

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Marcelo Carrijo da Costa

**Avaliação da atividade do Dióxido de Cloro na cicatrização de
feridas excisionais cutâneas em camundongos**

Uberlândia
2019

Marcelo Carrijo da Costa

**Avaliação da atividade do Dióxido de Cloro na cicatrização de
feridas excisionais cutâneas em camundongos**

Dissertação apresentada à banca de Defesa do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Linha de Pesquisa: Anestesiologia e Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda de Assis Araújo

Uberlândia
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C837a Costa, Marcelo Carrijo da, 1990
2019 Avaliação da atividade do dióxido de cloro na cicatrização de feridas excisionais cutâneas em camundongos [recurso eletrônico] / Marcelo Carrijo da Costa. - 2019.

Orientador: Francisco Cláudio Dantas Mota.

Coorientadora: Fernanda de Assis Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1246>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Cicatrização de feridas. 3. Dióxido de cloro. I. Mota, Francisco Cláudio Dantas, 1975, (Orient.). II. Araújo, Fernanda de Assis, 1976, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

Avaliação da atividade do Dióxido de Cloro na cicatrização de feridas excisionais cutâneas em camundongos

Dissertação apresentada à banca de Defesa do Programa de Mestrado em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Uberlândia, 07 de março de 2019

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota – UFU - Orientador

Profa. Dra. Paola Castro Moraes – UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó - UFU

Apressa-te a viver bem e pensa que cada dia é, por si só, uma vida.

Lucius Annaeus Sêneca

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter possibilitado tudo que aconteceu até aqui.

Aos meus pais que sempre, sempre me auxiliaram em tudo que decidi fazer, não só em meus estudos, mas em todas as decisões, saber que posso contar com eles é minha maior força e espero poder recompensá-los por tudo que fazem por mim. Agradeço ao meu irmão pelas orientações, conversas e por sempre estar presente quando preciso.

A todos os meus amigos que estavam presentes durante todas as fases de minha vida, aos de longa data que nunca me abandonaram e aos novos que também espero que se tornem de longa data.

Agradeço a professora Fernanda de Assis Araújo que nos recebeu tão bem e permitiu que esse projeto fosse executado, dispondo de tempo e recursos para a execução deste.

Agradeço grandemente aos doutorandos Bruno e Francielle, que me ajudaram na execução deste projeto, sem vocês este trabalho não poderia ser realizado. Obrigado pelas orientações, por tirarem todas as dúvidas e estarem sempre de bom humor. Tenho certeza que vocês terão muitas vitórias, pois para pessoas como vocês não há como ser diferente!

Agradeço a Lara, aluna de iniciação, que esteve todos os dias na execução deste trabalho, mesmo após uma festa de formatura, você estava lá, às 7 horas da manhã! Obrigado pela ajuda.

Agradeço ao REBIR (Rede de Biotérios – UFU) e toda a equipe que de forma responsável permitiu e auxiliou na execução deste projeto.

A CAPES pelo auxílio financeiro ao longo dos dois anos de pós-graduação.

Agradeço imensamente a empresa Dioxide, fabricante do Dióxido de Cloro, composto utilizado no presente estudo, que deram todo o suporte durante a realização deste trabalho, a toda equipe de vocês e em especial ao Renato, meu muito obrigado.

E claro agradeço ao meu orientador Prof. Francisco, que não só me orienta e ajuda nos últimos dois anos, mas há muito mais tempo, que desde a minha graduação é um exemplo de profissional. Obrigado pela paciência, por ter acreditado em mim e por toda a ajuda e tempo dispensado para a execução deste projeto. Obrigado por tudo!

RESUMO

Devido a importância das feridas cutâneas diversos estudos têm buscado por compostos que evitem os altos custos, os longos períodos de fabricação e o aumento da resistência bacteriana. Desta forma o dióxido de cloro (ClO₂) destaca-se pelo baixo custo, grande capacidade biocida e seu potencial de biocompatibilidade, além de apresentar baixa toxicidade quando comparado a outros antissépticos como a clorexidina. Este trabalho foi realizado em duas etapas distintas, onde no primeiro estudo determinou-se a concentração do dióxido de cloro a ser usado, por meio da técnica de implantação de esponja no subcutâneo de camundongos para avaliação da curva de dose-resposta, e no segundo momento testou-se esta concentração em modelo experimental de feridas cutâneas excisionais em camundongos. Em ambas as etapas foram dosados o colágeno solúvel, hemoglobina, atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) e quantificados a deposição de colágeno total e dos tipos I e III. Baseado nos resultados apresentados na técnica de implantação de esponjas e levando em consideração a importância da angiogênese e da presença dos neutrófilos e macrófagos no processo de cicatrização, optou-se por testar a concentração de 150 ppm de dióxido de cloro no processo de cicatrização cutânea de camundongos. Nos tempos de 1, 3, 7 e 14 dias de tratamento, o fechamento em % de área da ferida do grupo tratado com dióxido de cloro a 150 ppm foi superior quando comparado com o grupo controle, com diferença estatística em todos os tempos analisados ($p \leq 0,05^*$ e $p \leq 0,01^{**}$). A solução de dióxido de cloro estabilizado a 7% na concentração de 150 ppm foi efetivo em acelerar o fechamento de feridas excisionais cutâneas em camundongos, apresentando influência positiva nas etapas de reparação tecidual, desde a fase inflamatória da ferida até a fase proliferativa, com maior deposição de colágeno total e dos tipos I e III aos 14 dias após a realização da ferida.

Palavras – chave: Colágeno. Mieloperoxidase. ClO₂. Esponja. Reparo.

ABSTRACT

Due to the importance of cutaneous wounds several studies have been looking for compounds that avoid the high costs, the long periods of manufacture and the increase of bacterial resistance. In this way the chlorine dioxide (ClO₂) is distinguished by the low cost, great biocidal capacity and its biocompatibility potential, besides presenting low toxicity when compared to other antiseptics like chlorhexidine. This work was carried out in two distinct stages, in which the concentration of chlorine dioxide to be used was determined in the first study by the technique of sponge implantation in the subcutaneous of mice to evaluate the dose-response curve, and in the second This concentration was tested in an experimental model of excisional skin wounds in mice. Soluble collagen, hemoglobin, myeloperoxidase activity (MPO) and N-acetyl-β-D-glicosaminidase (NAG) were measured in both steps and quantified total collagen deposition and types I and III. Based on the results presented by the technique of sponge implantation and taking into account the importance of angiogenesis and the presence of neutrophils and macrophages in the healing process, it was decided to test the concentration of 150 ppm of chlorine dioxide in the cutaneous healing process of mice. At days 1, 3, 7 and 14 days of treatment, the closure in% wound area of the group treated with chlorine dioxide at 150 ppm was higher when compared to the control group, with statistical difference at all times analyzed ($p \leq 0,05$ * $p \leq 0,01$ **). The 7% stabilized chlorine dioxide solution at 150 ppm concentration was effective in accelerating the closure of excisional cutaneous wounds in mice, presenting a positive influence on tissue repair stages, from the inflammatory phase of the wound to the proliferative phase, with higher deposition of total collagen and types I and III at 14 days after the wound.

Key-words: Collagen. Myeloperoxidase. ClO₂. Sponge. Repair.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado das análises bioquímicas e histológicas das esponjas implantadas no subcutâneo de camundongos submetidos aplicação de diferentes concentrações do dióxido de cloro.....	22
Tabela 2. Média de fechamento da ferida cutânea de camundongo tratada com dióxido de cloro (ClO ₂) a 150 ppm comparado ao controle (CO).....	23
Tabela 3. Média e erro padrão da dosagem da hemoglobina obtida da ferida cutânea de camundongos tratados (ClO ₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	24
Tabela 4. Média e erro padrão da atividade da MPO obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO ₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	25
Tabela 5. Média e erro padrão da atividade da NAG obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO ₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	26
Tabela 6. Médias e erros padrão do colágeno solúvel obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO ₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	26
Tabela 7. Média e erro padrão da quantificação de colágeno total por densidade de área (µm) em lâminas coradas com Picosirius Red, obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO ₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	27
Tabela 8. Média e erro padrão da quantificação de colágeno tipo I por densidade de área (µm) em lâminas coradas com Picosirius Red, obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO ₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	28
Tabela 9. Média e erro padrão da quantificação de colágeno tipo III por densidade de área (µm) lâminas coradas com Picosirius Red, obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fases do reparo epitelial. (A) Durante a fase de hemostasia e inflamação, que ocorre imediatamente após a lesão, os macrófagos residentes contribuem para o início da resposta inflamatória local, que leva a um grande influxo de neutrófilos para a área lesada (...). ... 6
- Figura 2**- Em (A) Imagem fotográfica do Implante de esponja de poliéster poliuretano. Em (B) Técnica de colocação do implante de esponja, próximo a região interescapular de camundongo, por meio de túnel subcutâneo iniciado a partir de uma incisão dorsal sobre a região do sacro..... 15
- Figura 3** - Imagem fotográfica após a criação das quatro lesões cutâneas dorsais em camundongos, com punch cirúrgico de 5mm de diâmetro. 19
- Figura 4** - Imagem fotográfica mostrando a aplicação das soluções sobre as lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de camundongos..... 20
- Figura 5** - Imagem fotográfica mostrando a utilização do paquímetro digital na mensuração do maior e menor diâmetro das lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de camundongos..... 20
- Figura 6** - Gráfico do fechamento de feridas. Gráfico de fechamento em porcentagem de área das feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 1, 3, 7 e 14 após criação da ferida ($p \leq 0,05^*$) e ($p \leq 0,01^{**}$). 23
- Figura 7** - Fechamento das feridas excisionais em camundongos Balb/c. A imagem representa o fechamento dos grupos controle (CO) e tratado (ClO₂) logo após a lesão (Dia Zero) e após 3, 7 e 14 dias de tratamento..... 24
- Figura 8** - Dosagem de hemoglobina. O gráfico da dosagem de hemoglobina nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,001^{***}$). 25
- Figura 9** - Atividade da MPO. O gráfico representa a atividade da MPO nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,05^*$) e ($p \leq 0,001^{***}$). 25

Figura 10 – Atividade da NAG. O gráfico representa a atividade de NAG nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO ₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 (p≤ 0,05*).	26
Figura 11 - Dosagem de colágeno solúvel. O gráfico representa a dosagem de colágeno solúvel nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO ₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 (p≤0,01**).	27
Figura 12 - Quantificação de colágeno total em lâminas coradas com Picosirius Red. O gráfico representa a quantificação de colágeno total por densidade de área (µm) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO ₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 (p≤0,001*** e p≤0,05*).	28
Figura 13 - Quantificação de colágeno tipo I em lâminas coradas com Picosirius Red. O gráfico representa a quantificação de colágeno tipo I por densidade de área (µm) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO ₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 (p≤0,05*).	29
Figura 14 - Quantificação de colágeno tipo III em lâminas coradas com Picosirius Red. O gráfico representa a quantificação de colágeno tipo III por densidade de área (µm) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO ₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 (p≤0,05*).	29
Figura 15 - Fotomicrografias capturadas com microscópio Nikon TS 100 das áreas de feridas cutâneas excisionais em camundongos da linhagem Balb/c após 3, 7 e 14 dias de indução da ferida(...).	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP- Adenosina Difosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

DMPs – Padrões Moleculares Associados A Danos

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EGF- Fator de crescimento epidérmico

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FGF- Fator de crescimento dos fibroblastos

HB-EGF - Factor de crescimento do tipo EGF de ligação à heparina

IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-8 – Interleucina-8

IL-10 – Interleucina - 10

KGF - Fator de proliferação de queratinócitos

MEC - Matriz extracelular

MMPs - Metaloproteinases

MPO - Mieloperoxidase

NAG - N-acetil- β -D glicosaminidase

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas

PGE2 - Prostaglandina E2

TGF- α - Fator de crescimento transformador alfa

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo geral:	3
3.2 Objetivos específicos:	3
4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
4.1 Pele	4
4.2 Fechamento de feridas	5
4.3 Etapas do reparo tecidual	5
4.3.1 Hemostasia	6
4.3.2 Inflamação	7
4.3.4 Tecido de Granulação	9
4.3.4.1 Angiogênese	9
4.3.4.2 Fibroplasia	10
4.3.4.3 Reepitelização	10
4.4 Dióxido de Cloro	11
4.4.1 Características químicas	12
4.4.2 Ação Desinfetante	12
4.4.3 Citotoxicidade	12
4.4.4 Utilização como antisséptico	13
5. MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1 Animais	13
5.2 Primeira Etapa: Definição de curva Dose-Resposta das concentrações de Dióxido de Cloro	14
5.2.1 Remoção dos implantes	15
5.2.2 Análise bioquímica	16
5.2.3 Dosagem de colágeno Solúvel	16
5.2.4 Dosagem de hemoglobina	16
5.2.5 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	17
5.2.6 Avaliação da atividade de N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)	17
5.2.7 Análise histomorfométrica do colágeno total e dos tipos I e III	18

5.3 Segunda Etapa: Avaliação da Cicatrização em Feridas Excisionais Cutâneas de Camundongos.....	18
5.3.1 Tratamento da ferida	19
5.3.2 Fechamento da ferida e coleta das amostras.....	20
5.3.3 Análise bioquímica da Ferida	21
5.3.4 Análise histomorfométrica do colágeno total e dos tipos I e III.....	21
5.4 Análise Estatística.....	21
6. RESULTADOS	22
6.1 Primeira Etapa: Definição de curva Dose-Resposta das concentrações de Dióxido de Cloro.....	22
6.2 Segunda Etapa: Avaliação da cicatrização em Feridas Excisionais Cutâneas de Camundongos.....	23
6.2.1 Fechamento da Ferida	23
6.2.2 Dosagem de Hemoglobina.....	24
6.2.3 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)	25
6.2.4 Atividade da enzima N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)	25
6.2.5 Colágeno solúvel.....	26
6.2.6 Análise histomorfométrica do colágeno total, tipo I e III	27
6.2.7 Colágeno total	27
6.2.8 Colágeno Tipo I e III.....	28
7. DISCUSSÃO	31
8. CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
Anexo I	48

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo com cerca de 10% do peso total da massa corporal, realiza várias funções dentre elas a proteção física, química e a manutenção da hidratação, processos indispensáveis a sobrevivência (BORENA et al., 2015; MINUTTI et al., 2017). Apresenta a capacidade de produzir peptídeos antimicrobianos que previnem infecções, além de hormônios e citocinas que exercem efeitos biológicos (GILABERTE et al., 2016). As lesões de pele podem ser causadas por trauma, queimaduras ou por doenças crônicas e representam um problema na rotina veterinária e na saúde pública mundial (BALSA; CULP, 2015; WANG et al., 2018).

