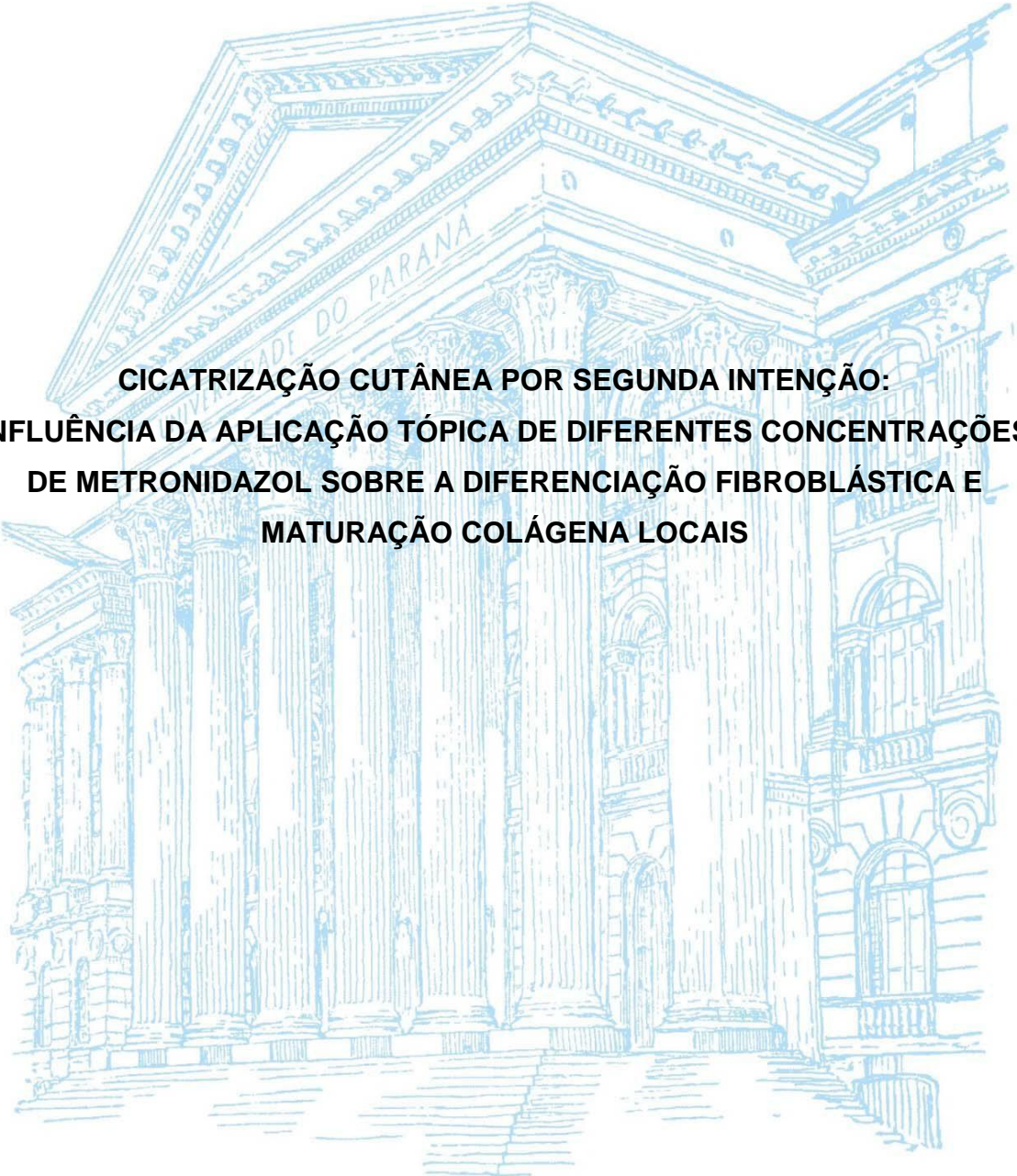


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LILIAN CRISTINE TEIXEIRA TRINDADE



**CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO:
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE METRONIDAZOL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO FIBROBLÁSTICA E
MATURAÇÃO COLÁGENA LOCAIS**

CURITIBA

2016

LILIAN CRISTINE TEIXEIRA TRINDADE

**CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO:
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES
DE METRONIDAZOL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO FIBROBLÁSTICA E
MATURAÇÃO COLÁGENA LOCAIS**

Tese apresentada ao Curso 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.^a Dr.^a Maria de Lourdes Pessole
Biondo-Simões

CURITIBA

2016

T833 Trindade, Lilian Cristine Teixeira.

Cicatrização cutânea por segunda intenção: influência da aplicação tópica de diferentes concentrações de metronidazol sobre a diferenciação fibroblástica e maturação colágena locais / Lilian Cristine Teixeira Trindade. -- Curitiba, 2016.

73 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a 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. Fibroblastos. 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

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

Aluna: **LILIAN CRISTINE TEIXEIRA TRINDADE**

Título da Tese: **"CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA POR SEGUNDA INTENÇÃO:
INFLUÊNCIA DA APLICAÇÃO TÓPICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
METRONIDAZOL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO FIBROBLÁSTICA E MATURAÇÃO
COLÁGENA LOCAIS"**

CONCEITOS EMITIDOS

MEMBROS	CONCEITO	EQUIVALÊNCIA
Jurandir Marcondes Ribas Filho	A	9,7
Christiano Coletto Druszczyk	A	9,7
Antônio Sergio Brenner	A	9,7
Jorge Eduardo Fouto Matias	A	9,7
Flávio Daniel Saavedra Tomasich	A	9,7

CONCEITO FINAL DE AVALIAÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Conceito Final: _____

Equivalência: _____

Curitiba, 16 de dezembro de 2016.

