

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**LARA GRAMA DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO CICATRICAL DE FERIDAS CUTÂNEAS DE  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO**

**UBERLÂNDIA**

**2019**

**LARA GRAMA DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO CICATRICAL DE FERIDAS CUTÂNEAS DE  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO**

Trabalho de monografia apresentado a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.

**Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota**  
**Co-orientador (a): Profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo**

Uberlândia

2019

**LARA GRAMA DE LIMA**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO CICATRICAL DE FERIDAS CUTÂNEAS DE  
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM DIÓXIDO DE CLORO**

Trabalho de monografia apresentado a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de curso II.

Uberlândia, 10 de julho de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

---

Prof. Dr. Geison Morel Nogueira  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

---

Profa. Dra. Aracelle Elisane Alves  
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus que me abençoou e me deu forças para que eu fosse capaz de chegar até aqui. Sem Ele, jamais conseguiria seguir os meus propósitos.

Agradeço aos meus pais, Eduardo e Carmen, e à minha irmã Marília que sempre me ajudaram e me apoiaram em minhas decisões, além disso, se fizeram extremamente presentes nesses anos de graduação.

Ao meu namorado, Vinícius, que há quatro anos caminha ao meu lado, mas me apoiou e esteve comigo desde o primeiro dia de UFU. Sem ele minha graduação não teria sido tão maravilhosa. Obrigada por ser bem mais que um namorado, e agir como um verdadeiro amigo.

Agradeço também aos meus amigos, os quais fizeram com que esses cinco anos fossem inesquecíveis. Especialmente à Kimberly, Marco Túlio e Vitória, que diariamente estiveram comigo. Saibam que meu desejo é levar vocês para a vida toda.

Agradeço aos meus pacientes, que graças a eles fui capaz de aprender mais, treinar mais e amar mais. Eles fizeram com que eu me apaixonasse cada vez mais por essa profissão.

Aos meus professores que tanto me ensinaram, e não apenas conhecimentos acadêmicos, mas valores para a vida. Em especial aos Professores Aracelle e Geison que aceitaram compor a minha banca para acrescentar ainda mais ao meu trabalho.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida para que eu conseguisse realizar a minha iniciação científica.

Agradeço ao doutorando Marcelo, que me acompanhou diariamente em meu experimento, tornando tudo mais leve. Obrigada por todas as ajudas, conversas e pelo companheirismo nesse último ano. Além disso, agradeço aos doutorandos Bruno e Francielly, e a Professora Fernanda de Assis que tornaram possível a realização desse projeto. Obrigada por disponibilizarem o seu tempo e conhecimento para somar à conclusão desta pesquisa.

E por fim, agradeço ao meu orientador Francisco “Chico” que foi um verdadeiro pai para mim. Obrigada por me apoiar e acreditar no meu potencial. Saiba que tenho uma enorme admiração por você e pelo profissional que é.

## RESUMO

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. 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. 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 ( $\text{ClO}_2$ ) 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. Neste trabalho, testou-se a concentração de 150 ppm de dióxido de cloro em modelo experimental de feridas cutâneas excisionais em camundongos. Foram dosados o colágeno solúvel, hemoglobina, atividade de mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) e quantificados a deposição de colágeno total e dos tipos I e III. 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 150ppm foi efetiva 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.  $\text{ClO}_2$ . Esponja. Reparo.

## ABSTRACT

The skin is the largest organ of the body with about 10% of the total weight of the body mass, performs several functions among them the physical protection, chemistry and the maintenance of hydration, the processes necessary for survival. Skin lesion initiates a response capable of limiting damage and inducing repair through the interaction of physiological processes that include the stages of tissue inflammation, proliferation and remodeling. 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 (ClO<sub>2</sub>) is distinguished by the low cost, great biocidal capacity and its biocompatibility potential, besides presenting low toxicity when compared to other antiseptics like chlorhexidine. In this work, the concentration of 150ppm of chlorine dioxide was tested in the cutaneous healing process of mice. Soluble collagen, hemoglobin, myeloperoxidase activity (MPO) and N-acetyl-β-D-glicosaminidase (NAG) were measured and quantified total collagen deposition and types I and III. 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 ( $p \leq 0.05$  ep  $\leq 0.01$ ). The 7% stabilized chlorine dioxide solution at 150ppm 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. ClO<sub>2</sub>. Sponge. Repair.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -Imagem fotográfica após a criação das quatro lesões cutâneas dorsais em camundongos, com punch de biópsia de 5mm de diâmetro.....18
- Figura 2 - Imagem fotográfica mostrando a aplicação das soluções sobre as lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de camundongos.....19
- Figura 3- O gráfico mostra redução em porcentagem da área das feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado 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 4- O gráfico mostra redução em porcentagem da área das feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 1, 3, 7 e 14 após criação da ferida ( $p \leq 0,05^*$ ) e ( $p \leq 0,01^{**}$ ).....24
- Figura 5- O gráfico mostra a dosagem de hemoglobina nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,001^{***}$ ).....24
- Figura 6.- O gráfico mostra atividade de MPO nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ) e ( $p \leq 0,001^{***}$ ).....25
- Figura 7 - O gráfico mostra atividade de NAG nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ).....26
- Figura 8- O gráfico mostra a dosagem de colágeno solúvel nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,01^{**}$ ).....26
- Figura 9- O gráfico mostra a quantificação de colágeno total por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,001^{***}$  e  $p \leq 0,05^*$ ).....27
- Figura 10 - O gráfico mostra a quantificação de colágeno tipo I por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ).....28
- Figura 11 - O gráfico mostra a quantificação de colágeno tipo III por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ).....28
- Figura 12 - 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 amarelo-esverdeado). 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 e o grupo tratado com dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) a 150ppm. Lâminas coradas com Picosirius Red [barra de escala de 100 e 50µm.....29