Todas as feridas de pele, desde incisões cirúrgicas até ferimentos perfurantes, passam pelo mesmo processo de cicatrização, esse mecanismo é complexo e depende de múltiplos tipos de células e mediadores que interagem em uma sequência sofisticada (BALSA; CULP, 2015; SORG et al., 2017). A lesão na pele dá início a uma resposta capaz de limitar os danos e induzir ao reparo, através da interação de processos fisiológicos que incluem as etapas de inflamação, proliferação e remodelação tecidual (BUEMI et al., 2004; SERRA et al., 2017).

Devido a importância das feridas cutâneas diversos estudos têm buscado por compostos que evitem os altos custos, os longos períodos de fabricação e o aumento da resistência bacteriana. Desta forma o dióxido de cloro (ClO_2) destaca-se pelo baixo custo, grande capacidade biocida e seu potencial de biocompatibilidade, além de ser um composto já empregado na área da saúde, como na odontologia, sendo utilizado como antisséptico oral, além de apresentar baixa toxicidade quando comparado a outros antissépticos como a clorexidina (REDDING; BOOTH, 1991; UCHIYAMA; YAMADA, 2014).

Além disso o dióxido de cloro é um agente com alta capacidade oxidativa e tem sido empregado em várias atividades, desde estações de tratamento para purificação de água até na indústria têxtil, mas sua principal utilização é como antimicrobiano eliminando bactérias, fungos e vírus (NOSZTICZIUS et al., 2013; GRAY, 2014; MA et al., 2017)

No entanto estudos sobre a ação do dióxido de cloro sobre o processo de cicatrização em feridas cutâneas são escassos, a farmacologia e os mecanismos de ação desse composto ainda não foram bem elucidados. Sendo assim torna-se relevante a avaliação da utilização do dióxido de cloro para cicatrização de feridas cutânea, podendo tornar o processo de reparo cutâneo mais eficaz.

2. JUSTIFICATIVA

As feridas são afecções com grande presença na rotina veterinária, mesmo que frequentes, a sua completa resolução pode ser desafiadora. As alterações no processo de reparo, podem resultar na cronificação da ferida, estes processos crônicos são relacionados ao maior risco de perda de cosmese, contaminação ou infecção, que podem levar a quadros de resistência a antibioticoterapia. Além disso a ocorrência de grandes áreas de lesão cutânea principalmente em membros e extremidades, pode levar ao desconforto físico, demora na reabilitação e a consequências mais graves como amputação de membros, que em quadros extremos pode evoluir para septicemia e morte.

Com o intuito de encontrar compostos que tenham a capacidade de auxiliar ou estimular o processo de cicatrização e que tenham baixa toxicidade e custo, o presente trabalho utilizou o Dióxido de Cloro que demonstrou efeito sobre a remodelação de aderências pós-operatórias e potente ação antimicrobiana, além do seu emprego como antisséptico (EDDY et al., 2005; NOSZTICZIUS et al., 2013; VALENTE et al., 2014; ZAVALA-RODRIGUEZ et al., 2014). Acreditamos que o Dióxido de Cloro possa funcionar como um possível agente terapêutico na estimulação do reparo de feridas.

Esse estudo é importante não somente para avaliar o uso do Dióxido de Cloro como uma possibilidade terapêutica, como também mensurar a concentração ideal para utilização desse princípio. Além disso, nosso trabalho pode contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de reparo tecidual a partir da aplicação desse composto.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos do dióxido de cloro estabilizado a 7% em um modelo pré-clínico de cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos.

3.2 Objetivos específicos:

- (1) Determinar a melhor concentração do dióxido de cloro estabilizado a 7% para utilização em feridas cutâneas;
- (2) Avaliar os efeitos do dióxido de cloro sobre a velocidade de fechamento de feridas cutâneas excisionais;
- (3) Avaliar através de parâmetros bioquímicos e histológicos, os efeitos do dióxido de cloro sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), bem como do conteúdo de hemoglobina e da produção e deposição de colágenos na feridas excisionais cutâneas de camundongos.

4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Pele

A pele dos mamíferos apresenta três camadas de tecido, a epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é a camada mais externa constituída por 4 a 5 subcamadas, quando integra funciona como uma barreira a agentes externos como microrganismos e traumas (BORENA et al., 2015). Na epiderme encontramos o estrato córneo, principal área de resistência ao meio externo, que tem origem a partir dos queratinócitos presentes na matriz extracelular (MEC) (TRAVAGLI et al., 2010). Outras células deste tecido são as células de Langerhans, melanócitos, linfócitos e as células de Merkel (BARONI et al., 2012).

A epiderme é formada por uma camada epitelial escamosa estratificada, basicamente composta por queratinócitos e melanócitos. É fisicamente separada da derme pela membrana basal ou pela lâmina basal que fornece adesão as estruturas da pele. A membrana basal regula a difusão de células e moléculas bioativas, como citocinas e fatores de crescimento, realizando a liberação controlada destes fatores durante o remodelamento fisiológico e o reparo após eventos de lesão (BARONI et al., 2012; CICHOREK et al., 2013; GILABERTE et al., 2016) .

Os estratos da epiderme são divididos em basal, espinhoso, granuloso e córneo. O estrato mais profundo é o basal, formado por uma coluna de queratinócitos, que representam cerca de 80% das células totais da epiderme e tem íntima ligação com a membrana basal. Com alta taxa de renovação celular, este estrato garante a contínua reposição de queratinócitos em maturação que povoam as camadas superiores da epiderme (FORTUNEL; MARTIN, 2012).

Nos queratinócitos ocorre o processo de queratinização, definido como um conjunto de eventos citoplasmáticos em que são sintetizados e depositados no interior destas células, filamentos proteicos fibrosos de queratina que desempenham função impermeabilizante e protetora da pele. Após a fase de síntese da queratina ocorre a sua degradação que leva a formação das células córneas ou corneócitos (GILABERTE et al., 2016; SANTORO; GAUDINO, 2005)

A derme é uma espessa camada de tecido fibroso e elástico, localizada logo abaixo da epiderme, onde encontram-se estruturas sensitivas, vasculares e feixes de colágeno que fornecem suporte estrutural e nutricional a camada epidérmica que é avascular (BORENA et al., 2015). É povoada principalmente pelos fibroblastos, que são células móveis, com prolongamentos citoplasmáticos e poder de adaptação (SCHULTZ; WYSOCKI, 2009). São responsáveis pela síntese de substâncias que compõem a MEC (matriz extracelular), como

colágeno, elastina e a substância fundamental amorfa. Além disso na fase de remodelamento desempenham papel importante ao diferenciarem-se em miofibroblastos, que apresentam fibras de actina em seu interior e participam da contração tecidual da ferida (RITTIÉ, 2016).

Em sua estrutura a derme divide-se em duas camadas, papilar e reticular. A camada papilar tem inserção na epiderme através da membrana basal, com grande aporte vascular, realizando a nutrição da epiderme. É rica em células, incluindo os fibroblastos, mastócitos, macrófagos, além de componentes estromais da MEC como, as fibras de colágeno tipo I e III, fibras elásticas e componentes da matriz (glicoproteínas, proteoglicanas e outras). Devido a essas características apresenta maior capacidade de regeneração quando comparada com a camada reticular (BORENA et al., 2015; GILABERTE et al., 2016; RITTIÉ, 2016). A camada reticular é formada por feixes espessos de colágeno, distribuídos paralelamente à superfície da pele (GILABERTE et al., 2016).

Já a matriz extracelular é composta por proteoglicanos, ácido hialurônico e principalmente por colágeno que corresponde a 90% da sua composição (WIEGAND et al., 2016). A MEC desempenha papel crucial no processo de reparação tecidual pois fornece suporte à migração celular, a angiogênese, permitindo assim que ocorra a granulação e reparação tecidual. (FRYKBERG; BANKS, 2015).

4.2 Fechamento de feridas

As feridas com fechamento em primeira intenção são as mais simples, definidas como, de origem cirúrgica sem sinais de infecção ou limpas com perda mínima de tecido, são fechadas por meio de sutura cirúrgica (RITTIÉ, 2016). Nos casos de feridas com perda total de epiderme, derme e estruturas profundas, a reparação ocorre através da formação de tecido de granulação que substitui o local da lesão, esse tipo de reparação é chamado de cicatrização por segunda intenção (SORG et al., 2017).

4.3 Etapas do reparo tecidual

A reparação dos tecidos apresenta quatro fases, hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, mesmo que separadas para melhor compreensão, essas etapas se sobrepõem durante o período de reparo (Figura 1) (HOSGOOD, 2006; SORG et al., 2017).

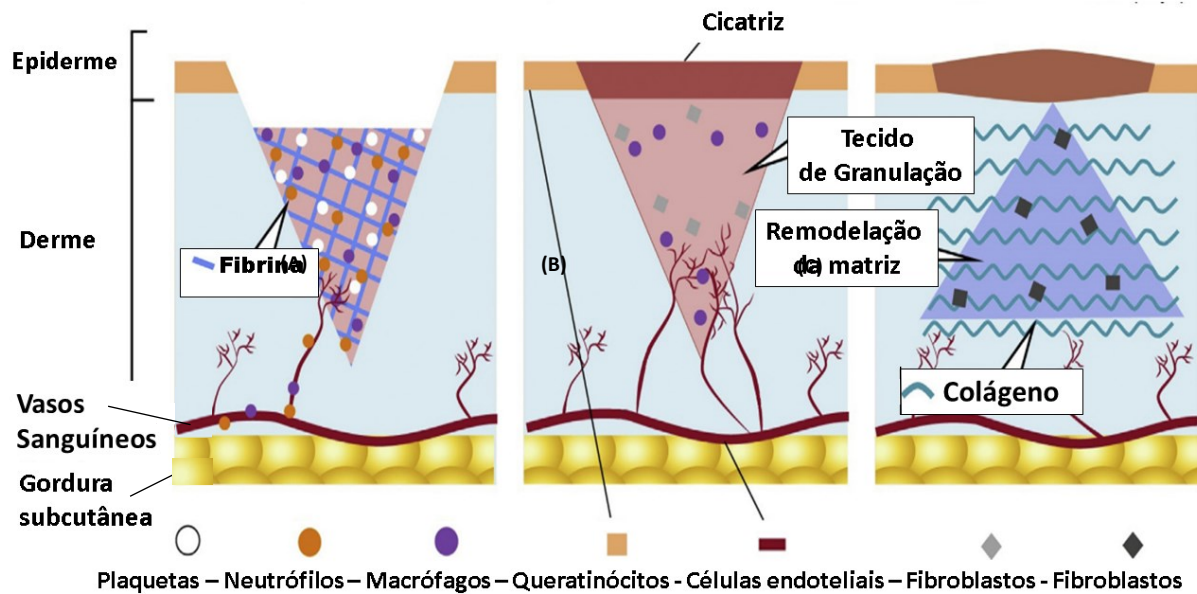


Figura 1: **Fases do reparo epitelial.** (A) Durante a fase de hemostasia e inflamação, que ocorre imediatamente após a lesão, os macrófagos residentes contribuem para o início da resposta inflamatória local, que leva a um grande influxo de neutrófilos para a área lesada. Neste momento também ocorre a formação do coágulo de fibrina, em torno do qual a matriz provisória é formada. (B) Na fase proliferativa forma-se um tecido altamente vascularizado e com alta densidade celular, sendo composto principalmente de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, denominado tecido de granulação. Em paralelo, os queratinócitos migram das margens da ferida para fechar o espaço epidérmico. (C) Durante a fase de remodelação do tecido, os macrófagos contribuem para a organização da matriz extracelular dentro da ferida, o que leva a um tecido cicatricial que se caracteriza pelo aumento da deposição de matriz e redução da densidade celular (MINUTTI et al., 2017) (Figura adaptada de ZOMER; TRENTIN, 2018).

4.3.1 Hemostasia

A hemostasia inicia-se imediatamente após a injúria, dando início a cascata de coagulação. Ocorre a vasoconstrição e a liberação de substâncias, como a serotonina, o tromboxano A2 e a prostaciclina pelas membranas celulares, a fim de evitar a perda de sangue (SERRA et al., 2017). Devido a exposição de colágeno presente nos vasos e na matriz extracelular, ocorre a liberação de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, que desencadeiam as vias intrínseca e extrínseca da coagulação (BELDON, 2010). Na superfície das plaquetas a protrombina é ativada para formar trombina, que realiza a clivagem do fibrinogênio para gerar fibrina (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016). Os mediadores secundários liberados, como o ADP (Adenosina Difosfato) e tromboxano A2, ativam a integrina das plaquetas e permite a formação de trombos plaquetários através da agregação de plaquetas ativadas (HOU et al., 2015).

A agregação plaquetária é a primeira barreira a entrada de patógenos, além disso filamentos de fibrina são então incorporadas a essa agregação e culminam na formação do coágulo. Esse tampão formado facilita a migração celular sobre o local da lesão, a diferenciação celular e reestabelece a função protetora da pele (HOU et al., 2015; MINUTTI et al., 2017). Além disso vários fatores de crescimento são liberados, dentre eles podemos citar, o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1) que são responsáveis pela ativação de fibroblastos, macrófagos e células endoteliais no ambiente da lesão (PEREIRA; BÁRTOLO, 2016).