MEMBROS	ASSINATURA
Jurandir Marcondes Ribas Filho	
Christiano Coletto Druszczyk	
Antônio Sergio Brenner	
Jorge Eduardo Fouto Matias	
Flávio Daniel Saavedra Tomasich	

RESUMO

Avaliar os efeitos benéficos da administração tópica do metronidazol no depósito de colágeno, na diferenciação de fibroblastos e na contração da ferida durante a cicatrização experimental por segunda intenção em 108 ratos machos Wistar, com peso de 300 a 350g, que foram submetidos a uma ferida circular, com dois centímetros de diâmetro, da espessura total de pele do dorso. Os animais foram divididos em cinco grupos (18 animais por grupo) de acordo com a concentração da solução do metronidazol utilizada (4%, 6%, 8%, 10% e 12%) durante o curativo realizado diariamente durante todo o período de experimento subdividido em três tempos de análise (após 3, 7 e 14 dias de observação). A contração da ferida foi avaliada por planimetria digital, a coloração Sirius Red foi utilizada para quantificar os tipos de colágeno I e III, os miofibroblastos e protomiofibroblastos foram identificados usando técnicas de imunohistoquímica CD34 e α -SMA. A análise estatística, incluindo comparações de intergrupos e intragrupos, foi calculada por teste não paramétrico de Kruskal-wallis usando o software SSPS e valor de p de 0,05, significância estatística de 95%. A contração da ferida não apresentou diferença entre os grupos e o controle. Os grupos de metronidazol apresentaram melhores depósitos de colágeno tipo I e III após 3 ($p=0,013$ e $p=0,003$) e 7 dias ($p=0,008$ e $p=0,001$) independentemente da concentração da solução. Os protomiofibroblastos foram significativamente mais numerosos aos 7 dias ($p=0,022$) nos grupos metronidazol de 4%, 6% e 8%. Após 14 dias, nos mesmos grupos, os miofibroblastos predominaram significativamente ($p=0,01$). A administração tópica de solução de metronidazol em feridas de pele com cicatrização por segunda intenção foi capaz de melhorar deposição local de colágeno e a diferenciação de fibroblastos. Apesar destes efeitos benéficos, a fase de contração da cicatrização de feridas permaneceu inalterada, sem redução significativa da contração avaliada pela planimetria digital. Essas descobertas podem ser potencialmente utilizadas em favor do processo de cicatrização de feridas.

Descritores: Cicatrização. Metronidazol. Administração Tópica. Absorção Cutânea. Colágeno. Fibroblastos. Miofibroblastos. Ratos.

ABSTRACT

In order to address beneficial effects of metronidazole topical administration on collagen deposit, fibroblasts differentiation and wound contraction 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). Wound contraction was assessed by digital planimetry, Sirius Red staining was used to quantified collagen types I and III, and myofibroblasts/protomyofibroblasts were identified using CD34 and α -SMA 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%. Wound contraction wasn't different between groups and control. Metronidazole groups showed better types I and III collagen deposits after 3 ($p=0,013$ and $p=0,003$) and 7 days ($p=0,008$ and $p=0,001$) regardless the solution concentration. Protomyofibroblasts were significantly more numerous at 7 days ($p=0,022$) in metronidazole groups of 4% 6% and 8%. After 14 days, at the same groups, myofibroblasts predominated significantly ($p=0,01$). Topical administration of metronidazole solution in experimental second-intention skin wounds was able to improve local collagen deposit and fibroblasts differentiation. Despite these beneficial effects, contraction phase of wound healing remained unchanged, without significant reduction of contraction phase as assessed by digital planimetry. These findings can be potentially used in favor of the wound healing process.

Keywords: Wound Healing. Metronidazole. Administration, Topical. Skin Absorption. Collagen. Fibroblasts. Myofibroblasts. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Demonstração das referências utilizadas para delimitação da área de tricotomia e localização da ferida operatória 15
- FIGURA 2 - Foto do rato 1 do grupo experimento 12% em posição de decúbito ventral, após realização da ferida operatória no momento zero 15
- FIGURA 3 - Imagem obtida do rato 1 do grupo experimento 12% no momento zero e importada para o programa *VeV MD-measurement Documentation*[®] 18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- DIVISÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS E DIAS DE AVALIAÇÃO	14
---	----

LISTA DE SIGLAS

EGF	- Fator de crescimento epidérmico
b-FGF	- Fator de crescimento fibroblástico básico
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- β	- Fator de crescimento transformante beta
TGF- β 1	- Fator de crescimento transformante beta 1
TNF- α	- Fator de necrose tumoral – alpha
VIP	- Peptídeo intestinal vasoativo
α -SMA	- Alpha smooth muscle actin
CD34	- Cluster of Differentiation 34
HE	- Hematoxilina e Eosina
PVPI	- Iodopovidona
GC	- Grupo Controle
GE	- Grupo Experimento
NaCl0,9%	- Cloreto de sódio ou soro fisiológico
CEUA	- Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
SUS	- Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 OBJETIVO	12
2. MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1 AMOSTRA	13
2.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	14
2.3 APLICAÇÃO DO CURATIVO COM METRONIDAZOL.....	16
2.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	17
2.5 PLANIMETRIA DIGITAL	17
2.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	19
2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	21
4. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
NORMAS ADOTADAS	60
APÊNDICES	61
ANEXOS.....	65

1. INTRODUÇÃO

As sucessivas descobertas dos elementos constituintes da derme e subcutâneo, aumentaram o interesse na fase de fibroplasia, por ser nesta fase que ocorrem a produção e reestruturação da matriz extracelular, deposição e início da reorganização do colágeno tipo I, que representa a principal proteína encontrada na fáscia ¹.

Nas últimas quatro décadas, após a descrição do miofibroblasto em 1971 por Gabbiani² intensificaram-se os trabalhos visando a funcionalidade desta célula com interesse em reabilitação funcional ou cosmético ^{3,4,5}, e recentemente, tornou-se célula alvo após o seu sugestivo envolvimento em neoplasias de origem estromal^{6,7}.

Todavia, faz-se necessário compreender a reparação tecidual normal e os fatores atuantes em suas fases para promover uma cicatrização mais efetiva ou bloquear uma de suas etapas em casos de doenças fibróticas.

No processo de reparação tecidual, a capacidade da pele e demais tecidos orgânicos de corrigir os danos sofridos após um trauma, acidental ou cirúrgico, pode ocorrer pela regeneração ou cicatrização. Na primeira situação com a recomposição da atividade funcional do órgão lesado. Na cicatrização com restabelecimento da homeostasia do tecido com perda parcial de sua atividade funcional pela formação de cicatriz fibrótica⁸.

Os fatores relacionados a homeostase tecidual são ativados imediatamente após a lesão, evoluindo por fases que podem ocorrer em concomitância ou sequencial, como coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação⁹.