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral: .....	14
2.2 Objetivos específicos: .....	14
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
3.1 Pele .....	15
3.2 Cicatrização .....	15
3.3 Etapas do reparo tecidual.....	16
3.3.1 Hemostasia .....	16
3.3.2 Inflamação .....	17
3.3.3 Proliferação .....	17
3.3.4 Resolução .....	18
3.4 Dióxido de Cloro .....	18
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>20</b>
4.1 Animais .....	20
4.2 Procedimento Cirúrgico .....	20
4.3 Grupos Experimentais .....	20
4.4 Eutanásia .....	21
4.5 Análise macroscópica da ferida e coleta das amostras .....	21
4.6 Análise histomorfométrica do colágeno total e dos tipos I e III.....	22
4.7. Atividade da N-Acetil B-D- Glicosaminidase (NAG) .....	22
4.8. Dosagem de hemoglobina .....	23
4.9. Dosagem de colágeno solúvel.....	23
4.10. Atividade da mieloperoxidase (MPO).....	24
4.11 Análise estatística .....	25
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
5.1 Análise Macroscópica da Ferida .....	25
5.2 Dosagem de Hemoglobina.....	26
5.3 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO) .....	27
5.4 Atividade da enzima N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....	27
5.6 Análise histomorfométrica do colágeno total, tipo I e III .....	29
5.6.1 Colágeno total .....	29
5.6.2 Colágeno Tipo I e III.....	29
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>35</b>

**REFERÊNCIAS ..... 36**

## 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 (WANG et al., 2018).

Todas as feridas de pele, desde incisões cirúrgicas até ferimentos perfurantes, passam por um processo de cicatrização. Esse mecanismo é complexo e depende de múltiplos tipos de células e mediadores que interagem em uma sequência sofisticada (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 à 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 ( $\text{ClO}_2$ ) 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. OBJETIVOS**

### **2.1 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.

### **2.2 Objetivos específicos**

(1) Avaliar os efeitos do dióxido de cloro sobre a velocidade de fechamento de feridas cutâneas excisionais;

(2) Avaliar através de parâmetros bioquímicos e histológicos, os efeitos do dióxido de cloro sobre a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), bem como do conteúdo de hemoglobina e da produção e deposição de colágenos na feridas excisionais cutâneas de camundongos.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Pele**

A pele é o maior órgão do organismo animal, e funciona como uma barreira entre os meios interno e externo. É dividida em camadas, sendo a epiderme a camada superficial, a derme uma camada fibrosa resistente, e hipoderme, caracterizada por tecido conjuntivo fibroso. Essas camadas são importantes para proteção contra agentes infecciosos e lesões. (WENDT, 2005). A perda da integridade da pele pode resultar em disfunções fisiológicas e até morte do animal, pois suas funções incluem a termorregulação e proteção. (THEORET, 2009).

A epiderme é formada por uma camada epitelial escamosa estratificada, basicamente composta por queratinócitos e melanócitos. É fisicamente separada da derme pela membrana basal, a qual 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 ocorrência de lesão (BARONI et al., 2012; CICHOREK et al., 2013; GILABERTE et al., 2016).

A derme é uma espessa camada de tecido fibroso e elástico, localizada logo abaixo da epiderme, onde se encontram 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, os quais são responsáveis pela síntese de substâncias que compõem a matriz extracelular (MEC), 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).

Já a matriz extracelular é composta por proteoglicanos, ácido hialurônico e principalmente por colágeno, correspondendo a 90% da sua composição (WIEGAND et al., 2016). A matriz extracelular 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).

#### **3.2 Cicatrização**

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, e 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).

A cicatrização compreende um processo dinâmico que envolve fenômenos celulares, psicológicos, bioquímicos e moleculares. Esta culmina na reparação tecidual e formação de cicatriz fibrosa (BOWLER, 2002).

### **3.3 Etapas do reparo tecidual**

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

#### **3.3.1 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 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 contra a entrada de patógenos, além disso, filamentos de fibrina são incorporados a essa agregação e culminam na formação do coágulo. Esse tampão 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). 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 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).

### 3.3.2 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, e para isso 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).

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 até a ferida e amadurecem em macrófagos no tecido (WYNN; VANNELLA, 2016; QING, 2017). Os macrófagos removem bactérias, tecido necrótico e participam da liberação de fatores de crescimento e citocinas que modulam e recrutam fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos (FRYKBERG; BANKS, 2015).

Devido os importantes papéis desempenhados pelos neutrófilos e macrófagos no processo inflamatório e de reparação cicatricial, as enzimas, mieloperoxidase (MPO) e a N-acetil- $\beta$ -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).

### 3.3.3 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, e 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 matriz extra celular 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 re-epitelização (LANDÉN; LI; STÄHLE, 2016; SERRA et al., 2017).