A degradação da fibrina seguida da ativação do sistema complemento desempenha papel fundamental, pois os produtos resultantes da degradação levam a liberação de agentes quimiotáticos (PDGF, TGF- β) e mediadores químicos iniciando assim a migração de leucócitos e macrófagos para a ferida, dando início a fase inflamatória (KUJATH; MICHELSEN, 2008; THIRUVOTH et al., 2015).

4.3.2 Inflamação

O processo inflamatório compreende uma das fases de reparo tecidual. É marcada pelos sinais de dor, hiperemia, edema e a perda de função (PITTMAN; KUBES, 2013). Os objetivos da fase inflamatória são de limpar a ferida de partículas estranhas e de agentes infecciosos. Para a realização dessas ações ocorre o recrutamento e a ativação das células de defesa. O primeiro tipo celular a chegar ao local são os neutrófilos (24h - 48h), devido ao aumento da permeabilidade endotelial causada pela trombina e interleucina-8 (IL-8), que facilitam a migração dos leucócitos do fluxo sanguíneo marginal para o local lesado. (KUJATH; MICHELSEN, 2008; RITTIÉ, 2016; THIRUVOTH et al., 2015).

Os neutrófilos originam-se de células-tronco hematopoiéticas presentes na medula óssea, no processo denominado de granulopoiese. Os primeiros sinais que são responsáveis pelo recrutamento são liberados por células danificadas e necróticas após a lesão tecidual (PITTMAN; KUBES, 2013). Esses sinais provavelmente sejam os DAMPs (Padrões Moleculares Associados a Danos), uma variedade de moléculas é alocada nessa classe que inclui DNA, peptídeos N-formil, componentes da matriz extracelular, ATP, entre outros. Os neutrófilos expressam grande quantidade de receptores que são capazes de detectar mediadores pró-inflamatórios e modular a sua migração, função e comportamento (DE OLIVEIRA; ROSOWSKI; HUTTENLOCHER, 2016).

Com alta capacidade destrutiva e fagocítica os neutrófilos produzem uma gama de substâncias químicas usadas no combate a microrganismos que incluem os peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteases (WILGUS; ROY; MCDANIEL, 2013). Os neutrófilos começam a diminuir após 24-36 horas do início da fase inflamatória, por apoptose, neste momento um grande número de monócitos inflamatórios, que foram recrutados da medula óssea através de quimiocinas e várias moléculas de adesão, chegam a ferida e amadurecem em macrófagos no tecido (WYNN; VANNELLA, 2016; QING, 2017).

Os macrófagos removem bactérias, tecido necrótico e neutrófilos apoptóticos (eferocitose), além disso participam da liberação de fatores de crescimento e citocinas que modulam e recrutam fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (FRYKBERG; BANKS, 2015). A eferocitose destaca-se como um processo importante não só pela eliminação de neutrófilos que podem causar dano tecidual adicional, mas também pela resposta anti-inflamatória que causa, pois quando ocorre a fagocitose de um neutrófilo apoptótico gera um forte estímulo para a supressão do processo inflamatório. (ELLIOTT; KOSTER; MURPHY, 2017).

Após a eferocitose altos níveis de interleucina -10 (IL-10), TGF- β e prostaglandina E2 (PGE2) são liberados por macrófagos, além da secreção de VEGF, fatores esses importantes na reparação tecidual (KORNS et al., 2011; MARTIN et al., 2015). A fagocitose de neutrófilos representa então a passagem do macrófago (M1) de caráter fagocítico e produtor de mediadores pró-inflamatórios, para a fase reparadora, macrófagos (M2), envolvidos na síntese de mediadores anti-inflamatórios, no estímulo a proliferação de fibroblastos e nos processos de angiogênese, a depleção de neutrófilos e a alteração do fenótipo de macrófagos marca o início da fase proliferativa (LUCAS et al., 2010; SORG et al., 2017).

Devido os importantes papéis desempenhados pelos neutrófilos e macrófagos no processo inflamatório e de reparação cicatricial, as enzimas, mieloperoxidase (MPO) e a N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), presentes em neutrófilos e macrófagos respectivamente, servem de marcadores para a mensuração de suas atividades. A MPO é uma heme proteína presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos que atua na destruição de patógenos invasores, e outros fagócitos, tem capacidade de amplificar o efeito oxidativo e citotóxico destas células, além de gerar espécies de radicais livres (HAZEN et al., 1996; KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018; ZHANG et al., 2002). Já a NAG, enzima lisossômica hidrolítica, está presente em altos níveis em macrófagos ativados (LIMA et al., 2014; MENDES et al., 2007).

4.3.3 Proliferação

A fase proliferativa se sobrepõe a fase inflamatória e ocorre do 2º ao 10º dia após a lesão, podendo estender até o 14º dia, é caracterizada pela migração e proliferação de diferentes tipos celulares (REINKE; SORG, 2012; GONZALEZ et al., 2016). O início desta fase ocorre pela migração de queratinócitos e fibroblastos para o local da lesão, além da deposição de MEC e secreção de metaloproteinases (MMPs), responsáveis por facilitar a migração celular pelo coágulo de fibrina (THIRUVOTH et al., 2015). Nesta fase ocorre intensa atividade celular com o objetivo de diminuir a área da lesão e formar tecido de granulação e epitélio. A fase de proliferação pode ser dividida nos seguintes estágios: angiogênese, fibroplasia (formação de tecido de granulação e deposição de colágeno) e a reepitelização (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; SERRA et al., 2017).

4.3.4 Tecido de Granulação

O tecido de granulação é um conjunto denso de vasos sanguíneos e células, principalmente macrófagos e fibroblastos, que estão mergulhados em uma matriz proteica, constituída em sua maioria de colágeno tipos I e III, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, sintetizadas em grande parte pelos fibroblastos (OLCZYK et al., 2014; THIRUVOTH et al., 2015).

4.3.4.1 Angiogênese

A angiogênese tem papel fundamental na cicatrização, pois fornece nutrientes e oxigênio ao tecido neoformado, falhas nesse processo estão associados a casos de retardo na reparação tecidual (WILLENBORG et al., 2012; SORG et al., 2017). No início o processo aparenta ser de forma bem desorganizada, devido à alta densidade de capilares, mas trata-se de um processo altamente controlado, tanto por sinais oriundos do soro quanto do microambiente da ferida (SORG et al., 2017; WANG, 2018). Entre as citocinas mais potentes para a angiogênese podemos citar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a angiopoietina, o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o TGF- β . Ainda participam desse processo as células epiteliais, fibroblastos e os macrófagos que demonstram uma alta atividade pro-angiogênica (OLCZYK et al., 2014; SORG et al., 2017).

Após a dissolução da lâmina basal, as células endoteliais saem dos vasos existentes, multiplicam e migram em direção à origem do estímulo angiogênico. O processo de vasculogênese, formação de novos vasos a partir de substâncias progenitores endoteliais derivados da medula óssea, também pode ocorrer. Ao fim os brotos dão origem ao lúmen dos vasos e diferenciam-se em vasos de maior calibre como artérias e vênulas (REINKE; SORG, 2012; LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016).

4.3.4.2 Fibroplasia

Durante a fibroplasia os fibroblastos da derme são atraídos para o local da lesão, um dos fatores que media a atração é o PDGF que é secretado pelos grânulos das plaquetas, imediatamente após a lesão. Este fator apresenta forte característica mitogênica e ainda estimula os fibroblastos a sintetizar a nova MEC (OLCZYK et al., 2014; SORG et al., 2017). As transições de fibroblasto para miofibroblastos necessitam tanto de sinais mecânicos quanto da sinalização de TGF- β , além disso após a diferenciação os próprios miofibroblastos liberam TGF- β para estimular a diferenciação de outros fibroblastos (DULMOVITS; HERMAN, 2012). O surgimento dos miofibroblastos no local da ferida ocorre cerca de 4 dias após a lesão, essas células exibem capacidade contrátil, pois expressão a α -SM actina na forma de microfilamentos, desempenhando papel importante na contração e no processo de maturação do tecido de granulação (DESMOULIERE et al., 2014; THIRUVOTH et al., 2015).

Além disso a MEC recém formada facilita a migração, adesão e proliferação celular e de vasos (LUCAS et al., 2010). Constituintes como o ácido hialurônico oferecem estrutura e viscosidade à MEC devido às suas propriedades hidrofílicas, com capacidade de regular o comportamento celular, incluindo cicatrização e inflamação (XUE; JACKSON, 2015). A fase de remodelação ocorre de forma mais acentuada no fim da formação do tecido de granulação (SERRA et al., 2017).

4.3.4.3 Reepitelização

A Reepitelização é a migração dos queratinócitos pela epiderme da borda da ferida, essa mobilidade é estimulada pela liberação dos fatores de crescimento e principalmente pela hipóxia que ocorre na área lesada (WOODLEY et al., 2015). A fase de reepitelização se sobrepõe à fase inflamatória, pois a atividade migratória de queratinócitos é detectada poucas horas após a lesão (RITTIÉ, 2016). A proliferação máxima destas células na borda da lesão

ocorre entre 24 a 72 horas após a injúria, são as principais responsáveis pelo aumento das mitoses e pela hiperplasia epitelial (USUI et al., 2008; SERRA et al., 2017). São a primeira camada que cobre a ferida e apenas os queratinócitos basais têm a capacidade de proliferação, pois a medida que se diferenciam para formar os estratos da epiderme perdem a característica proliferativa (PASTAR et al., 2014; WOODLEY et al., 2015).

Vários fatores de crescimento mediam a maturação e proliferação dos queratinócitos, como o HB-EGF (Factor de Crescimento do Tipo EGF de Ligação à Heparina), EGF, TGF- α (Fator de Crescimento Transformador Alfa), KGF (Fator de Proliferação de Queratinócitos) e o IGF-1, outros agentes são envolvidos nesse processo como as integrinas, as MMPs e componentes da MEC, que podem auxiliar os fatores de crescimento na estimulação de queratinócitos (OLCZYK et al., 2014; PASTAR et al., 2014). Ocorre também a migração e proliferação de fibroblastos para matriz provisória e a produção de MMPs, colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico, glicosaminoglicanos e fibronectina. As fibras de colágenos são depositadas de forma desorganizada inicialmente, após a ação de enzimas digestivas liberadas por neutrófilos, macrófagos e pelos fibroblastos ocorre então a deposição de forma mais organizada sobre o tecido conjuntivo. Essas características finais dão início a fase de remodelação (SERRA et al., 2017).

4.4 Dióxido de Cloro

O Dióxido de Cloro (ClO_2) é um composto capaz de oxidar agentes orgânicos e inorgânicos e por ser um gás solúvel em água pode ser empregado nas formas gasosa ou em solução aquosa e utilizado como desinfetante, agente antimicrobiano, na sanitização de alimentos, esterilizante, no sistema de tratamento de água, antisséptico, supressor de aderências pós operatórias e na indústria hospitalar tanto para descontaminar salas quanto materiais (BURTON et al., 2008; HE et al., 2015; NOSZTICZIUS et al., 2013; SHARMA; SOHN, 2012; SHIN; SONG; SONG, 2012; ZAVALA-RODRIGUEZ et al., 2014). Os empregos desse composto são os mais variados, sendo que a medida que crescem os estudos os resultados da biocompatibilidade do ClO_2 é evidenciada (BARNHART et al., 2005; STRATILO; CRICHTON; SAWYER, 2015; VALENTE et al., 2014).

4.4.1 Características químicas

O Dióxido de Cloro, mesmo que apresente a palavra cloro em sua nomenclatura, diferencia-se quimicamente de compostos clorados de larga utilização, como o cloro e o hipoclorito de sódio (HE et al., 2015; MOGOA et al., 2011). Compostos esses que produzem substâncias cancerígenas como os trihalometanos e os ácidos haloacéticos, que são produtos de reações destes agentes com substâncias orgânicas, já o dióxido de cloro tem como vantagem a não formação de níveis detectáveis destes produtos (YANG; GUO; LEE, 2013). Produtos recentes como o Atomic 70® fornecem ao mercado o dióxido de cloro já estabilizado, facilitando assim seu uso nos diversos setores da área hospitalar e da saúde.

4.4.2 Ação Desinfetante

O Dióxido de Cloro é empregado como desinfetante e apresenta vários relatos de seu uso no controle de agentes infecciosos (ISON; ODEH; MARGERUM, 2006; NOSZTICZIUS et al., 2013; STRATILO; CRICHTON; SAWYER, 2015). Um dos mecanismos de ação para a eliminação desses agentes ocorre quando o dióxido de cloro em contato com grupos sulfidrilas leva a oxidação destes grupos, efeito esse que explica sua ação antimicrobiana, pois acredita-se que o ClO_2 permeia a membrana celular alterando o grupo $-\text{SH}$ da glicose oxidase em um grupo $-\text{S}-\text{S}-$, causando a interrupção da atividade enzimática e por consequência a morte bacteriana. Já a lesão sobre os vírus deve ocorrer pelo dano ao ácido nucléico ou pela ruptura da proteína viral (ISON; ODEH; MARGERUM, 2006). O tempo de contato do dióxido de cloro para eliminação de microrganismos ocorre em apenas alguns milissegundos. (NOSZTICZIUS et al., 2013).

4.4.3 Citotoxicidade

A citotoxicidade da solução aquosa de dióxido de cloro já foi objeto de estudo dos pesquisadores Nishikiori e colaboradores (2008), em que a ação do dióxido de cloro a 0,3% (3000 ppm) sobre o ciclo e a morfologia dos fibroblastos gengivais humanos, não apresentou indução de apoptose ou necrose destes, as análises foram feitas em citometria de fluxo e os achados sugeriram que o ClO_2 é adequado para uso como antisséptico bucal. Em outro estudo realizado por Stratilo e colaboradores (2015) a citotoxicidade do dióxido de cloro sobre culturas

celulares de queratinócitos da pele humana foi até duas ordens de magnitude menor do que quando comparada a do hipoclorito de sódio.