Na fase de coagulação após o trauma, o tamponamento dos vasos que foram rompidos ocorre por vasoconstrição, como resposta à descarga adrenérgica e às citocinas oriundas da degranulação dos mastócitos. O trombo recém-formado pela agregação plaquetária, é infiltrado por fibrina formando uma rede que captura os eritrócitos, tornando-se a matriz provisória para a migração das células responsáveis pelas fases seguintes¹⁰.

Na inflamação as primeiras células a migrarem para a ferida são os neutrófilos provenientes da circulação local, predominante nos primeiros dias, e responsável pela eliminação de bactérias por fagocitose. Na sequência, surgem os macrófagos, do

segundo ao quinto dia da lesão, que também auxiliam na fagocitose ao apresentarem os peptídeos dos microorganismos fagocitados, pelo complexo de histocompatibilidade, às células T auxiliares¹¹.

A fibronectina sintetizada por células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, promove a formação da matriz extracelular e a quimiotaxia local, recobre as fibras de fibrina e favorece a migração celular por facilitar o deslocamento das células epiteliais e endoteliais, e em seguida, os fibroblastos. O fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante beta (TGF- β) estimulam a síntese de fibronectina^{12,13}.

Nas feridas não contaminadas a inflamação desaparece entre 3 a 5 dias depois do trauma. Os eosinófilos auxiliam na resolução do processo, fagocitando leucotrienos e complexos imunes, e produzindo histaminase, fosfolipase e prostaglandinas com ação contrária às que iniciaram a inflamação¹⁴.

Na fase de proliferação, a formação do tecido de granulação depende do fibroblasto que na matriz deposita colágeno, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas e proteases, sendo estas duas últimas responsáveis pelo desbridamento e remodelação fisiológicos¹⁵. Na fase de proliferação ocorrem epitelização, fibroplasia e angiogênese⁹.

Na epitelização, as mitoses chegam ao auge próximo do terceiro dia, predominando nas áreas periféricas, criando excessos laterais de células, que empurram as células das bordas e se movem por debaixo da crosta. O queratinócito ao se encontrar com outra célula idêntica, muda à direção de seu movimento, e cessando esta movimentação quando estiver rodeado de similares, ocorrendo a inibição por contato^{8,9}.

Na fibroplasia, os primeiros fibroblastos a migrarem para a matriz provisória, dirigidos pela fibronectina, são os residentes na derme ao redor da lesão, e aparecem entre o 3º e o 5º dia depois do trauma, atraídos por substâncias produzidas pelos macrófagos ativados, linfocinas e pela degradação do colágeno lesionado^{16,17}.

O TGF- β é o mais poderoso estimulante conhecido da síntese do colágeno e favorece sua acumulação, já que diminui a atividade das proteases que destrói o colágeno. Esta citocina é produzida por células inflamatórias e fibroblastos. O PDGF, b-FGF e EGF também favorecem a fibroplasia, enquanto que os glicocorticoides e interferon- γ interferem nesta fase^{13,18}.

Na matriz extracelular, os fibroblastos produzem condroitin sulfato, dermatan sulfato, heparina, queratan sulfato e ácido hialurônico¹³. Este último sendo um polissacarídeo glicosaminoglicano não sulfatado que se liga à água e auxilia na resistência do tecido à compressão. As modificações que ocorrem na composição da matriz extracelular favorecem a fixação celular e a diferenciação para fenótipos mais maduros⁸.

Na fase de angiogênese, os níveis elevados de lactato, o pH ácido e a diminuição da tensão do oxigênio na ferida estimulam a formação de neovasos¹⁹. Os macrófagos podem produzir lactato mesmo sob condições normais de oxigenação dos tecidos¹¹, e sua presença na lesão acelera a deposição de colágeno e estimula a neovascularização²⁰. Com o decorrer do processo de cicatrização os vasos neoformados se diferenciam em capilares^{8,19}.

A contração da ferida representa o movimento das bordas e não formação de tecido novo, podendo reduzir de forma significativa a área da superfície do defeito cutâneo a ser preenchido⁹. O PDGF, TGF- β e b-FGF estimulam esta fase em feridas experimentais^{21,22}. Esta fase é objeto de estudo nos artigos apresentados.

A fase de remodelação pode durar meses. A colagenólise elimina as fibras colágenas depositadas desorganizadamente, trocando-as por fibras orientadas na matriz e mais resistentes, ajudando a formar uma matriz madura estável⁹. A remodelação é responsável pelo aumento da força tensional e pela diminuição do tamanho da cicatriz, sendo esta considerada avascular na fase tardia^{16,17}.

Mas as fases de cicatrização poderão ser alteradas em diversas situações, como ocorre em infecções locais que perpetuam o processo inflamatório propiciando a cronificação de uma lesão de pele como úlcera de perna, ou em uso de cremes tópicos e curativos especiais que aceleram o processo de fibroplasia em procedimentos estéticos^{9,19,23,24}.

Em 1990, Darby, Skalli e Gabbiani²⁵ em seu estudo, demonstraram que os fibroblastos adquirem algumas características de músculo liso, tornando-se miofibroblastos, que desaparecem quando a ferida está totalmente epitelizada. A imunofluorescência marcada com anticorpos para detectar todas as isoformas de actina demonstrou que após o sexto dia somente a metade das feridas examinadas dos animais tinham os fibroblastos corados por anticorpo para *alpha smooth muscle actin* (α -SMA). Do 12º ao 15º dia havia difusão de miofibroblastos na ferida, e do 16º ao 20º dia declinaram intensamente o anti α -SMA positivo nos fibroblastos. No 20º,

25º e 30º dia da lesão, figuras apoptóticas foram vistas nos fibroblastos e nas células endoteliais.

Grinnell²⁶ afirmou que durante a formação do tecido de granulação, fibroblastos migram e se diferenciam em miofibroblastos, e que os fibroblastos das margens da ferida geram força suficiente para iniciar a contração da ferida. A contratilidade celular pode ser controlada por fatores extracelulares, como TGF- β que tem sido relatado como promotor da diferenciação.

Há registros na literatura de que o TGF- β atua na diferenciação dos miofibroblastos e na expressão da α -SMA, e que há relação da tensão mecânica da ferida e manutenção do fenótipo destas células^{27,28}.

Hinz *et al.*²⁹ obtiveram melhoramento da atividade contrátil dos fibroblastos subcutâneos de ratos tratados com TGF- β , levando ao aumento da expressão da α -SMA nestes fibroblastos, demonstrando o acréscimo da contração da matriz colágena pelo TGF- β .