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). 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 por colágeno dos tipos I e III, elastina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (OLCZYK et al., 2014; THIRUVOTH et al., 2015). Já a re-epitelização é a migração dos queratinócitos pela epiderme da borda da ferida. Essa mobilidade é estimulada pela liberação dos fatores de crescimento e pela hipóxia que ocorre na área lesada (WOODLEY et al., 2015).

#### 3.3.4 Resolução

A fase de resolução é marcada pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. A diminuição da cicatriz ocorre devido à contração da ferida por meio de um movimento centrípeto de toda a pele circundante. Há, também, maturação das fibras de colágeno (TAZIMA *et al.*, 2008). A neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. (MANDELBAUM, 2003).

### 3.4 Dióxido de Cloro

Várias pesquisas por tratamentos alternativos têm sido realizadas com a intenção de encontrar compostos de baixo custo, baixa toxicidade celular e tecidual, e cicatrização em menor período de tempo, de acordo com o poder bacteriostático ou bactericida. (MONTEIRO *et al.*, 2004; SARANDY, 2007). Sendo assim o Dióxido de Cloro destaca-se por compreender baixa toxicidade quando comparado a outros compostos, como por exemplo o clorexidine (PERUZZO, 2007).

O dióxido de cloro é um composto químico de fórmula  $\text{ClO}_2$ , com características oxidantes, que atua na parede celular de microorganismos. Tem atividade bactericida e é



tóxico para os vírus envelopados e não envelopados. (PERUZZO, 2007). É amplamente usado como purificador de água e desinfetante local de alimentos (WIRTHLIN, 2001).

A desinfecção de feridas promovida pelo dióxido de cloro é obtida a partir do uso de baixas concentrações e pouco tempo de exposição. Já os danos teciduais, ocorrem apenas com altas concentrações e longo tempo de exposição ao dióxido de cloro, o que confere ao composto uma baixa toxicidade (NOSZTICZIUS, 2013). Stratilo e colaboradores (2015) demonstraram que 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.

Em um 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  $\text{ClO}_2$ . Nos resultados obtidos não foi observado diferença na cosmese das feridas.

Os mecanismos de ação do dióxido de cloro a nível celular ainda não são totalmente compreendidos, mas sabe-se que se trata de um oxidante que interage com aminoácidos, proteínas e ácido ribonucleico viral (RNA). Além disso, sabe-se que a ação oxidante danifica o interior das membranas de determinadas bactérias que possuem endósporos (MCDONNELL, 1999).

## 4. METODOLOGIA

Este projeto foi submetido e aprovado pelo CEUA (comissão de experimentação animal) UFU de acordo com o protocolo 009/18.

### 4.1 Animais

Foram utilizados 60 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 horas (livre acesso a água e ração, durante todo o estudo) seguindo o padrão realizado em experimentos com camundongos desta espécie.

### 4.2 Procedimento Cirúrgico

Todos animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de quetamina 10% (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg), aplicados por via intraperitoneal. Após 10 minutos da aplicação da anestesia, os animais sofreram tricotomia, com máquina, da região dorsal, a partir do segmento cervical até o início do segmento lombar da coluna, em ambos os antímeros. Com o camundongo em decúbito ventral, foi feita antissepsia da região dorsal com álcool 70% v/v. Verificado a presença de anestesia, realizou-se com o auxílio de um “punch” de biópsia de 5 mm de diâmetro quatro incisões circulares equidistantes no dorso dos animais, removendo a pele e todo subcutâneo.



Figura 1 - Imagem fotográfica após a criação das quatro lesões cutâneas dorsais em camundongos, com “punch” de biópsia de 5mm de diâmetro. (Fonte: Arquivo Pessoal).

### 4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos com 30 animais cada, controle (CO) e tratado (ClO<sub>2</sub>). 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  $\mu$ L de solução de PBS, já no grupo ClO<sub>2</sub> realizou-se a aplicação de 20  $\mu$ L da solução de dióxido de cloro a 150 ppm sobre a ferida. As aplicações foram realizadas com auxílio de uma pipeta, imediatamente após a realização das feridas até o dia anterior a eutanásia. Os animais foram tratados com 3, 7 e 14 dias após a realização da ferida. Ao apresentarem crostas, essas foram removidas mecanicamente antes do tratamento, com auxílio de gase estéril embebida em solução fisiológica.



Figura 2 - Imagem fotográfica mostrando a aplicação das soluções sobre as lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de camundongos. (Fonte: Arquivo Pessoal).

#### 4.4 Eutanásia

Os animais de ambos os grupos foram submetidos a eutanásia no final dos respectivos dias de observação (0, 24 horas, 3, 7 e 14 dias de pós-operatório), com lidocaína 2% 57mg/kg (0,1 mL) seguido de Tiopental sódico 5% 150 mg/Kg (0,1mL) ambos por via intraperitoneal e deslocamento cervical.

#### 4.5 Análise macroscópica 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. 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):

$$\frac{(\text{diâmetro menor})}{2} \times \frac{(\text{diâmetro maior})}{2} \times \text{valor de } \pi \text{ (PI): } 3,14$$

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 %:

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

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 amostras excisadas com auxílio de um “punch” de biópsia de 8mm de diâmetro. Uma das amostras foi direcionada ao processamento histológico e uma para atividade de de N-acetil – B-D Glicosaminidase NAG (atividade de macrófagos). Outras duas amostras restantes foram divididas ao meio, obtendo-se então quatro metades de uma amostra, as quais foram direcionadas para as demais avaliações: dosagem de hemoglobina, colágeno solúvel, atividade de MPO (atividade de neutrófilos) e zimografia (dosagem da atividade de metaloproteinases).