Os autores Redding e Booth (1991) realizaram a comparação de toxicidade celular entre o gluconato de clorexidina e o dióxido de cloro em fibroblastos da derme de equinos. Na concentração de 0,5% a 1% o gluconato de clorexidina causou a morte de todos os fibroblastos, a viabilidade de 50% destas células só foi mantida na concentração de 0.005%, já o dióxido de cloro apresentou a mesma viabilidade do grupo controle, em que foi utilizado a Solução de Fosfato Tamponada, evidenciando assim sua baixa toxicidade celular.

4.4.4 Utilização como antisséptico

Em estudo realizado por Valente e colaboradores (2014), o dióxido de cloro foi utilizado como solução antisséptica em pacientes com lacerações não complicadas, definidas como lesões até oito horas da sua ocorrência e passíveis de sutura, sendo a limpeza da ferida feita com 100 ml de solução a 50 ppm de ClO_2 . Nos resultados obtidos não foi observado diferença na cosmese das feridas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pela CEUA/UFU (Comissão de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia) de acordo com o protocolo 009/18 (Anexo I).

Este experimento foi realizado em duas etapas distintas, onde no primeiro estudo determinou-se a concentração do dióxido de cloro a ser usado, por meio da técnica de implantação de esponja no subcutâneo de camundongos para avaliação da curva de dose-resposta das concentrações de dióxido de cloro, e no segundo momento testou-se esta concentração em modelo experimental de feridas cutâneas excisionais em camundongos.

5.1 Animais

Foram utilizados nos dois estudos 130 camundongos machos, albinos da linhagem Balb/c, com idade entre 7 e 8 semanas, pesando entre 25-30g, fornecidos e mantidos na Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Após o procedimento cirúrgico eram transferidos para gaiolas individuais com controle de temperatura,

umidade e ciclo claro/escuro de 12 h, (com livre acesso a água e ração, durante todo o experimento).

5.2 Primeira Etapa: Definição de curva Dose-Resposta das concentrações de Dióxido de Cloro

Para este estudo utilizou-se a solução de Dióxido de Cloro estabilizado a 7% (Atomic 70®), um desinfetante de alto nível destinado a área da saúde. Foram testadas as concentrações de 50 ppm, 150 ppm, 250 ppm e 350 ppm, obtidas pela diluição do produto na forma comercial em Solução Salina Tamponada de Fosfato (PBS). As diluições eram feitas diariamente e descartadas após a utilização.

A técnica de implantes de esponjas a seguir é a mesma descrita e empregada por Cassini-Vieira e colaboradores (2014):

Nesta etapa foram utilizados discos de esponjas (poliéster poliuretano) de 8 mm de diâmetro e 4 mm de espessura, os quais eram mantidos em álcool 70% v/v durante 24 horas e em seguida fervidos em água destilada por 30 minutos antes da implantação.

Para a implantação das esponjas foram utilizados 70 camundongos, os quais foram anestesiados por via intraperitoneal com a associação de cloridrato de xilazina (10mg/kg) e cloridrato de cetamina (100mg/kg). Foi realizado à tricotomia e antissepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Em seguida promoveu uma incisão dorsal transversal de aproximadamente 1 cm sobre região sacral. Por este acesso criou-se um túnel subcutâneo em direção cranial, por onde os discos de esponja foram introduzidos e posicionados a aproximadamente 0,5 cm da região interescapular (Figura 2). Os discos de esponjas não são implantados próximos ao local de incisão para que o processo inflamatório desta região não altere o conteúdo da mesma. A síntese cutânea foi feita com fio de nylon 3-0 e pontos simples separado e os animais mantidos em gaiolas individuais.

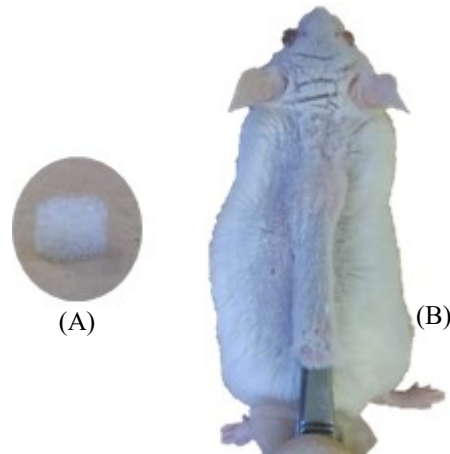


Figura 2- Em (A) Imagem fotográfica do Implante de esponja de poliéster poliuretano. Em (B) Técnica de colocação do implante de esponja, próximo a região interescapular de camundongo, por meio de túnel subcutâneo iniciado a partir de uma incisão dorsal sobre a região do sacro.

Após a implantação das esponjas, os animais foram divididos em 5 grupos com 14 indivíduos cada:

- Grupo I controle: recebeu um volume de 20 μ L de PBS.
- Grupo II: recebeu um volume de 20 μ L da solução de dióxido de cloro a 50 ppm.
- Grupo III: recebeu um volume de 20 μ L da solução de dióxido de cloro a 150 ppm.
- Grupo IV: recebeu um volume de 20 μ L da solução de dióxido de cloro a 250 ppm.
- Grupo V: recebeu um volume de 20 μ L da solução de dióxido de cloro a 350 ppm.

As soluções foram aplicadas dentro da esponja através de injeção subcutânea, por meio de seringa ultrafina de 50UI (0,5mL) e agulha 31G, logo após a cirurgia durante todos os dias, no mesmo horário até o 8º dia pós-implantação.

5.2.1 Remoção dos implantes

No 9º dia pós-implantação os animais foram submetidos à eutanásia com Lidocaína 2% 57mg/kg (0,1 mL), seguido do aprofundamento anestésico com Tiopental sódico 5% 150 mg/Kg (0,1 mL) ambos por via intraperitoneal, sendo ainda realizado o deslocamento cervical. Após eutanásia, os implantes foram retirados através de incisão de pele realizada ao redor de toda a esponja, mantendo uma margem de 0,5 cm, para evitar alterações no conteúdo da mesma, em seguida foram dissecadas, pesadas e processadas para estudos bioquímicos e histológicos.

5.2.2 Análise bioquímica

Oito indivíduos de cada grupo tiveram seus implantes removidos para as análises bioquímicas. As esponjas foram pesadas e divididas ao meio. Uma parte foi utilizada para determinação do colágeno solúvel e a outra para dosagem de hemoglobina, atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG).

5.2.3 Dosagem de colágeno Solúvel

A quantidade de colágeno solúvel nas amostras foi avaliada por um ensaio colorimétrico, pela reação do Picrosirius Red. Esta técnica foi desenvolvida por Phillips e colaboradores (2002) e adaptada para o modelo de implantes de esponja por Campos e colaboradores (2006), sendo também empregada na avaliação de deposição de colágeno solúvel nas feridas.

As amostras foram homogeneizadas com tampão (salina 0.1% Triton X-100), após homogeneização os debris foram removidos pela centrifugação. Foram adicionados 50 μ L do reagente Picrosirius Red em 50 μ L da amostra da esponja, para a ferida foi utilizado 30 μ L de amostra. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente o complexo colágeno-picrosirius red foi separado por centrifugação a 10.000 g durante 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, retirando o máximo de líquido possível, vertendo-se o tubo sobre papel absorvente. O sedimento foi lavado com 500 μ L de etanol, colocado delicadamente pela parede do tubo para não remover o pellet, e então, todo etanol foi removido, vertendo-se com cuidado em papel absorvente. Foi adicionado ao sedimento, em 1 mL de reagente alcalino (NaOH 0,5 M). A absorbância foi quantificada a 540 nm em um leitor de microplacas (E max, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) onde foram transferidos 200 μ L das amostras, em duplicata. A quantidade de colágeno em cada amostra foi determinada através da comparação de uma curva padrão utilizando-se padrão de colágeno (Merk) e os resultados expressos em μ g de colágeno por mg de peso da amostra.

5.2.4 Dosagem de hemoglobina

A dosagem do conteúdo de hemoglobina foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin desenvolvido em 1932 e adaptado como índice de vascularização por Plunkett e Hailey (1990) e Hu e colaboradores (1995). As amostras que apresentaram hemorragia ou infecção à

análise macroscópica foram excluídas do ensaio. Em seguida, cada amostra foi homogeneizada em 2,0mL de um reagente cromogênico específico para hemoglobina (reagente de Drabkin-kit de Dosagem de Hemoglobina Labtest) e adicionados em microtubos (ependorff) de 2,0 mL.

As amostras foram centrifugadas a 4 °C por 40 minutos a 12.000 g e os homogenatos filtrados em filtros de 0,22 µm (Millipore). Posteriormente, foi realizada leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540 nm (Leitor de Elisa), utilizando-se uma placa de 96 poços. A concentração de hemoglobina de cada amostra foi calculada a partir de uma curva padrão conhecida (Labtest) e os resultados expressos em concentração de hemoglobina (microgramas) por miligrama de peso úmido da amostra.

5.2.5 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A metodologia empregada é a mesma descrita por Bradley e colaboradores (1982). Após a dosagem de hemoglobina, a esponja utilizada foi dividida ao meio, obtendo $\frac{1}{4}$ da esponja original a qual foi ressuspensa em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio, pH 5,4. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em vórtex por 30 segundos, foram transferidos 300 µL desse homogenato para microtubos (ependorf) de 1,5 mL e acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% p/v diluído em tampão fosfato pH 5,4. Após nova homogeneização no vórtex as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado no ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi realizado em microtubos (ependorf) de 1,5 mL, e a reação seguiu a seguinte ordem: 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003%, 100 µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); acrescentados a 200 µL do sobrenadante da amostra, deixando a solução reagir por 1 minuto cronometrado. Para interromper a reação adicionou 100 µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) a 4 M. Em seguida, foram adicionados 200 µL à placa de 96 poços e a leitura espectrofotométrica feita em comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em índice de MPO (Absorbância em D.O./g de peso úmido da amostra).

5.2.6 Avaliação da atividade de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A metodologia empregada seguiu a mesma descrita por Bailey, (1988). O $\frac{1}{4}$ restante da esponja original foi ressuspensa em 2,0 mL de solução salina 0,9% com Triton X-100

(Promega) a 0,1%. As amostras foram trituradas e homogeneizadas em vórtex até obter uma suspensão homogênea e, posteriormente, centrifugadas em 3.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante foi utilizado para a realização do ensaio enzimático. Para o ensaio, foram adicionados 100 µL das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Nas amostras, foram adicionados 100 µL do substrato (*p*-nitrofenil-*n*-acetil-β-D-glicosaminida– Sigma), diluído em tampão citrato/fosfato pH 4,5, em seguida, incubadas a 37 °C durante 30 minutos. Por último, foram adicionados 100 µL de tampão glicina 0,2 M, pH 10,6. A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor de Elisa, em comprimento de onda de 400 nm. A atividade de NAG no implante foi calculada a partir de uma curva padrão de *p*-nitrofenol avaliada paralelamente.

O *p*-nitrofenol é o produto cromógeno da reação entre *p*-nitrofenil-*N*-acetil-β-D-glicosamina com a *N*-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL⁻¹/mg de peso úmido da amostra.

5.2.7 Análise histomorfométrica do colágeno total e dos tipos I e III

Os seis animais restantes de cada grupo tiveram seus implantes removidos e fixados em solução de methacarn por um tempo mínimo de 3 horas, e em seguida desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, segundo técnicas de rotina.

Foram confeccionadas cinco lâminas para cada peça, com cortes seriados de cinco micrômetros de espessura, com 60 micrômetros entre si. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Picrosirius Red, sendo avaliada a área total de tecido fibrovascular formado na periferia do implante, desconsiderando a região central onde foram aplicadas as soluções analisadas. Essas áreas foram digitalizadas por meio de microscópio Nikon TS 100 com objetiva de 20X e ocular de 10X com filtro de polarização para diferenciação do colágeno tipo I e III. Em seguida essas imagens eram submetidas ao programa Image J através das ferramentas *Threshold* e *Spilt Channel* para quantificação destes colágenos.

5.3 Segunda Etapa: Avaliação da Cicatrização em Feridas Excisionais Cutâneas de Camundongos

Para este estudo foram utilizados 60 camundongos, anestesiados com o mesmo protocolo anterior. Foi realizado à tricotomia e antissepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Em

seguida foram criadas quatro lesões circulares equidistantes no dorso dos animais de 5 mm de diâmetro por meio de punch cirúrgico removendo a pele e todo subcutâneo (Figura 3).



Figura 3 - Imagem fotográfica após a criação das quatro lesões cutâneas dorsais em camundongos, com punch cirúrgico de 5mm de diâmetro.

5.3.1 Tratamento da ferida

Baseado nos resultados da primeira etapa do experimento optou-se pela utilização do Dióxido de Cloro a 150 ppm.

Nesta fase os animais foram divididos em dois grupos com 30 animais cada, controle (CO) e tratado (ClO₂). Sendo cada grupo subdividido em três subgrupos de igual número (n=10).

O tratamento foi realizado diariamente, sempre no mesmo período. No grupo CO foi realizada a aplicação de 20 µL de solução de PBS, já no grupo ClO₂ realizou-se a aplicação de 20 µL da solução de dióxido de cloro a 150 ppm sobre a ferida, as aplicações foram realizadas com auxílio de uma pipeta (Figura 4). Iniciadas imediatamente após a realização das feridas até o dia anterior a eutanásia. Que se deu aos quatro, oito e 15 dias após a criação da ferida.



Figura 4 - Imagem fotográfica mostrando a aplicação das soluções sobre as lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de camundongos.

