



## AValiação PRÉ-CLÍNICA DA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES EM RATOS TRATADOS COM BIOMATERIAIS A BASE DE QUITOSANA

Áurea Pandolfo Correa<sup>1</sup>

Vanessa Gaissler<sup>2</sup>

Alessandra Hubner de Souza<sup>3</sup>

### Resumo

A cicatrização de feridas crônicas é um desafio terapêutico, desenvolvendo úlceras cutâneas que necessitam de um longo tempo de tratamento, resultando em alto custo com cuidados médicos. O uso de recursos naturais é uma tendência mundial na tentativa de mimetizar uma matriz cutânea original. A biomembrana formada por quitosana tem se mostrado promissora, pois além de ser abundante na natureza, apresenta várias funções biológicas, como: propriedades de acelerar a cicatrização, estimular a diferenciação celular e a reepitelização da pele. Este estudo objetivou avaliar e comparar a eficácia dos diferentes tipos de biomembranas de quitosana no processo cicatricial de lesões cutâneas. Foram utilizados ratos Wistar submetidos a uma excisão cirúrgica na parte superior do dorso, onde avaliou-se sua reparação tecidual em diferentes dias. Os tratamentos utilizados foram: soro fisiológico, colagenase, membrana de sal de quitosana, nanomembrana de quitosana em ácido acético e nanomembrana de quitosana em ácido clorídrico. Foram realizadas análises morfométrica, morfológica, histológica e estatística. Os animais tratados com biomembranas de quitosana apresentaram melhor aparência da ferida em todo o período quando comparado aos demais grupos. A formação de exsudato e a contração final da ferida foram semelhantes em todos os grupos. A avaliação do tipo de inflamação aguda dos grupos com biomembrana de quitosana demonstrou melhores resultados apesar da formação de crosta sob a membrana, que configurou um aspecto sero-hemático; apesar desta alteração, não houve alteração do processo cicatricial. A análise histológica demonstrou que os grupos com biomembranas de quitosana apresentaram aspectos histológicos mais favoráveis, estimulando as fases subsequentes da cicatrização. O presente estudo demonstrou que o tratamento com as biomembranas de quitosana, especialmente a com ácido clorídrico, estimulou as fases subsequentes da cicatrização, fazendo com que seu arranjo histológico fosse mais denso e consistente.

Palavras chave: Feridas; Biomembrana; Nanotecnologia.

### INTRODUÇÃO

Em todas as fases da vida, a pele exerce a função de reguladora do balanço hídrico, de infecção e da termogênese. Quando a integridade da pele é rompida, podem surgir feridas crônicas e agudas. Milhões de pessoas no mundo são acometidas por feridas cutâneas, sendo que nas últimas décadas avanços ocorreram para a compreensão dos mecanismos de cicatrização e das causas de seus atrasos. Este progresso científico tem levado a melhora na qualidade de vida dos pacientes (WONG; CRAWFORD, 2013).

---

1 Aluna do curso de Farmácia – Bolsista CNPq – adapcorrea@hotmail.com

2 Aluna do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada

3 Professora do curso de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada – alessandrahubnersouza@gmail.com

A cicatrização de feridas envolve vários processos tais como inflamação, proliferação celular e contração do colágeno formado (GANTWERKER; HOM, 2011). Trata-se de um mecanismo bem organizado onde atuam plaquetas, queratinócitos, leucócitos, células microvasculares e fibroblastos na restauração do tecido, acarretando o fechamento das lesões (DEMIDOVA-RICE; HAMBLIN; HERMAN, 2012; SINNO; PRAKASH, 2013). A reparação das lesões depende de vários fatores como: a) idade do paciente, b) grau de nutrição, c) uso de corticosteróides, d) diabetes, e) influência do hormônio de crescimento e f) resposta genética (ADAMS, 2009).

O processo de cicatrização é universal: após o ferimento, ocorre uma sequência de reações físicas, químicas e biológicas, cuja finalidade é reconstituir a continuidade tecidual que foi interrompida. Inflamação, debridamento, cicatrização e maturação são eventos distintos que ocorrem simultaneamente (HEDLUND, 2008).