#### **4.6 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, segundo 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. 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.

#### **4.7. Atividade da N-Acetil B-D- Glicosaminidase (NAG)**

O ¼ restante da amostra original foi ressuspenso 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  $\mu$ L das amostras em duplicata a uma placa de 96 poços. Nas amostras, foram adicionados 100  $\mu$ L do substrato (p-nitrofenil-n-acetil- $\beta$ -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  $\mu$ L 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-nitrofenol-nacetil- $\beta$ -D-glicosamina com a N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG). Os resultados das leituras foram expressos em nmol.mL<sup>-1</sup>/mg de peso úmido da amostra.

#### **4.8. 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  $\mu$ m (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.

#### **4.9. 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) sendo 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 50µL do reagente Picrossirius Red e 30 µL 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 µL 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 µL 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 µg de colágeno por mg de peso da amostra.

#### **4.10. Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Após a dosagem de hemoglobina, a amostra utilizada foi dividida ao meio, obtendo  $\frac{1}{4}$  da amostra 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 (eppendorf) 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 (eppendorf) 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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).

#### 4.11 Análise estatística

Os resultados foram apresentados pelas médias  $\pm$  e.p.m. (erro padrão médio) dos dados. A comparação entre os grupos do tratamento de feridas foi feita a análise de variância com Two-way (ANOVA) 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.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise Macroscópica da Ferida

Em todos os tempos avaliados de 1, 3, 7 e 14 dias, o fechamento em % de área da amostra do grupo tratado com dióxido de cloro a 150 ppm foi superior quando comparado com o grupo controle (Figuras 3 e 4), com diferença estatística em todos os tempos analisados ( $p \leq 0,05^*$  e  $p \leq 0,01^{**}$ ).

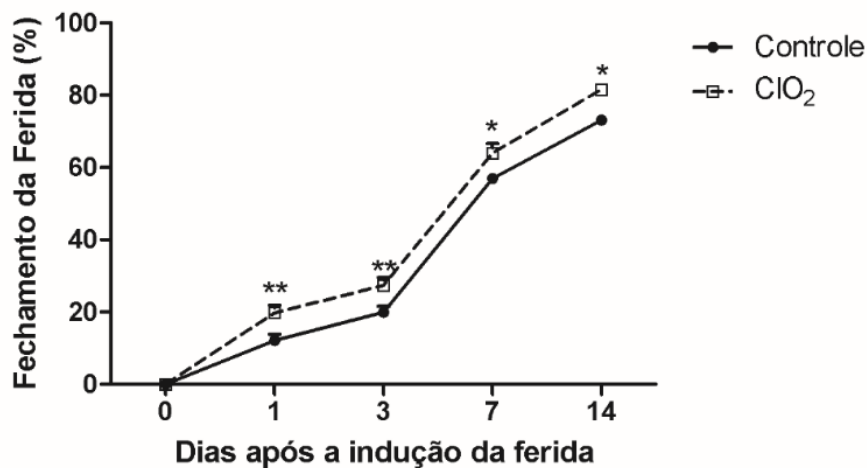


Figura 3- O gráfico mostra redução em porcentagem da área das feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 1, 3, 7 e 14 após criação da ferida ( $p \leq 0,05^*$ ) e ( $p \leq 0,01^{**}$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

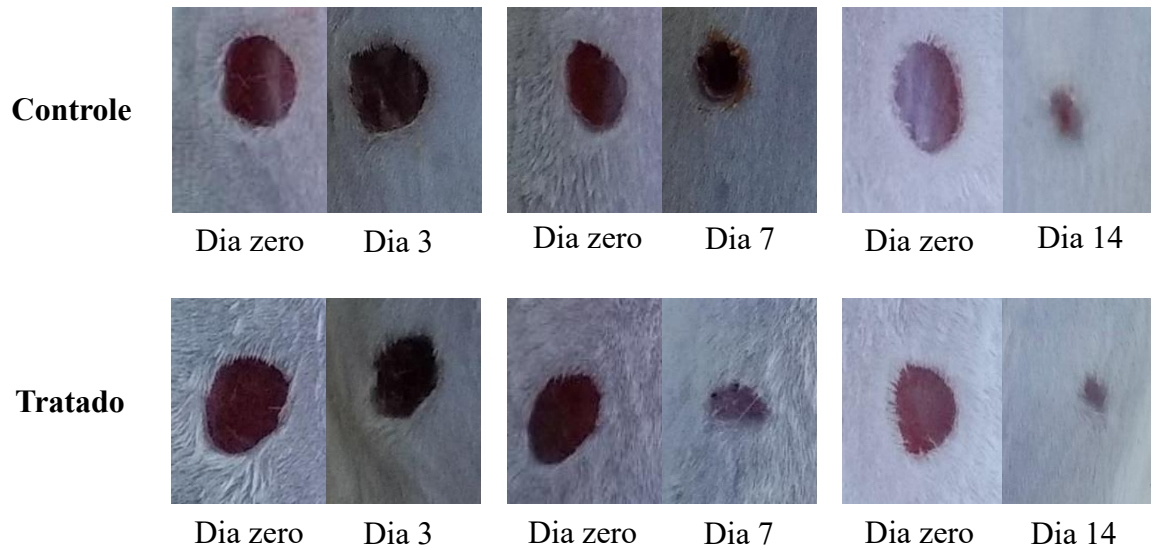


Figura 4- O gráfico mostra redução em porcentagem da área das feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 1, 3, 7 e 14 após criação da ferida ( $p \leq 0,05^*$ ) e ( $p \leq 0,01^{**}$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

## 5.2 Dosagem de Hemoglobina

Com relação a dosagem de hemoglobina, o grupo tratado com dióxido de cloro a 150 ppm, apresentou diferença estatística apenas no sétimo dia de observação quando comparado ao grupo controle ( $p \leq 0,001^{***}$ ). (Figura 5).

