lipinski, à minha co-orientadora Bruna Carletto e aos demais colaboradores deste projeto, à Universidade Estadual de Ponta Grossa, que foi sede do projeto e proporcionou a estrutura necessária para a conclusão desse trabalho e à Fundação Araucária por seu incentivo ao desenvolvimento da pesquisa científica, meus sinceros agradecimentos.

## Referências

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v.20, n.1, p. 51-58, 2007.

CEREDA, E.; KLERSY, C.; SERIOLY, M. A nutritional formula enriched with arginine, zinc, and antioxidants for the healing of pressure ulcers: a randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 162, n. 3, p. 167-174, 2015.

HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Advances in Therapy**, v.34, n. 3, p. 599–610, 2017.

MISHRA, P. K. et al. Zinc oxide nanoparticles: a promising nanomaterial for biomedical applications. **Drug Discovery today**. v. 22, n. 12, p. 1825-1834, 2017.

SHAOQIANG, L. et al. Combined Use of Acid Fibroblast Growth Factor, Granulocyte Colony-stimulating Factor and Zinc Sulphate Accelerates Diabetic Ulcer Healing. **Journal of Health Science**, v. 55, n. 6, p. 910-922, 2009.

TOCCO, I. et al. Nanotechnology-Based Therapies for Skin Wound Regeneration. **Journal of nanomaterials**. p. 1-11, 2012.