Atualmente, o miofibroblasto se tornou uma célula de interesse de estudos devido ao seu envolvimento em neoplasias de origem estromal e doenças fibróticas. Trabalhos recentes afirmam que os fatores moduladores dos miofibroblastos determinarão os possíveis tratamentos e controle destas doenças^{6,7,30}.

O metronidazol é um antiprotozoário com ação antibacteriana, tendo como fórmula estrutural 2-metil-5-nitroimidazol-1-etanol³¹, ativo contra organismos anaeróbicos^{32,33}, sendo a droga de escolha contra *Trichomonas vaginalis*, amebíase causada por *Entamoeba histolítica* e angina de Vincent, uma ulceração aguda da boca causada por bactéria anaeróbica. Esta medicação é um inibidor seletivo da produção de hidrogênio pelo *Clostridium welchii* e pelo *Trichomonas vaginalis*, exercendo seu efeito no componente hidrogenase como receptor de elétrons. Esta transferência de elétrons pela redução da ferredoxina para enzima hidrogenase produz gás hidrogênio. O potencial redox não é encontrado em sistemas microbiais aeróbicos, exceto na fotossíntese^{32,33}.

A ação do metronidazol contra anaeróbios ocorre por estas bactérias obterem a sua energia pela oxidação da enzima denominada tiamina pirofosfatase, que utiliza ferredoxina ou seus equivalentes como transferidores elétricos de proteínas^{31,34}. Geralmente, a redução da ferredoxina transfere elétrons por hidrogenase, mas na presença do metronidazol, estes elétrons são transferidos tardiamente. Este mecanismo na redução do grupo cinco nitro³⁵, possibilita a hidroxilamina prevenir a

formação de um princípio ativo para DNA e RNA polimerases, causando a cessação de toda a síntese de ácido nucléico.

O metronidazol se agrega a um composto citotóxico, com ação inibitória sobre o ácido nucléico e a síntese protéica nas células anaeróbicas, que possuem um sistema enzimático para redução da droga, com acúmulo de subprodutos desta redução intracelular³⁶, exercendo ação deletéria sobre estas células, possibilitada pela combinação destes subprodutos com importantes macromoléculas celulares³⁷.

Stoltze e Stellfeld³⁸ pesquisaram a absorção sistêmica do metronidazol com sua aplicação tópica em gel a 25% em bolsas periodontais inflamadas *versus* administração de metronidazol na dose de 100mg endovenoso, e concluíram ser possível obter altas concentrações de metronidazol nas bolsas periodontais com metronidazol a 25% sem induzir a altas concentrações plasmáticas.

Elewski³⁹ utilizou pele humana de cadáver montada em difusor celular para avaliar a farmacocinética da absorção percutânea do metronidazol, em diferentes veículos e concentrações, como o agente ativo em seis formulações tópicas. O estudo demonstrou que ocorre influência do veículo utilizado, como creme, loção ou gel, sendo que o creme possuiu uma absorção maior que a loção, e está maior que o gel.

Em 1984, Ashford *et al.*⁴⁰, utilizaram pela primeira vez o metronidazol aplicado de forma tópica para controle de odor de ferida tumoral fungóide. Esta ferida, entre outras substâncias voláteis, apresenta alta incidência de infecções por bactérias anaeróbicas, sendo esta uma das causas do odor fétido destas lesões. Desde então esta medicação tem sido universalmente usada com tal finalidade⁴¹⁻⁴⁷.

1.1 OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo avaliar, em modelo experimental animal de cicatrização cutânea por segunda intenção, a maturação do colágeno local, a diferenciação dos fibroblastos e sua correlação com a contração das feridas quando expostos a diferentes concentrações de solução tópica de metronidazol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa do presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - CEUA PUC PR e aprovado conforme parecer nº 655 (Anexo). Todas as fases de execução do projeto respeitaram as orientações da Lei 11.794/2008 regulamentada pelo decreto número 6899 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.1 AMOSTRA

Utilizaram-se 108 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem *Wistar*, adultos jovens com idade de 110 dias e com peso médio entre 300g e 315g.

Mantiveram-se os animais provenientes do Biotério Central da Pontifícia Universidade Católica do Paraná em gaiolas apropriadas para a espécie, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e à ração padrão para a espécie.

Distribuíram-se aleatoriamente os animais em seis grupos, conforme tabela 1. Avaliaram-se as lesões na pele de cada grupo em três, sete e quatorze dias após a eutanásia dos ratos.

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)

2.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No Laboratório de Técnica Cirúrgica Experimental anestesiaram-se os animais com ketamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg⁴⁸, por via intramuscular na porção posterior da coxa, conforme orientação descrita por Sharp e LaRegina⁴⁸. Em seguida, posicionaram-se os mesmos em decúbito ventral, tendo os membros anteriores e posteriores fixados num suporte de madeira.

Realizou-se tricotomia de uma área de aproximadamente 24cm² (seis centímetros de comprimento x quatro centímetros de largura) localizada na região toracolombar de cada rato, utilizando-se como referência a coluna vertebral e uma linha imaginária tangente à inserção dos membros posteriores (Figura 1). Logo após, fez-se a antissepsia com Iodopovidona (PVPI) e a delimitação da área operatória com campo esterilizado fenestrado.