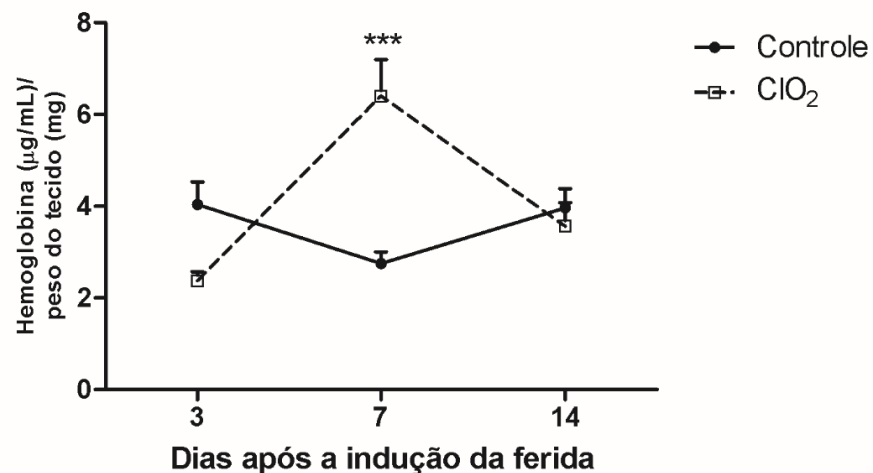


Figura 5- O gráfico mostra a dosagem de hemoglobina nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,001^{***}$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.



### 5.3 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

A atividade de neutrófilos foi mensurada a partir da dosagem bioquímica da enzima mieloperoxidase, o grupo tratado 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, e aos 14 dias os valores encontrados foram semelhantes em ambos os grupos ( $p \geq 0,05$ ). (Figura 6).

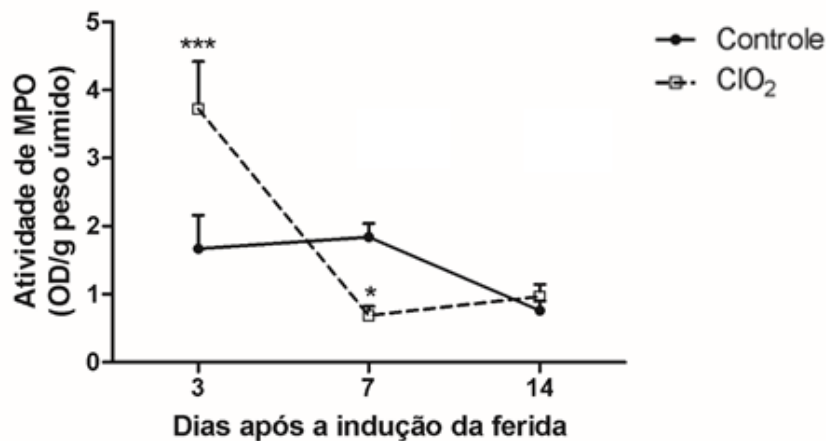


Figura 6.- O gráfico mostra atividade de MPO nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05$ \*) e ( $p \leq 0,001$ \*\*\*). Fonte: Arquivo Pessoal

### 5.4 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 por 3 e 7 dias com dióxido de cloro em comparação com o grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). No dia 14 o grupo tratado e o grupo controle não apresentaram diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ). (Figura 7)

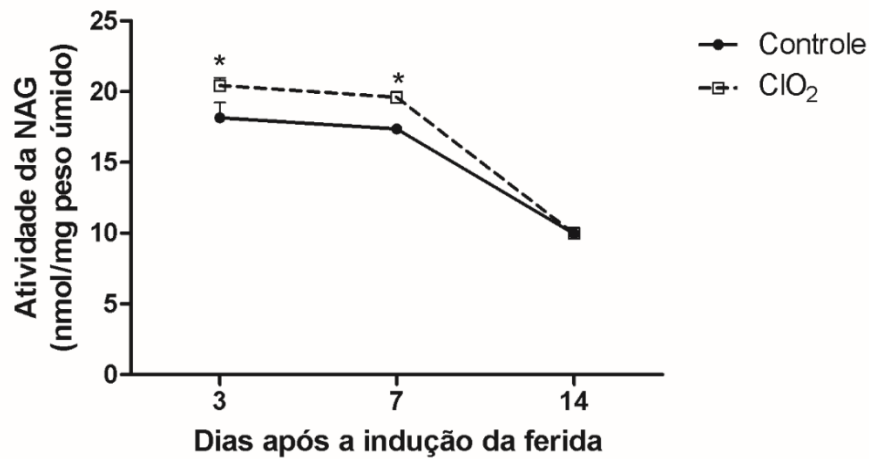


Figura 7 - O gráfico mostra atividade de NAG nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

### 5.5 Colágeno solúvel

A quantificação de colágeno solúvel foi significativamente maior nos grupos tratados durante 3 e 7 dias, quando comparado aos grupos controles ( $p \leq 0,01^{**}$ ). Aos 14 dias de tratamento não foi observado diferença estatística entre os grupos ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 8).

