ANÁLISE HISTOLÓGICA DE FIBRAS DE COLÁGENO ATRAVÉS DA TÉCNICA PICROSIRIUS NA CICATRIZAÇÃO DE RATAS DIABETIZADAS

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

Universidade Estadual de Ponta Grossa / SEBISA - Departamento de Medicina.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da saúde - Cirurgia Experimental
Palavras-chave: modelo experimental, diabetes, reparo tecidual.

Resumo
O processo de cicatrização possui etapas de grande complexidade e que podem ser alteradas por inúmeros agentes e/ou circunstâncias, sendo um desses fatores a diabetes mellitus. Os indivíduos diabéticos possuem alterações sistêmicas que prejudicam o reparo de lesões, causando ulcerações crônicas com risco de amputação. Essa doença afeta várias etapas do processo cicatricial, desde o recrutamento de células até a deposição de colágeno. Portanto, o presente estudo tem o objetivo de analisar a cicatrização, em especial a deposição de fibras colágenas, do tipo I e III, em 30 ratas Wistar diabetizadas, nas quais foram realizadas feridas de peles na região dorsal. Os animais foram separados em 6 grupos (n=90) sendo G1 a G3 grupos controle, G4 a G6 diabetizadas. Neste subprojeto o material será corado a fim de se avaliar as fibras colágenas tipo I e III, seguida de análise histológica para identificar possíveis mudança da normalidade. Acredita-se que serão encontradas alterações. A análise será realizada com o intuito de avaliar se o tratamento com zinco melhora o quadro de cicatrização.

Introdução

Existem etapas de extrema complexidade no decorrer do processo de cicatrização, que dependem de diversas células, moléculas e substâncias pró inflamatórias, que podem ser influenciadas por inúmeros fatores, sejam eles de origem externa ou interna, química ou física, locais ou sistêmicas (GONZALEZ et al, 2016). A regeneração tecidual acontece basicamente em três etapas: inflamatória, formação e proliferação do tecido de granulação com deposição da matriz extracelular, e remodelagem (CLARK, 1993).

De acordo com a Diretriz de 2017 da Sociedade Brasileira de Diabetes, em 2015 cerca de 415 milhões de pessoas já viviam com diabetes mellitus (DM). Atualmente, sabe-se que essa doença tem impacto direto na cicatrização, pois ela causa microangiopatia que reduz o provimento de nutrientes e oxigênio para a lesão, prejudica a função imune e a angiogênese, desfavorece a formação e deposição de fibras colágeno (SIMON et al, 2016). Uma consequência da dificuldade do reparo tecidual que essa comorbidade promove, são ulcerações crônicas que não cicatrizam nos membros inferiores. Cerca de 85% das amputações em diabéticos são precedidas por esse quadro (SBD, 2017).

Um dos compostos que vem sendo explorado nos últimos anos em dispositivos biomédicos é o oxido de zinco (ZnO). Sabe-se que é um elemento essencial em inúmeras reações biológicas, como para o sistema imune, proteção contra danos oxidativos, atuação nos mecanismos de reparação do DNA, sintetização de proteínas, etc (MARTINS, 2011).

ISSN 1676-0093

Os colágenos I e III são os principais tipos de fibras envolvidas na restauração dos tecidos, conferindo resistência e elasticidade para a pele. Portanto, a avaliação da deposição dessas fibras é uma etapa importante na investigação da cicatrização. Assim, o presente trabalho procura associar técnicas e métodos de tratamento já conhecidos a tecnologias avançadas, analisar as etapas do reparo tecidual em ratas diabetizadas tratadas com zinco convencional e nanoparticulado (NP).

Material e Métodos

O seguinte projeto possui aprovação da Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob número de protocolo 12393/2017. Todas as etapas foram realizadas com técnicas padronizadas, e seguindo métodos que protegessem a integridade dos animais.

