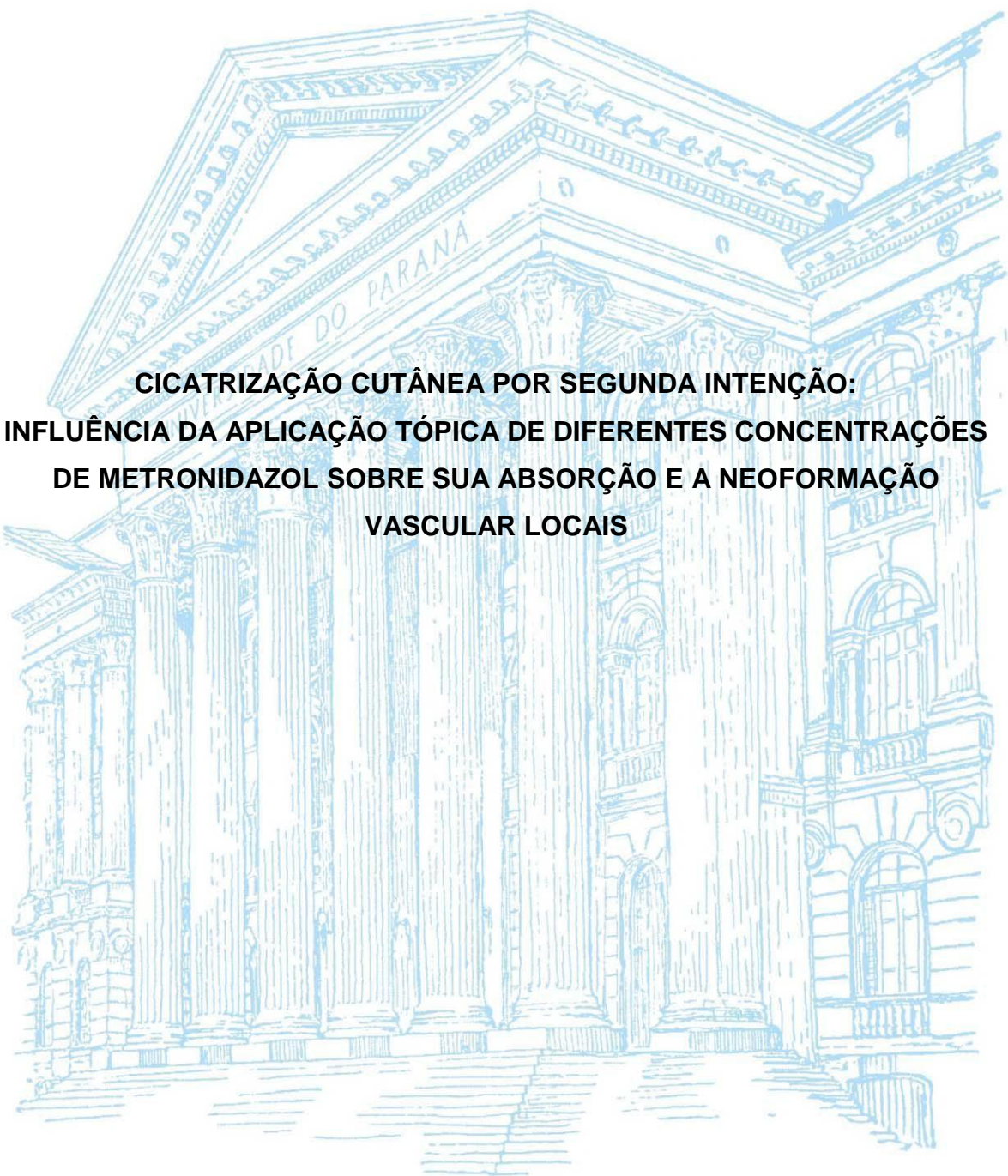


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO**



**CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO:  
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES  
DE METRONIDAZOL SOBRE SUA ABSORÇÃO E A NEOFORMAÇÃO  
VASCULAR LOCAIS**

**CURITIBA**

**2016**

**CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO**

**CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO:  
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES  
DE METRONIDAZOL SOBRE SUA ABSORÇÃO E A NEOFORMAÇÃO  
VASCULAR LOCAIS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões

**CURITIBA**

**2016**

S192 Sampaio, Cláudia Paraguaçu Pupo

Cicatrização cutânea por segunda intenção: influência da aplicação tópica de diferentes concentrações de metronidazol sobre sua absorção e a neoformação vascular locais / Cláudia Paraguaçu Pupo Sampaio -- Curitiba, 2016.

61 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Pessole  
Biondo-Simões

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Cicatrização. 2. Metronidazol. 3. Absorção cutânea. 4. Colágeno. 5. Neovascularização fisiológica. I. Matias, Jorge Eduardo Fouto. II. Biondo-Simões, Maria de Lourdes Pessole. III. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

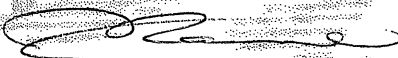
NLMC: WO185



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 177ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente à aluna **CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO** com o trabalho intitulado: **"CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO: INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE METRONIDAZOL SOBRE A NEOFORMAÇÃO VASCULAR LOCAL"** Área de Concentração: *Nutrição e cicatrização em cirurgia*; Linha de Pesquisa: *Cicatrização e medidas de resistência dos tecidos*; tendo como orientador o Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias.

As sete horas e trinta minutos do dia dezesseis de dezembro de dois mil e dezesseis, no auditório da CAD – sala 702 – 7º andar do prédio central do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos seguintes doutores: Gyl Henrique Albrecht Ramos, Eduardo José Brommelstroed Ramos, João Henrique Felício De Lima, Adonis Nasr, Rogério Hamerschmidt, sendo este último presidente da banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pela candidata das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora de Avaliação convidou a candidata a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pela candidata, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a banca examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A candidata foi considerada **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes membros.

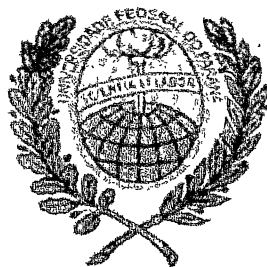
  
Gyl Henrique Albrecht Ramos

  
Eduardo José Brommelstroed Ramos

  
João Henrique Felício De Lima

  
Adonis Nasr

  
Rogério Hamerschmidt



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA  
NÍVEIS MESTRADO E DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO**

Aluna: **CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO**

Título da Tese: **“CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO:  
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE METRONIDAZOL SOBRE A NEOFORMAÇÃO  
VASCULAR LOCAL”.**

**CONCEITOS EMITIDOS**

<b>MEMBROS</b>	<b>CONCEITO</b>	<b>EQUIVALÊNCIA</b>
Gyl Henrique Albrecht Ramos	9,5	A
Eduardo José Brommelstroed Ramos	9,5	A
João Henrique Felício De Lima	9,0	A
Adonis Nasr	9,0	A
Rogério Hamerschmidt	9,0	A

**CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Conceito Final: 9,0 Equivalência: A

Curitiba, 16 de dezembro de 2016.

<b>MEMBROS</b>	<b>ASSINATURA</b>
Gyl Henrique Albrecht Ramos	
Eduardo José Brommelstroed Ramos	
João Henrique Felício De Lima	
Adonis Nasr	
Rogério Hamerschmidt	

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido, João Palma; minha filha, Catharine Palma pela paciência e apoio ao tempo necessário para a elaboração desta tese.

Aos meus pais Maria Cecília Pupo Sampaio e João Antonio Sampaio (*in memoriam*), pelo exemplo.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias e Co- Orientadora Prof. Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Biondo Simões pela orientação desta tese, contribuindo com a vasta experiência de ambos.

Ao amigo Emir Toktar, pelas orientações.

Aos professores Sérgio Fontoura, professor da PUC PR, pelas orientações.

Ao professor Roberto Sidnei Chiandotti, do TECPAR, pelas orientações.

## RESUMO

A fim de abordar os efeitos da administração tópica do metronidazol na absorção local e neovascularização durante cicatrização experimental por segunda intenção, 108 ratos machos, Wistar, pesando entre 300-350g foram submetidos a uma ferida de pele de espessura total, circular, com 2cm de diâmetro. Os animais foram divididos em 5 grupos (18 cada grupo) de acordo com a concentração usada da solução de metronidazol (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) durante todo o período do experimento os curativos foram realizados diariamente, cada subdividido em três tempos de análise ( após 3, 7 e 14 dias de observação). Amostras de sangue venoso para avaliação da concentração de metronidazol foram obtidas por punção cardíaca e manipuladas por cromatografia líquida de alta performance; neovasos formados foram demonstrados usando CD34 e vimentina por técnicas de imunoistoquímica. Análise estatística, incluindo comparações intergrupos e intragrupos foram calculados por testes não paramétricos de Kruskal-Wallis usando SSPS software e valor de "p" 0,05, significância estatística de 95%. O metronidazol esteve presente na corrente sanguínea em todos os grupos de metronidazol e momentos estudados mas não houve diferença estatística de acordo com a concentração de metronidazol usada ou o tempo de exposição da ferida à droga. Foi significativo o número de neovasos formados ( $p=0,005$ ) nas feridas tratadas com administração de solução de metronidazol tópico 6% e 8%. Concentrações séricas de metronidazol não foram afetadas pelo uso tópico das concentrações da solução de metronidazol topicamente ou pela duração do tempo de administração. O uso tópico de metronidazol em soluções de 6% e 8% em feridas com cicatrização experimental por segunda intenção melhorou significativamente a neovascularização local conforme avaliado pelas técnicas imunoistoquímicas CD34 e vimentina. Estes achados podem ser potencialmente usados em favor do processo de cicatrização de feridas.

**Descritores: Cicatrização. Metronidazol. Absorção cutânea. Neovascularização. Administração tópica. Fisiológica. Ratos.**

## ABSTRACT

In order to address beneficial effects of metronidazole topical administration on local absorption and neovascularization during experimental second-intention healing, 108 Wistar male rats, weighing 300-350g were submitted to a circular, 2 cm diameter, total deep back skin wound. Animals were divided into five groups (18 each group) according to the metronidazole solution concentration used (4%, 6%, 8%, 10% and 12%) during the dressing performed daily all over the period of experiment which was subdivided into three times of analysis (after 3, 7 and 14 days of observation). Blood samples for metronidazole venous concentration were obtained from cardiac puncture and manipulated by High-Performance Liquid Chromatography; newly formed vessels were demonstrated using CD34 and vimentin immunohistochemistry techniques. Statistical analysis, including intergroups and intragroups comparisons was calculated by non-parametric Kruskal-Wallis test using SSPS software and p value of 0,05, statistical significance of 95%. Metronidazole was present at bloodstream in all metronidazole groups and moments studied but there was no statistical differences according to metronidazole solution concentration used or time of wound exposure to the drug. There was significantly more newly formed vessels ( $p=0,005$ ) at the wounds treated by topical administration of 6% and 8% metronidazole solutions. Metronidazole serum concentrations are not affected by metronidazole solution concentration used topically or by the duration time of administration. Topical administration of metronidazole solutions at 6% and 8% in experimental second-intention skin wounds was able to improve significantly local neovascularization as assessed by CD34 and vimentin immunohistochemistry techniques. These findings can be potentially used in favor of the wound healing process.

**Keywords: Wound Healing. Metronidazole. Administration, Topical. Skin Absorption. Neovascularization, Physiologic. Rats.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

- FIGURA 1 - Foto do rato 14 do grupo experimento III (8%) em posição decúbito ventral, após a realização da ferida operatória, no momento zero ..... 11
- TABELA 1- DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS E DIAS DE AVALIAÇÃO ... 12

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
1.1 OBJETIVOS.....	9
<b>1 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>10</b>
1.1 AMOSTRA .....	10
1.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	10
1.3 GRUPOS .....	11
1.4 TRATAMENTO DAS FERIDAS CUTÂNEAS .....	12
1.5 COLETA SANGUÍNEA PARA DETECÇÃO DE METRONIDAZOL.....	12
1.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE .....	13
1.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA .....	14
1.8 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA .....	14
1.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA .....	15
<b>2 ARTIGOS CIENTÍFICOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>
<b>NORMAS ADOTADAS</b> .....	<b>51</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>52</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Para o controle da cicatrização das feridas era preconizada a necessidade das lesões permanecerem secas. Esse conceito permaneceu até o final da Segunda Guerra. Inicialmente, utilizou-se um filme transparente, permeável ao vapor. Na sequência, o mesmo tipo de filme foi envolto em moldura adesiva de polivinil. Percebeu-se o benefício do ambiente úmido para a cicatrização e em 1982, surgiram as coberturas à base de hidrocolóides, para feridas de espessura parcial, nos Estados Unidos e na Europa, disponibilizadas no mercado brasileiro a partir de 1990(1).

Na sequência surgiram os hidropolímeros, que mantêm o meio úmido, além de promoverem a evaporação do exsudato, favorecendo a granulação e diminuindo a maceração dos tecidos neoformados(1).

Os recursos, na atualidade, visam acelerar o processo de cicatrização e reduzir as complicações, minimizando os gastos. Entre estes recursos encontram-se: ácidos graxos essenciais, colágenos biológicos, hidropolímeros, hidrogéis, hidrocolóides e enzimas proteolíticas. Muitos destes, têm no seu custo, o impedimento para a sua maior utilização(2).

As estatísticas da América do Norte e da Europa, com relação às úlceras de pressão, indicam, em pacientes de unidade de terapia intensiva (UTI), uma prevalência superior a 14,8% e incidência de 0,4 a 38%. Em hospitais para idosos, com problemas crônicos de saúde, a taxa de prevalência se localiza entre 2,3 a 28% e a incidência entre 2,2 a 23,9%. Para pacientes sob cuidados domiciliares a prevalência é registrada até 29%, sendo a incidência de 6,3%. Pessoas com lesão medular apresentam taxa de prevalência entre 20 e 60%(3).

Estudo realizado no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, com pacientes internados em unidades cirúrgicas, cuidados semi-intensivos e unidades de terapia intensiva, indicou a incidência de úlceras de pressão entre 29,63 e 42,64%. Outro estudo, na mesma cidade, em uma unidade de terapia intensiva de um hospital privado, revelou a incidência de 10,62%(4).

A equipe da Divisão de Cirurgia Plástica e Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo avaliou 45 pacientes com 77 úlceras. Na maioria, pacientes jovens (média de 34,78 anos), sendo que 100% dos pacientes com lesão medular, 60% das vítimas de lesões por arma de

fogo e 93,3% dos pacientes com enfermidades crônicas, desenvolveram úlceras. A taxa de recorrência foi de 25%(5).

Isik *et al.* (6) referem que nos Estados Unidos da América, o tempo médio de internação de um serviço de referência é de 20 dias e o gasto é de 21.675 dólares/úlceras.

Cerca de 2,7% da população tem úlceras crônicas nos pés e pernas, porcentagem que chega a 10% nos diabéticos e que representa a segunda causa de afastamento do trabalho no Brasil(7).

Ereno(7) refere a importância do desenvolvimento de curativos, com preços razoáveis, para atender 4,5 milhões de pessoas, no Brasil, que, provavelmente, não possam pagar os altos valores dos medicamentos importados.

Os escassos registros, fazem com que os dados estatísticos não retratem de forma fidedigna o sério problema de saúde pública que as feridas representam(8). Considerando que o metronidazol encontra-se disponível na rede pública e apresenta um baixo custo, sua utilização, em feridas crônicas, poderia representar o acesso de milhões de pessoas a um tratamento de melhor qualidade, visando não apenas o benefício particular, do paciente que iria utilizá-lo, mas a redução dos gastos públicos. Há que se considerar que o gasto público não se limita ao valor do tratamento da úlcera, mas inclui o tempo de afastamento do trabalho e o custo diário de um leito, quando o paciente requer internamento.

Além disso se torna de vital importância a elucidação sobre o efeito benéfico anti-infeccioso advindo da aplicação tópica do metronidazol se deve, exclusivamente, a uma ação local ou se apóia, também, em efeito sistêmico através da potencial absorção do fármaco a partir da lesão cutânea.