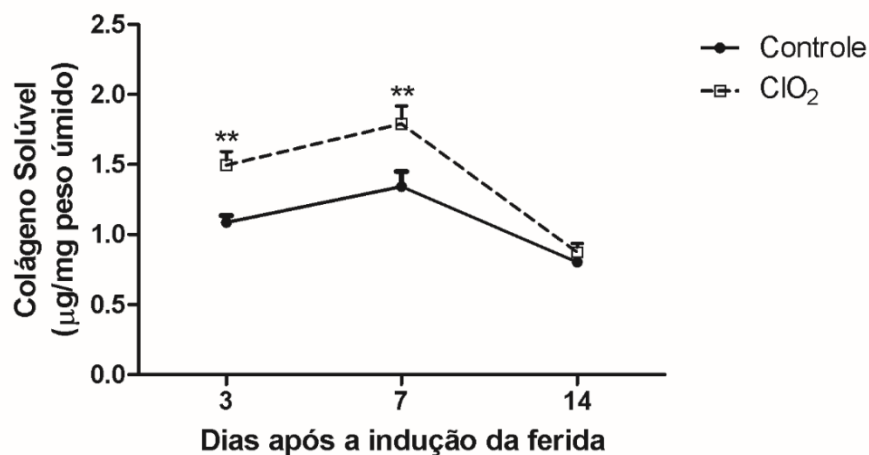


Figura 8- O gráfico mostra a dosagem de colágeno solúvel nas feridas cutâneas do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,01^{**}$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

## 5.6 Análise histomorfométrica do colágeno total, tipo I e III

### 5.6.1 Colágeno total

A maior deposição de colágeno total ocorreu nos grupos tratados com dióxido de cloro nos dias 3 e 14, com diferença estatística ( $p \leq 0,001^{***}$  e  $p \leq 0,05^*$ ) quando comparado ao grupo controle. Com 7 dias de tratamento os grupos não apresentaram diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 9)

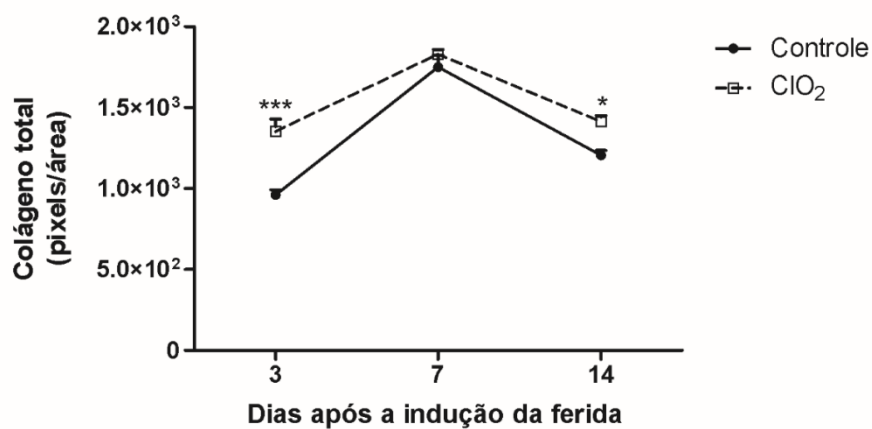


Figura 9- O gráfico mostra a quantificação de colágeno total por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,001^{***}$  e  $p \leq 0,05^*$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

### 5.6.2 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.

Não houve diferença estatística ( $p \geq 0,05$ ) da deposição de colágeno tipo I nas feridas dos animais do grupo controle e tratado 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 com dióxido de cloro, estatisticamente significante ( $p \leq 0,05^*$ ), quando comparado com o seu respectivo controle (Figura 10).

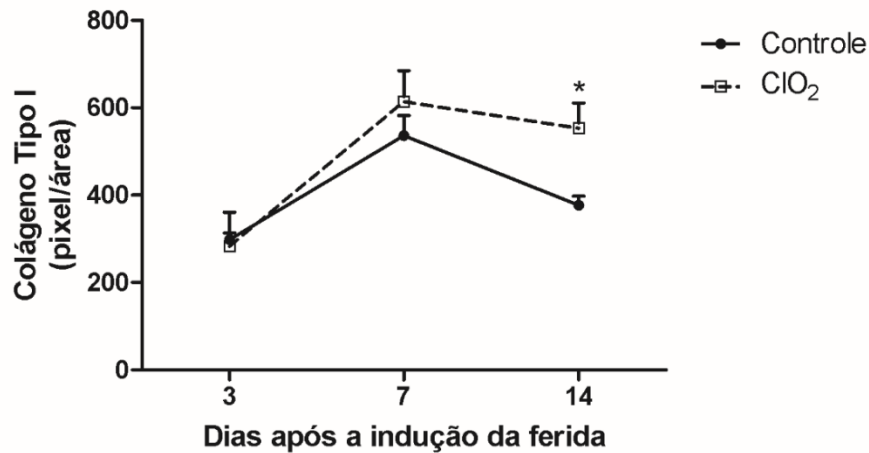


Figura 10- O gráfico mostra a quantificação de colágeno tipo I por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

O grupo tratado com dióxido e cloro a 150 ppm, apresentou grande deposição de colágeno tipo III, estatisticamente significante ( $p \leq 0,05^*$ ), observados nos períodos de 7 e 14 dias, quando comparados com seus respectivos controles (Figuras 11 e 12).