5.3.2 Fechamento da ferida e coleta das amostras

O acompanhamento do fechamento macroscópico das feridas foi realizado nos dias 0, 1, 3, 7 e 14 após a criação da lesão com o auxílio de um paquímetro digital calibrado em milímetros (Figura 5).



Figura 5 - Imagem fotográfica mostrando a utilização do paquímetro digital na mensuração do maior e menor diâmetro das lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de camundongos.

$$\frac{(\text{diâmetro menor})^2}{2} \times \frac{(\text{diâmetro maior})^2}{2} \times \pi$$

A medida da área foi realizada após a mensuração dos diâmetros maiores e menores da ferida. E a área calculada com a seguinte fórmula, utilizada por Canesso e colaboradores (2014):

$$\pi (Pi) = 3,14$$

Após a obtenção do valor da área nos dias 0, 1, 3, 7 e 14, a porcentagem de fechamento foi calculada a partir da fórmula:

Fechamento da ferida em %:

Após os tempos de tratamento de 3, 7 e 14 dias os animais foram submetidos a eutanásia, seguindo o mesmo protocolo já mencionado, e as feridas excisadas com auxílio de um punch cirúrgico de 8mm.

$$\left(1 - \frac{\text{área no dia atual}}{\text{área da ferida no dia zero}}\right) \times 100$$

5.3.3 Análise bioquímica da Ferida

As análises bioquímicas das feridas foram feitas seguindo a mesma metodologia empregada no modelo de esponja. As feridas foram utilizadas da seguinte forma, uma ferida inteira para a dosagem da MPO, uma ferida inteira para a dosagem da NAG, uma ferida inteira para dosagem de hemoglobina e ½ (meia) ferida para dosagem do colágeno solúvel.

5.3.4 Análise histomorfométrica do colágeno total e dos tipos I e III

Para a análise histológica a ½ (meia) ferida restante foi fixada em solução de methacarn por um tempo mínimo de 3 horas, e em seguida desidratada, diafanizada e incluída em parafina, seguindo técnicas de rotina. Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Picrosirius Red, para a avaliação do colágeno total e dos colágenos tipo I e III. As imagens para avaliação foram obtidas a partir de 10 áreas escolhidas aleatoriamente no local da ferida. A leitura das imagens foi realizada seguindo a mesma metodologia dos implantes de esponja.

5.4 Análise Estatística

Os resultados foram apresentados pelas médias \pm e.p.m. (erro padrão médio) dos dados. A comparação entre os grupos do implante de esponja foi feita utilizando (ANOVA) seguido do Pós-teste de Student-Newman-Keuls (SNK) ($p < 0,05^*$). Já para a comparação entre os grupos do tratamento de feridas foi feita a análise ANOVA Two-way com o Pós-teste de

Bonferroni (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Para a realização das análises e construção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.

6. RESULTADOS

6.1 Primeira Etapa: Definição de curva Dose-Resposta das concentrações de Dióxido de Cloro

A partir da dosagem das enzimas MPO e NAG presentes nos implantes, referentes a atividade de neutrófilos e macrófagos respectivamente, foi possível quantificar de forma indireta a presença destes no infiltrado das esponjas, além disso foi realizada a dosagem de colágeno solúvel e hemoglobina. Nas análises histológicas foram realizados a quantificação de colágeno total e dos tipos I e III (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado das análises bioquímicas e histológicas das esponjas implantadas no subcutâneo de camundongos submetidos aplicação de diferentes concentrações do dióxido de cloro.

	<i>Concentrações</i>				
	Controle	50 ppm	150 ppm	250 ppm	350 ppm
<i>MPO (OD/g)</i>	2,10 ± 0,26	1,32 ± 0,27*	1,24 ± 0,24*	1,11 ± 0,19*	0,85 ± 0,09*
<i>NAG (nmol/mg)</i>	3,87 ± 0,36	3,24 ± 0,49	2,34 ± 0,26*	2,36 ± 0,27*	1,89 ± 0,21*
<i>Colágeno Solúvel (µg/mL)</i>	0,81 ± 0,02	0,83 ± 0,06	0,79 ± 0,02	0,80 ± 0,06	0,88 ± 0,03
<i>Colágeno Total (pixel/área)</i>	3.9x10 ⁶ ± 3.4x10 ⁵	3.9 x10 ⁶ ± 4.7x10 ⁵	4.1x10 ⁶ ± 5.5x10 ⁵	4.2x10 ⁶ ± 3.8x10 ⁵	3.8x10 ⁶ ± 4.3x10 ⁵
<i>Colágeno Tipo I (pixel/área)</i>	1.8x10 ⁶ ± 2.6x10 ⁵	2.0x10 ⁶ ± 2.6x10 ⁵	1.9x10 ⁶ ± 2.3x10 ⁵	2.1x10 ⁶ ± 2.3x10 ⁵	2.0x10 ⁶ ± 1.8x10 ⁵
<i>Colágeno Tipo III (pixel/área)</i>	1.5x10 ⁶ ± 1.7x10 ⁵	1.7x10 ⁶ ± 1.9x10 ⁵	1.5x10 ⁶ ± 1.9x10 ⁵	1.7x 10 ⁶ ± 1.9x10 ⁵	1.x10 ⁶ ± 1.5x10 ⁵
<i>Hemoglobina (µg/mL)</i>	1,49 ± 0,11	1,31 ± 0,19	2,24 ± 0,36*	1,14 ± 0,17	0,67 ± 0,13*

As análises histológicas de colágeno total, tipo I e tipo III e a análise bioquímica de colágeno solúvel não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados. Todos os grupos submetidos as diferentes concentrações de dióxido de cloro, apresentaram maior ação anti-inflamatória em relação ao controle com valores estatisticamente menores nas dosagens de MPO e NAG (* $p \leq 0,05$). Sendo o grupo de 350 ppm, com valores mais expressivos (0,85 ± 0,09). Já na dosagem da hemoglobina (efeito pró-angiogênico), o grupo com 150 ppm de

dióxido de cloro foi o que apresentou maior valor ($2,24 \pm 0,36$), e o grupo de 350 ppm o de menor valor ($0,67 \pm 0,13$), ambos estatisticamente significativos ($*p \leq 0,05$).

Baseado nos resultados apresentados na técnica de implantação de esponja e levando em consideração a importância da angiogênese e da presença dos neutrófilos e macrófagos no processo de cicatrização, optou-se por testar a concentração de 150 ppm de dióxido de cloro no processo de cicatrização cutânea de camundongos.

6.2 Segunda Etapa: Avaliação da cicatrização em Feridas Excisionais Cutâneas de Camundongos

6.2.1 Fechamento da Ferida

Em todos os tempos avaliados de 1, 3, 7 e 14 dias, o fechamento em % de área da ferida do grupo tratado (ClO_2) com dióxido de cloro a 150 ppm foi superior quando comparado com o grupo controle (CO) (Figuras 6 e 7), com diferença estatística em todos os tempos analisados ($p \leq 0,05^*$ e $p \leq 0,01^{**}$) (Tabela 2).

Tabela 2. Média de fechamento da ferida cutânea de camundongo tratada com dióxido de cloro (ClO_2) a 150 ppm comparado ao controle (CO).

	Dia 1	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	12,12%	19,94%	56,97%	73,14%
ClO_2	19,74%	23,37%	63,93%	81,52%

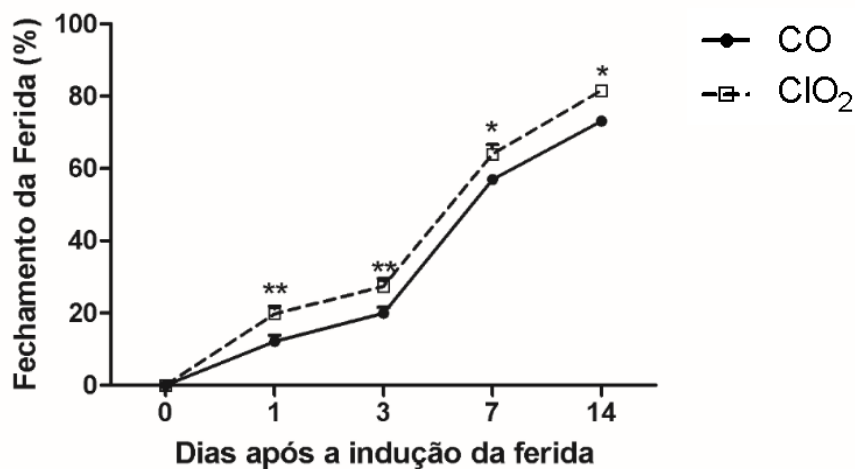


Figura 6- **Gráfico do fechamento de feridas.** Gráfico de fechamento em porcentagem de área das feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO_2) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 1, 3, 7 e 14 após criação da ferida ($p \leq 0,05^*$) e ($p \leq 0,01^{**}$).

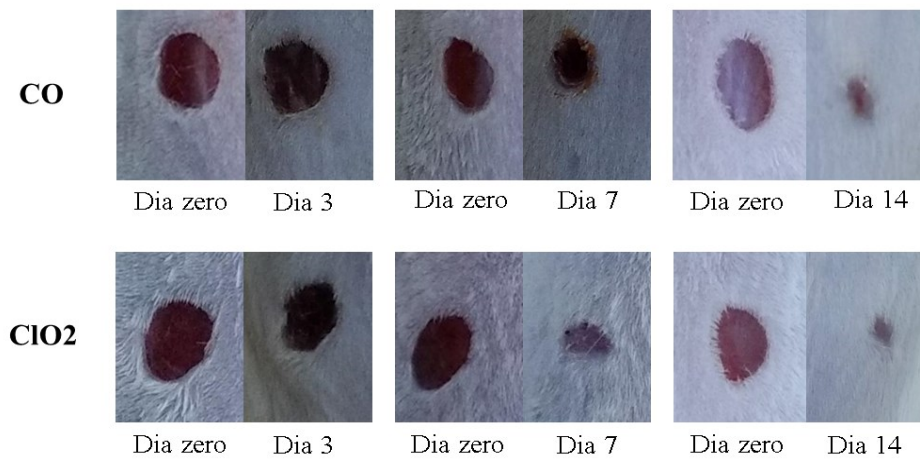


Figura 7- **Fechamento das feridas excisionais em camundongos Balb/c.** A imagem representa o fechamento dos grupos controle (CO) e tratado (ClO₂) logo após a lesão (Dia Zero) e após 3, 7 e 14 dias de tratamento.

6.2.2 Dosagem de Hemoglobina

Com relação a dosagem de hemoglobina, o grupo tratado (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm, apresentou diferença estatística apenas no sétimo dia de observação quando comparado ao grupo controle (CO) ($p \leq 0,001$ ***) (Tabela 3 e figura 8).

Tabela 3. Média e erro padrão da dosagem da hemoglobina obtida da ferida cutânea de camundongos tratados (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	4,3 ± 0,21 µg/mL	2,74 ± 0,37 µg/mL	3,96 ± 0,26 µg/mL
ClO ₂	2,37 ± 0,19 µg/mL	6,40 ± 0,79 µg/mL	3,56 ± 0,33 µg/mL

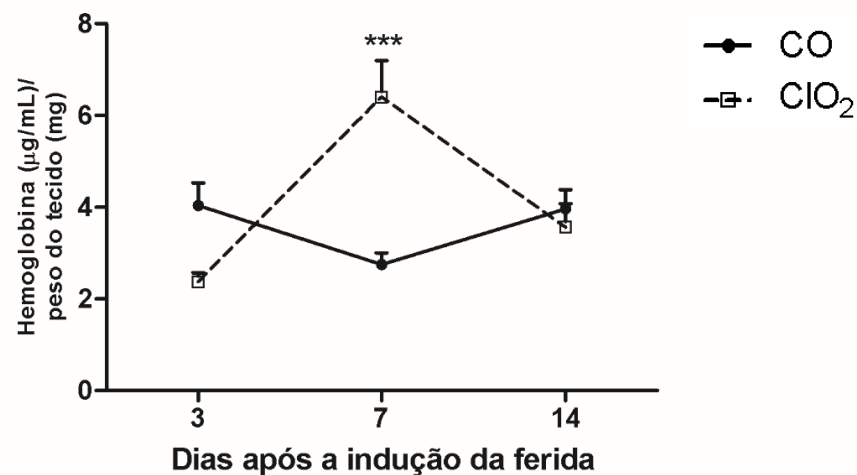


Figura 8.- **Dosagem de hemoglobina.** O gráfico da dosagem de hemoglobina nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,001$ ***).

6.2.3 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de neutrófilos foi mensurada a partir da dosagem bioquímica da enzima mieloperoxidase, o grupo tratado (ClO₂) com dióxido de cloro apresentou aumento da atividade aos 3 dias ($p \leq 0,001$ ***) e redução aos 7 dias ($p \leq 0,05$ *) quando comparados aos respectivos controles (CO), e aos 14 dias os valores encontrados foram semelhantes em ambos os grupos, tratado (ClO₂) e controle (CO) ($p \geq 0,05$) (Tabela 4 e figura 9).

Tabela 4. Média e erro padrão da atividade da MPO obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	1,67 ± 0,49 OD/g p.u.	1,83 ± 0,20 OD/g p.u.	0,75 ± 0,14 OD/g p.u.
ClO ₂	3,72 ± 0,69 OD/g p.u.	0,68 ± 0,13 OD/g p.u.	0,96 ± 0,17 OD/g p.u.