Foi utilizado material coletado de um experimento já existente. Onde houve diabetização laboratorial de 45 ratas Wistar com duas doses de estreptozotocina (STZ) 50mg/kg cada e intervalo de 24h. Sendo consideradas diabetizadas os animais que aumentaram em 40% o valor da glicemia capilar inicial, aferida com glicosímetro portátil e uma gota de sangue periférico da cauda do animal. A média das aferições iniciais foram de 129,7mg/dL, e nos dias 7, 14 e 21 foram 361,4mg/dL, 272,8mg/dL e 422mg/dL, respectivamente.

Ao final do projeto foram inclusos grupos controle para uma análise comparativa, a fim de melhorar os resultados. Os animais foram divididos em 6 grupos com n=15 cada: G1 – sem DM e sem tratamento; G2 – sem DM e tratado com ZnO tópico convencional; G3 – sem DM e tratado com ZnO tópico NP; G4 – portador de DM e sem tratamento; G5 – portador de DM e tratado com ZnO tópico convencional; e G6 – portador de DM e tratado com ZnO tópico NP.

Foi realizada lesão dorsal, medindo 2cm x 2cm em cada animal (D0), e analisado o processo de cicatrização. Os grupos G2, G3, G5 e G6 receberam as respectivas medidas terapêuticas uma vez ao dia, durante 7 dias. Foram eutanasiados 5 animais de cada grupo e biopsiadas as áreas das feridas nos dias 7, 14 e 21.

As amostras das lesões dos animais coletados haviam sido emblocadas em parafina e armazenadas em condições apropriadas. Realizou-se então a coloração em picrosirius red a fim de visualizar a deposição colágena, além da coloração padrão com hematoxilina e eosina (HE) para avaliar parâmetros adicionais da cicatrização. Fotografou-se 3 imagens de cada lâmina. Estas foram analisadas com o mesmo microscópio, Olympus DP72, utilizando o programa CellSens Standard, para garantir que a avaliação mantivesse a mesma referência.

Resultados e Discussão

Todos os grupos apresentaram retração visível na área da ferida. Os gráficos da figura 1, demonstram em porcentagem o quanto as lesões dos grupos regrediram em cada período e como era de se esperar, a maioria dos grupos tem maior retração ao final da fase proliferativa (CLARK, 1993). As biopsias realizadas no D7 pós-injúria, mostram que o parâmetro de infiltração neutrofílica é menor em G3 comparado à G1 e G2. Já no 14º dia, G6 apresentou maior número de neutrófilos que G3 e G5 (Figura 2). E por fim, no dia 21, houve significância na análise da colagênese.

No presente estudo, a STZ foi utilizada com o objetivo de mimetizar um quadro de DM crônica e retardar a cicatrização, contudo, as áreas de retração das lesões em G4 e G1 foram semelhantes (ambas acima de 92%). Os achados macro e

microscópicos desta pesquisa, sugerem que essa droga desencadeia um quadro agudo da doença, onde o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia está relacionado à ativação de macrófagos, à indução de citocinas, e características relacionadas ao aumento de proteínas de fase aguda de inflamação (LAPW, 2006).

As biópsias do 7º dia mostraram infiltração por neutrófilos significativamente menor quando comparado G3 a G1 e G2. Já no 14º dia, apesar de não mostrar significância em relação aos demais grupos, essa média da quantidade de neutrófilos continuou diminuindo. Isso retifica o fato de que a nanoestrutura agiu na fase precoce pós lesão, melhorando o quadro inflamatório inicial. Esse resultado favorável à nanotecnologia pode ser explicado pelo fato de suas moléculas apresentarem melhor controle e distribuição do medicamento, sendo biologicamente mais ativas, com um maior potencial para atravessar barreiras biológicas (SOUZA, 2015).