Há pesquisas que indicam que o metronidazol possui propriedades relacionadas com a cicatrização, promovendo aceleração da contração e da epitelização, culminando com a precocidade do processo de reparação(9-13). Indaga-se, porém, se além de efeitos sobre a contração da ferida, o metronidazol não teria parte de seu favorecimento à cicatrização de feridas explicado por efeitos benéficos sobre o fenômeno de neovascularização local. Poletti *et al.*(14) e Kalinski *et al.*(15) indicaram a aplicação tópica de metronidazol, gel ou solução, para o controle do odor, este, referindo que o efeito da desodorização do metronidazol poderia estar relacionado com a erradicação da infecção anaeróbia.

## 1.1 OBJETIVOS

- Analisar a possível absorção sistêmica do metronidazol a partir da aplicação tópica de soluções com diferentes concentrações (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) em modelo experimental de cicatrização, por segunda intenção, de ferida cutânea.

- Investigar o potencial efeito da aplicação tópica de soluções de diferentes concentrações (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) em ferida cutânea aberta sobre o processo de neovascularização local.

## 1 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi desenvolvido após análise e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 654/2012. O estudo seguiu as orientações da Lei Federal 11.794 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

### 1.1 AMOSTRA

Foram empregados 108 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus, Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com 110 dias de idade e peso entre 300g e 350g. Os animais foram mantidos no laboratório em período de ambientação, em gaiolas individuais, com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie e em condições ambientais controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ( $18 \pm 2^\circ$ ) e de umidade relativa do ar ( $55 \pm 15\%$ ).

### 1.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com quetamina 80mg/kg e xilazina 8mg/kg, via intramuscular, na porção posterior da coxa direita, posicionados em decúbito ventral e com os membros superiores e inferiores estendidos e fixados num suporte cirúrgico. Uma área de pele, da região dorsal, de 24 cm<sup>2</sup> (6 cm X 4 cm) foi tricotomizada e submetida à antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e protegida com campo esterilizado fenestrado. Uma área circular de pele com dois centímetros de diâmetro, demarcada pela rotação da borda cortante de "punch" metálico, foi ressecada à tesoura em espessura total expondo a fáscia muscular dorsal (Figura 1). Não houve necessidade de hemostasia e a área foi deixada exposta. Imediatamente, após o procedimento, os animais receberam dipirona na dose de 10mg/kg, por via intramuscular (IM), com finalidade analgésica (16).

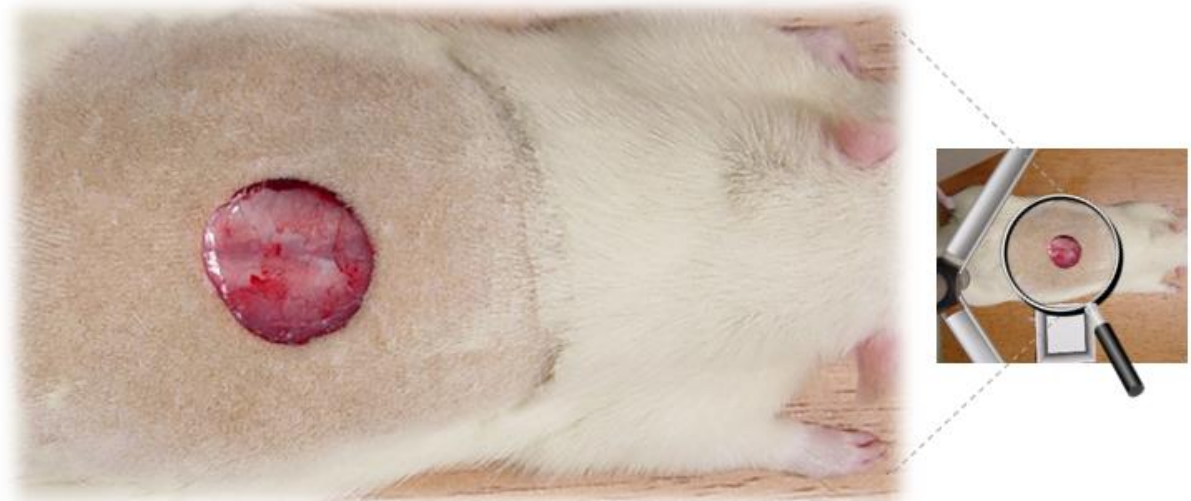


FIGURA 1 - Foto do rato 14 do grupo experimento III (8%) em posição de decúbito ventral, após realização da ferida operatória no momento zero  
FONTE: A autora (2015)

### 1.3 GRUPOS

Grupos de estudo- 18 grupos, com seis animais cada, foram, aleatoriamente, estabelecidos de acordo com a concentração da solução de metronidazol utilizada no tratamento diário das feridas. No grupo controle (GC) não se utilizou solução de metronidazol e sim solução de cloreto de sódio à 0,9%. Em todos os outros grupos foi utilizada solução aquosa de metronidazol puro, manipulada, diluída em veículo q.s.p. solução final de 40mg/kg (4%) no grupo I (GI), 60mg/kg (6%) no grupo II (GII), 80mg/kg (8%) no grupo III (GIII), 100mg/kg (10%) no grupo IV (GIV) e 120mg/kg (12%) no grupo V (GV).

TABELA 1- DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS E DIAS DE AVALIAÇÃO

GRUPOS	NÚMERO DE RATOS	DIAS DE AVALIAÇÃO
GC (controle)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE I (4%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE II (6%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE III (8%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE IV (10%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias
GE V (12%)	n-6	3 dias
	n-6	7 dias
	n-6	14 dias

FONTE: A autora (2015)

#### 1.4 TRATAMENTO DAS FERIDAS CUTÂNEAS

Todas as feridas confeccionadas foram tratadas pelo mesmo protocolo conforme literatura prévia (17). Diariamente, as lesões eram lavadas com solução de cloreto de sódio à 0,9%, realizada a retirada de crostas, seguida da aplicação de 0,3 ml de metronidazol solução com a respectiva diluição de acordo com o grupo. Para o tratamento diário das feridas não houve necessidade de nenhum procedimento anestésico.

#### 1.5 COLETA SANGUÍNEA PARA DETECÇÃO DE METRONIDAZOL

Em cada grupo de animais houve retirada de amostras de sangue para a determinação da presença de metronidazol na circulação sistêmica em três momentos distintos: terceiro, sétimo e décimo-quarto dias após a confecção da ferida cutânea, o que subdividiu cada grupo em três subgrupos de acordo com o dia da coleta sanguínea. As amostras foram coletadas através de punção cardíaca com retirada de

três mililitros de sangue acondicionados em frascos para armazenamento contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), colocados em caixa térmica reutilizável(18) e enviados, imediatamente, para a Central Analítica do Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), onde as amostras foram centrifugadas e congeladas, para posterior análise. Após a punção cardíaca procedeu-se a eutanásia com dose letal de tiopental sódico intra-peritoneal (120mg/kg).

## 1.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA DO SANGUE

Detecção do metronidazol na circulação sistêmica- a análise da presença do metronidazol no sangue foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*) por pareamento iônico com duas colunas Novapak® com 10% de carbono e fase móvel de acetonitrila à 15%. Para a calibração do cromatógrafo Agilent® modelo 1100, considerou-se a extrapolação alométrica determinando-se a curva de metabolização do metronidazol por meio de gavagem de solução com 80 mg/kg e coleta sanguínea após 30, 60 e 120 minutos. Inicialmente, o produto aplicado nas feridas, em quantidade contendo 40 mg de metronidazol foi comparado a 10,6 mg de metronidazol puro para confirmação de identidade; ambos diluídos em 100 ml de metanol: H<sub>2</sub>O (1:1) e aplicados nas colunas (10uL) num fluxo de 0,4 ml/min, à temperatura de 30°C e comprimento de onda 272 nanômetros (nm). A concentração aproximada do metronidazol padrão foi calculada a partir das áreas obtidas ao injetar a amostra padrão de metronidazol (10 mg/L), sendo essa 104,327 unidades de absorvância por segundo (uA.s). A seguir todas as amostras de sangue coletadas e congeladas de todos os grupos de estudo (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e respectivos subgrupos (3 dias, 7 dias e 14 dias) foram preparadas e analisadas pelo cromatógrafo nas mesmas condições descritas. A concentração foi avaliada pelo comportamento da área por meio da equação: *concentração = área X fator de proporcionalidade + coeficiente linear da reta*. O cálculo da área foi feito pelo próprio cromatógrafo por intermédio do *software "Chem Station"*.

## 1.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

As feridas foram fotografadas; após ressecadas ocorreu a eutanásia.

Foi realizada a retirada de cada ferida cirúrgica, com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato.

Os segmentos destinados à histologia foram estendidos sobre papel cartão identificado. Na seqüência, mergulhados em formol a 10% por 24 horas. Após este período, foram inclusos em blocos de parafina e submetidos a cortes de cinco micrômetros.

Os cortes histológicos foram corados por Hematoxilina Eosina e *Sirius Red*. Para cada corte histológico, foi realizada a leitura de três campos, para ambas as colorações, com ampliação de 400X, sobre a área da lesão, para a coloração Hematoxilina Eosina e 200X para a coloração *Sirius Red*. Os campos foram marcados nas lâminas; foram definidas áreas superficiais, sendo as áreas de transição entre o processo cicatricial e os tecidos antigos dos extremos da ferida e área superficial central da mesma.

## 1.8 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Para a imunistoquímica foi utilizado o método *tissue array* ou *mycro array*, sendo retiradas amostras do bloco de parafina utilizado para corar os cortes histológicos pelas técnicas hematoxilina e eosina (HE) e *Sirius Red* (SR). A área escolhida para a retirada da amostra foi a área superficial central da ferida, localizada na lâmina do HE, previamente demarcada e utilizada como espelho para a realização do *punch*. O *punch* utilizado foi o número 3. As amostras foram retiradas e depositadas em um "cassete", conforme determinação do mapa previamente elaborado. O material foi encaminhado, na seqüência, para processamento imunistoquímico, tendo sido utilizado o anti-CD34(19) e a vimentina(20). O anti-CD34 é um marcador de endotélio, a coloração acastanhada confere resultado positivo, mas não apresenta resultados satisfatórios para vasos maiores, sendo sua indicação para microvasculatura. A

vimentina é um marcador de tecido mesenquimal, com muitos tipos celulares, havendo necessidade de correlação com outros marcadores. Foi realizada a leitura de todos os campos para cada corte histológico. Foi utilizado, para a leitura, microscópio Olympus® BX500. A leitura foi realizada por patologista que não conhecia a que animal pertenciam.

## 1.9 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Média das leituras para estatística- foi feita a média do número de vasos pelo número de campos, de cada ferida, para definir a densidade de vasos. Essa média foi encaminhada para análise estatística.

Análise Estatística- os resultados de área foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em cada dia de avaliação e para a comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo, foi considerado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

## 2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

**ABSORÇÃO DO METRONIDAZOL PARA A CORRENTE SANGUÍNEA A PARTIR  
DE SUA APLICAÇÃO TÓPICA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, EM  
FERIDAS CUTÂNEAS EXPERIMENTAIS DURANTE CICATRIZAÇÃO POR  
SEGUNDA INTENÇÃO<sup>1</sup>**

**CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO<sup>I</sup>**

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões<sup>II</sup>

Lilian Cristine Teixeira Trindade<sup>I</sup>

Márcia Olandowski<sup>III</sup>

Jorge Eduardo Fouto Matias<sup>II</sup>

Conflito de interesse: Não

Recursos de financiamento: CAPES

---

1. Trabalho realizado no Laboratório de Técnica Cirúrgica Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) como parte integrante do doutorado da aluna Cláudia P. P. Sampaio no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR)

I. Médica, discente nível Doutorado do programa de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR

II. Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR

III. Professora do Departamento de Estatística Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR)

## RESUMO

**OBJETIVO:** caracterizar qualitativa e quantitativamente a absorção de solução de metronidazol, em concentrações e períodos crescentes, quando aplicada de maneira tópica em modelo experimental de ferida cutânea aberta. **MÉTODOS:** uma ferida cutânea aberta, com 2 cm de diâmetro e espessura total de pele foi confeccionada, sob anestesia, no dorso de 108 ratos Wistar pesando entre 300 e 350 gramas. Os animais foram divididos em grupos de 18 animais de acordo com a concentração de metronidazol na solução para aplicação diária na ferida. No grupo controle (GC), utilizou-se solução de cloreto de sódio 0,9% para aplicação e nos grupos experimentais (GI, GII, GIII, GIV e GV) solução de Metronidazol a 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, respectivamente. Após 3, 7 e 14 dias de tratamento, amostras de sangue coletadas por punção cardíaca foram examinadas para a existência ou não de Metronidazol, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Valores de Metronidazol detectados foram comparados, estatisticamente, dentro de cada grupo (análise temporal 3 dias X 7 dias X 14 dias) e entre os grupos que utilizaram Metronidazol tópico (4% X 6% X 8% X 10% e 12%) através de teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). **RESULTADOS:** foi detectado Metronidazol em todas as amostras de todos os momentos em todos os grupos que aplicaram Metronidazol tópico nas feridas. Caracteristicamente não houve significância estatística entre as dosagens obtidas dentro de cada grupo ao longo do tempo (3 dias X 7 dias X 14 dias) GI=0,461; GII=0,154; GIII=0,888; GIV= 0,264 e GV=0,152. Na avaliação entre os grupos verificou-se similar grau de absorção em 3 dias ( $p=0,829$ ) e 14 dias ( $p=0,751$ ). **CONCLUSÃO:** a concentração sérica de Metronidazol atingida não foi influenciada pela concentração da solução empregada na ferida cutânea e nem pelo tempo de duração da aplicação.

**DESCRITORES:** Cicatrização. Metronidazol. Absorção cutânea. Ratos. Administração tópica.

**KEYWORDS:** Wound healing. Metronidazole. Skin absorption. Rats. Administration topical.

## INTRODUÇÃO

O metronidazol (1-beta-hidroxi-etil-2-metil-5-nitroimidazol) é um antibiótico ativo tanto contra protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*) (1-2); quanto contra bactérias anaeróbias obrigatórias, incluindo *Bacteroides fragilis*(3), *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Eubacterium*, *Helicobacter*, *Campilobacter fetus*, *Espiroquetas* e *Gardnerella vaginalis*.

Devido à sua boa penetração tecidual pode atingir níveis terapêuticos em ossos, articulações, cérebro e líquido céfalo-raquidiano, sendo eficaz na septicemia e na endocardite bacterianas causadas por anaeróbios(3-7).

A utilização tópica do metronidazol, em gel ou solução, tem sido proposta para o controle de odor de feridas infectadas(8). Justifica-se o efeito desodorizante pela erradicação de infecção anaeróbia(9).

Além disso o metronidazol pode influenciar, favoravelmente, a cicatrização cutânea, acelerando a contração e a epitelização, diminuindo o tempo de reparação(10-13). Os resultados, de forma geral, mostram favorecimento à reepitelização precoce(12-15), apesar do tempo de granulação e de reepitelização não serem, aparentemente, influenciados pela via ou dosagens utilizadas. Entretanto, concentrações muito baixas podem não ser suficientes e concentrações muito altas podem ter efeito tóxico, ambas prejudicando a cicatrização(10-16).

Portanto, quando do seu uso tópico sobre feridas cutâneas, indaga-se sobre os potenciais efeitos após sua provável absorção, tanto sistêmicos, à distância, quanto locais, sobre a própria lesão cutânea.

O maior desafio na avaliação do efeito e da presença sistêmicos do metronidazol, quando de sua aplicação tópica, é a falta de padronização das formulações. A cinética da absorção percutânea de formulações tópicas revela não ser a concentração o fator mais importante, mas sim o veículo. Nestes termos, a aplicação tópica de creme favoreceria menos a absorção sistêmica do que a loção, e esta menos do que o gel(17). Porém, metronidazol gel à 25%, utilizado em bolsas periodontais não induziu à altas concentrações plasmáticas(18).

Este estudo teve por finalidade analisar a influência da aplicação tópica, em feridas cutâneas, de soluções de diferentes concentrações de metronidazol, sobre os níveis séricos após períodos crescentes (3, 7 e 14 dias) da aplicação(4%, 6%, 8%, 10% e 12%) .

## MÉTODO

O projeto de pesquisa foi desenvolvido após análise e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 654/2012. O estudo seguiu as orientações da Lei 11.794 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Animais do estudo- foram empregados 108 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com 110 dias de idade e peso entre 300g e 350g. Os animais foram mantidos no laboratório em período de ambientação, em gaiolas individuais, com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie e em condições ambientais controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ( $18 \pm 2^{\circ}$ ) e de umidade relativa do ar ( $55 \pm 15\%$ ).