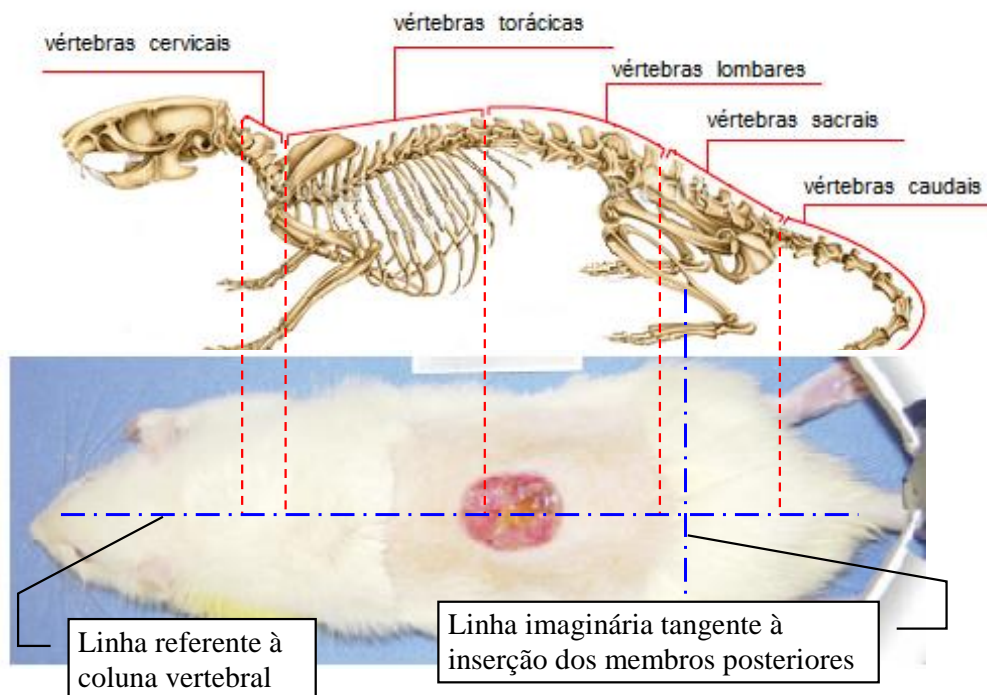


FIGURA 1 - Demonstração das referências utilizadas para delimitação da área de tricotomia e localização da ferida operatória
 FONTE: A autora (2015)

No centro da área tricotomizada, demarcou-se a pele por rotação da borda cortante de um demarcador (*punch*) metálico com dois centímetros de diâmetro e efetuou-se a ressecção do segmento de pele circular demarcada pelo *punch*, até exposição da fáscia muscular dorsal^{9,19} (Figura 2).

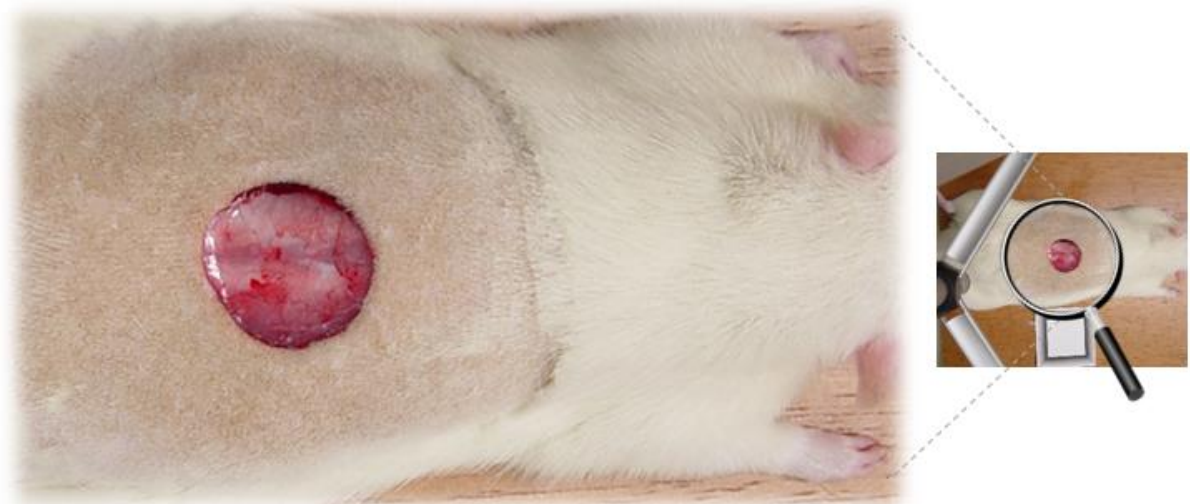


FIGURA 2 - Foto do rato 1 do grupo experimento 12% em posição de decúbito ventral, após realização da ferida operatória no momento zero
 FONTE: A autora (2015)

Após o término do ato operatório os animais receberam dipirona na dose de 10mg/Kg, por via intramuscular com finalidade analgésica⁴⁸.

As feridas permaneceram ocluídas somente até a recuperação anestésica devido à dificuldade da permanência do curativo sobre as lesões em ratos fora desta condição. Após este período, levaram-se os animais devidamente identificados para o Biotério da instituição. Mantiveram-se os animais em gaiolas individuais, e estas foram colocadas em prateleiras à igual distância da fonte de luz, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

2.3 APLICAÇÃO DO CURATIVO COM METRONIDAZOL

Imediatamente após término do ato operatório, realizou-se a limpeza das feridas de todos os animais com solução fisiológica 0,9%. Em seguida, no Grupo controle (GC) foi aplicado curativo com gazes secas, e nos cinco grupos experimento (GE) foram aplicados curativos com gazes embebidas em metronidazol solução (benzoilmetronidazol) em veículo q.s.p., sendo GE I na concentração de 40 mg/ml (4%), GE II de 60 mg/ml (6%), GE III de 80 mg/ml (8%), GE IV de 100 mg/ml (10%) e GE V de 120 mg/ml (12%).

Nos demais dias, sempre no período da manhã, limpou-se as feridas com solução fisiológica 0,9%. Na sequência o GC recebeu 0,3 ml da mesma solução fisiológica e os GE 0,3 ml de metronidazol solução, correspondendo a 12 mg/dia no GE I (4%, 40mg/kg/peso), 18 mg/dia no GE II (6%, 60mg/kg/peso), 24 mg/dia no GE III (8%, 80mg/kg/peso), 30 mg/dia no GE IV (10%, 100mg/kg/peso) e 36 mg/dia no GE V (12%, 120mg/kg/peso).

Estas doses foram escolhidas por não haver consenso nas doses utilizadas nos trabalhos com metodologia similar ao presente estudo e os resultados encontrados na literatura foram sugestivos de serem doses dependentes. A opção pelo uso do metronidazol em solução ocorreu por esta medicação estar disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) na apresentação de 4%.

Após o 3º, 7º, 14º dia de tratamento, os animais alocados em cada subgrupo, controle (GC) e experimento (GE I, II, III, IV e V), sofreram eutanásia por dose letal de

tiopental sódico intraperitoneal (120mg/kg).

Avaliaram-se os grupos experimento entre si e em comparação com o grupo controle.

2.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Nas feridas, avaliaram-se macroscopicamente a ocorrência de hemorragia, extensão de crostas, presença de secreção, de tecido de granulação.

2.5 PLANIMETRIA DIGITAL

Após a eutanásia, colocou-se cada animal sobre prancha cirúrgica e fez-se a fotografia da lesão por câmera digital, modelo Cyber-Shot P71[®], Sony, resolução de 3.2Mpixels, mantida em tripé a uma distância constante de 34cm.