Numerosos tratamentos têm sido desenvolvidos para promover a cicatrização de lesões, e observa-se que o tratamento ideal precisa ser biocompatível, não citotóxico, não antigênico, garantir a distribuição celular, manter a viabilidade celular e o fenótipo, induzir a migração e a proliferação das células epiteliais (BALAKRISHNAN et al., 2005; PADDLE; NASA; CLELAND, 2006).

Curativos biológicos (biomateriais) produzidos à base de polímeros como a celulose, colágeno, alginato e quitosana, têm a capacidade de envolvimento natural no tecido lesado, assim como no tecido em formação, para promover a cicatrização. Além disso, eles apresentam propriedades antimicrobianas intrínsecas e distintas possibilidades de ligações para mediadores inflamatórios (citocinas, proteases e radicais livres), cujas concentrações são elevadas em úlceras crônicas de difícil cicatrização (WIEGAND; HIPLER, 2010).

Existe uma grande variedade de curativos diferentes com biomateriais, mas ainda não representam uma forma ideal (HEDLUND, 2002). Neste sentido, este trabalho visa aprimorar a confecção de um curativo biológico para o tratamento de lesões cutâneas a base de diferentes tipos de biomembranas de quitosana.

## **METODOLOGIA**

**Animais:** 60 ratos Wistar machos, com 11 semanas de idade (250g a 350g), provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). A eutanásia dos animais foi realizada através da overdose de xilasina e cetamina conforme o Guia Brasileiro de Boas Práticas para a Eutanásia de Animais. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) - Canoas RS, sob protocolo nº 2016/132.

**Padronização dos grupos:** Os animais foram divididos nos seguintes grupos: soro fisiológico, collagenase, membrana sal de quitosana, nanomembrana de quitosana em ácido acético e nanomembrana de quitosana em ácido clorídrico. Os animais foram distribuídos em cinco grupos com doze animais cada.

**Procedimento cirúrgico:** Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em condições assépticas e as lesões cicatrizaram por segunda intenção. Foi realizada uma lesão na parte superior do dorso dos animais, até a fáscia muscular de 2 x 2 cm.

**Análises Morfológica e Morfométrica:** Nos dias 3, 7, 10 e 14 do pós-operatório, a área lesada de todos os animais foi medida e fotografada. As imagens foram analisadas com o software processador de imagens IMAGE J (NIH, Bethesda, MD, USA), que estimou a área da lesão. Os parâmetros morfológicos analisados foram presença de crosta, reepitelização, esfacelo e granulação. Os resultados foram transformados em escores de 0 a 4 (SANTOS et al., 2005).

**Análise Histológica:** As biópsias do tecido foram colhidas e fixadas em formaldeído a 10% durante um período de 48 horas. Posteriormente, foram desidratadas, colocadas em parafina e

depois seccionadas com um micrótomo (7 µm). As seções transversais foram coradas com Hematoxilina e Eosina para avaliação dos parâmetros a seguir. Na epiderme: presença de crosta, reepitelização e queratinização; e na derme: hemorragia, vasodilatação, neovascularização, anexos (folículo piloso, glândula sebácea e glândula sudorípara) e colagenização por Tricrômico de Masson.. Foi selecionada uma área representativa para análise qualitativa de microscópio óptico (aumento de 400 ×). Os dados obtidos para esses parâmetros acima foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em escores: ausente – até 15% (0), muito pouco – até 20% (1), pouco – até 50% (2), moderado – até 80% (3) e muito intenso – até 100% (4), de acordo com o seu aspecto histológico (TOLOSA et al., 2001).

**Análise estatística:** A análise estatística dos dados referentes à morfologia e histologia foi realizada pelo teste de distribuição não paramétrica de Kruskal-Wallis, seguido do teste Student – Newman - Keuls do Bioestat 5.0. Os valores de  $p < 0,05$  mostraram evidências estatísticas de que há diferença entre os dados em questão, com intervalo de confiança de 95%. Os resultados da análise do tamanho da retração da lesão foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguidos pelo teste de Bonferroni, através do software GraphPad 4 Software (USA). Todos os dados foram expressos como média + desvio padrão e foram considerados significativos os valores de  $p < \pm 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise morfométrica

**Taxa de contração da ferida:** No terceiro dia, foi observado a maior contração do grupo soro fisiológico (34,36%) e um aumento significativo (\*\*\*)  $p < 0,0001$  do tamanho da ferida de 13,70% no grupo da colagenase. No dia 7, houve uma contração maior no grupo nanomembrana de quitosana em ácido clorídrico (57,09%), seguido do grupo soro fisiológico (52,57%), nanomembrana de quitosana em ácido acético (49,26%) e sal de quitosana (39,58%). Apesar da colagenase ter o pior desempenho da taxa de contração até o dia 7 (21,20%), houve uma recuperação na contração significativa neste período (\*\*\*)  $p < 0,01$ . A partir do décimo dia, todos os grupos tiveram taxa de contração da ferida semelhante.