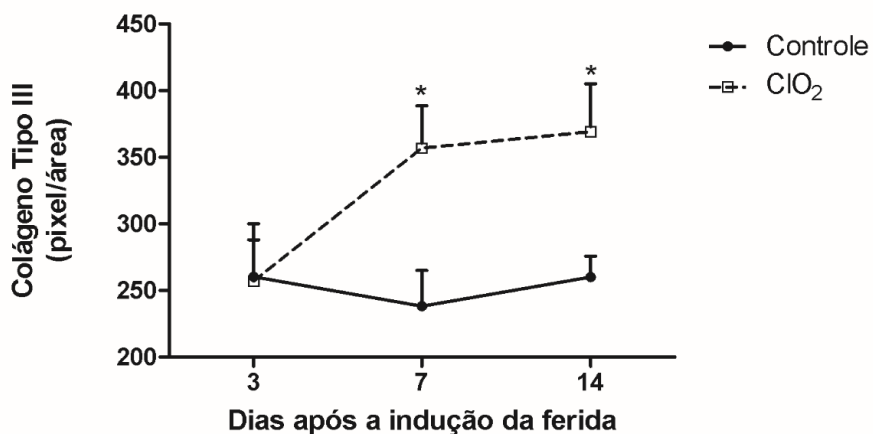


Figura 11 - O gráfico mostra a quantificação de colágeno tipo III por densidade de área ( $\mu\text{m}$ ) em lâminas coradas com Picosirius Red, de feridas cutâneas de camundongo do grupo controle comparada ao grupo tratado com 150 ppm de dióxido de cloro nos dias 3, 7 e 14 ( $p \leq 0,05^*$ ). Fonte: Arquivo Pessoal.

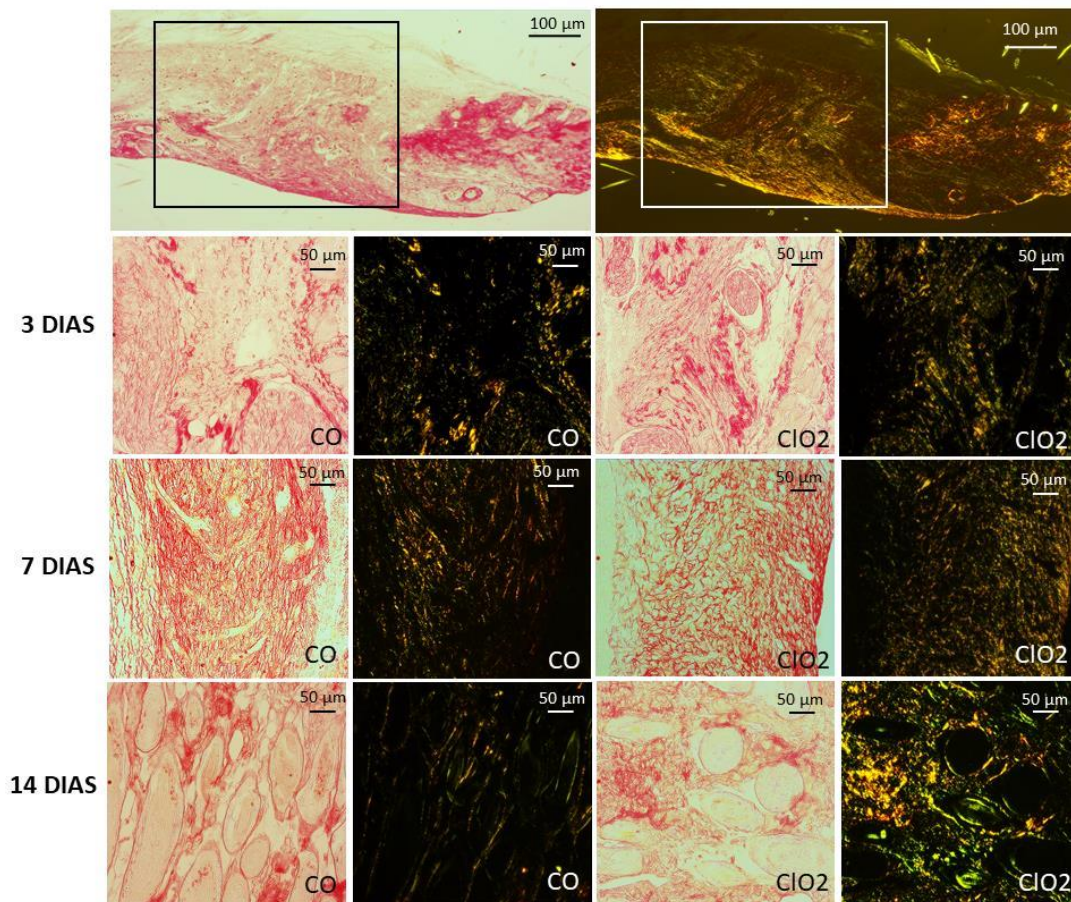


Figura 12 - Fotomicrografias capturadas com microscópio Nikon TS 100 das áreas de feridas cutâneas excisionais em camundongos da linhagem Balb/c após 3, 7 e 14 dias de indução da ferida. Em (A) fotomicrografia em luz branca da área da lesão após 7 dias, a forma retangular delimita o local de captura 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 amarelo-esverdeado). 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 e o grupo tratado com dióxido de cloro (ClO<sub>2</sub>) a 150ppm. Lâminas coradas com Picosirius Red [barra de escala de 100 e 50µm. (Fonte: Arquivo Pessoal)