Importou-se a imagem obtida para o programa de computador *VeV MD-measurement Documentation*[®], para avaliar a contração da ferida por planimetria digital. Para o cálculo da área real, utilizou-se como referência um gabarito fornecido pelo fabricante do programa, quadrado de três por três centímetros, posicionado ao lado direito da ferida no momento da fotografia, que permitiu a conversão da imagem eletrônica para uma escala em centímetros (Figura 3).

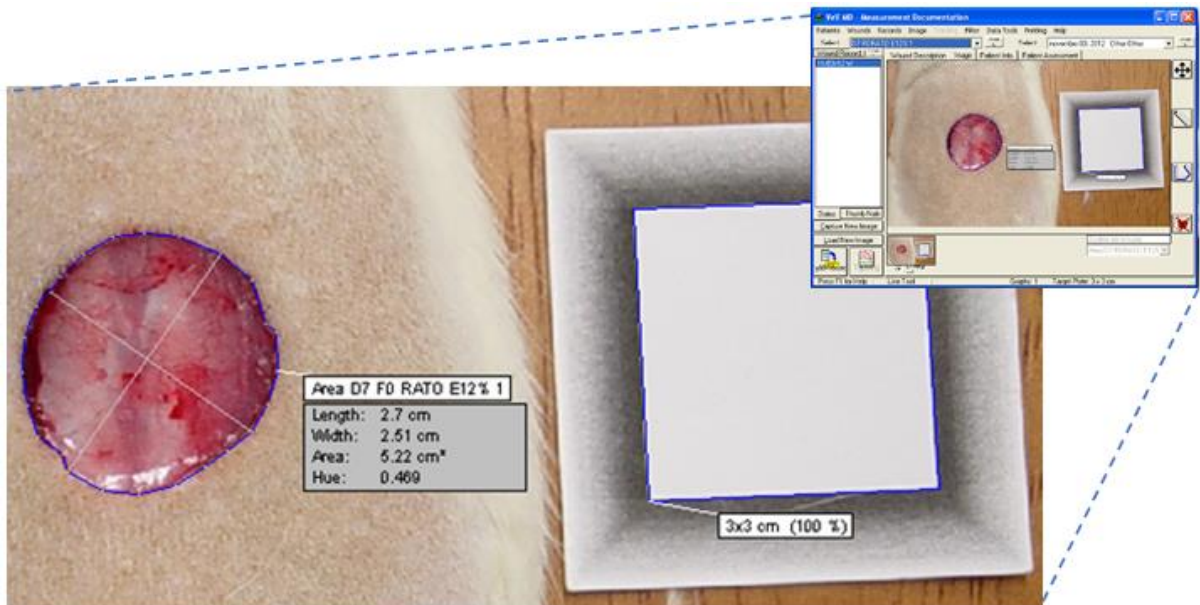


FIGURA 3 - Imagem obtida do rato 1 do grupo experimento 12% no momento zero e importada para o programa *VeV MD-measurement Documentation*[®]
 FONTE: A autora (2015)

Armazenaram-se todas as fotografias obtidas das feridas dos grupos controle e experimento nos momentos zero e após a eutanásia em três, sete e quatorze dias. Analisaram-se as mesmas de forma aleatória, após a obtenção das fotografias dos últimos grupos.

Realizou-se este procedimento sem conhecimento do grupo a que pertencia à imagem analisada, sendo posteriormente identificada conforme numeração que as fotografias receberam durante suas confecções.

Utilizou-se como critério principal para delimitação das margens das feridas a coloração dos tecidos, diferenciando as estruturas referentes à pele íntegra e a fáscia muscular dorsal do rato no momento zero. Nas avaliações das feridas após a eutanásia, utilizou-se igualmente a coloração dos tecidos, a identificação do tecido de granulação, a reepitelização e a pele íntegra com seus anexos.

Avaliou-se a contração subtraindo os valores obtidos das áreas, em centímetros quadrados, após a eutanásia em três, sete e quatorze dias, dos valores das áreas dos momentos zero.

2.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Após a eutanásia e a fotografia da lesão no dorso do rato, realizou-se a retirada de cada ferida, com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão e com profundidade até a musculatura dorsal do rato. Estendeu-se o segmento destinado à histologia sobre papel filtro identificado. Na sequência, mergulhou-se este em recipiente com formol a 10% por 24 horas. Após este período, incluiu-se o segmento em bloco de parafina e submeteu-se o mesmo a cortes de cinco micrômetros. Corou-se estes cortes histológicos por *Sirius Red* e realizou-se leitura em três campos, localizados na região central, a direita e a esquerda deste ponto central, porém distantes das bordas de ferida, com ampliação de 200x sobre a área da lesão.

Usou-se a coloração *Sirius Red* para avaliar o colágeno por meio da birrefringência específica do mesmo, utilizando um microscópio de luz polarizada.

O colágeno tipo I, que representa a fibra mais espessa e possui a maior birrefringência, corou-se em tons laranja a vermelho. O colágeno tipo III, sendo a fibra mais fina e com menor birrefringência, corou-se em verde⁴⁹.

Utilizou-se o microscópio da marca Olympus BX50 com câmeras de captura 3CCD pró-séries, e o programa de captura de imagens foi o Pró-plus versão 4.5 da Cybermetics. Captou-se as imagens por câmera Sony[®] CCD 101, enviadas a um monitor Sony Trinitron[®] colorido, congeladas e digitalizadas por uma placa Oculus TCX[®] (coreco). Analisou-se as imagens pelo aplicativo *Image Plus 4.5* para *Windows* em computador Pentium III. Calculou-se o percentual de fibras colágenas tipo I e tipo III em cada área analisada.

Coraram-se os cortes histológicos pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para avaliação da ferida e localização de sua área central.

Para a imunoistoquímica, utilizou-se a técnica de *tissue array*, sendo retirado um fragmento da porção central de cada uma das feridas, com um *punch* número 3. Na lâmina da coloração HE, localizou-se e marcou-se com caneta de retroprojeter a porção central da ferida, e em seguida, colocou-se esta lâmina sobre o respectivo bloco de parafina, identificando a área a ser retirada pelo *punch*. O processo foi repetido com todas as lâminas e blocos. Colocaram-se estes fragmentos identificados

conforme mapeamento prévio em um recipiente com separações individuais (Apêndice).