Confecção da ferida cutânea- os animais foram anestesiados com quetamina 80mg/kg e xilazina 8mg/kg, via intramuscular, na porção posterior da coxa direita, posicionados em decúbito ventral e com os membros superiores e inferiores estendidos e fixados num suporte cirúrgico. Uma área de pele, da região dorsal, de 24 cm<sup>2</sup> (6 cm X 4 cm) foi tricotomizada e submetida à antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e protegida com campo esterilizado fenestrado. Uma área circular de pele com dois centímetros de diâmetro, demarcada pela rotação da borda cortante de "punch" metálico, foi ressecada à tesoura em espessura total expondo a fáscia muscular dorsal. Não houve necessidade de hemostasia e a área foi deixada exposta. Imediatamente, após o procedimento, os animais receberam dipirona na dose de 10mg/kg, por via intramuscular (IM), com finalidade analgésica.

Grupos de estudo- 18 grupos de seis animais cada foram, aleatoriamente, estabelecidos de acordo com a concentração da solução de metronidazol utilizada no tratamento diário das feridas. No grupo controle (GC) não se utilizou solução de metronidazol e sim solução de cloreto de sódio à 0,9%. Em todos os outros grupos foi utilizada solução aquosa de metronidazol puro, manipulada, diluída em veículo q.s.p. solução final de 40mg/kg (4%) no grupo I (GI), 60mg/kg (6%) no grupo II (GII), 80mg/kg (8%) no grupo III (GIII), 100mg/kg (10%) no grupo IV (GIV) e 120mg/kg (12%) no grupo V (GV).

Tratamento das feridas cutâneas- todas as feridas confeccionadas em todos os grupos de animais foram tratadas pelo mesmo protocolo conforme literatura prévia(19). Diariamente, as lesões eram lavadas com solução de cloreto de sódio à 0,9%, realizada a retirada de crostas, seguida da aplicação de 0,3 ml de metronidazol

solução com a respectiva diluição de acordo com o grupo. Para o tratamento diário das feridas não houve necessidade de nenhum procedimento anestésico.

Coleta sanguínea para detecção de metronidazol- em cada grupo de animais houve retirada de amostras de sangue para a determinação da presença de metronidazol na circulação sistêmica em três momentos distintos: terceiro, sétimo e décimo-quarto dias após a confecção da ferida cutânea, o que subdividiu cada grupo em três subgrupos de acordo com o dia da coleta sanguínea. As amostras foram coletadas através de punção cardíaca com retirada de três mililitros (03 ml) de sangue acondicionados em frascos para armazenamento contendo ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), colocados em caixa térmica reutilizável(20) e enviados, imediatamente, para a Central Analítica do Instituto Tecnológico do Paraná (TECPAR), onde as amostras foram centrifugadas e congeladas, para posterior análise. Após a punção cardíaca procedeu-se a eutanásia com dose letal de tiopental sódico intra-peritoneal (120mg/kg).

Detecção do metronidazol na circulação sistêmica- a análise da presença do metronidazol no sangue foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography*) por pareamento iônico com duas colunas Novapak® com 10% de carbono e fase móvel de acetonitrila à 15%. Para a calibração do cromatógrafo Agilent® modelo 1100, considerou-se a extrapolação alométrica determinando-se a curva de metabolização do metronidazol por meio de gavagem de solução com 80 mg/ml em outros animais e coleta sanguínea após 30, 60 e 120 minutos. Inicialmente, o produto aplicado nas feridas, em quantidade contendo 40 mg de metronidazol foi comparado a 10,6 mg de metronidazol puro para confirmação de identidade; ambos diluídos em 100 ml de metanol: H<sub>2</sub>O (1:1) e aplicados nas colunas (10uL) num fluxo de 0,4 ml/min, à temperatura de 30°C e comprimento de onda 272 nanômetros (nm). A concentração aproximada do metronidazol padrão foi calculada a partir das áreas obtidas ao injetar a amostra padrão de metronidazol (10 mg/L), sendo essa 104,327 unidades de absorvância por segundo (uA.s). A seguir todas as amostras de sangue coletadas e congeladas de todos os grupos de estudo (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e respectivos subgrupos (3 dias, 7 dias e 14 dias) foram preparadas e analisadas pelo cromatógrafo nas mesmas condições acima descritas. A concentração foi avaliada pelo comportamento da área através da equação: *concentração = área X fator de proporcionalidade + coeficiente*

*linear da reta*. O cálculo da área foi feito pelo próprio cromatógrafo por intermédio do software "Chem Station".

Análise Estatística- os resultados de área foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em cada dia de avaliação e para a comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo, foi considerado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

## RESULTADOS

O cromatograma obtido, com a amostra de sangue retirada 120 minutos após gavagem de metronidazol a 4%, conforme método para calibração do cromatógrafo, confirmou a sensibilidade do aparelho para a detecção do metronidazol, em amostras sanguíneas. A presença do mesmo pico cromatográfico confirmou a identidade da substância utilizada na amostra.

O comportamento físico-químico do metronidazol padrão e da substância candidata (metronidazol utilizado no estudo), no terceiro, sétimo e décimo- quarto dias, em diferentes polaridades de fase móvel (acetonitrila) confirmaram a identidade da substância candidata como metronidazol, por apresentarem idêntico tempo de retenção, nas mesmas condições de fluxo, temperatura e comprimento de onda.

Foi possível registrar, com segurança e precisão, a presença do metronidazol na circulação sistêmica de cada animal cuja ferida cutânea dorsal foi exposta apenas à aplicação tópica do produto em todas as concentrações utilizadas neste estudo (grupos 4%, 6%, 8%, 10% e 12%) e em todos os momentos de avaliação (subgrupos- 03, 07 e 14 dias). A Figura 1 mostra as curvas sobrepostas em registro cromatográfico de detecção do metronidazol no sangue coletado dos animais submetidos à aplicação tópica das soluções à 4%, 6%, 8%, 10% e 12% durante as avaliações realizadas após 03, 07 e 14 dias de aplicação tópica das respectivas soluções. No grupo controle todas as análises cromatográficas das amostras coletadas foram negativas para a detecção da substância metronidazol.

Numa análise cromatográfica quantitativa, comparando-se os valores médios de área obtidos com o uso das diferentes concentrações de solução de metronidazol, foi possível observar, caracteristicamente, a invariabilidade das dosagens obtidas na corrente sanguínea independente da concentração de metronidazol presente na

solução utilizada para as aplicações tópicas diárias. Não houve, portanto, variação quantitativa nas dosagens sanguíneas de metronidazol obtidas em todos os grupos de experimento, independente tanto da concentração de metronidazol na solução empregada para as aplicações (4% até 12%), quanto do tempo de uso das respectivas soluções (3 dias até 14 dias) (Tabela 1).

## **DISCUSSÃO**

À medida em que o tratamento das feridas se aprimora, de maneira geral, e a utilização tópica de princípios ativos com os mais variados efeitos e finalidades ganha espaço, torna-se imprescindível conhecer de maneira aprofundada quais as possíveis consequências sistêmicas e locais, benéficas ou não, da aplicação tópica e prolongada de substâncias ativas sobre diferentes áreas cruentas desprovidas de isolamento muco-cutâneo.

Por se tratar de antimicrobiano com ação conhecida contra vários micro-organismos e de valor terapêutico especialmente relevante, o emprego local de metronidazol, em feridas cutâneas, levanta a pertinente questão da segurança de seu uso tópico sob alguns aspectos. Existiria efetiva absorção da molécula pela área cruenta permeando a circulação sistêmica com níveis a ponto de interferir em microbiotas comensais à distância? Se tais níveis plasmáticos consistentes são atingidos, poder-se-ia indagar sobre qual via é, realmente, a responsável pelos potenciais benefícios sobre a ferida tratada. Além disso, existiria risco real de efeitos tóxicos pelo seu uso frequente e prolongado, ainda que, de maneira tópica?

É importante conhecer qual seria a concentração mínima capaz de facilitar a cicatrização e qual a máxima, a partir da qual ter-se-ia, talvez, ação tóxica. Porém, o fundamental é definir se há absorção do metronidazol, na área de lesão, quando o mesmo é utilizado de forma tópica.

A ampla variação das concentrações de Metronidazol utilizadas para uso tópico em nível experimental é uma dificuldade adicional. Encontram-se estudos relacionando efeitos do metronidazol sobre a cicatrização utilizando 20mg/kg(16) , 50mg/kg(14) , 108 mg/kg (10), 160mg/kg (13) e 180mg/kg(12) .

Este estudo avaliou a presença do metronidazol, no sangue, à partir de seu uso tópico exclusivo, em feridas não infectadas, procurando estabelecer um parâmetro de absorção, um comportamento padrão, de acordo com a concentração e o tempo utilizado.

Para a avaliação da absorção utilizou-se a mesma via (tópica), o mesmo volume (0,3ml) e concentrações diferentes (4%, 6%, 8%, 10% e 12%). Fizeram-se avaliações de amostras sanguíneas em dias diferentes (terceiro, sétimo e décimo-quarto). Neste momento o importante é definir se o metronidazol tópico, capaz de facilitar a cicatrização(10,12,14,16), pode ser absorvido, na área da lesão, mantendo concentração no sangue.

Na realidade, pudemos comprovar por meio deste estudo, que existiu absorção sistêmica de metronidazol a partir da sua presença na superfície da ferida que recebia o tratamento tópico diário proposto com solução de concentrações variáveis por períodos de tempo, também, variáveis. Entretanto, os níveis circulantes atingidos nos vários grupos não se correlacionaram, diretamente, de maneira significativa com a concentração utilizada ou o tempo de uso, o que favorece o emprego local de metronidazol em concentrações maiores e por tempo prolongado.

Em estudos com animais de experimentação, soluções de metronidazol na dosagem de 20mg/kg resultou em atraso da cicatrização(16). Efeito semelhante foi relatado para a dosagem de 160mg/kg(13). Dosagens acima de 20 e inferiores a 160mg/kg promoveram aumento da granulação e da epitelização(10,12-15). Talvez, dosagens até 20mg/kg não sejam suficientes para facilitar a cicatrização e dosagens acima de 160mg/kg, tenham absorção comprometedoras, culminando com o atraso cicatricial.

É possível, ainda, considerar que se a dosagem for proporcional ao estímulo cicatricial, desde que a mesma não seja em nível tóxico, maiores dosagens promoveriam melhores resultados em termos de cicatrização. Quanto maior a área da ferida, maior deverá ser a sua capacidade absorptiva.

Apesar de se ter encontrado, neste estudo, concentrações de metronidazol, no sangue, estas foram muito baixas. As concentrações encontradas no sangue no terceiro, no sétimo e no décimo-quarto dias foram, aproximadamente, 0,28 mg/l e, independente, da concentração aplicada nas feridas dos ratos, a concentração encontrada, por meio de cromatografia líquida, foi, relativamente, a mesma. Isso corrobora com o relato de altas concentrações de metronidazol (25%), em bolsas periodontais, sem induzir à altas concentrações plasmáticas(18). É importante a observação de que tanto em bolsas periodontais, com tecido íntegro, quanto em feridas abertas, como o modelo empregado neste estudo, a concentração do metronidazol, no sangue, foi baixa.

O volume de sangue total do rato equivale a 6,4% do seu peso total, sendo de 58 a 70ml/kg. Considerando-se que os ratos utilizados neste estudo tiveram seus pesos entre 300 e 350g, seus volumes totais de sangue variaram entre 17,4ml e 24,5ml. Como as concentrações encontradas, no grupo experimental metronidazol 12% variou entre 0,2323mg/ml e 0,2709mg/ml; considerando-se os pesos dos animais, tivemos a presença detectada de 0,004g a 0,007g de metronidazol, na circulação sanguínea, totalizando, em termos de peso total do rato, uma presença sanguínea correspondendo a 0,001% a 0,002% do seu peso, caracterizando um nível de presença sanguínea, extremamente baixo.

O presente estudo é consonante com outros estudos que indicam a possibilidade de se empregar altas concentrações de metronidazol, de forma tópica, sem induzir à altas concentrações plasmáticas(18).

## **CONCLUSÃO**

A aplicação tópica de metronidazol sobre a ferida cutânea experimental, de espessura total, induz absorção sistêmica de quantidades muito baixas do antibiótico e não dependentes tanto da concentração da solução aplicada, quanto do período de tempo em que foi empregada.

## REFERÊNCIAS

1. Warner JF, Perkins RL, Cordero L. Metronidazole therapy of anaerobic bacteremia, meningitis and brain abscess. *Arch Intern Med.* 1979;139(2):167–9.
2. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazol ainda é a droga de escolha para o tratamento de infecções anaeróbias. *Clin Infec Dis.* 2010;50(1):16–23.
3. Jokipii AM, Myllylä VV, Hokkanen E, Jokipii L. Penetration of the blood brain barrier by metronidazole and tinidazole. *J Antimicrob Chemoter.* 1977;3(3):239–45.
4. Lerner P. Susceptibility of pathogenic actinomycetes to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1974;5(3):302–9.
5. George RH, Bint AJ. Treatment of a brain abscess due to *Bacteroides fragilis* with metronidazole. *J Antimicrob Chemoter.* 1976;2(1):101–2.
6. Ingham HR, Rich GE, Selkon JB, Hale JH, Roxby CM, Betty MJ. Treatment with metronidazole of three patients with serious infections due to *bacteroides fragilis*. *J Antimicrob Chemoter.* 1975;1(2):235–42.
7. O' Grady LR, Ralph ED. Anaerobic meningitis and bacteremia caused by *Fusobacterium* species. *Am J Dis Child.* 1976;130(8):871–3.
8. Poletti NAA, Caliri MHL, Simão CDSR, Juliani KB, Tácito VE. Feridas malignas: uma revisão de literatura. *Rev Bras Cancerol.* 2002;48(3):411–7.
9. Kalinski C, Schnepf M, Laboy D, Hernandez L, Nusbaun J, McGrinder B, Comfort C, Alvarez OM. Effectiveness of a topical formulation containing metronidazole for wound odor and exudate control. *Wounds.* 2005;17(4):84–90.
10. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. *Indian J Exp Biol.* 1995;33(11):845–7.
11. Nicholson TJ, Armstrong DT. Topical metronidazole (10 percent) decreases posthemorrhoidectomy pain and improves healing. *Dis Colon Rectum.* 2004;47(5):711–6.
12. Rao CM, Glosch A, Raghothama C, Bairy KL. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? *Burns.* 2002;28(5):427–9.
13. Girish MB, Patil PA. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. *Indian J Pharmacol.* 2005;37(4):247–50.
14. Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Inflammatory alterations provoke the by metronidazole in wounds: an experimental study in rats. *J Vasc Bras.* 2009;8(3):232–7.
15. Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias RE, Pierin RJ, Neto MC. Evaluation of topical metronidazole in the healing wounds: an experimental study. *Rev Col Bras Cir.* 2010;37(5):358–63.
16. Borden EB, Sammartano RJ, Dembe C, Boley SJ. The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgery.* 1995;97(3):331–6.

17. Elewski BE. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. *Adv Ther.* 2007;24(2):239–46.
18. Stolze K, Stellfeld M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. *J Clin Periodontol.* 1992;19(9pt2):693–7.
19. Pereira AL, Bachion MM. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev Bras Enferm.* 2005;58(2):2008–13.
20. Melo MR, Martins AR, Barbosa IV, Romano P, Shcolnik W. Collection, Transport and storage of samples for molecular diagnosis. *Bras Patol Med Lab.* 2012;46(5):375–81.