Nas fases de proliferação e de remodelamento tecidual, o zinco age nas metaloproteinases, substância que irão modular a matriz extra celular e melhorar a deposição de colágeno (TAKEO, 2015). Visto isso, no 21º dia, é possível entender o aumento da intensidade de colagênese em ambos os grupos tratados com ZnO, sendo que G3 (nano tratamento) foi significativamente maior que G1. Porém, ao iniciar a análise das lâminas coradas com picrosirius red, notou-se que houve um erro de padronização da coloração. Isso comprometeu a avaliação da deposição de colágeno, o qual era objetivo principal do presente estudo. Foi necessário então retornar à etapa de preparo de novas lâminas com corante acima citado. Esse imprevisto afetou o andamento das atividades e atrasou o cronograma.

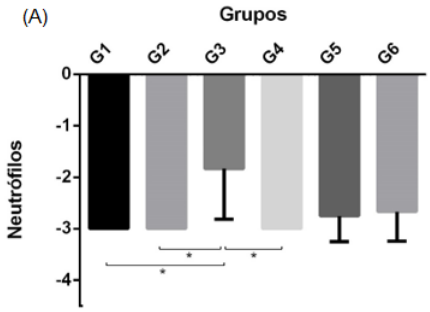
Outra dificuldade enfrentada foi o fato de que o micrótomo disponível é antigo e impediu agilidade para o corte das lâminas na espessura ideal, tomando mais tempo do que o previsto. Portanto, no momento, a pesquisa encontra-se em atraso. Sendo este apenas um resultado parcial

Figura 1 – Gráfico com porcentagem das áreas retraídas por período analisado.

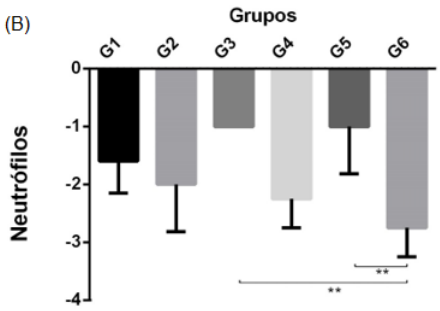


Figura 2 – Neutrófilos no D7 e D14, respectivamente.

ISSN 1676-0093



FONTE: Os autores, 2018.



FONTE: Os autores, 2018.

Conclusão

Conclui-se que o tratamento com óxido de zinco nanoparticulado se apresentou com melhores resultados na cicatrização em D14 e D21 nos grupos não-diabetizados. No entanto, é necessária análise das fibras de colágeno para retificar o tratamento. Devido ao comprometimento da qualidade do material, houve atraso no decorrer das tarefas propostas, estando a pesquisando ainda em andamento.

Agradecimentos

Agradeço ao orientador e ao co-orientador, assim como aos colegas de pesquisa e a Universidade Estadual de Ponta Grossa que possibilitaram que o projeto acontecesse até o momento.

Referências

CLARK. R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Investigation Dermatology**, v.11, p. 647-661, 1993.

GONZALEZ, A. C. de O.; et al. Cicatrização cutânea – Revisão de literatura. **An Bras de Dermatol**., v.91, n.5, p. 614-620, 2016.

LAPW ML, Wound Healing. **Wiley Enciyclopedia o Biomedical Engineering.** v. 39, 2006.

MARTINS C, Farmaconutrientes: evidência clínica atual. **OFIL**. v.21, n.4, p177-186, 2011.

SIMON, P. E.; et al. **Skin Wound Healing.** Disponível em: https://emedicine.medscape.com/article/884594-overview#showall. Acesso em: jul 2019.

SOC. BRAS. DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017/2018**. São Paulo, editora Clannad, p.12-18, 2017.

SOUZA RC. **Ação antimicrobiana de filmes de polietileno de baixa densidade e polietileno de baixa densidade linear modificado com anidrido maleico incorporados com nanopartículas de óxido de zinco**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

TAKEO M, Lee W, Ito M. Wound healing and skin regeneration. **Cold Sprig Harb Perspect Med**. v.5 n.1, 2015.