Utilizou-se para a imunistoquímica o anticorpo *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA), este anticorpo marca a actina lisa nos miofibroblastos. Utilizou-se a imunistoquímica CD34, para identificar células estromais não vinculadas a neovasos na matriz, α -SMA negativas, sendo possível identificar os protomiofibroblastos. Leram-se dez campos em cada corte histológico de ferida, correspondendo à leitura de toda a lâmina devido à utilização da técnica de *tissue array* com *punch* número 3. Realizou-se a contagem destas células presentes nos campos examinados, considerando-se somente as células nucleadas. A técnica utilizada na confecção das lâminas e a bula do anticorpo estão em Anexo.

2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Descreveu-se os resultados obtidos de variáveis quantitativas por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação dos grupos em cada momento de avaliação e para a comparação dos momentos de avaliação dentro de cada grupo, considerou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Analisou-se os dados com o programa computacional IBM SPSS v.20.0.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

**AVALIAÇÃO DO USO TÓPICO DO METRONIDAZOL NA CONTRAÇÃO E
MATURAÇÃO DE COLÁGENO DE FERIDAS EM CICATRIZAÇÃO POR
SEGUNDA INTENÇÃO EM RATOS¹**

LILIAN CRISTINE TEIXEIRA TRINDADE^I

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões^{II}

Cláudia Paraguaçu Pupo Sampaio^I

Rogério Estevam Farias^{III}

Jorge Eduardo Fouto Matias^{II}

Conflito de interesse: Não

Recursos de financiamento: CAPES

-
1. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Técnica de Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) como parte integrante do doutorado da aluna Lilian Cristine Teixeira Trindade no Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR)
 - I. Doutoranda 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. Professor Adjunto da Universidade Federal de Juiz de Fora, doutor em Patologia pela Universidade Federal Fluminense

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a ação do metronidazol em solução a 4%, 6%, 8%,10% e 12%, tópico, na contração e concentração de colágeno em feridas com cicatrização por segunda intenção em ratos. **MÉTODOS:** Fez-se feridas circulares com dois centímetros de diâmetro no dorso de ratos e estudou-se a contração e produção de colágeno em 3, 7 e 14 dias. A contração da ferida foi avaliada por planimetria digital e a produção de colágeno pela coloração *Sirius Red*. **RESULTADOS:** Não houve diferença entre os grupos em relação à contração ferida. Nos grupos experimento houve maior concentração de colágeno I e III no 3º dia ($p=0,013$ e $p=0,003$) e no 7º dia ($p=0,008$ e $p=0,001$). **CONCLUSÃO:** O metronidazol, solução a 4% (40mg/kg/dia), 6% (60mg/kg/dia), 8% (80mg/kg/dia), 10% (100mg/kg/dia) e 12% (120mg/kg/dia) aplicado de forma tópica nas feridas com cicatrização por segunda intenção, não interfere na contração da ferida e aumenta a concentração de colágeno I e III.

DESCRITORES: Cicatrização. Metronidazol. Colágeno. Ratos.

INTRODUÇÃO

A melhora na qualidade de vida proporcionou o envelhecimento progressivo da população, e subsequente aparecimento de doenças crônicas como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus, que favorecem o aumento da incidência de lesões ulceradas de pele ocasionadas por pequenos traumas, que cronificam e evoluem com complicações locais e sistêmicas¹.

No mercado há diversos produtos e curativos oclusivos para auxiliar no processo de cicatrização por segunda intenção de feridas crônicas, porém alguns possuem custo elevado^{1,2}, e os disponíveis na rede pública não apresentam resultados satisfatórios no tratamento das lesões ulceradas crônicas^{2,3}.

A cicatrização por segunda intenção ocorre quando a ferida apresenta perda de tecido, bordas irregulares, necrose, contaminação ou infecção local³. Esta cicatrização normalmente apresenta as fases de hemostasia, inflamação, proliferativa ou de fibroplasia, remodelação ou maturação, porém pode evoluir para cronificação quando há interferência em uma ou mais destas fases².

O antibiótico metronidazol, ativo contra anaeróbicos obrigatórios⁴⁻⁷, é usado com frequência em pacientes com feridas malignas cutâneas para controle da secreção e odor fétido, por diminuir a concentração de anaeróbios destas lesões^{8,9}. Esta medicação aplicada de forma tópica também constitui terapia de primeira linha em casos de rosácea¹⁰.

Há trabalhos experimentais que afirmam ação benéfica do metronidazol no processo de cicatrização referente à contração da ferida e à concentração de colágeno, com uso por via oral¹¹ e por via tópica^{12,13}. Outros autores relatam toxicidade do metronidazol para células de mamíferos em estudos *in vitro*¹⁴⁻¹⁶. Porém todos os autores afirmam a necessidade de maiores estudos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação do metronidazol nas concentrações de 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, uso tópico em feridas com cicatrização por segunda intenção em ratos, analisando a contração macroscópica e correlacionando com a concentração do colágeno.

MÉTODOS

O projeto foi **aprovado** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - CEUA PUCPR, sob o **protocolo nº 655**.

O estudo experimental utilizou 108 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem *Wistar*, adultos jovens com idade de 110 dias e com peso médio entre 300g e 315g. Foram mantidos em gaiolas apropriadas individuais para a espécie, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e à ração-padrão para a espécie. O tamanho da amostra foi estimado através dos estudos realizados na literatura pesquisada^{2,3,17,18}, e o projeto seguiu as orientações da Lei 11.794/2008 regulamentada pelo decreto número 6899 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos, conforme tabela 1, que excetuando o grupo controle (GC), foram submetidos a curativos com o uso de metronidazol em solução a 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, tópico, com frequência de uma vez ao dia, sendo que cada grupo foi avaliado em três, sete e quatorze dias após a lesão na pele.

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

Os animais foram anestesiados com ketamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg¹⁹. Foi tricotomizada, na região dorsal de cada animal, uma área de aproximadamente 24 cm². Após a antisepsia com PVPI e a delimitação da área operatória com campo esterilizado fenestrado, foi realizada a demarcação na pele por rotação da borda cortante de demarcador (*punch*) metálico com dois centímetros de diâmetro e

efetuada a ressecção do segmento de pele circular demarcada pelo *punch*, até expor a fáscia muscular dorsal^{2,3,18}.