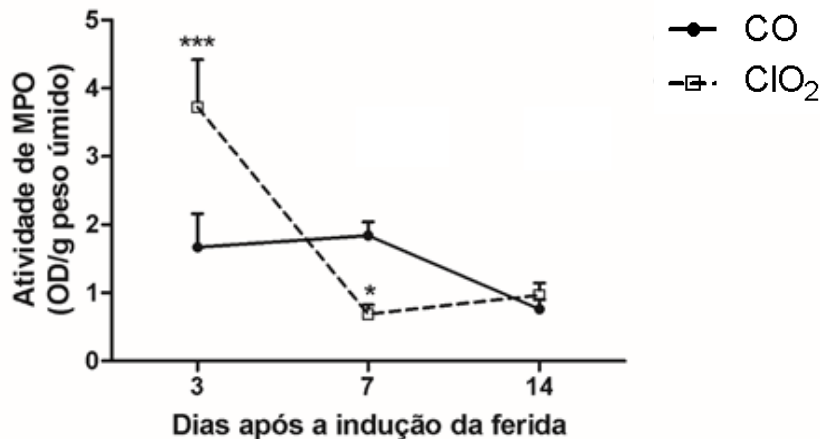


Figura 9.- **Atividade da MPO.** O gráfico representa a atividade da MPO nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,05$ *) e ($p \leq 0,001$ ***).

6.2.4 Atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A atividade de macrófagos avaliada pela dosagem da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) foi maior nos grupos tratados (ClO₂) por 3 e 7 dias com dióxido de cloro em comparação com os respectivos grupos controles (CO) ($p \leq 0,05$). No dia 14 o grupo

tratado (ClO₂) e o grupo controle (CO) não apresentaram diferença estatística ($p \geq 0,05$) (Tabela 5 e figura 10).

Tabela 5. Média e erro padrão da atividade da NAG obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	18.15 ± 1,0 nmol.mL-1/mg	17.35 ± 0,35 nmol.mL-1/mg	9.9±0.27 nmol.mL-1/mg
ClO ₂	20.4 ± 0,54 nmol.mL-1/mg	19. 6 ± 0,40 nmol.mL-1/mg	9.9±0.41 nmol.mL-1/mg

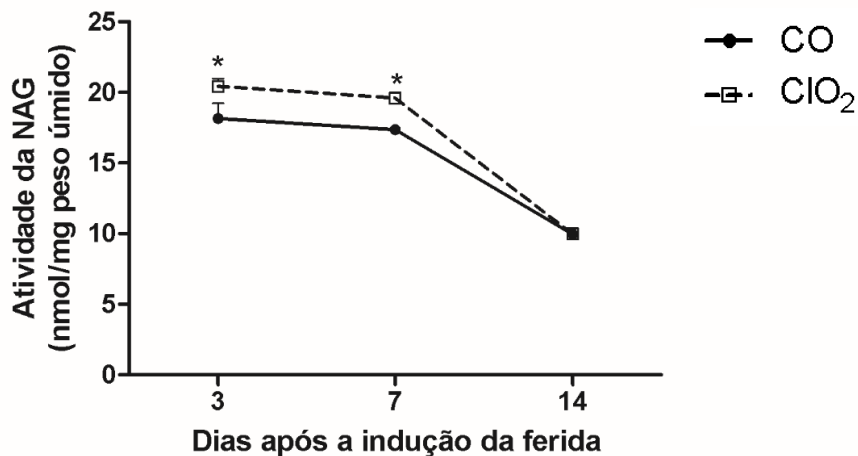


Figura 10 – **Atividade da NAG.** O gráfico representa a atividade de NAG nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,05^*$).

6.2.5 Colágeno solúvel

A quantificação de colágeno solúvel foi maior nos grupos tratados (ClO₂) durante 3 e 7 dias, quando comparado aos respectivos grupos controles (CO) ($p \leq 0,01^{**}$). Aos 14 dias de tratamento não foi observado diferença estatística entre os grupos ($p \geq 0,05$) (Tabela 6 e figura 11).

Tabela 6. Médias e erros padrão do colágeno solúvel obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	1.08 ± 0,05 µg/mg p.u.	1.34 ± 0,10 µg/mg p.u.	0.80 ± 0,03 µg/mg p.u.
ClO ₂	1.49 ± 0,09 µg/mg p.u.	1.7 ± 0,14 µg/mg p.u.	0.87 ± 0,06 µg/mg p.u.

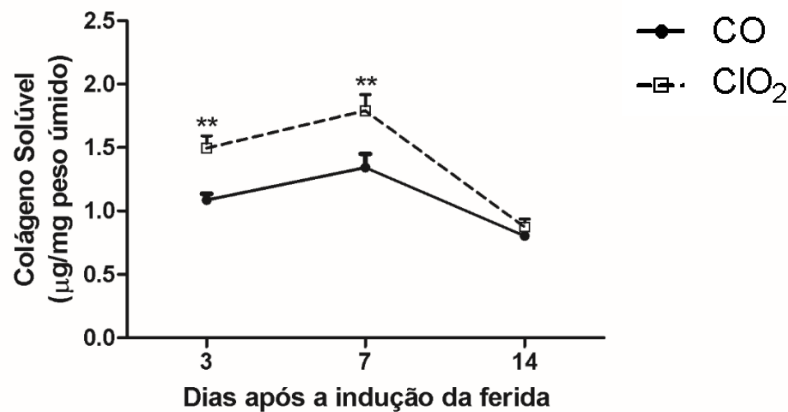


Figura 11- **Dosagem de colágeno solúvel.** O gráfico representa a dosagem de colágeno solúvel nas feridas cutâneas do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,01^{**}$).

6.2.6 Análise histomorfométrica do colágeno total, tipo I e III

6.2.7 Colágeno total

A maior deposição de colágeno total ocorreu nos grupos tratados (ClO₂) com dióxido de cloro nos dias 3 e 14, com diferença estatística ($p \leq 0,001^{***}$ e $p \leq 0,05^*$) quando comparado aos grupos controle (CO). Com 7 dias de tratamento os grupos não apresentaram diferença estatística ($p \geq 0,05$) (Tabela 7 e figura 12).

Tabela 7. Média e erro padrão da quantificação de colágeno total por densidade de área (μm) em lâminas coradas com Picosirius Red, obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	$9,8 \times 10^2 \pm 38$ pixel /área	$1,7 \times 10^3 \pm 72$ pixel /área	$1,2 \times 10^3 \pm 45$ pixel /área
ClO ₂	$1,3 \times 10^3 \pm 77$ pixel /área	$1,7 \times 10^3 \pm 50$ pixel /área	$1,4 \times 10^3 \pm 38$ pixel /área

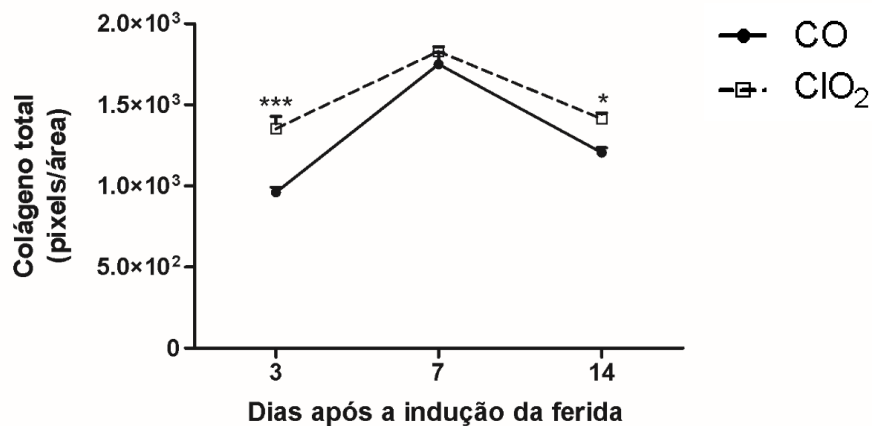


Figura 12- **Quantificação de colágeno total em lâminas coradas com Picosirius Red.** O gráfico representa a quantificação de colágeno total por densidade de área (μm) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO_2) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,001$ *** e $p \leq 0,05$ *).

6.2.8 Colágeno Tipo I e III

As lâminas coradas com Picosirius Red e utilizadas para a quantificação de colágeno total, foram também avaliadas quanto à proporção de colágeno do tipo I e III em microscópio com filtro de polarização. Os resultados para a diferenciação destes tipos de colágeno estão demonstrados na figura 15.

Não houve diferença estatística ($p \geq 0,05$) da deposição de colágeno tipo I nas feridas dos animais do grupo controle (CO) e tratado (ClO_2) com dióxido de cloro nos períodos de 3 e 7 dias. Já aos 14 dias de tratamento, observou maior deposição de colágeno tipo I no grupo tratado (ClO_2) com dióxido de cloro, estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$ *), quando comparado com o seu respectivo controle (CO) (Tabela 8 e figura 13).

Tabela 8. Média e erro padrão da quantificação de colágeno tipo I por densidade de área (μm) em lâminas coradas com Picosirius Red, obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada (ClO_2) com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle (CO) de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	298±62 pixel /área	536±46 pixel /área	377±20 pixel /área
ClO_2	282±30 pixel /área	613±71 pixel /área	553±58 pixel /área

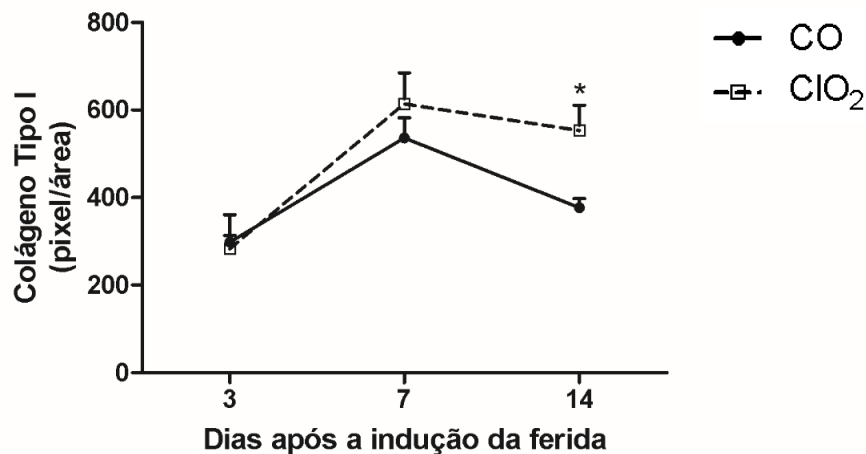


Figura 13 - **Quantificação de colágeno tipo I em lâminas coradas com Picosirius Red.** O gráfico representa a quantificação de colágeno tipo I por densidade de área (μm) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle (CO) comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,05^*$).

O grupo tratado (ClO₂) com dióxido e cloro a 150 ppm, apresentou maior deposição de colágeno tipo III, com diferença estatística ($p \leq 0,05^*$), observados nos períodos de 7 e 14 dias, quando comparados com seus respectivos controles (CO) (Tabela 9 e figura 14).

Tabela 9. Média e erro padrão da quantificação de colágeno tipo III por densidade de área (μm) lâminas coradas com Picosirius Red, obtidas da ferida cutânea de camundongo tratada com dióxido de cloro a 150 ppm comparado ao controle de acordo com os tempos de 3, 7 e 14 dias.

	Dia 3	Dia 7	Dia 14
CO	260±39 pixel /área	238±27 pixel /área	260±15 pixel /área
ClO ₂	257±31pixel /área	356±31 pixel /área	369±36 pixel /área

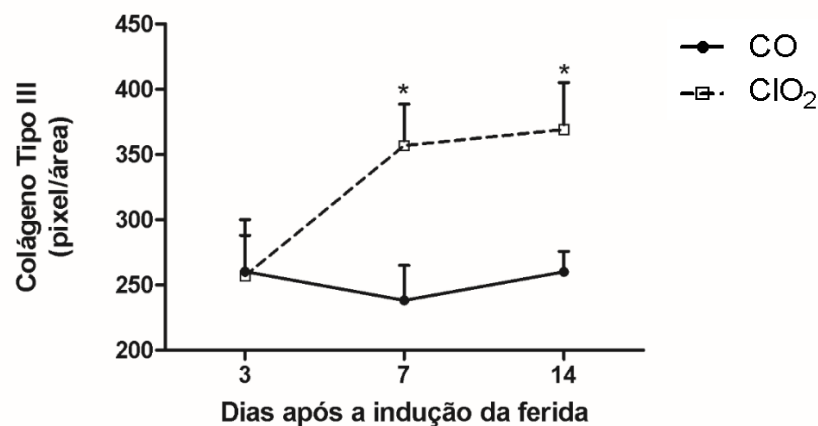


Figura 14 - **Quantificação de colágeno tipo III em lâminas coradas com Picosirius Red.** O gráfico representa a quantificação de colágeno tipo III por densidade de área (μm) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle (CO)

comparada ao grupo tratado (ClO₂) com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ($p \leq 0,05^*$).