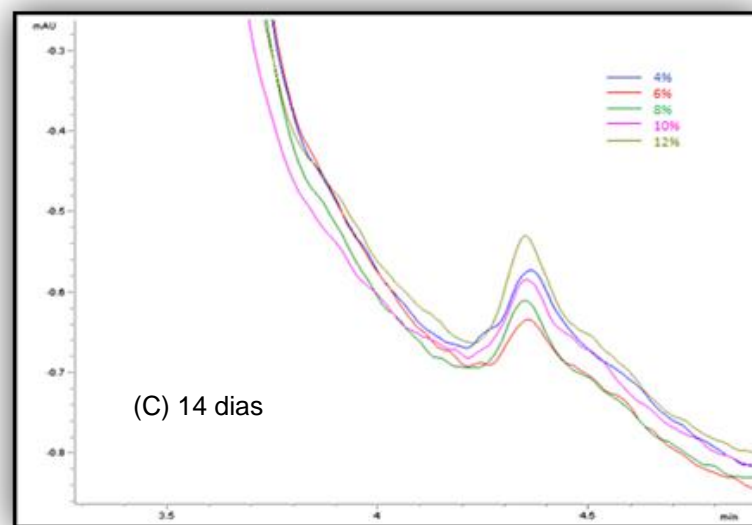
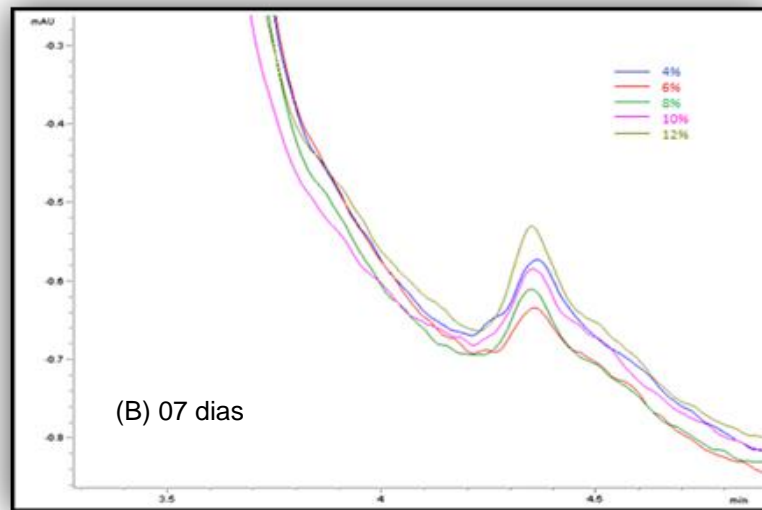
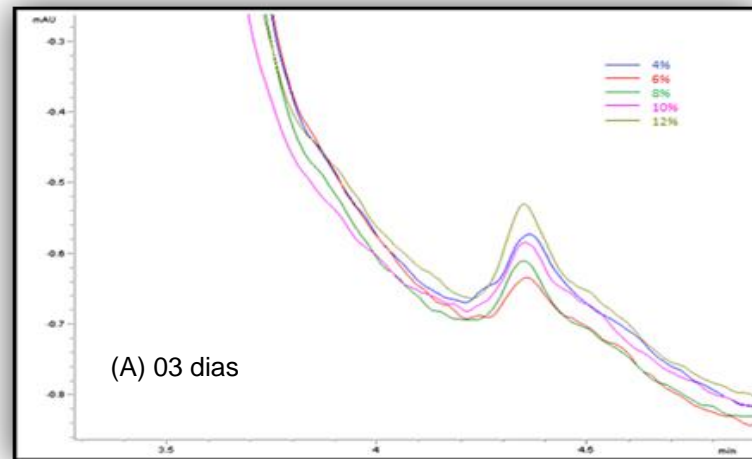


Figura 1- Traçados cromatográficos (HPLC) com as curvas individuais de detecção de metronidazol nas amostras de sangue dos animais que fizeram uso tópico de solução de metronidazol à 4%, 6%, 8%, 10% e 12% durante 3 dias (A), 7 dias (B) e 14 dias (C).

Tabela 1- Absorção: comparações estatísticas intergrupos (4% X 6% X 8% X 10% X 12%) e intragrupos (3 X 7 X 14 dias) das médias de área em uA.s obtidas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

<b>TEMPO</b>	<b>G1=4%</b>	<b>GII=6%</b>	<b>GIII=8%</b>	<b>GIV=10%</b>	<b>GV=12%</b>	
	<b>Área±dp (unid)</b>	<b>Área±dp (unid)</b>	<b>Área±dp (unid)</b>	<b>Área±dp (unid)</b>	<b>Área±dp (unid)</b>	<b>p</b>
<b>03 dias</b>	0,4818±0,1245	0,6557±0,4347	0,5038±0,1698	0,5872±0,1083	0,5715±0,3045	0,829
<b>07 dias</b>	0,6567±0,2103	0,9907±0,2983	0,5083±0,3432	0,5083±0,012	0,2810±0,0433	NA*
<b>14 dias</b>	0,6340±0,4634	0,7056±0,5252	0,5083±0,0603	0,6853±0,3324	0,6535±0,3029	0,751
<b>p</b>	0,461	0,154	0,888	0,264	0,152	

\* NA= Não Aplicado Comparação estatística inviável pela perda de amostra

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE  
METRONIDAZOL TÓPICO SOBRE A ANGIOGÊNESE DURANTE O PROCESSO  
DE CICATRIZAÇÃO<sup>1</sup>**

**CLÁUDIA PARAGUAÇU PUPO SAMPAIO <sup>I</sup>**

Jorge Eduardo Fouto Matias <sup>II</sup>

Lilian Cristine Teixeira Trindade <sup>I</sup>

Márcia Olandowski <sup>III</sup>

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões <sup>II</sup>

Conflito de interesse: Não

Recursos de financiamento: CAPES

- 
1. Trabalho realizado no Laboratório de Técnica Cirúrgica Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) como parte integrante do doutorado da aluna Cláudia P. P. Sampaio no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR)
    - I. Médica, discente nível Doutorado do programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR
    - II. Professor Associado do Departamento de Cirurgia e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR
    - III. Professora do Departamento de Estatística Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR)

## RESUMO

**OBJETIVO:** avaliar os efeitos do metronidazol nas concentrações de 4%, 6%, 8%, 10 e 12%, sobre a angiogênese, quando aplicado de maneira tópica em modelo experimental de ferida cutânea aberta. **MÉTODOS:** uma ferida cutânea aberta, com 2 cm de diâmetro e espessura total de pele foi confeccionada, sob anestesia, no dorso de 108 ratos Wistar pesando entre 300 e 350 gramas. Os animais foram alocados em grupos de 18 indivíduos de acordo com a concentração de metronidazol na solução para aplicação diária na ferida. No grupo controle (GC), utilizou-se solução de cloreto de sódio 0,9% para aplicação e nos grupos experimentais (GI, GII, GIII, GIV e GV) solução de Metronidazol a 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, respectivamente. Após 3, 7 e 14 dias de tratamento, os animais sofreram eutanásia e as feridas foram avaliadas por parâmetros histológicos e imunoistoquímicos. Resultados foram tratados, estatisticamente, dentro de cada grupo (análise temporal 3 dias X 7 dias X 14 dias) e entre os grupos que utilizaram Metronidazol tópico (4% X 6% X 8% X 10% e 12%) através de teste de Kruskal-Wallis, considerando-se significância estatística de 95% ( $p < 0,05$ ). **RESULTADOS:** a avaliação feita com anti CD34, no terceiro dia, nas feridas tratadas com metronidazol 8% demonstrou angiogênese abaixo do padrão do grupo controle ( $p = 0,022$ ). No sétimo dia de avaliação nas tratadas com metronidazol 6% e 8% houve aumento na angiogênese ( $p = 0,005$ ). Na avaliação da vimentina, no terceiro dia, foi verificada redução de tecido mesenquimal, nos grupos tratados com metronidazol 6%, 8% e 10% ( $p = 0,003$ ). **CONCLUSÃO:** o uso de metronidazol em baixas concentrações (6 e 8%) mostra aumento da angiogênese.

**DESCRITORES:** Cicatrização. Metronidazol. Administração tópica. Neovascularização. Absorção cutânea. Fisiológica. Rats.

**KEYWORDS:** Wound healing. Metronidazole. Administration topical. Skin absorption. Neovascularization. Physiologic. Rats.

## INTRODUÇÃO

O metronidazol (1-beta-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol) é um antibiótico contra bactérias anaeróbias obrigatórias, incluindo *Bacteroides fragilis*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Eubacterium*, *Helicobacter*, *Campilobacter fetus*, Espiroquetas e *Gardnerella vaginalis*. É ativo contra protozoários (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*) (1-3). É indicado para septicemia e endocardite bacterianas causadas por anaeróbios. Pode atingir níveis terapêuticos em ossos, articulações, cérebro e líquido céfalo-raquidiano (3)(4)(5)(6)(7)(8). Há relato de não haver diferenças na cicatrização pós hemorroidectomias, quando do uso profilático de ceftriaxona e metronidazol (9). É o antibiótico de escolha para o tratamento do pé diabético, embora não seja obrigatório (10), sendo utilizado para o controle do odor das feridas (11).

A literatura relata uso tópico de metronidazol promovendo efeito sobre a angiogênese (12). A utilização de clindamicina e metronidazol, em pacientes com tumores ginecológicos benignos, resultou em angiogênese precoce (13). O uso do metronidazol acelera a contração e a epitelização das feridas (14-17). A reepitelização precoce é confirmada por diversos autores (16-19). Concentrações muito baixas podem não ser suficientes e concentrações muito altas podem ter efeito tóxico, ambas prejudicando a cicatrização (14,20,21).

O gel de metronidazol reduz contagens bacterianas (22) e sua utilização tópica, como filme curativo com metronidazol e hidrogel apresentou melhora de padrão cicatricional (23). Membranas antimicrobianas e esferas com metronidazol promovem melhora da cicatrização, levando à cura precoce da ferida e reduzindo complicações pós operatórias(24-25). Entretanto na comparação do metronidazol tópico com o placebo, em feridas malignas, exista relato de não haver diferença significativa, até o ponto do *cross over* (26).

O efeito favorável à cicatrização abre possibilidades em diferentes áreas de tratamento. No entanto, os resultados positivos do uso do metronidazol, em concentrações e formas de aplicação diferentes, questiona o padrão de ação do mesmo.

Encontra-se na literatura muitos indicativos do benefício deste antibiótico no processo de cicatrização. Porém, a avaliação desses resultados torna-se difícil pela falta de padronização das concentrações e vias de aplicação utilizadas (27). Há o

indicativo do benefício, na cicatrização; porém, a linha que define a via e a concentração que promoveria melhores resultados, encontra-se indefinida.

Este estudo visa investigar o potencial efeito da aplicação tópica de soluções de diferentes concentrações de metronidazol (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) em ferida cutânea aberta sobre o processo de neovascularização local.

## **MATERIAL E MÉTODO**

O projeto de pesquisa foi desenvolvido após análise e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, tendo sido aprovado sob o protocolo nº 654/2012. O estudo seguiu as orientações da Lei Federal 11.794 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Animais do estudo- foram empregados 108 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com 110 dias de idade e peso entre 300g e 350g. Os animais foram mantidos no laboratório em período de ambientação, em gaiolas individuais, com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie e em condições ambientais controladas de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura ( $18 \pm 2^\circ$ ) e de umidade relativa do ar ( $55 \pm 15\%$ ).

Confecção da ferida cutânea- os animais foram anestesiados com quetamina 80mg/kg e xilazina 8mg/kg, via intramuscular, na porção posterior da coxa direita, posicionados em decúbito ventral e com os membros superiores e inferiores estendidos e fixados num suporte cirúrgico. Uma área de pele, da região dorsal, de 24 cm<sup>2</sup> (6 cm X 4 cm) foi tricotomizada e submetida à antissepsia com polivinilpirrolidona-iodo (PVPI) e protegida com campo esterilizado fenestrado. Uma área circular de pele com dois centímetros de diâmetro, demarcada pela rotação da borda cortante de "punch" metálico, foi ressecada à tesoura em espessura total expondo a fáscia muscular dorsal. Não houve necessidade de hemostasia e a área foi deixada exposta. Imediatamente, após o procedimento, os animais receberam dipirona na dose de 10mg/kg, por via intramuscular (IM), com finalidade analgésica.

Grupos de estudo- 18 grupos de 6 animais cada foram, aleatoriamente, estabelecidos de acordo com a concentração da solução de metronidazol utilizada no tratamento diário das feridas. No grupo controle (GC) não se utilizou solução de metronidazol e sim solução de cloreto de sódio à 0,9%. Em todos os outros grupos foi utilizada solução aquosa de metronidazol puro, manipulada, diluída em veículo q.s.p. solução final de 40mg/kg (4%) no grupo I (GI), 60mg/kg (6%) no grupo II (GII), 80mg/kg

(8%) no grupo III (GIII), 100mg/kg (10%) no grupo IV (GIV) e 120mg/kg (12%) no grupo V (GV).

Tratamento das feridas cutâneas- todas as feridas confeccionadas foram tratadas pelo mesmo protocolo conforme literatura prévia (28). Diariamente, as lesões eram lavadas com solução de cloreto de sódio à 0,9%, realizada a retirada de crostas, seguida da aplicação de 0,3 ml de metronidazol solução com a respectiva diluição de acordo com o grupo. Para o tratamento diário das feridas não houve necessidade de nenhum procedimento anestésico.

Retirada das feridas- imediatamente, após a eutanásia, as feridas cirúrgicas dos animais foram fotografadas.

Foi realizada a retirada de cada ferida cirúrgica, com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato.

Os segmentos destinados à histologia foram estendidos sobre papel cartão identificado. Na seqüência, mergulhados em recipiente com formol a 10% por 24 horas. Após este período, foram inclusos em blocos de parafina e submetidos a cortes de cinco micrômetros.

Os cortes histológicos foram corados por Hematoxilina Eosina e *Sirius Red*. Para cada corte histológico, foi realizada a leitura de três campos, para ambas as colorações, com ampliação de 400X, sobre a área da lesão, para a coloração Hematoxilina Eosina e 200X para a coloração *Sirius Red*. Os campos foram marcados nas lâminas; foram definidas áreas superficiais, sendo as áreas de transição entre o processo cicatricial e os tecidos antigos dos extremos da ferida e área superficial central da mesma.

Análise Imunoistoquímica- para a imunoistoquímica foi utilizado o método *tissue array*, sendo retiradas amostras do bloco de parafina utilizado para a confecção do hematoxilina e eosina (HE) e *Sirius Red* (SR). A área escolhida para a retirada da amostra foi a área superficial central da ferida, localizada na lâmina do HE, previamente demarcada e utilizada como espelho para a realização do *punch*. O *punch* utilizado foi o número 3. As amostras foram retiradas e depositadas em um "cassete", conforme determinação do mapa previamente elaborado. O material foi encaminhado, na seqüência, para processamento imunoistoquímico, tendo sido utilizado o anti-CD34(29) e a vimentina(30). O anti-CD34 é um marcador de endotélio, a coloração acastanhada confere resultado positivo, mas não apresenta resultados

satisfatórios para vasos maiores, sendo sua indicação para microvasculatura. A vimentina é um marcador de tecido mesenquimal, cora muitos tipos celulares, havendo necessidade de correlação com outros marcadores. Foi realizada a leitura de todos os campos para cada corte histológico. Foi utilizado, para a leitura, microscópio Olympus® BX500. A leitura foi realizada por patologista que não conhecia a que animal pertenciam.

Média das leituras para estatística- foi feita a média do número de vasos pelo número de campos, de cada ferida, para definir a densidade de vasos. Essa média foi encaminhada para análise estatística.

Análise Estatística- os resultados de área foram descritos por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em cada dia de avaliação e para a comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo, foi considerado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

## **RESULTADOS**

### **Anti CD 34**

#### **Comparação dos grupos em cada dia de avaliação**

Houve diferença do número de vasos entre os grupos no terceiro dia ( $p=0,022$ ) (Tabela 1).

Na comparação dois a dois, verificou-se que a diferença foi às custas do grupo metronidazol 8%, ficando abaixo do padrão do controle ( $p=0,004$ ) (Tabela 2).

No sétimo dia constatou-se variação no número de vasos entre os grupos ( $p=0,005$ ) (Tabela 3). Sendo encontrado o maior número de vasos nos grupos tratados com metronidazol 6% ( $p < 0,001$ ) e 8% ( $p=0,016$ ) (Tabela 4).

O número de vasos foi semelhante entre os grupos, no décimo quarto dia ( $p=0,283$ ) (Tabela 5).