## 6. 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).

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 também superior ( $p \leq 0,01$ ) 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 provavelmente a capacidade de oxidação do sulfeto de hidrogênio pelo dióxido de cloro a 150 ppm (PAN; GAO; STANBURY, 2016).

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- $\beta$ 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 a transição mais rápida 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 O<sub>2</sub> 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 resolução nos camundongos, e 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).



## 7. CONCLUSÃO

A solução de dióxido de cloro estabilizado a 7% na concentração de 150ppm 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, comparado ao grupo controle.

## REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- BELDON, P. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 28, n. 9, p. 409–412, 2010.
- BODNAR, R. J. Chemokine Regulation of Angiogenesis During Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 11, p. 641–650, 2015.
- 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.
- 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.
- CICHOREK, M. et al. Skin melanocytes: Biology and development. **Postepy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 1, p. 30–41, 2013.
- 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.
- DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 979–984, 2016.
- 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.
- FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 9, p. 560–582, 2015.
- GILABERTE, Y. et al. **Anatomy and Function of the Skin**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.
- GONZALEZ, A. C. DE O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p. 614–620, 2016.
- GRAY, N. F. Chlorine Dioxide. In: **Microbiology of Waterborne Diseases**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 591–598.
- 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.
- 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.

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.

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.

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.

KUJATH, P.; MICHELSEN, A. Wounds - from physiology to wound dressing. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 105, n. 13, p. 239–48, 2008.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÄHLE, 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.

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.

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.

LUO, B. et al. Phagocyte respiratory burst activates macrophage erythropoietin signalling to promote acute inflammation resolution. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–14, 2016.

MANDELBAUM, DI SANTIS & MANDELBAUM. **Cicatrização: current concepts and auxiliary resources - Part I\*** 78(4):393-410, jul./ago. 2003.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance; Clin. Microbiol. Rev. 1999, vol 12, no 1, pg 147-179. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88911/>> Acesso em: 13 de março de 2018.

NOSZTICZIUS, Z. et al. Chlorine Dioxide Is a Size-Selective Antimicrobial Agent. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79157, 5 nov. 2013.

OLCZYK, P. et al. The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

P. G. BOWLER. **Wound pathophysiology, infection and therapeutic options**. Annals of Medicine 2002, vol. 34, no. 6, pag. 419–427. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523497>>. Acesso em: 13 de março de 2018.

PAN, C.; GAO, Q.; STANBURY, D. M. Kinetics of the Benzaldehyde-Inhibited Oxidation of Sulfite by Chlorine Dioxide. **Inorganic Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 366–370, 4 jan. 2016.

PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional Therapies for Skin Wound Healing. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 5, p. 208–229, 2016.

PERUZZO DC, JANDIROBA PF, NOGUEIRA FILHO GDA R. **Use of 0.1% chlorine dioxide to inhibit the formation of morning volatile sulphur compounds (VSC)**. Brazilian Oral Research, São Paulo, 2007, vol 21, no 1. Periodontics.

PITTMAN, K.; KUBES, P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. **Journal of Innate Immunity**, v. 5, n. 4, p. 315–323, 2013.

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.

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.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012.

RICARD-BLUM, S. The Collagen Family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. a004978–a004978, 1 jan. 2011.

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.

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.

SARANDY, M. M. In: **Avaliação do efeito cicatrizante do extrato de repolho (Brassica oleracea var. capitata) em ratos wistar**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa. Defesa: Lavras, 2007.

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.

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.

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.

TAZIMA, M., VICENTE, Y. E MORIYA, T., 2008. **Biologia da Ferida e Cicatrização**. Medicina Ribeirão Preto Online, 2008, vol 41, no 3, pag 259- 264. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/271>>. Acesso em: 30 de março de 2018.

THEORET, C. Tissue **engineering in wound repair: the three R's: repair, replace, regenerate**. *Veterinary Surgery*, Ontario. 2009, vol 38, no 8, pag 905-913. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1532-950X.2009.00585.x>>. Acesso em: 2 de abril de 2018.

THIRUVOTH, F. et al. Current concepts in the physiology of adult wound healing. **Plastic and Aesthetic Research**, v. 2, n. 5, p. 250, 2015.

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.

VALENTE, J. H. *et al.* Activated chlorine dioxide solution can be used as a biocompatible antiseptic wound irrigant. **Advances in Skin and Wound Care**, 2014.

WENDT, S.B.T. In: **Comparação da eficácia da calêndula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Defesa: Curitiba, 2005.

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.

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.

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.

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.

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.

WYNN, T. A.; VANNELLA, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. **Immunity**, v. 44, n. 3, p. 450–462, 2016.

ZAVALA-RODRIGUEZ, J. M. *et al.* Oxychlorine species suppress postsurgical adhesions in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 186, n. 1, p. 164

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.