**Avaliação da cicatrização tecidual:** A avaliação da cicatrização demonstrou, inicialmente, que o grupo soro fisiológico (SF) obteve uma maior redução do tamanho da lesão, porém com aspecto mais necrótico. O grupo colagenase apresentou um aspecto necrótico. Os grupos das biomembranas apresentaram bom aspecto evolutivo e de contração. Ao final do dia 14, todos os grupos tiveram contração semelhante, praticamente cicatrizado, sendo um pouco menos evidente no grupo da colagenase e, com pior aspecto, no grupo soro fisiológico.

### Análise morfológica

**Análise do exsudato:** A análise do exsudato foi pequena e semelhante em todos os grupos. No dia 3, foi um pouco mais pronunciada no grupo colagenase seguido do grupo soro fisiológico. O dia 7 foi o que apresentou maior quantidade de exsudato em todos os grupos.

**Aparência da lesão:** A análise da aparência da ferida está relacionada com o status cicatricial e apresentada conforme o escore: 1 - lesão epitelizada, 2 - lesão com tecido de granulação, 3 - lesão com fibrina e 4 - lesão com aspecto necrótico; sendo o maior valor relacionado com o pior aspecto da ferida. Os grupos soro fisiológico e colagenase apresentaram-se com mais crosta e fibrina que os grupos das biomembranas, especialmente no dia 7. A nanomembrana

em ácido clorídrico apresentou um aspecto melhor e mais próximo a granulação que os demais grupos (\*\*p<0,01). No sétimo dia, os grupos de biomembranas de quitosana tiveram seus aspectos classificados entre esfacelo, mas melhor que o aspecto necrótico dos grupos soro fisiológico e collagenase (\*\*p<0,0001). No décimo quarto dia, todos os grupos, exceto o grupo soro fisiológico, obtiveram aparência classificada entre granulação e esfacelo (\*\*p<0,0001). Em todos os dias, o grupo nanomembrana em ácido clorídrico teve aparência significativamente melhor. As biomembranas de quitosana isolaram a lesão do curativo secundário, não necessitando de trocas frequentes. Estudos sugerem que as lesões tratadas com gaze têm seu tecido de granulação prejudicado pelas trocas dos curativos, com aderência das fibras da gaze à cicatriz (WANG et al., 2002; DAI et al., 2009, KUMAR et al., 2008). A formação da crosta sob as biomembranas de quitosana parece não ter prejudicado nem atrasado o processo de reepitelização e queratinização, mas são necessários mais estudos.

**Análise histológica:** A análise da epiderme através da coloração Hematoxilina e Eosina demonstrou presença de crosta muito intensa no grupo soro fisiológico e collagenase no dia 3. No sétimo dia, os grupos com biomembranas de quitosana apresentaram derme espessa e organizada, com muitos fibroblastos de forma a propiciar o início da epitelização. O processo de reepitelização iniciou de forma sutil no grupo collagenase, sem queratinização, no dia 10; já os grupos sal de quitosana e nanomembrana de quitosana em ácido acético apresentaram reepitelização e queratinização de até 50%, e o grupo nanomembrana de quitosana em ácido clorídrico moderada - até 80%. O grupo soro fisiológico, além de apresentar reepitelização pequena e ausência de queratinização, também não demonstrou estruturação dérmica até o dia 14. A avaliação da derme demonstrou presença de hemorragia inicial de até 80% nos grupos soro fisiológico e collagenase que persistiu até o 7º dia e pouca hemorragia nos grupos com quitosana. A vasodilatação foi semelhante nos grupos, sendo um pouco mais pronunciado nos grupos com biomembranas, até o sétimo dia. A neovascularização foi identificada no grupo nanomembrana de quitosana em ácido acético no sétimo dia, nos demais grupos foi identificada a partir do décimo dia. Quanto ao número de vasos, houve um aumento inicial (terceiro dia), com um decréscimo especialmente dos grupos com biomembranas de quitosana no dia 7. A análise histológica através da coloração do Tricrômio de Masson (TS) para avaliação da colagênese mostrou pequena quantidade de colágeno. A partir do sétimo dia, todos os grupos com biomembranas tiveram aumento na produção de colágeno. No décimo dia, a colagênese praticamente se assemelhou em todos os grupos; porém, os grupos com biomembranas, especialmente as nanomembranas, demonstraram fibras colágenas, mas organizadas, densas e compactas.