Tabela 1- Avaliação anti CD34 do número de vasos/ número de campos no D3

Grupo	CD34 CVASOS/ N° CAMPOS						Valor de p*
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Controle	6	4,05	3,91	1,82	6,43	2,07	0,022
4%	6	6,88	4,61	2,07	20,00	6,77	
6%	6	2,05	1,88	0,80	3,33	0,87	
8%	6	1,03	0,67	0,27	3,00	1,04	
10%	6	3,46	3,54	0,71	6,00	2,21	
12%	6	3,78	3,33	0,83	9,00	2,77	

\*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

Tabela 2 - Comparação dos grupos dois a dois do anti CD34 do número de vasos/ número de campos no D3

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,611
Controle x 6%	0,074
Controle x 8%	0,004
Controle x 10%	0,536
Controle x 12%	0,811
4% x 6%	0,025
4% x 8%	0,001
4% x 10%	0,263
4% x 12%	0,456
6% x 8%	0,220
6% x 10%	0,231
6% x 12%	0,118
8% x 10%	0,019
8% x 12%	0,008
10% x 12%	0,702

Tabela 3 - Avaliação anti CD34 do número de vasos/ número de campos no D7

Grupo	CD34 CVASOS/ N° CAMPOS						Valor de p*
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Controle	6	0,93	0,80	0,44	1,87	0,51	0,005
4%	6	1,23	1,08	0,53	2,00	0,63	
6%	6	4,43	3,53	2,67	8,24	2,07	
8%	6	2,38	2,01	0,50	5,00	1,65	
10%	6	1,47	1,40	0,60	2,62	0,69	
12%	6	1,64	1,22	0,80	3,20	0,97	

\*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

Tabela 4 - Comparação dos grupos dois a dois do anti CD34 do número de vasos/ número de campos no D7

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,379
Controle x 6%	<0,001
Controle x 8%	0,016
Controle x 10%	0,122
Controle x 12%	0,097
4% x 6%	0,000
4% x 8%	0,107
4% x 10%	0,489
4% x 12%	0,417
6% x 8%	0,033
6% x 10%	0,003
6% x 12%	0,004
8% x 10%	0,343
8% x 12%	0,407
10% x 12%	0,903

Tabela 5 - Avaliação anti CD34 do número de vasos/ número de campos no D14

Grupo	CD34 CVASOS/ N° CAMPOS						Valor de p*
	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Controle	6	2,45	2,42	1,33	3,71	0,91	0,283
4%	6	3,39	2,97	1,00	7,75	2,56	
6%	6	3,13	2,98	1,33	6,20	1,81	
8%	6	4,04	3,65	1,80	7,50	2,10	
10%	6	1,94	1,76	1,17	3,15	0,77	
12%	6	1,97	2,08	0,63	3,53	1,20	

\*Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$

### Comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo

Houve variação no número de vasos do grupo controle, quando comparados os dias 3, 7 e 14 ( $p=0,006$ ). Houve maior número de vasos no terceiro dia, quando comparado com o sétimo dia ( $p < 0,001$ ) e maior número de vasos no décimo quarto em relação ao sétimo dia ( $p=0,004$ ) (Tabela 6).

No grupo tratado com metronidazol 4%, encontrou-se diferença na comparação dos dias 3, 7 e 14 ( $p=0,016$ ). No terceiro dia constatou-se a presença de mais vasos do que no sétimo dia ( $p=0,002$ ) e mais vasos no sétimo do que no décimo quarto dia ( $p=0,025$ ) (Tabela 6).

No grupo tratado com metronidazol 8% o número de vasos variou entre os dias 3, 7 e 14 ( $p=0,019$ ). Verificou-se mais vasos no décimo quarto dia em comparação com o terceiro (0,003) (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação do número de neovasos dos grupos nos momentos 3 X 7 X 14 dias

Grupo	Valor de p (dia 3 x 7 x 14)	Momentos comparados		
		3 x 7	3 x 14	7 x 14
CONTROLE	0,006	<0,001	0,186	0,004
4	0,016	0,002	0,246	0,025
6	0,066			
8	0,019	0,062	0,003	0,130
10	0,268			
12	0,164			

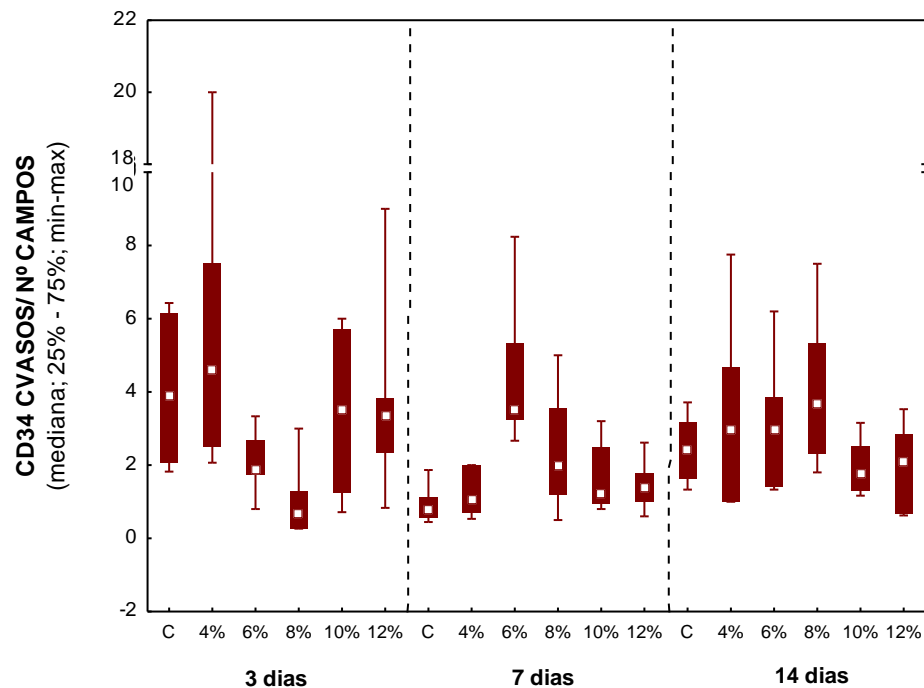


Figura 1- Comparação do número de neovasos em 3, 7 e 14 dias dentro de cada grupo

## VIMENTINA

### Comparação dos grupos em cada dia de avaliação

Houve diferença da marcação de tecido mesenquimal, entre os grupos no terceiro dia ( $p=0,003$ ) (Tabela 7).

Na comparação dois a dois, verificou-se que a diferença foi às custas dos grupos metronidazol 6% ( $p=0,001$ ), 8% ( $p=0,001$ ) e 10% ( $p=0,034$ ), ficando abaixo do padrão do controle (Tabela 8).

O número de vasos foi semelhante entre os grupos, no sétimo ( $p=0,056$ ) (Tabela 9) e décimo-quarto ( $p=0,184$ ) dias (Tabela 10).

Tabela 7 - Avaliação vimentina do número de vasos/ número de campos no D3

	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p (grupos)
Dia 3	Controle	6	1,560	1,643	0,882	2,333	0,571	0,003
	4%	6	1,386	1,292	1,000	1,875	0,366	
	6%	6	0,723	0,697	0,556	1,000	0,177	
	8%	6	0,768	0,667	0,588	1,429	0,326	
	10%	6	0,924	0,969	0,667	1,154	0,195	
	12%	6	1,653	1,292	0,667	4,000	1,198	

Tabela 8 - Comparação dos grupos dois a dois vimentina do núm. de vasos/núm. de campos no D3

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,900
Controle x 6%	0,001
Controle x 8%	0,001
Controle x 10%	0,034
Controle x 12%	0,579
4% x 6%	0,001
4% x 8%	0,001
4% x 10%	0,044
4% x 12%	0,667
6% x 8%	0,788
6% x 10%	0,106
6% x 12%	0,002
8% x 10%	0,173
8% x 12%	0,005
10% x 12%	0,106

Tabela 9 - Avaliação vimentina do número de vasos/número de campos no D7

	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p (grupos)
Dia 7	Controle	6	2,491	2,434	2,222	3,000	0,270	0,056
	4%	6	2,614	2,518	1,875	4,000	0,747	
	6%	6	2,639	2,667	2,353	2,813	0,152	
	8%	6	2,651	2,667	2,222	3,000	0,321	
	10%	6	3,100	3,000	2,667	4,000	0,464	
	12%	6	2,510	2,510	2,353	2,667	0,172	

Tabela 10 - Avaliação vimentina do número de vasos/número de campos no D14

	Grupo	n	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p (grupos)
Dia 14	Controle	6	2,203	2,176	1,579	2,857	0,508	0,184
	4%	6	2,906	2,667	2,222	4,000	0,621	
	6%	6	2,806	2,596	2,308	3,500	0,492	
	8%	6	3,045	2,833	2,188	4,000	0,698	
	10%	6	2,446	2,353	2,308	2,857	0,213	
	12%	6	2,484	2,426	1,765	3,333	0,629	

### Comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo

Houve variação no número de vasos do grupo controle, quando comparados os dias 3, 7 e 14 ( $p=0,019$ ). Houve maior número de vasos no sétimo, quando comparado com o terceiro dia ( $p=0,003$ ) e maior número de vasos no décimo-quarto dia em relação ao terceiro ( $p=0,039$ ) (Tabela 11).

No grupo tratado com metronidazol 4%, encontrou-se diferença na comparação dos dias 3, 7 e 14 ( $p=0,003$ ). No sétimo dia constatou-se a presença de mais vasos do que no terceiro ( $p=0,001$ ) e mais vasos no décimo-quarto do que no sétimo dia ( $p<0,001$ ) (Tabela 11).

O grupo tratado com metronidazol 6% apresentou diferença na comparação dos dias 3, 7 e 14 ( $p=0,003$ ). No sétimo dia constatou-se a presença de mais vasos do que no terceiro dia ( $p<0,001$ ) e mais vasos no décimo quarto do que no terceiro ( $p<0,001$ ) (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação dos grupos nos momentos 3 x 7 x 14 dias

Grupo	Valor de p			
	Dia 3 x dia 7 x dia 14	Dia 3 x dia 7	Dia 3 x dia 14	Dia 7 x dia 14
Controle	0,019	0,003	0,039	0,205
4%	0,003	0,001	<0,001	0,227
6%	0,003	<0,001	<0,001	0,859
8%	0,003	<0,001	<0,001	0,364
10%	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
12%	0,076	-	-	-

No grupo tratado com metronidazol 8% o número de vasos variou entre os dias 3, 7 e 14 ( $p=0,03$ ). Houve a presença de mais vasos no sétimo do que no terceiro dia ( $p<0,001$ ) e mais vasos no décimo-quarto do que no terceiro dia ( $p<0,001$ ) (Tabela 11).

No grupo tratado com metronidazol 10% o número de vasos variou entre os dias 3, 7 e 14 ( $p=0,001$ ). Percebeu-se a presença de mais vasos no sétimo do que no terceiro dia ( $p<0,001$ ) e mais vasos no décimo-quarto do que no terceiro dia ( $p<0,001$ ). Neste grupo houve presença de mais vasos no décimo-quarto dia, quando comparado ao sétimo dia ( $p<0,001$ ) (Tabela 11).

Não houve diferença no número de vasos, no grupo tratado com metronidazol 12%, na comparação dos momentos.

## DISCUSSÃO

Substâncias que promovam uma melhor cicatrização são muito estudadas porque representam não só qualidade de vida, mas redução de custos, de forma geral.

O uso do metronidazol que já era utilizado para o controle do odor das feridas (11), também apresentou melhora em padrões de cicatrização, confirmada por diversos autores (14, 16-19).

Quando se avalia a literatura, percebe-se que não há padronização, nas concentrações utilizadas e nas vias de administração, o que impossibilita a comparação adequada entre os resultados.

Há estudos que procuram avaliar os efeitos do metronidazol na cicatrização utilizando 20mg/kg (21), 50mg/kg (18), 108 mg/kg (14), 160mg/kg (17) e 180mg/kg (16). Com concentrações diferentes torna-se difícil estabelecer um padrão de comportamento para o metronidazol.

Com a falta de padronização dos estudos, torna-se difícil definir uma concentração mínima, abaixo da qual não haveria benefício cicatricional. Da mesma forma não há como definir um limite a partir do qual seu uso seria tóxico ou qual a concentração que estabeleceria benefício cicatricional.

Para responder essas dúvidas utilizamos, em nível experimental, o metronidazol nas concentrações de 40mg/kg (4%), 60mg/kg (6%), 80mg/kg (8%), 100mg/kg (10%) e 120mg/kg (12%); em uso tópico, para feridas de espessura total. Concentramos nossa avaliação na angiogênese. Uma vez que maior angiogênese representa maior aporte de nutrientes para a ferida, logo menor tempo de cicatrização; poderemos relacionar o metronidazol à melhora cicatricional ou precocidade cicatricional, se o mesmo aumentar o número de vasos na ferida (31).

Este estudo comprovou benefício a partir do sétimo dia. Houve aumento dos neovasos nos grupos que utilizaram metronidazol 6% e 8%, embora, neste dia tenha sido verificada maior angiogênese em todos os grupos experimentais, em números absolutos (4%, 6%, 8%, 10% e 12%). A vimentina, que pode ter marcado tecido mesenquimal, teve o mesmo comportamento. No terceiro dia 6%, 8% e 10% ficaram com valores abaixo do grupo controle. No sétimo dia houve uma tendência a valores maiores que o controle nesses grupos.

Borden (21) em estudo com metronidazol tópico, 20mg/kg (2%), referiu retardo cicatricional, atribuindo à toxicidade. Acreditamos que 2% seja uma

concentração muito baixa para alcançar um efeito pró cicatricial, uma vez que comprovamos maior angiogênese em 6% e 8%.

No terceiro dia, encontrou-se menor número de vasos, quando comparado ao controle, na utilização da concentração de 8%. Poderia ser justificado como efeito tóxico dessa concentração, pois há estudo referindo toxicidade em 2% (21). Porém, este estudo comprovou maior angiogênese, em 6% e 8%, no sétimo dia; o que descarta a teoria da toxicidade. Talvez, esse valor negativo da concentração de 8%, no terceiro dia, se deva ao nosso "n", o qual, em função do número de concentrações utilizadas no estudo (5 grupos experimentais e 1 grupo controle), precisou se enquadrar no "n" mínimo necessário.

A hipóxia ou mesmo a hipoperfusão, causada por um número menor de vasos que o padrão esperado, força as células a quebrarem a glicose, anaerobicamente, resultando na formação do ácido láctico (32).

A combinação entre a hipóxia, o *ph* baixo e a alta concentração de ácido láctico ativa o macrófago para a produção de fatores de crescimento (31) .

Baixas doses de oxigênio aumentam a secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)(33).

O macrófago produz entre os fatores de crescimento, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (34-37); o qual pode ter estimulado o tecido mesenquimal em sua diferenciação.

A exposição prolongada à hipóxia promove alterações fisiológicas em um período de horas a dias(38). A resposta à hipóxia inclui a regulação da angiogênese (39,40). Os fatores indutores da hipóxia estimulam a transcrição de genes envolvidos na angiogênese, além de processos de multiplicação celular (41).

Neuropeptídeo, em uso tópico, parece induzir a proliferação de células mesenquimais (42), talvez o metronidazol, também, possa fazê-la.

As concentrações de metronidazol 6% e 8% interferiram no terceiro dia, reduzindo o número de vasos, o que poderia ter reduzido o aporte de oxigênio, aumentando a produção de ácido láctico, estimulando os macrófagos a induzirem a angiogênese, no sétimo dia, poderia ter sido uma resposta adaptativa à hipóxia tecidual. Essa reação teria corrigido o *déficit* no número de vasos, a ponto de não haver diferença no décimo-quarto dia, confirmando um efeito de aumento de vasos, tardio para essa concentração.

O desvio padrão mostra que a angiogênese não foi homogênea e o "n" não permite delinear um perfil.

Prasad (14) utilizou 160mg/kg referindo efeito negativo para a cicatrização, o que pela avaliação de Girish e Patil (17) e pela nossa avaliação ocorreu devido a uma dosagem alta, 16%, a qual possa levar à toxicidade.

Verificou-se em nosso estudo que Metronidazol 10% e 12%, no terceiro e no décimo quarto dia, foram menores em números absolutos, indicando um *status*, que tenderia a algum grau de toxicidade, uma vez que o número de neovasos foi menor que do controle. Portanto, uma concentração de 16% seria tóxica.

Quando comparamos as diferentes concentrações, em uso tópico, delineamos o que poderia se traduzir como um perfil do efeito do metronidazol. Houve maior angiogênese, no sétimo dia, nas concentrações de 6% e 8%.