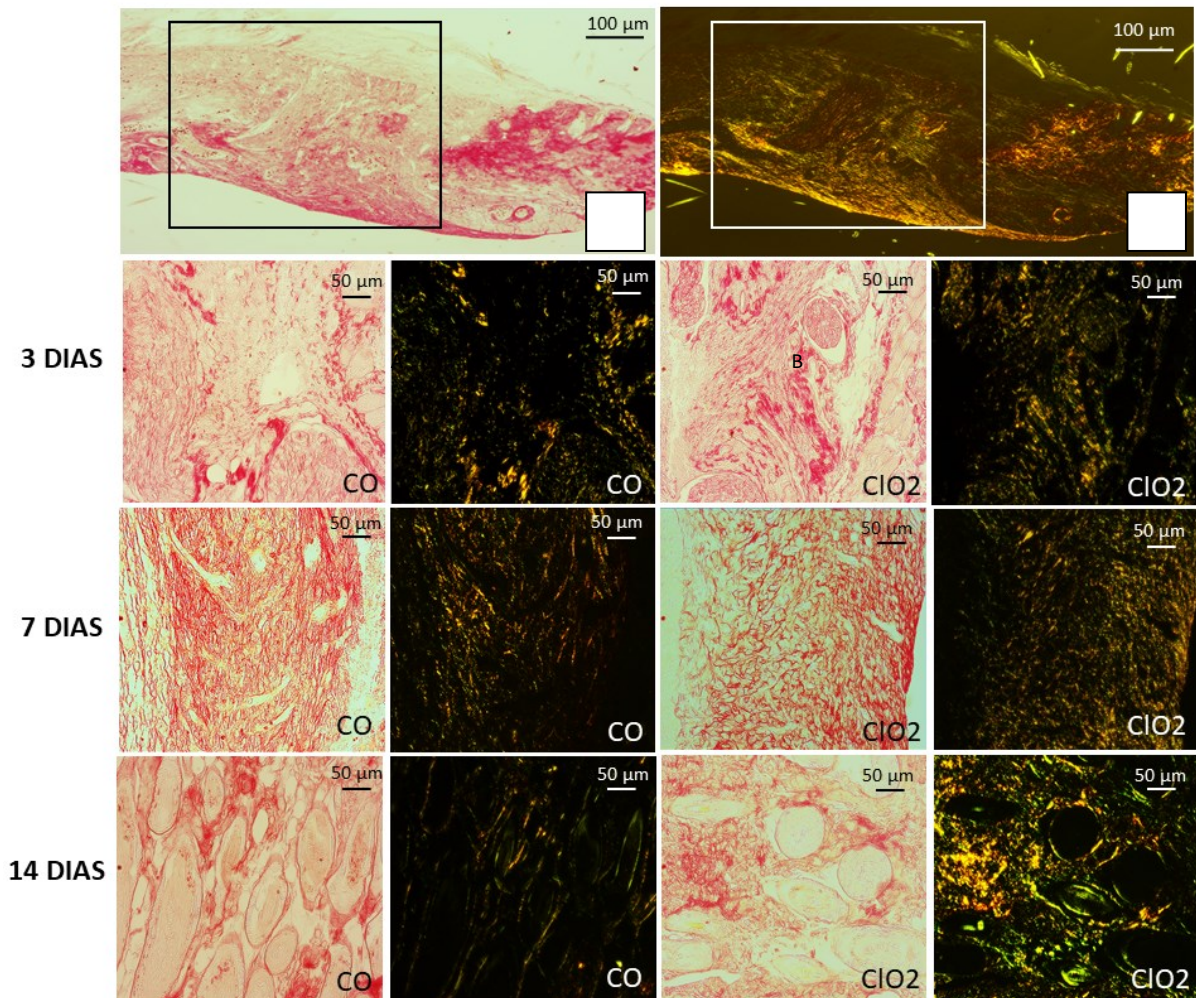


Figura 15 - Fotomicrografias capturadas com microscópio Nikon TS 100 das áreas de feridas cutâneas excisionais em camundongos da linhagem Balb/c após 3, 7 e 14 dias de indução da ferida. Em (A) fotomicrografia em luz branca da área da lesão após 7 dias, a forma retangular delimita o local de captura das imagens para quantificação de colágeno total. Em (B) fotomicrografia em luz polarizada da área da lesão após 7 dias, a forma retangular delimita o local de captura das imagens para quantificação dos colágenos tipo I (fibras em vermelho) e III (fibras em verde), as áreas em amarelo-alaranjado correspondem a sobreposição das fibras tipo I e tipo III. Em cada período analisado (3, 7 e 14 dias) é possível observar a deposição de colágeno total e dos tipos I e III nos grupos controle (CO) e o grupo tratado (ClO₂) com dióxido de cloro a 150 ppm. Lâminas coradas com Picosirius Red [barra de escala de 100 e 50μm].

7. DISCUSSÃO

A utilização da solução de dióxido de cloro (estabilizado a 7% na concentração de 150 ppm) utilizada nesta pesquisa, apresentou influência positiva sobre o processo de cicatrização de feridas cutâneas excisionais em camundongos, o mecanismo de ação e a farmacocinética deste composto ainda não foram bem elucidados, mas a biocompatibilidade é relatada em estudos já realizados (BARNHART et al., 2005; STRATILO; CRICHTON; SAWYER, 2015; VALENTE et al., 2014).

A definição da concentração a ser empregada foi realizada por meio da implantação de esponjas no subcutâneo de camundongos, onde foram testadas 4 diferentes concentrações (50, 150, 250 e 350 ppm). A escolha destas doses utilizadas na primeira etapa deste trabalho se deu baseado no estudo de peritonite realizado por Zavala-Rodriguez e colaboradores (2014), onde as concentrações de dióxido de cloro até 110 ppm suprimiram as aderências intra-abdominais quando comparados ao grupo controle.

No presente estudo as concentrações de dióxido de cloro a 250 e 350 ppm mostraram-se de caráter anti-inflamatório e anti-angiogênico, reduzindo os níveis da MPO, NAG e hemoglobina respectivamente. Sendo assim, optou-se pela dose de 150 ppm para a segunda etapa deste trabalho, pois a mesma apresentou níveis intermediários de NAG e MPO, comparado ao grupo controle e de 250 e 350 ppm, além de apresentar maior dosagem de hemoglobina comparada aos demais grupos, o que sugere a capacidade desta concentração em estimular um maior aporte vascular no local da ferida, que é essencial no processo de cicatrização.

De forma geral os animais tratados com dióxido de cloro apresentaram melhor evolução no fechamento macroscópico da ferida, comparado aos seus respectivos controles, desde a segunda mensuração, realizada após 24h da lesão até o final dos 14 dias de observação.

Aos 3 dias de tratamento o fechamento foi maior ($p \leq 0,01$) no grupo com dióxido de cloro, quando comparado ao seu controle. Fato este, que pode ser explicado pela maior deposição de colágeno total encontrada na análise histológica deste grupo. Essa elevada deposição pode ter ocorrido provavelmente, devido a ação do dióxido de cloro a 150 ppm, que favoreceu tanto a atividade dos neutrófilos como dos macrófagos nas feridas, conforme observados em nossos resultados, através das análises da MPO e do NAG aos 3 dias.

Durante o processo inflamatório, os neutrófilos liberam a MPO a partir de seus grânulos azurófilos, esta enzima tem a capacidade de ligar-se a integrinas de superfície de neutrófilos promovendo a fosforilação de tirosina, que ativa a proteína tirosina quinase, levando a

degranulação e à explosão respiratória destes (KHAN; ALSAHLI; RAHMANI, 2018). Essa explosão respiratória é capaz de estimular, a ação de eferocitose dos macrófagos, levando a resolução da inflamação aguda (LUO et al., 2016). Evento este, que acreditamos ter ocorrido de forma acentuada no grupo tratado deste estudo, decorrente da maior atividade da MPO comparado ao controle, culminado em um maior estímulo para a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização.

Além disso, em feridas, a MPO atuou recrutando fibroblastos e estimulando a síntese de colágenos, o que faz com que ela tenha um papel fundamental na biossíntese da MEC, favorecendo desta forma o reparo tecidual (DENICHILO et al., 2015).

O aumento significativo da MPO no grupo tratado com relação ao controle aos 3 dias, se deve a possível capacidade de oxidação do sulfeto de hidrogênio pelo dióxido de cloro a 150 ppm (CSEKÖ et al., 2018). Segundo Pálinkás e colaboradores (2015), a mieloperoxidase pode ser inibida na presença do sulfeto de hidrogênio.

O sulfeto de hidrogênio tem recebido atenção por ter sido detectado em vários quadros de inflamação e outras patologias (BHATIA, 2012). Seus possíveis mecanismos de ação e de participação em processos fisiológicos já foram descritos por alguns autores, mas ainda não foram bem elucidados (PÁLINKÁS et al., 2015; SHENG et al., 2013; WHITEMAN; WINYARD, 2011).

Os macrófagos, cuja atividade nesta pesquisa está representada pelo NAG, desempenham um importante papel no processo de cicatrização, principalmente durante a formação da nova MEC, pois os mesmos, no final da fase inflamatória mediam várias ações como a liberação dos fatores de crescimento PDGF, IGF-1, TGF- β 1 e o VEGF e a diferenciação e proliferação de outras células, esses agentes em conjunto tem a capacidade de estimular a proliferação celular e a angiogênese (KRZYSZCZYK et al., 2018).

O aumento significativo do NAG no grupo tratado aos 3 dias de observação, fortalece a hipótese que o dióxido de cloro tenha promovido maior estímulo para a transição da fase inflamatória para a fase proliferativa da cicatrização, que é caracterizada pelo aumento das atividades celulares como dos fibroblastos e macrófagos (GONZALEZ et al., 2016; REINKE; SORG, 2012). Nesta fase, ocorre uma grande migração de fibroblastos a partir da derme adjacente, estas células desempenham papel importante na formação do tecido de granulação e síntese de colágenos (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016).

Outra hipótese que pode ser levantada para explicar os resultados do grupo tratado analisado aos 3 dias, é a capacidade do dióxido de cloro em estabilizar o superóxido, reduzindo a cascata inflamatória e os danos aos tecidos adjacentes (ZAVALA-RODRIGUEZ et al., 2014).

O superóxido é um produto decorrente da explosão respiratória, que ocorre em ambiente de hipóxia tecidual com consumo de O₂ e subsequente formação de EROs que muitas vezes pode superar a capacidade de ação da superóxido dismutase, enzima responsável pela remoção desta espécie reativa no tecido (DUNNILL et al., 2017).

Aos 7 dias o grupo tratado com dióxido de cloro indica melhor resolução da fase inflamatória, com valores da MPO abaixo do grupo controle, sugerindo que o grupo tratado esteja na etapa proliferativa da ferida e a frente do grupo controle que ainda apresenta valores de MPO maiores. Essa hipótese também é sustentada a partir da dosagem de hemoglobina que apresentou valor significativamente maior no grupo tratado com dióxido de cloro aos 7 dias de tratamento, esse dado indica um alto índice de vascularização no leito da ferida, que é compatível com a etapa proliferativa.

A formação de novos vasos é necessária para a geração de tecido de granulação, pois estima-se que nesse período a necessidade de vasos seja cinco vezes maior para suprir as demandas metabólicas das células locais (BODNAR, 2015). O restabelecimento da rede vascular é um dos componentes de maior importância no sucesso do reparo de feridas, pois a angiogênese tem papel fundamental durante todo o período de reparação tecidual devido a neovascularização ser responsável pelo transporte de células do sistema imunológico, suporte nutricional e oxigenação do tecido neoformado (DIPIETRO, 2016; SORG et al., 2017; WIETECHKA; DIPIETRO, 2013).

Aos 7 dias de tratamento a atividade dos macrófagos foi maior no grupo tratado quando comparado ao seu controle, sugerindo assim que os macrófagos possam estar estimulando o microambiente da lesão e principalmente os fibroblastos, devido ao aumento da dosagem de colágeno solúvel e da deposição de colágeno tipo III encontrado neste grupo no mesmo período. O colágeno tipo III é predominante nas fases iniciais da ferida, sendo responsável pela estabilidade e resistência do tecido recém criado (OLCZYK et al., 2014). A maior atividade de macrófagos tem características benéficas, pois estudos indicam que a depleção destes no local da ferida prejudica a reparação tecidual (LUCAS et al., 2010; MINUTTI et al., 2017).

Aos 14 dias após a realização da ferida, o fechamento manteve-se significativamente maior no grupo dióxido de cloro quando comparado ao controle. Nas análises histológicas a deposição de colágeno total e dos colágenos tipo III e I foram significativamente maiores no grupo tratado. No presente estudo os valores maiores de colágeno tipo III podem ter influenciado de forma positiva na modulação da síntese do colágeno tipo I assim como observado por Liu e colaboradores (1997) em um estudo realizado em camundongos que demonstrou que esta proteína fibrilar é essencial para a fibrilogênese do colágeno I normal, pois

os animais deficientes em colágeno tipo III apresentaram feridas de pele, rupturas intestinais e de vasos. Apesar do colágeno tipo III está entre os colágenos mais abundantes nos tecidos, a forma como ele direciona os principais aspectos do desenvolvimento, manutenção e reparo dos tecidos é relativamente pouco conhecida.

Já o colágeno tipo I é o mais abundante encontrado no corpo, tem papel importante na manutenção da integridade estrutural da pele e fornece a esta maior resistência à tração (DENICHILO et al., 2015; RICARD-BLUM, 2011). Aos 14 dias a ferida encontra-se na fase de remodelação, a presença do colágeno tipo I em maior quantidade no grupo tratado indica melhor evolução no processo de cicatrização, uma vez que o colágeno tipo I corresponde à forma madura da fibra e o colágeno tipo III corresponde à forma imatura (RODRIGUES et al., 2018).

8. CONCLUSÃO

A solução de dióxido de cloro estabilizado a 7% na concentração de 150 ppm é efetiva em acelerar o fechamento de feridas excisionais cutâneas em camundongos, apresentando influência melhor evolução nas etapas de reparação tecidual, desde a fase inflamatória da ferida até a fase proliferativa, com maior deposição de colágeno total e dos tipos I e III aos 14 dias após a realização da ferida.

REFERÊNCIAS

BAILEY, P. J. Sponge Implants as Models. *Methods in Enzymology*, v. 162, n. C, p. 327-334, 1988.

[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)62087-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)62087-8)

BALSA, I. M.; CULP, W. T. N. Wound Care. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 45, n. 5, p. 1049-1065, set. 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2015.04.009>

BARNHART, B. D. et al. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *Journal of Endodontics*, v. 31, n. 8, p. 613-615, 2005.

<https://doi.org/10.1097/01.don.0000153840.94227.87>

BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, v. 30, n. 3, p. 257-262, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>

BELDON, P. Basic science of wound healing. *Surgery*, v. 28, n. 9, p. 409-412, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2010.05.007>

BHATIA, M. Role of Hydrogen Sulfide in the Pathology of Inflammation. *Scientifica*, v. 2012, p. 1-12, 2012.

<https://doi.org/10.6064/2012/159680>

BODNAR, R. J. Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 11, p. 641-650, 2015.

<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0594>

BORENA, B. M. et al. Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 36, n. 1, p. 1-23, 2015.