## CONCLUSÕES

Os achados deste trabalho indicam que as biomembranas de quitosana parecem desempenhar importante papel em todas as fases da cicatrização. Apesar de não ter uma diferença importante na contração da cicatriz, sua presença produz um arranjo estrutural da derme mais precoce, favorecendo as fases subsequentes da cicatrização. Por isolar a lesão do curativo secundário, não necessita trocas frequentes, o que favorece a integridade do tecido de granulação. A formação da crosta sob a membrana parece não ter prejudicado nem atrasado o processo de reepitelização e queratinização que ocorreu sob a crosta.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, P.D. Healing and hurting: molecular mechanisms, functions, and pathologies of cellular senescence. *Mol Cell*, v. 36, p. 2–14, 2009.

- BALAKRISHNAN, B.; MOHANTY, M.; UMASHANKAR, P.R.; JAYAKRISHNAN, A. Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate na gelatin. **Biomaterial**, v.26, p. 6335-42, 2005.
- DAI, M.; ZHENG, X.; XU, X.; KONG, X.; LI, X.; GUO, G.; LUO, F.; ZHAO, X.; QUANWEI, Y.; QIAN, Z. Chitosan Alginate Sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. **J Biomed Biotechnol**, v. 2009, p. 1-8, 2009.
- DEMIDOVA-RICE, T.N.; HAMBLIN, M.R.; HERMAN, I.M. Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. **Adv Skin Wound Care**, v.7, n.25, p. 304–14, 2012.
- GANTWERKER, E.A.; HOM, D.B. Skin: histology and physiology of wound healing. **Facial Plast Surg Clin North Am.**, v.19, p. 441–53, 2011.
- HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**. 3<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 159-259, 2008.
- HEDLUND, C. S. Cirurgia Do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, W. T.; HEDLUND, C.S; HULSE, D.; JOHNSON, A. L.; SEIM H. B.; WILLARD, M. D.; CARROLL, G.L. (Eds). **Cirurgia de Pequenos Animais**. 5<sup>a</sup>ed. São Paulo: Roca, p. 101-162, 2002.
- KUMAR, M.S.; KIRUBANANDAN, S.; SRIPRIYA, R.; SEHGAL, P.K. Triphala promotes healing of infected full-thickness dermal wound. **J Surg Res**, v. 144, p. 94-101, 2008.
- PADDLE, L.J.E.; NASA, Z.; CLELAND, H.J. Effect of different wound dressings on cell viability and proliferation. **Plast. Reconstr. Surg**, v.117, p.110 - 118, 2006.
- SANTOS, V.L.C.G.; AZEVEDO, M.A.J.; SILVA, T.S.; CARVALHO, V.M.J.; CARVALHO, V.F. Adaptação transcultural do pressure ulcer scale for healing (PUSH) para a língua portuguesa. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.13, n.3, 2005.
- SINNO, H.; PRAKASH, S. Complements and the wound healing cascade: an updated review. **Plastic Surg. Internat**, 2013.
- TOLOSA, E.M.C.; RODRIGUES, J.C.; BEHMER, O.A.; NETO, A.G.F. **Manual de Técnicas para a Histologia Normal e Patológica**. São Paulo: Manole, 2001.
- WANG, L.; KHOR, E.; WEE, A.; LIM, L. Y. Chitosan alginate PEC membrane as wound dressing: assessment of incisional wound healing. **J Biomed Mater Res**, v. 63, n. 5, p. 610-618, 2002.
- WIEGAND, C.; HIPLER, U. Polymer-based Biomaterials as Dressings for Chronic Stagnating Wounds. **Macromolecular Symposia**, v. 294, n 2, p. 1–13, 2010.
- WONG, V.W.; Crawford, J.D. Vasculogenic cytokines in would healing. **Biomed Rest**. 2013.