Dosagens abaixo de 6% poderiam ser insuficientes para estimular a angiogênese. Assim como dosagens a partir de 10% poderiam exercer alguma atividade tóxica, impedindo a neoangiogênese.

Sendo o metronidazol um antibiótico, as dosagens de 6% e 8%, poderiam ser suficientes para reduzir a flora bacteriana, permitindo um melhor desenvolvimento tecidual; neste caso, um melhor desenvolvimento angiogênico.

Dosagens abaixo desses valores, talvez sejam insuficientes, para reduzir a flora bacteriana a ponto de interferir na angiogênese; valores a partir de 10% poderiam promover um maior desequilíbrio da flora colonizadora, causando dificuldade para o desenvolvimento de vasos, culminando com um resultado que possa ser interpretado como toxicidade. Mesmo uma alta concentração, por si só poderia agredir o tecido, infringindo um padrão de toxicidade.

Prasad e Rao (14), Rao(16) e Girish e Patil (17) utilizaram via oral; Rao (20) e Sampaio (18) utilizaram tópico; as concentrações foram diversas: 108 mg/kg, 180 mg/kg, 160 mg/kg, 10 mg/kg e 50 mg/kg. Independente, da via e da dosagem os resultados evidenciaram epitelização precoce.

Poderíamos entender que a via oral permitiria a absorção e seus efeitos antibacterianos sobre os tecidos, enquanto o uso tópico permite a ação antibacteriana, talvez, em menor escala, porém suficiente para um efeito angiogênico.

Se o uso oral promove um efeito sobre a cicatrização, é provável que a ação esteja relacionada com a atividade antibacteriana e não relacionada à presença física no local. Embora haja relato de antibiótico tópico interferindo na neoangiogênese (12).

Talvez características estruturais ou fisiológicas da linhagem celular, sejam as responsáveis pela resposta às diferentes concentrações de metronidazol.

Fica evidente, neste estudo, que a mesma substância apresenta comportamento diferente, em sua ação, de acordo com a concentração.

Nos permite entender que se quisermos otimizar um processo cicatricial, pode-se promover um maior padrão de angiogênese, utilizando metronidazol em baixas concentrações, 6% e 8%, alcançando esse efeito no sétimo dia. Concentrações abaixo dessas nos parecem insuficientes para afetar a angiogênese e acima destas, exercem efeito tóxico.

Há necessidade de mais estudos para a confirmação desses resultados, expondo os mesmos a um número maior de animais nos grupos de estudo.

## **CONCLUSÃO**

É possível se concluir, que no presente estudo, a aplicação tópica de metronidazol, em ratos, nas feridas de espessura total, influencia, positivamente, o aumento de neovasos em concentrações de 6 e 8%.

## REFERÊNCIAS

1. Warner JF, Perkins RL, Cordero L. Metronidazole therapy of anaerobic bacteremia, meningitis and brain abscess. *Arch Intern Med.* 1979;139(2):167–9.
2. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazol ainda é a droga de escolha para o tratamento de infecções anaeróbias. *Clin Infec Dis.* 2010;50(1):16–23.
3. Jokipii AM, Myllylä VV, Hokkanen E, Jokipii L. Penetration of the blood brain barrier by metronidazole and tinidazole. *J Antimicrob Chemoter.* 1977;3(3):239–45.
4. Lerner P. Susceptibility of pathogenic actinomycetes to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemoter.* 1974;5(3):302–9.
5. George RH, Bint AJ. Treatment of a brain abscess due to *Bacteroides fragilis* with metronidazole. *J Antimicrob Chemoter.* 1976;2(1):101–2.
6. Ingham HR, Rich GE, Selkon JB, Hale JH, Roxby CM, Betty MJ. Treatment with metronidazole of three patients with serious infections due to *bacteroides fragilis*. *J Antimicrob Chemoter.* 1975;1(2):235–42.
7. O'Grady LR, Ralph ED. Anaerobic meningitis and bacteremia caused by *Fusobacterium* species. *Am J Dis Child.* 1976;130(8):871–3.
8. Oehlers SH, Cronan MR, Scott NR, Thomas MI, Okuda KS, Walton EM, Beerman RW, Crosier PS, Tobin DM. Interception of host angiogenic signalling limits mycobacterial growth. *Nature.* 2015;517(7536):612–5.
9. Khan KI, Akmal M, Waqas A, Mahmood S. Role of prophylactic antibiotics in Milligan Morgan hemorrhoidectomy - a randomized control trial. *Int J Surg.* 2014;12(8):868–71.
10. Aherrao N, Shahi SK, Dwivedi A, Kumar A, Gupta S, Sing SK. Detection of anaerobic infection in diabetic foot ulcer using PCR technique and the status of metronidazole therapy on treatment outcome. *Wounds.* 2012;24(10):283–8.
11. Gethin G, Grocott P, Probst Se, Clarke E. Current practice in the management of wound odour: an international survey. *Int J Nurs Stud.* 2014;51:865–74.
12. Gao L, Phan S, Nadora DM, Gernova M, Sun V, Preciado SM, Ballew B, Jia Z, Jia W, Wang G, Mlhn MC Jr, Nelson JS, Tan W. doi: 10.1002 / Ism.22296. Topical rapamicin sistematically supresses the initial stages of the angiogenic pathways by laser pulsed dye. *Lasers Surg Med.* 2014;46(9):679–88.
13. Michalska M, Palatyńska-Ulatowska A, Palatyński A, Mirowski M, Kaplińska K, Nawrot-Modranka J, Lazarenkow A. Influence of antibiotic therapy on the level of selected angiogenic factors in patients with benign gynecologic tumors--preliminary report. *Pharm* 2011 Aug;66(8)619-22. 2011;66(8):619–22.
14. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. *Indian J Exp Biol.* 1995;33(11):845–7.
15. Nicholson TJ, Armstrong DT. Topical metronidazole (10 percent) decreases post-hemorrhoidectomy pain and improves healing. *Dis Colon Rectum.* 2004;47(5):711-6.

16. Rao CM, Glosch A, Raghothama C BK. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? *Burns*. 2002;28(5):427–9.
17. Girish MB, Patil PA. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. *Indian J Pharmacol*. 2005;37(4):247–50.
18. Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Inflammatory alterations provoke the by metronidazole in wounds: an experimental study in rats. *J Vasc Bras*. 2009;8(3):232–7.
19. Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias RE, Pierin RJ Neto MC. Evolution of topical metronidazole in the healing wounds: an experimental study. *Rev Col Bras Cir*. 2010;37(5):358–63.
20. Rao CM, George KM, Bairy KL, Somayaji SN. An appraisal of the healing profiles of oral and external (gel) metronidazole on partial thickness burn wounds. *Indian J Pharmacol*. 2000;32(5):282–7.
21. Borden EB, Sammartano RJ, Dembe C, Boley SJ. The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgery*. 1995;97(3):331–6.
22. Miani PK, do Nascimento C, Sato S, Filho AV, da Fonseca MJ, Pedrazzi V. In vivo evaluation of a metronidazole-containing gel for the adjuvant treatment of chronic periodontitis: preliminary results. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(7):1611–8.
23. Sarheed O, Rasool BK, Abu-Gharbieh E, Aziz US. An investigation and characterization on alginate hydrogel dressing loaded with metronidazole prepared by combined inotropic gelation and freeze-thawing cycles for controlled release. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(3):601–9.
24. Li YQ, Shan ZC. Initial study on facilitating wound healing after tooth extraction by using microbial fiber membrane-flagyl. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(4):994–1003.
25. Rath G, Johal ES, Goyal AR. Development of serratiopeptidase and metronidazole based alginate microspheres for wound healing. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 2011;39(1):44–50.
26. Adderley UJ, Holt IG. Topical agents and dressings for fungating wounds. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;15(5):CD003948.
27. Elewski BE. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. *Adv Ther*. 2007;24(2):239–46.
28. Pereira AL, Bachion MM. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev Bras Enferm*. 2005;58(2):2008–13.
29. Hussein M. Evaluation of angiogenesis in normal and lichen planus skin by CD34 protein immunohistochemistry: preliminary findings. *Cell Biol Int*. 2007;31(10):1292–5.
30. Park I, Kang J, Shin J, Lee H. Trichostatin A Inhibits Epithelial Mesenchymal Transition Induced by TGF- $\beta$ 1 in Airway Epithelium. *PLoS One*. 2016;11(8).
31. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Bras J Pharm Sci*. 2005;41(1):27–51.

32. Bertuzzes RCM, Lima-Silva AE, Abad CCC, Pires FOd. Lactate metabolism: bioenergetics and muscle fatigue review. *Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.* 2009;11(2):226–34.
33. Udartseva O, Andreeva E, Buravkova L. Impact of active oxygen forms induction on expression of molecular adhesion and paracrine activity of mesenchimal stromal cells. *Aviakosm Ekol Med.* 2016;50(1):61–5.
34. Iida J, Kudo T, Shimada K, Yatsuno Y, Yamagishi S, Hasegawa S, Ike H, Sato T, Kagaya H. Investigation of the safety of topical metronidazole from a pharmacokinetic perspective. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(1):89–95.
35. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738–46.
36. Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulação da angiogênese por hipóxia: papel do sistema HIF. *Nat Med.* 2003;9(6):677–84.
37. Reinke JM, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49:35–43.
38. Hodson EJ, Nicholls LG, Turner PJ, Ronan L, Fielding JW, Douglas G et al. Regulation of ventilatory sensitivity and carotid body proliferation in hypoxia by the PHD2/HIF-2 pathway. *J Physiol.* 2016;594(5):1179–95.
39. Tian Y-M, Yeoh KK, Lee MK, Eriksson T, Kessler BM, Kramer HB et al. Differential Sensitivity of Hypoxia Inducible Factor Hydroxylation Sites to Hypoxia and Hydroxylase Inhibitors. *J Biol Chem.* 2011;286(3):13041–51.
40. Sugimoto M, Kohashi K, Itsumi M, Shiota M, Abe T, Yamada Y, Kuroiwa K, Naito S, Oda Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma with Rhabdoid Features. *Pathobiology.* 2016;83(6):277–86.
41. Pugh C. Modulation of the Hypoxic Response. *Adv Exp Med Biol.* 2016;903:259–71.
42. Kant V, Gopal A, Kumar D, Bag S, Kurade NP, Kumar A, et al. Topically applied substance P enhanced healing of open excision wound in rats. *Eur J Pharmacol.* 2013;715:345–53.
43. Cabrera E. Estudo comparativo entre as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e detecção por arranjo de diodos e biochip natriagem toxicológica forense. 2013.

### 3 CONCLUSÃO

- A aplicação tópica de metronidazol sobre a ferida cutânea experimental, não infectada, de espessura total, induz absorção sistêmica de quantidades muito baixas do antibiótico e não dependentes tanto da concentração da solução aplicada, quanto do período de tempo em que foi empregada.

- A aplicação tópica de metronidazol, em ratos, nas feridas de espessura total, influencia, positivamente, o aumento de neovasos em concentrações de 6 e 8%.

## REFERÊNCIAS

1. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares/ Parte I. An Bras Dermatol. 2003; 78(4): 393-410.
2. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares- Parte II. An Bras Dermatol. 2003; 78(5):525-42.
3. Pressure ulcer stages revised by NPUAP. National Pressure Ulcer Advisory Panel 2007. Disponível em URL: <http://www.npuap.org/pr2htm> Acessado em 19/08/16.
4. Feridas: úlcera de pressão. Disponível em URL: <http://www.eerp.usp.br/projetos/feridas/defpres.html> Acessado em 19/08/16.
- 5 Costa MP, Sturtz G, Costa FPP, Ferreira MC, Barros-Filho TEP. Epidemiologia e tratamento das úlceras de pressão: experiência de 77 casos. Acta Ortop Bras 2005;13(3):124-33.
6. Isik F, Engrav L, Rand R, Kierney P, Cardenas D. Reducing the period of immobilization following pressure sore surgery: a prospective, randomized trial. Plastic and reconstructive surgery. 1997;100(2):350-4.
- 7 Ereno D. Curativo de Borracha. Revista Pesquisa Fapesp, n.º88, junho de 2003. Disponível em URL: <http://www.fapesp.org.br/www.revistapesquisa.fapesp.br>. Acessado em 19/08/2016.
8. Moraes GFC, Oliveira SHS, Soares MJGO. Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública. 2008; 17(1):98-105.
9. Castro DLV, Santos GLCV. Controle do odor de feridas com metronidazol: revisão sistemática. Rev Esc Enferm USP. 2015; 49(5):858-63.
10. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. Indian J Exp Biol. 1995; 33(11):845-7.
11. Rao CM, Glosch A, Raghothama C, Bairy KL. Does metronidazole reduce lipid peroxidation in burn injuries to promote healing? Burns. 2002; 28(5):427-9.
12. Nicholson TJ, Armstrong D. Topical metronidazole (10 percent) decreases posthemorrhoidectomy pain and improves healing. Dis Colon Rectum. 2004; 47(5):711-6.
13. Girish MB, Patil PA. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. Indian J Pharmacol. 2005;37(4):247-50.
14. Poletti NAA, Caliri MHL, Simão CDSR, Juliani KB, Tácito VE. Feridas malignas: uma revisão de literatura. Rev Bras Cancerol. 2002;48(3):411-7.
15. Kalinski C, Schnepf M, Laboy D, Hernandez L, Nusbaun J, McGrinder B, Comfort C, Alvarez OM. Effectiveness of a topical formulation containing metronidazole for wound odor and exudate control. Wounds. 2005;17(4):84-90.
16. Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat . Washington: CRC Press; 1998. p. 103-12.

17. Pereira AL, Bachion MM. Tratamento de feridas: análise da produção científica publicada na Revista Brasileira de Enfermagem de 1970-2003. *Rev Bras Enferm.* 2005;58(2):2008–13.
18. Melo MR, Martins AR, Barbosa IV, Romano P, Shcolnik W. Collection, Transport and storage of samples for molecular diagnosis. *Bras Patol Med Lab.* 2012;46(5):375–81.
19. Hussein M. Evaluation of angiogenesis in normal and lichen planus skin by CD34 protein immunohistochemistry: preliminary findings. *Cell Biol Int.* 2007;31(10):1292–5.
20. Park I, Kang J, Shin J, Lee H. Trichostatin A Inhibits Epithelial Mesenchymal Transition Induced by TGF- $\beta$ 1 in Airway Epithelium. *PLoS One.* 2016;11(8).

## NORMAS ADOTADAS

Normativa de Vancouver: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals do International Committee of Medical Journal Editors ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

Normativa da Associação Brasileira de Normas Técnicas- NBR 14.724- informações e documentos, trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997; 126(1):36-47.

International Anatomical Nomenclature Committee. *Nomina histologica*. 2nd ed. New York: Ithaca, 1983.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature: *Nomina anatomica veterinária*. 3rd ed. New York: Ithaca, 1983.