<https://doi.org/10.1159/000374049>

BRADLEY, P. P. et al. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

<https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12506462>

BUEMI, M. et al. RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN STIMULATES ANGIOGENESIS AND HEALING OF ISCHEMIC SKIN WOUNDS. *Shock*, v. 22, n. 2, p. 169-173, ago. 2004.

<https://doi.org/10.1097/01.shk.0000133591.47776.bd>

BURTON, N. C. et al. Effect of Gaseous Chlorine Dioxide on Indoor Microbial Contaminants. *Journal of the Air & Waste Management Association*, v. 58, n. 5, p. 647-656, 2008.

<https://doi.org/10.3155/1047-3289.58.5.647>

CAMPOS, P. P. et al. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyether-polyurethane sponge implant model in mice. *Histology and Histopathology*, v. 21, n. 10-12, p. 1263-1270, 2006.

CANESSO, M. C. C. et al. Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. *The Journal of Immunology*, v. 193, n. 10, p. 5171-5180, 15 nov. 2014.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625>

CASSINI-VIEIRA, P. et al. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, v. 92, p. 81-89, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.007>

CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*, v. 30, n. 1, p. 30-41, 2013.

<https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33376>

CSEKÖ, G. et al. Kinetics of the Two-Stage Oxidation of Sulfide by Chlorine Dioxide. *Inorganic Chemistry*, v. 57, n. 16, p. 10189-10198, 20 ago. 2018.

<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01386>

DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 6, p. 378-391, 1 jun. 2016.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.49>

DENICHILO, M. O. et al. Peroxidase Enzymes Regulate Collagen Extracellular Matrix Biosynthesis. *The American Journal of Pathology*, v. 185, n. 5, p. 1372-1384, maio 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.01.013>

DESMOULIERE, A. et al. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, p. 301, nov. 2014.
<https://doi.org/10.2147/CCID.S50046>

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 100, n. 5, p. 979-984, 2016.
<https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0316-102R>

DULMOVITS, B. M.; HERMAN, I. M. Microvascular remodeling and wound healing: A role for pericytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 44, n. 11, p. 1800-1812, nov. 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.06.031>

DUNNILL, C. et al. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *International Wound Journal*, v. 14, n. 1, p. 89-96, 2017.
<https://doi.org/10.1111/iwj.12557>

EDDY, R. S. et al. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. *J Endod*, v. 31, n. 9, p. 672-675, 2005.
<https://doi.org/10.1097/01.don.0000155223.87616.02>

ELLIOTT, M. R.; KOSTER, K. M.; MURPHY, P. S. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*, v.

198, n. 4, p. 1387-1394, 2017.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601520>

FORTUNEL, N. O.; MARTIN, M. T. Cellular organization of the human epidermal basal layer: Clues sustaining a hierarchical model. *International Journal of Radiation Biology*, v. 88, n. 10, p. 677-681, 2012.
<https://doi.org/10.3109/09553002.2012.706359>

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 9, p. 560-582, 2015.
<https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>

GILABERTE, Y. et al. *Anatomy and Function of the Skin*. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>

GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, p. 614-620, 2016.
<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>

GRAY, N. F. Chlorine Dioxide. In: *Microbiology of Waterborne Diseases*. Second Edition. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 591-598.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00032-9>

HAZEN, S. L. et al. Human neutrophils employ chlorine gas as an oxidant during phagocytosis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 98, n. 6, p. 1283-1289, 15 set. 1996.
<https://doi.org/10.1172/JCI118914>

HE, S. et al. Cross-linking of gelatin by chlorine dioxide steam. *Food Hydrocolloids*, v. 45, p. 63-71, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.10.003>

HOSGOOD, G. Stages of Wound Healing and Their Clinical Relevance. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, v. 36, n. 4, p. 667-685, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.02.006>

HOU, Y. et al. Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *Journal of Biomedical Research*, v. 29, n. August, p. 437-444, 2015.

HU, D. E. et al. Correlation of ¹³³Xe clearance, blood flow and histology in the rat sponge model for angiogenesis. Further studies with angiogenic modifiers. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 72, n. 5, p. 601-610, 1995.

ISON, A.; ODEH, I. N.; MARGERUM, D. W. Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione. *Inorganic Chemistry*, v. 45, n. 21, p. 8768-8775, 2006.
<https://doi.org/10.1021/ic0609554>

KHAN, A.; ALSAHLI, M.; RAHMANI, A. Myeloperoxidase as an Active Disease Biomarker: Recent Biochemical and Pathological Perspectives. *Medical Sciences*, v. 6, n. 2, p. 33, 2018.
<https://doi.org/10.3390/medsci6020033>

KORNS, D. et al. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 2, n. NOV, p. 1-10, 2011.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00057>

KRZYSZCZYK, P. et al. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. MAY, p. 1-22, 1 maio 2018.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>

KUJATH, P.; MICHELSEN, A. Wounds - from physiology to wound dressing. *Deutsches Ärzteblatt international*, v. 105, n. 13, p. 239-48, 2008.
<https://doi.org/10.3238/arztebl.2008.0239>

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 73, n.

20, p. 3861-3885, 2016.
<https://doi.org/10.1007/s00018-016-2268-0>

LIMA, L. D. C. et al. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, p. 1-9, 2014.
<https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-177>

LIU, X. et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 5, p. 1852-1856, 4 mar. 1997.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1852>

LUCAS, T. et al. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, v. 184, n. 7, p. 3964-3977, 1 abr. 2010.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>

LUO, B. et al. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signalling to promote acute inflammation resolution. *Nature Communications*, v. 7, p. 1-14, 2016.
<https://doi.org/10.1038/ncomms12177>

MA, J.-W. et al. Efficacy and Safety Evaluation of a Chlorine Dioxide Solution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 14, n. 3, p. 329, 22 mar. 2017.
<https://doi.org/10.3390/ijerph14030329>

MARTIN, K. R. et al. Promoting apoptosis of neutrophils and phagocytosis by macrophages: Novel strategies in the resolution of inflammation. *Swiss Medical Weekly*, v. 145, n. February, p. 1-10, 2015.
<https://doi.org/10.4414/smw.2015.14056>

MENDES, J. B. et al. Host response to sponge implants differs between subcutaneous and intraperitoneal sites in mice. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 83B, n. 2, p. 408-415, nov. 2007.
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.30810>

MINUTTI, C. M. et al. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 61, p. 3-11, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.006>

MOGOÁ, E. et al. Cellular response of the amoeba *Acanthamoeba castellanii* to chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 14, p. 4974-4980, 2011.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00234-11>

NISHIKIORI, R. et al. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *Journal of Dentistry*, v. 36, n. 12, p. 993-998, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.08.006>

NOSZTICZIUS, Z. et al. Chlorine Dioxide Is a Size-Selective Antimicrobial Agent. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. e79157, 5 nov. 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079157>

OLCZYK, P. et al. The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-8, 2014.
<https://doi.org/10.1155/2014/747584>

PÁLINKÁS, Z. et al. Interactions of hydrogen sulfide with myeloperoxidase. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 6, p. 1516-1532, 2015.
<https://doi.org/10.1111/bph.12769>

PASTAR, I. et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in Wound Care*, v. 3, n. 7, p. 445-464, 2014.
<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0473>

PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 5, n. 5, p. 208-229, 2016.
<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0506>

PHILLIPS, C. L. et al. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). *Kidney International*, v. 62, n. 2, p. 383-391, 2002.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00451.x>

PITTMAN, K.; KUBES, P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *Journal of Innate Immunity*, v. 5, n. 4, p. 315-323, 2013.
<https://doi.org/10.1159/000347132>

PLUNKETT, M. L.; HAILEY, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 62, n. 4, p. 510-517, 1990.

QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese Journal of Traumatology - English Edition*, v. 20, n. 4, p. 189-193, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.cjtee.2017.06.001>

REDDING, W. R.; BOOTH, L. C. Effects of Chlorhexidine Gluconate and Chlorous Acid-Chlorine Dioxide on Equine Fibroblasts and Staphylococcus aureus. *Veterinary Surgery*, v. 5, n. 20, p. 306-310, 1991.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1991.tb01272.x>

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.
<https://doi.org/10.1159/000339613>

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 3, n. 1, p. a004978-a004978, 1 jan. 2011.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>

RITTIÉ, L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, v. 10, n. 2, p. 103-120, 12 jun. 2016.
<https://doi.org/10.1007/s12079-016-0330-1>

RODRIGUES, H. W. S. et al. Stereological and Morphometric Study of Type 3 Collagen Formation in the Cutaneous Wounds of Diabetic Mice Treated with

Mesenchymal Stem Cells. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 46, n. 1, p. 1-11, 16 maio 2018.

<https://doi.org/10.22456/1679-9216.82619>

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*, v. 304, n. 1, p. 274-286, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.10.033>

SCHULTZ, G. S.; WYSOCKI, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 17, n. 2, p. 153-162, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>

SERRA, M. B. et al. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *International Journal of Inflammation*, v. 2017, p. 1-17, 2017.

<https://doi.org/10.1155/2017/3406215>

SHARMA, V. K.; SOHN, M. Reactivity of chlorine dioxide with amino acids, peptides, and proteins. *Environmental Chemistry Letters*, v. 10, n. 3, p. 255-264, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s10311-012-0355-5>

SHENG, J. et al. Hydrogen sulphide suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 17, n. 10, p. 1345-1354, 2013.

<https://doi.org/10.1111/jcmm.12114>

SHIN, Y. J.; SONG, H. Y.; SONG, K. BIN. Effect of a combined treatment of rice bran protein film packaging with aqueous chlorine dioxide washing and ultraviolet-C irradiation on the postharvest quality of "Goha" strawberries. *Journal of Food Engineering*, v. 113, n. 3, p. 374-379, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.07.001>

SORG, H. et al. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, v. 58, n. 1-2, p. 81-94, 2017.
<https://doi.org/10.1159/000454919>

STRATILO, C. W.; CRICHTON, M. K. F.; SAWYER, T. W. Decontamination efficacy and skin toxicity of two decontaminants against bacillus anthracis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1-12, 2015.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138491>

THIRUVOTH, F. et al. Current concepts in the physiology of adult wound healing. *Plastic and Aesthetic Research*, v. 2, n. 5, p. 250, 2015.
<https://doi.org/10.4103/2347-9264.158851>

TRAVAGLI, V. et al. Ozone and ozonated oils in skin diseases: A review. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, 2010.
<https://doi.org/10.1155/2010/610418>

UCHIYAMA, K.; YAMADA, M. An examination of the effect of new disinfectant (matatacorotm) for patients with terminal oral cancer or abscess. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 72, n. 9, p. e97, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.06.172>

USUI, M. L. et al. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 56, n. 7, p. 687-696, 2008.
<https://doi.org/10.1369/jhc.2008.951194>

VALENTE, J. H. et al. Activated Chlorine Dioxide Solution Can Be Used as a Biocompatible Antiseptic Wound Irrigant. *Advances in Skin & Wound Care*, v. 27, n. 1, p. 13-19, jan. 2014.
<https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000439060.79822.b3>

WANG, C. et al. Asperosaponin VI promotes angiogenesis and accelerates wound healing in rats via up-regulating HIF-1 α /VEGF signaling. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 39, n. 3, p. 393-404, 7 mar. 2018.
<https://doi.org/10.1038/aps.2017.161>

WANG, J. Neutrophils in tissue injury and repair. *Cell and Tissue Research*, v. 371, n. 3, p. 531-539, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s00441-017-2785-7>

WHITEMAN, M.; WINYARD, P. G. Hydrogen sulfide and inflammation: The good, the bad, the ugly and the promising. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 4, n. 1, p. 13-32, 2011.

<https://doi.org/10.1586/ecp.10.134>

WIEGAND, C. et al. A novel native collagen dressing with advantageous properties to promote physiological wound healing. *Journal of Wound Care*, v. 25, n. 12, p. 713-720, 2016.

<https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.12.713>

WIETECH, M. S.; DIPIETRO, L. A. Therapeutic Approaches to the Regulation of Wound Angiogenesis. *Advances in Wound Care*, v. 2, n. 3, p. 81-86, abr. 2013.

<https://doi.org/10.1089/wound.2011.0348>

WILGUS, T. A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*, v. 2, n. 7, p. 379-388, 2013.

<https://doi.org/10.1089/wound.2012.0383>

WILLENBORG, S. et al. CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood*, v. 120, n. 3, p. 613-625, 2012.

<https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403386>

WOODLEY, D. T. et al. Keratinocyte Migration and a Hypothetical New Role for Extracellular Heat Shock Protein 90 Alpha in Orchestrating Skin Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 4, p. 203-212, 2015.

<https://doi.org/10.1089/wound.2014.0566>

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*, v. 44, n. 3, p. 450-462, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.015>

XUE, M.; JACKSON, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 3, p. 119-136, mar. 2015.
<https://doi.org/10.1089/wound.2013.0485>

YANG, X.; GUO, W.; LEE, W. Formation of disinfection byproducts upon chlorine dioxide preoxidation followed by chlorination or chloramination of natural organic matter. *Chemosphere*, v. 91, n. 11, p. 1477-1485, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.014>

ZAVALA-RODRIGUEZ, J. M. et al. Oxychlorine species suppress postsurgical adhesions in rats. *Journal of Surgical Research*, v. 186, n. 1, p. 164-169, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.07.043>

ZHANG, R. et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 48, p. 46116-46122, 2002.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209124200>

ZOMER, H. D.; TRENTIN, A. G. Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research. *Journal of Dermatological Science*, v. 90, n. 1, p. 3-12, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.12.009>

Anexo I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 056/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 009/18

Projeto Pesquisa: “Avaliação da atividade do Dióxido de Cloro na reparação epitelial de feridas e sua resposta inflamatória em camundongos.”.

Pesquisador Responsável: Francisco Cláudio Dantas Mota

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 19 de abril de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17