Becker I [editor]. *Nomenclatura anatômica da língua portuguesa*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

## APÊNDICE

### MAPEAMENTO IMUNOISTOQUÍMICA

<b>Lâmina 01 - Controle e Experimento 4% Dia 3</b>					<b>Lâmina 02 - Experimento 6% e 8% Dia 3</b>				
<b>D3 C 4%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>D3 6%8%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
1	D3-C1	D3-C2	D3-C3	D3-C4	1	D3 6%1	D3 6%2	D3 6%3	D3 6%4
2	D3-C5	D3-C6			2	D3 6%5	D3 6%6		
3	D3 4%1	D3 4%2	D3 4%3	D3 4%4	3	D3 8%1	D3 8%2	D3 8%3	D3 8%4
4	D3 4%5	D3 4%6			4	D3 8%5	D3 8%6		
<b>Lâmina 03 - Experimento 10% e 12% Dia 3</b>					<b>Lâmina 04 - Controle e Experimento 4% Dia 7</b>				
<b>D3 10%12%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>D7 C 4%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
1	D3 10%1	D3 10% 2	D3 10% 3	D3 10%4	1	D7 C 1	D7 C2	D7 C3	D7 C4
2	D3 10%5	D3 10% 6			2	D7 C5	D7 C6		
3	D3 12%1	D3 12%2	D3 12%3	D3 12%4	3	D7 4%1	D7 4%2	D7 4%3	D7 4%4
4	D3 12%5	D3 12%6			4	D7 4%5	D7 4%6		
<b>Lâmina 05 - Experimento 6% e 8% Dia 7</b>					<b>Lâmina 06 - Experimento 10% e 12% Dia 7</b>				
<b>D7 6%8%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>D7 10%12%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
1	D7 6%1	D7 6%2	D7 6%3	D7 6%4	1	D7 10%1	D7 10%2	D7 10%3	D7 10%4
2	D7 6%5	D7 6%6			2	D7 10%5	D7 10%6		
3	D7 8%1	D7 8%2	D7 8%3	D7 8%4	3	D7 12%1	D7 12%2	D7 12%3	D7 12%4
4	D7 8%5	D7 8%6			4	D7 12%5	D7 12%6		
<b>Lâmina 07 - Controle e Experimento 4% Dia 14</b>					<b>Lâmina 08 - Experimento 6% e 8% Dia 14</b>				
<b>D14 C 4%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>D14 6%8%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
1	D14 C1	D14 C2	D14 C3	D14 C4	1	D14 6%1	D14 6%2	D14 6%3	D14 6%4
2	D14 C5	D14 C6			2	D14 6%5	D14 6%6		
3	D14 4%1	D14 4%2	D14 4%3	D14 4%4	3	D14 8%1	D14 8%2	D14 8%3	D14 8%4
4	D14 4%5	D14 4%6			4	D14 8%5	D14 8%6		
<b>Lâmina 09 - Experimento 10% e 12% Dia 14</b>									
<b>D14 10%12%</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>					
1	D14 10%1	D14 10%2	D14 10%3	D14 10%4					
2	D14 10%5	D14 10%6							
3	D14 12%1	D14 12%2	D14 12%3	D14 12%4					
4	D14 12%5	D14 12%6							

**ANEXOS**

ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....	54
ANEXO 2: DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA..	56
ANEXO 3: ANTICORPO DAKO CÓDIGO M0851 .....	57
ANEXO 4: CERTIFICADO DE ANÁLISE DO METRONIDAZOL.....	61

## ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Núcleo de Bioética  
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 03 de novembro de 2011.

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

**REGISTRO DO PROJETO:** 655 – 2ª versão

**TÍTULO DO PROJETO:** Avaliação da absorção dos efeitos do uso tópico do metronidazol, com diferentes concentrações, na angiogênese de feridas com cicatrização por segunda

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Maria de Lourdes Pessole Biondo Simões

**EQUIPE DE PESQUISA:**

Lilian Cristine Teixeira Trindade, Jorge Eduardo Fouto Matias, Maria de Lourdes Pessole Biondo Simões

**INSTITUIÇÃO:**

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

**CENTRO / CURSO:**

CCBS / Medicina

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Rattus norvegicus, Rodentina Mammalia	Macho	110 dias / 250g a 350g	C	144

O colegiado do CEUA em reunião no dia 03/11/2011, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.


Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

  
Profª Graciinda Maria D'Almeida e Oliveira  
Coordenadora Adjunta  
Comitê de Ética no Uso de Animais



## ANEXO 2: DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA

Os blocos parafinados, relativos ao experimento, foram cortados em micrótomo de parafina. Os cortes de 5 micra de espessura foram estendidos em lâminas previamente lavadas em solução sulfocrômica, emulsionadas com adesivo à base de poli-L-lisina 10% (Poly-L-Lysine, da marca Sigma, USA, cód. P8920), e colocadas em estufa a 60°C durante 12 horas, para melhor aderência destes às lâminas.

Depois de identificadas, as lâminas voltaram à estufa a 60°C por 20 minutos e, a seguir, foram colocadas em três banhos de xilol (5 minutos cada) e em 3 banhos de álcool em concentrações decrescentes de 95%, 70%, 50% e água corrente (cinco minutos cada), conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente. Em seguida a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% e em metanol a 70% durante 20 minutos, então as lâminas foram lavadas em água destilada.

A recuperação antigênica seguiu os procedimentos descritos nos *data-sheet* destes.

As lâminas do anticorpo ACTINA LISA (dil.: 1:250) marca marca Dako cód. M 0851, foram mergulhadas em tampão citrato de sódio a 0,01M com pH igual a 6.0 em câmara de pressão PASCAL por 2 minutos e 30 segundos, quando começava a pressão (temperatura chegava a 117°C). Depois de desligada, quando a temperatura chegava a 90°C, a câmara de pressão já estava pronta para abrir.



Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão PBS pH 7.4 com TWIN 20 marca Sigma cód. P7949 para diminuir o background. Foi realizado 3 banhos de 5 minutos cada.

Em seguida, os cortes foram ciclados por uma caneta hidrofóbica, de marca Dako cód. S2002, para evitar que escorresse a solução com o anticorpo diluído, e incubados com o anticorpo previamente diluído em uma solução de PBS-TWIN20 + BSA a 0,1% (esta solução serve para bloquear as proteínas inespecíficas). Após uma hora de reação em temperatura ambiente foi aplicado o kit da EasyPath ABC Universal, sendo que ao fim de cada etapa as lâminas foram lavadas em tampão PBS-TWIN20.

A seguir foi adicionado o cromógeno DAB, marca Dako cód. K3468, por 30 segundos a 1 minuto, em média. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas em hematoxilina de Harris, azuladas em água corrente (núcleos em azul para revelar a morfologia do tecido), desidratadas em álcool com concentrações crescentes 50%, 70%, 90% e P.A., e depois quatro banhos de xilol, sendo finalmente montadas com goma de Damar, da marca Proquímios, para fixação das lamínulas, e posterior observação ao microscópio óptico.

Wellington Xavier Gomes da Costa  
[wellington@anticorpos.com.br](mailto:wellington@anticorpos.com.br)

## ANEXO 3: ANTICORPO DAKO CÓDIGO M0851

 	
<b>Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin</b> Clone 1A4 <b>Code No./ Code/ Code-Nr. M0851</b>	
ENGLISH	
<b>Intended use</b>	For in vitro diagnostic use. Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, is intended for use in immunocytochemistry. The antibody labels smooth muscle cells, myofibroblasts and myoepithelial cells, and is a useful tool for the identification of leiomyomas, leiomyosarcomas (1, 2), and pleomorphic adenomas (3). Differential identification is aided by the results from a panel of antibodies. Interpretation must be made within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.
<b>Introduction</b>	Cytoplasmic actins, which belong to the microfilament system of cytoskeleton proteins, are some of the most conserved eukaryotic proteins being expressed in mammals and birds. The actin protein consists of six isoforms, varying in their amino acid sequence, but all having the same molecular mass of 42 kDa. The isoforms show more than 90% overall sequence homology, but only 50-60% homology in their 18 N-terminal residues. The N-terminal region appears to be a major antigenic region (4). There are different $\alpha$ isoforms specific for muscle tissues, i.e. skeletal muscle $\alpha$ , cardiac muscle $\alpha$ , and smooth muscle $\alpha$ , respectively (1). The $\beta$ - and $\gamma$ -actins may be present in muscle cells as well as most other cell types in the body, including non-muscle cells (5).
<b>Reagent provided</b>	Monoclonal mouse antibody provided in liquid form as cell culture supernatant dialysed against 0.05 mol/L Tris/HCl, pH 7.2, and containing 15 mmol/L NaN <sub>3</sub> . <u>Clone:</u> 1A4. The 1A4 clone is identical to the anti-asm-1 described in (4). <u>Isotype:</u> IgG2a, kappa. <u>Mouse IgG concentration:</u> see label on vial.
<b>Immunogen</b>	N-terminal synthetic decapeptide of $\alpha$ -smooth muscle actin coupled to keyhole limpet haemocyanin (KLH) (4).
<b>Specificity</b>	In Western blotting and SDS-PAGE immunoblotting of the $\alpha$ -smooth muscle isoform of actin, the antibody labels a band corresponding to $\alpha$ -smooth muscle actin (4). As demonstrated by Western blotting and/or immunocytochemistry, the antibody cross-reacts with the $\alpha$ -smooth muscle actin-equivalent protein in chicken, cow and rat (4).
<b>Precautions</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>For professional users.</li> <li>This product contains sodium azide (NaN<sub>3</sub>), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.</li> <li>As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.</li> <li>Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.</li> <li>Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.</li> </ol>
<b>Storage</b>	Store at 2-8 °C. Do not use after expiration date stamped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the user must verify the conditions. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact our Technical Services.
<b>Specimen preparation</b>	<u>Paraffin sections:</u> The antibody can be used for labelling paraffin-embedded tissue sections fixed in formalin. Pre-treatment of tissues with heat-induced epitope retrieval is recommended. Optimal results are obtained with 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0. Less optimal results are obtained with DakoCytomation Target Retrieval Solution, High pH, code No. S3308, or 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. However, DakoCytomation Target Retrieval Solution, code No. S1700 was found inefficient. Pre-treatment of tissues with proteinase K was found destructive of the epitope. The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunocytochemical staining procedure. <u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections (1).
<b>Staining procedure</b>	<u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, code No. M0851, may be used at a dilution range of 1:50-1:100 when applied on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of normal human colon and using 20 minutes heat-induced epitope retrieval in 10 mmol/L Tris buffer, 1 mmol/L EDTA, pH 9.0, and 30 minutes incubation at room temperature with the primary antibody. Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation method, and should be determined by each individual laboratory. The recommended negative control is DakoCytomation Mouse IgG2a, code No. X0943, diluted to the same mouse IgG concentration as the primary antibody. Unless the stability of the diluted antibody and negative control has been established in the actual staining procedure, it is recommended to dilute these reagents immediately before use, or dilute in DakoCytomation Antibody Diluent, code No. S0609. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen. <u>Visualization:</u> LSAB™+HRP kit, code No. K0679, and EnVision™+HRP kits, code Nos. K4004 and K4006, are recommended. For frozen sections and cell preparations, the DakoCytomation APAAP kit, code No. K0670, is a good alternative if endogenous peroxidase staining is a concern. Follow the procedure enclosed with the selected visualization kit. <u>Automation:</u> The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the DakoCytomation Autostainer.
<b>Performance characteristics</b>	Cells labelled by the antibody display a cytoplasmic staining pattern. <u>Normal tissues:</u> The antibody labels smooth muscle cells in blood vessels and, additionally, salivary ducts and myoepithelial cells around acini in salivary glands (3). Smooth muscle cells in 35/36 normal uterine myometria were also positively labelled (2). Further, a temporal labelling of perisinusoidal liver cells has been observed (6). In frozen tissues, the antibody labels myofibroblasts and myoepithelial cells around acini and ducts of the breast, whereas epithelia (adeno, squamous), lymphocytes, cardiac- and skeletal muscle cells, endothelial cells, fat cells, Schwann cells and fibroblast are negative (1).
(103467-002)	M0851/EFG/HEW/23.08.05 p. 1/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

	<p><b>Abnormal tissues:</b> The antibody labelled 24/26 leiomyomas, 6/7 atypical leiomyomas and 21/25 leiomyosarcomas of the uterus, as well as 13/13 extrauterine nongastrointestinal spindle leiomyosarcomas (2). Moreover, the antibody labelled a variable amount of cells in 8/8 pseudosarcomatous myofibroblastic tumours of the urinary bladder in children (7). In pleomorphic adenomas, the antibody labelled tumour epithelial cells (myoepithelial cells) in 19/20 cases (3). In frozen tissues, the antibody, in addition to the labelling of 5/5 leiomyomas and 6/7 leiomyosarcomas, also labelled 4/22 malignant fibrous histiocytomas and 1/2 rhabdomyosarcomas. 6/6 malignant schwannomas were negative, as also 13/13 other soft tissue tumours, including 1 fibrosarcoma, 6 liposarcomas, 1 angio-sarcoma, 1 capillary haemangioma, 1 Triton tumour, and 3 synovial sarcomas (1).</p>
<b>FRANÇAIS</b>	
<b>Intérêt</b>	<p>Pour diagnostic <i>in vitro</i>.</p> <p>Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, est destiné pour un usage en immunocytochimie. L'anticorps marque les cellules des muscles lisses, les myofibroblastes, les cellules myoépithéliales, et constitue un instrument pratique pour l'identification des léiomyomes, des léiomyosarcomes (1,2) et des adénomes pléomorphes (3). L'identification différentielle s'appuie sur les résultats obtenus à l'aide d'un panel d'anticorps. L'interprétation des résultats doit être entreprise par un professionnel certifié dans le contexte de l'histoire clinique du patient et des autres examens diagnostics.</p>
<b>Introduction</b>	<p>Les actines cytoplasmiques, qui appartiennent au système microfilamentaire des protéines cytosquelettiques, font partie des protéines eucaryotes les mieux conservées, exprimées chez les mammifères et les oiseaux. La protéine d'actine est constituée de six isoformes, différentes par la séquence de leurs acides aminés, mais qui ont toutes une même masse moléculaire de 42 kDa. Les isoformes présentent une homologie globale de leur séquence supérieure à 90 %, mais cette homologie n'est que de 50 à 60 % pour leurs résidus 18 N-terminaux. La région N-terminale semble être une région antigénique majeure (4). Il existe des isoformes <math>\alpha</math> spécifiques des tissus musculaires, par exemple <math>\alpha</math> actine des muscles squelettiques, <math>\alpha</math> actine du muscle cardiaque et <math>\alpha</math> actine des muscles lisses, respectivement (1). Les actines <math>\beta</math>- et <math>\gamma</math>- peuvent être présentes dans les cellules des muscles ainsi que dans d'autres types de cellules du corps humain, y compris des cellules non-musculaires (5).</p>
<b>Réactif fourni</b>	<p>L'anticorps de souris monoclonale fourni à l'état liquide comme culture cellulaire sumageante dialysée contre 0,05 mol/L Tris/HCl, pH 7,2, et contenant 15 mmol/L Na<sub>2</sub>S.</p> <p><u>Clone:</u> 1A4. Le clone 1A4 est identique à l'anti-asm-1 décrit dans (4). <u>Isotype:</u> IgG2a, kappa.</p> <p><u>Concentration IgG de Souris:</u> Voir l'étiquette sur le flacon de l'échantillon.</p>
<b>Immunogène</b>	<p>Décapétide synthétique N-terminal d'<math>\alpha</math> actine du muscle lisse couplé à de l'hémocyanine de patelle (KLH) (4).</p>
<b>Spécificité</b>	<p>Lors d'analyses par Western blot ou SDS-PAGE de l'isoforme <math>\alpha</math>-muscle lisse de l'actine, l'anticorps marque une bande correspondant à l'actine <math>\alpha</math>-muscle lisse (4).</p> <p>Comme démontré par les transferts de type Western et/ou en immunocytochimie, l'anticorps montre une réaction croisée à la protéine équivalente à l'<math>\alpha</math>-actine du muscle lisse chez le poulet, la vache et le rat (4).</p>
<b>Précautions d'emploi</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Pour utilisateurs professionnels.</li> <li>Ce produit contient de l'azide de sodium (Na<sub>3</sub>N), un produit chimique hautement toxique à l'état pur. Aux concentrations du produit, bien qu'il ne soit pas classé comme étant nuisible, l'azide de sodium peut réagir avec la tuyauterie en plomb et en cuivre pour former des dépôts hautement explosifs d'azides métallisés. Lors de l'élimination du produit, laisser couler l'eau à flot pour éviter toute accumulation d'azides métallisés dans la tuyauterie.</li> <li>Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose.</li> <li>Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.</li> <li>Les solutions inutilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.</li> </ol>
<b>Stockage</b>	<p>Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption mentionnée sur le flacon. Dans le cas où les réactifs sont conservés sous d'autres conditions que celles spécifiées, les conditions doivent être vérifiées par l'utilisateur. Il n'existe pas de signe particulier pour indiquer l'instabilité de ce produit. Par conséquent, les contrôles doivent être opérés simultanément avec les échantillons du patient. En cas de résultats imprévus qui ne peuvent pas être expliqués par des changements de procédures de laboratoire et qu'un problème avec le produit est suspecté, contactez nos Services Techniques.</p>
<b>Préparation de l'échantillon</b>	<p><u>Coupes en paraffine:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol. Le prétraitement des tissus par desquantage des épitopes par la chaleur est requis. Des résultats optimaux sont obtenus avec du tampon Tris 10 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, à 9,0 de pH. Des résultats plus faibles sont obtenus dans DakoCytomation Target Retrieval, pH élevé, code S3308, 10 mmol/l tampon citrate, à 6,0 de pH. Toutefois, DakoCytomation Target Retrieval Solution, code S1700 s'est avérée inefficace. Le prétraitement des tissus à la Protéinase K a entraîné la destruction de l'épitope. Les coupes de tissus ne doivent pas sécher pendant le traitement ou la procédure d'immunomarquage immunocytochimique suivante.</p> <p><u>Coupes congelées et préparations cellulaires:</u> L'anticorps peut être utilisé pour marquer les coupes congelées fixées à l'acétone. (1).</p>
<b>Procédure d'immunomarquage</b>	<p><u>Dilution:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, code M0851 peut être dilué entre 1:50 et 1:100 pour application sur des coupes de tissus incluses en paraffine, fixées au formol du col humain pendant 20 de démasquage de l'épitope dans 10 mmol/L tampon Tris, 1 mmol/L EDTA, pH 9,0, and 30 minutes d'incubation à température ambiante avec l'anticorps primaire. Les conditions optimales peuvent varier selon l'échantillon et la méthode de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire particulier. Le contrôle négatif requis est DakoCytomation Mouse IgG2a, code X0943, dilué à la même concentration d'IgG de souris que l'anticorps primaire. A moins que la stabilité de l'anticorps dilué et du contrôle négatif ait été établie dans la procédure d'immunomarquage réelle, il est recommandé de diluer ces réactifs juste avant leur emploi; ou de les diluer dans DakoCytomation Antibody Diluent, code S0809. Les contrôles positifs et négatifs doivent être opérés simultanément avec l'échantillon du patient.</p> <p><u>Révélation:</u> LSAB™+HRP kit, code K0679, et EnVision™+HRP kits, codes K4004 et K4006, sont requis. Pour les coupes en congélation et préparations cellulaires, DakoCytomation APAAP kit, code KD670, est une alternative valable si le marquage endogène peroxydasique est à craindre. Suivre la procédure incluse avec le kit de révélation choisi.</p> <p><u>Automatisation:</u> L'anticorps est bien adapté au marquage immunocytochimique sur des plates-formes automatisées comme le DakoCytomation Autostainer.</p>
<b>Performances</b>	<p>Les cellules marquées par l'anticorps révèlent un modèle de marquage cytoplasmique.</p> <p><u>Tissus normaux:</u> L'anticorps marque les cellules des muscles lisses des vaisseaux sanguins, ainsi que les cellules des canaux salivaires et les cellules myoépithéliales autour des acini des glandes salivaires (3). Les cellules des muscles lisses de 35 myomètres utérins normaux sur 36 ont également été marquées positivement (2). De plus, un marquage temporaire des cellules hépatiques périsinusoidales a été observé (6). Sur des tissus congelés, l'anticorps marque les myofibroblastes et les cellules myoépithéliales situés autour des canaux et des acini mammaires, alors que les épithéliums (adénoépithélium, épithélium squameux), les lymphocytes, les cellules des muscles squelettiques et cardiaque, les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules de Schwann et les fibroblastes sont négatifs (1).</p>
(103467-002)	M0851/EFG/HEW/23.08.05 p. 2/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	

<p><u>Tissus anormaux:</u> L'anticorps a marqué 24 léiomyomes sur 26, 6 léiomyomes atypiques sur 7 et 21 léiomyosarcomes de l'utérus sur 25, ainsi que 13 léiomyosarcomes non gastro-intestinaux, extra-utérins, d'aspect fusiforme, sur 13 (2). En outre, l'anticorps a marqué un nombre variable de cellules dans 8 cas de tumeurs myofibroblastiques pseudosarcomateuses de la vessie sur 8, chez l'enfant (7). Dans les cas d'adénomes pléomorphes, l'anticorps a marqué les cellules épithéliales tumorales (cellules myoépithéliales) dans 19 cas sur 20 (3). Sur les tissus congelés, l'anticorps, outre le marquage de 5 léiomyomes sur 5 et de 6 léiomyosarcomes sur 7, a également marqué 4 histiocytomes fibreux malins sur 22 et 1 rhabdomyosarcome sur 2, 6 schwannomes malins sur 6 ont été négatifs, ainsi que 13 autres tumeurs des tissus mous sur 13, dont 1 fibrosarcome, 6 liposarcomes, 1 angiosarcome, 1 hémangiome capillaire, 1 tumeur de type triton et 3 sarcomes synoviaux (1).</p>	
<b>DEUTSCH</b>	
<b>Zweckbestimmung</b>	Zur Verwendung für In-vitro-Untersuchungen. Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Clone 1A4, ist für den immunzytochemischen Gebrauch bestimmt. Der Antikörper markiert Zellen der glatten Muskulatur, Myofibroblasten und Myoepithelzellen und hat sich bei der Identifizierung von Leiomyomen, Leiomyosarkomen (1, 2) und polymorphen Adenomen als nützlich erwiesen (3). Die differentielle Identifizierung wird durch die mit einem Antikörper-Panel erhaltenen Resultate unterstützt. Die Befunde müssen unter Berücksichtigung der klinischen Anamnese des Patienten und im Kontext weiterer diagnostischer Verfahren von einem zertifizierten Facharzt interpretiert werden.
<b>Einleitung</b>	Zytoplasmatische Actine gehören zum Mikrofilamentsystem der Zellskelettproteine und zählen zu den im höchsten Umfang erhaltenen, bei Säugern und Vögeln exprimierten eukaryotischen Proteinen. Das Actinprotein besteht aus sechs Isoformen, die sich hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden, aber alle die gleiche Molekülmasse von 42 kDa aufweisen. Die Isoformen zeigen insgesamt mehr als 90%ige Sequenzhomologie, allerdings nur 50-60 % Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer 18 N-terminalen Reste. Bei der N-terminalen Region scheint es sich um einen majoren antigenen Bereich zu handeln (4). Es bestehen unterschiedliche $\alpha$ -Isoformen, die für Muskelgewebe spezifisch sind, d. h. Skelettmuskel- $\alpha$ , Herzmuskel- $\alpha$ beziehungsweise Glattmuskel- $\alpha$ (1). Die $\beta$ - und $\gamma$ -Actine können in Muskelzellen ebenso wie in den meisten weiteren Zelltypen des Körper vorliegen, einschließlich von nicht zum Muskelgewebe gehörenden Zellen (5).
<b>Geliefertes Reagenz</b>	Der monoklonale Mausantikörper wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/l NaN <sub>3</sub> . <u>Klon:</u> 1A4. Der 1A4-Klon ist mit dem in Literaturangabe (4) beschriebenen anti-asm-1 identisch. <u>Isotyp:</u> IgG2a, Kappa. <u>Maus-IgG-Konzentration:</u> Siehe Produktetikett.
<b>Immunogen</b>	An KLH (keyhole limpet haemocyanin) gekoppeltes N-terminales synthetisches Decapeptid des $\alpha$ -Glattmuskel-Actin (4).
<b>Spezifität</b>	Beim Western-Blott und SDS-PAGE-Immun-Blotting der $\alpha$ -Glattmuskel-Isoform des Actin markiert der Antikörper eine Bande, die dem $\alpha$ -Glattmuskel-Actin entspricht (4). Anhand von Western-Blott und/oder immunzytochemisch wurde der Nachweis erbracht, dass der Antikörper bei Huhn, Kuh und Ratte eine Kreuzreaktion mit dem Actin-äquivalenten $\alpha$ -Glattmuskel-Protein eingeht (4).
<b>Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>	1. Für geschultes Fachpersonal. 2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN <sub>3</sub> ), eine in reiner Form hochtoxische chemische Verbindung. Bei den in diesem Produkt verwendeten Konzentrationen kann Natrium-Azid, obwohl nicht als gefährlich klassifiziert, mit in Wasserleitungen vorhandenem Blei oder Kupfer reagieren und zur Bildung von hochexplosiven Metall-Azid-Anreicherungen führen. Nach der Entsorgung muss mit reichlich Wasser nachgespült werden, um Metall-Azid-Anreicherung zu vermeiden. 3. Wie bei allen aus biologischen Materialien gewonnenen Produkten müssen die ordnungsgemäßen Handhabungsverfahren eingehalten werden. 4. Entsprechende Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden. 5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen
<b>Lagerung</b>	Bei 2-8 °C lagern. Nicht nach dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum verwenden. Sollten die Reagenzien unter anderen Bedingungen als den beschriebenen aufbewahrt worden sein, so müssen diese vom Anwender verifiziert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anhaltspunkte für die mögliche Instabilität dieses Produktes. Es sollten daher die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. Wenn unerwartete Verfärbung beobachtet wird, welche durch Änderungen in den Labormethoden nicht erklärt werden kann und falls Verdacht auf ein Problem mit dem Antikörper besteht, ist bitte Kontakt mit unserem technischen Kundendienst aufzunehmen.
<b>Probenvorbereitung</b>	<u>Paraffinschnitte:</u> Der Antikörper kann für die Markierung von paraffineingebetteten, formalinfixierten histologischen Schnitten genutzt werden. Es wird eine Vorbehandlung der Gewebe mit hitzeinduzierter Epitopdemaskierung empfohlen. Optimale Ergebnisse werden mit 10 mmol/l Tris-Puffer, 1 mmol/l EDTA, pH 9,0, erhalten. Die Nutzung von DakoCytomation Target Retrieval Solution, pH 9,9, Code-Nr. S3308 oder 10 mmol/l Citratpuffer, pH 6,0, erbringt weniger optimale Resultate. DakoCytomation Target Retrieval Solution, Code-Nr. S1700, pH 6,1, hat sich als ineffizient erwiesen. Dagegen wurde festgestellt, dass die Gewebepreparation mit Proteinase K zur Zerstörung des Epitops führt. Während der Gewebepreparation oder während der sich anschließenden immunzytochemischen Färbeprozedur dürfen die Gewebeschnitte nicht austrocknen. <u>Gefrierschnitte und zytologische Präparate:</u> Der Antikörper kann für die Markierung von azetonfixierten Gefrierschnitten verwendet werden (1).
<b>Färbeprozedur</b>	<u>Verdünnung:</u> Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Code-Nr. M0851, kann bei einem Verdünnungsbereich von 1:50-1:100 eingesetzt werden, wenn es für Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Schnitte des gesunden humanen Kolon genutzt wird und wenn 20 Minuten lang die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung in 10 mmol/l Tris-Puffer, 1 mmol/l EDTA, pH 9,0, gefolgt von 30 Minuten Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur, durchgeführt wird. Die optimalen Bedingungen schwanken je nach Probe und Methode der Probenvorbereitung und sollten von jedem einzelnen Labor bestimmt werden. Die empfohlene Negativkontrolle ist DakoCytomation Mouse IgG2a, Code-Nr. X0943, das auf dieselbe murine IgG-Konzentration wie der primäre Antikörper verdünnt wurde. Solange mit dem eigentlichen Testsystem die Stabilität des verdünnten Antikörpers und der Negativkontrolle nicht sichergestellt ist, wird empfohlen, diese Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch zu verdünnen oder die Verdünnung mit DakoCytomation Antibody Diluent, Code-Nr. S0809, vorzunehmen. Es sollten die Positiv- und Negativkontrollen gleichzeitig mit den Patientenproben mitgeführt werden. <u>Visualisierung:</u> Folgende Kits werden empfohlen: DAKO LSAB™ +/HRP-Kit, Code-Nr. K0679 und DAKO EnVision™ +/HRP-Kits, Code-Nr. K4004 und K4006. Falls bei Gefrierschnitten und Zellpräparaten Probleme mit endogener Peroxidasefärbung auftreten, bietet der DakoCytomation APAAP Kit, Code-Nr. K0670, eine gute Alternative. Es ist dem Verfahren zu folgen, das in den Anleitungen des genutzten Kits für die Visualisierung erläutert wird. <u>Automatisierung:</u> Der Antikörper ist gut für das immunzytochemische Färben unter Nutzung automatisierter Plattformen wie beispielsweise des „Autostainer“ von DakoCytomation geeignet.
<b>Leistungseigenschaften</b>	Durch den Antikörper markierte Zellen zeigen ein zytoplasmatisches Färbemuster. <u>Normalgewebe:</u> Der Antikörper markiert Zellen der glatten Muskulatur von Blutgefäßen sowie zusätzlich Zellen der Speicheldrüsen und Myoepithelzellen um die Azini in den Speicheldrüsen (3). Außerdem wurden Zellen der glatten Muskulatur von 35/36 befundlosen uterinen
(103467-002)	M0851/EFG/HEW/23.08.05 p. 3/4
DakoCytomation Denmark A/S · Produktionsvej 42 · DK-2600 Glostrup · Denmark · Tel. +45 44 85 95 00 · Fax +45 44 85 95 95 · CVR No. 33 21 13 17	








Myometria markiert (2). Zusätzlich wurde eine zeitweilige Markierung perisinusoidaler Leberzellen beobachtet (6). Bei tiefgekühlten Schnitten markiert der Antikörper Myofibroblaste und Myoepithelialzellen um Gänge und Azini der Mamma, wohingegen Epithelien (adenomatös, squamös), Lymphozyten, Zellen von Herz- und Skelettmuskel, Endothelzellen, Fettzellen, Schwann-Zellen wie auch Fibroblaste negativ sind (1).

**Anomales Gewebe:** Der Antikörper markierte 24/26 Leiomyome, 6/7 atypische Leiomyome und 21/25 Leiomyosarkome des Uterus ebenso wie 13/13 extrauterine, nicht gastrointestinale spindelzellige Leiomyosarkome (2). Zudem markierte der Antikörper bei Kindern eine schwankende Anzahl von Zellen bei 8/8 pseudosarkomatösen myofibroblastischen Tumoren der Harnblase (7). Der Antikörper markierte bei polymorphen Adenomen in 19/20 Fällen Epithelzellen des Tumors (Myoepithelzellen) (3). Zusätzlich zur Markierung von 5/5 Leiomyomen und 6/7 Leiomyosarkomen markierte der Antikörper bei Gefrierschnitten auch 4/22 maligne fibröse Histozytome und 1/2 Rhabdomyosarkome. 6/6 maligne Schwannome (Neurine) testeten negativ, ebenso wie 13/13 weitere Weichteilneoplasien, einschließlich von: 1 Fibrosarkom, 6 Liposarkome, 1 Angiosarkom, 1 kapilläres Hämangiom, 1 Triton-Tumor und 3 Synovialsarkome (1).

#### References/ Références/ Literatur

1. Roholl PJM, Elbers HRJ, Prinsen I, Claessens JAJ, van Unnik JAM. Distribution of actin isoforms in sarcomas: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1990;21:1269-74.
2. Rizeq MN, van de Rijn M, Hendrickson MR, Rouse RV. A comparative immunohistochemical study of uterine smooth muscle neoplasms with emphasis on the epithelioid variant. *Hum Pathol* 1994;25:671-7.
3. Brennan PA, Umar T, Zaki GA, Langdon JD, Spedding A, Buckley J, et al. Are myoepithelial cells responsible for the widespread expression of inducible nitric oxide synthase in pleomorphic adenoma? An immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2000;29:279-83.
4. Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, Benzouana G, Gillesen D, Gabbian G. A monoclonal antibody against  $\alpha$ -smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 1986;103:2787-96.
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. The cytoskeleton. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, editors. *Molecular biology of the cell*. 2nd ed. New York and London: Garland Publishing; 1989. p. 613-629.
6. Schmitt-Gräff A, Krüger S, Bochar F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased livers. *Am J Pathol* 1991;138:1233-42.
7. Hojo H, Newton WA, Hamoudi AB, Qualman SJ, Wakasa H, Suzuki S, et al. Pseudosarcomatous myofibroblastic tumor of the urinary bladder in children: a study of 11 cases with review of the literature. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1224-36.

#### Explanation of symbols/ Légende des symboles/ Erläuterung der Symbole

	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer		Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Manufacturer Fabricant Hersteller
	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum		Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung		
	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis		



S192 Sampaio, Cláudia Paraguaçu Pupo

Cicatrização cutânea por segunda intenção: influência da aplicação tópica de diferentes concentrações de metronidazol sobre sua absorção e a neoformação vascular locais / Cláudia Paraguaçu Pupo Sampaio -- Curitiba, 2016.

61 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Lourdes Pessole  
Biondo-Simões

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Cicatrização. 2. Metronidazol. 3. Absorção cutânea. 4. Colágeno. 5. Neovascularização fisiológica. I. Matias, Jorge Eduardo Fouto. II. Biondo-Simões, Maria de Lourdes Pessole. III. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WO185