Todos os animais tiveram as feridas limpas com solução de NaCl 0,9%. Em seguida, no grupo controle (GC) foi aplicado curativo com gazes secas, e nos cinco grupos experimento (GE) foram aplicados curativos com gazes embebidas em metronidazol solução (benzoilmetronidazol) em veículo q.s.p., sendo GE I na concentração de 40 mg/ml (4%), GE II de 60 mg/ml (6%), GE III de 80 mg/ml (8%), GE IV de 100 mg/ml (10%) e GE V de 120 mg/ml (12%).

Após o término do ato operatório os animais receberam dipirona na dose de 10mg/Kg, por via intramuscular com finalidade analgésica¹⁹.

A ferida permaneceu ocluída até a recuperação anestésica. Após este período, estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, as quais foram colocadas em prateleiras à igual distância da fonte de luz, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Nos demais dias, sempre no período da manhã, as feridas foram limpas com solução fisiológica 0,9%. Na sequência o GC recebeu 0,3 ml da mesma solução aplicada na ferida e os GE 0,3 ml de metronidazol solução aplicada de forma tópica na ferida, correspondendo a 12 mg/dia no GE I (4%, 40mg/kg/peso), 18 mg/dia no GE II (6%, 60mg/kg/peso), 24 mg/dia no GE III (8%, 80mg/kg/peso), 30 mg/dia no GE IV (10%, 100mg/kg/peso) e 36 mg/dia no GE V (12%, 120mg/kg/peso).

No terceiro, sétimo e décimo quarto dia de tratamento, seis animais dos GE I, II, III, IV, V e GC sofreram eutanásia por dose letal de tiopental sódico intraperitoneal (120 mg/Kg), sendo este o método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002.

Cada animal foi colocado sobre prancha cirúrgica e fotografado por câmera digital, modelo Cyber-Shot P71, Sony®, resolução de 3.2M pixels, mantida em tripé a uma distância constante de 34 cm. Este procedimento foi efetuado na realização da ferida (momento zero) e imediatamente após eutanásia no 3º, 7º e 14º dia.

A imagem obtida foi importada para o programa de computador *VeV MDmeasurement Documentation*®, para avaliar a contração da ferida por planimetria digital. Para o cálculo da área real, foi utilizado como referência um gabarito fornecido pelo fabricante do programa, um quadrado de três por três centímetros, posicionado

ao lado direito da ferida no momento da fotografia, que permitiu a conversão da imagem eletrônica para uma escala em centímetros.

Após os registros fotográficos, as feridas foram ressecadas com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato. O segmento destinado à histologia foi estendido sobre filtro de papel identificado e fixado em formol a 10% por 24 horas. Após este período, foi submetido ao preparo histológico convencional, incluso em bloco de parafina e cortes de cinco micrômetros. Os cortes histológicos foram corados por *Sirius Red*. Para cada lâmina, em média, foi realizada a leitura de três campos, sendo próximo as bordas direita e esquerda e no centro da lesão, com ampliação de 200x, sobre a área da lesão.

Para a comparação dos grupos em cada momento 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 IBM SPSS v.20.0.

RESULTADOS

A macroscopia não apresentou hemorragias, secreção de aspecto purulento, excesso de formação de crostas, e todos os animais no decorrer do tempo apresentaram tecido de granulação.

Na análise da contração das feridas, observou-se que as áreas destas diminuíram significativamente com o decorrer do tempo nos grupos controle (GC) e experimento (GE I, II, III, IV e V). Portanto, dentro do mesmo grupo houve redução progressiva da ferida no 3º, 7º e 14º dia, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Contração das feridas intragrupo nos períodos avaliados.

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	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
4%	0,001	<0,001	<0,001	0,002
6%	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
8%	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
10%	0,002	0,001	<0,001	0,009
12%	0,002	0,001	<0,001	0,007

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

Todavia, quando os grupos experimento foram comparados ao controle, não houve diferença significativa nos mesmos períodos avaliados.

Quanto a concentração do colágeno, o tipo I foi maior em todos os grupos experimento (GE) em relação ao controle (GC) nas avaliações do terceiro ($p=0,013$) e sétimo dia ($p=0,008$). No décimo quarto dia não houve diferença, como demonstra a tabela 3.

Tabela 3 - Concentração de colágeno tipo I em todos os grupos, nos períodos avaliados.

	Grupos	n	Médias	Desvio padrão	Valor de p
Dia 3	Controle	6	1,37	0,31	0,013
	4%	6	2,47	0,65	
	6%	6	2,80	0,94	
	8%	6	2,27	0,36	
	10%	6	2,27	0,52	
	12%	6	3,20	1,20	
Dia 7	Controle	6	1,69	1,39	0,008
	4%	6	7,57	4,46	
	6%	6	7,41	3,00	
	8%	6	8,78	2,18	
	10%	6	8,94	2,16	
	12%	6	8,29	1,44	
Dia 14	Controle	6	6,78	2,65	0,270
	4%	6	6,26	1,36	
	6%	6	7,19	1,98	
	8%	6	5,80	2,37	
	10%	6	8,38	1,12	
	12%	6	6,04	2,35	

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

Na comparação dos grupos experimento entre si, no terceiro e sétimo dia, em que houve predomínio do colágeno tipo I em relação ao grupo controle, não houve diferença nos grupos experimentos em nenhum destes períodos, conforme tabela 4.

Tabela 4 - Comparação dos grupos experimento entre si no terceiro e sétimo dia, em relação ao colágeno tipo I.

GRUPOS COMPARADOS	Valor de p	
	Dia 3	Dia 7
4% x 6%	0,669	0,946
4% x 8%	0,693	0,255
4% x 10%	0,646	0,216
4% x 12%	0,451	0,438
6% x 8%	0,413	0,228
6% x 10%	0,377	0,193
6% x 12%	0,742	0,400
8% x 10%	0,948	0,919
8% x 12%	0,255	0,710
10% x 12%	0,229	0,636

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

O colágeno III apresentou maior concentração em todos os grupos experimento (GE) comparado ao controle (GC) no terceiro dia ($p=0,003$) e sétimo dia ($p=0,001$). No décimo quarto dia não houve diferença, como demonstra tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de colágeno tipo III em todos os grupos, nos períodos avaliados.

	Grupos	n	Médias	Desvio padrão	Valor de p
Dia 3	Controle	6	2,16	0,75	0,003
	4%	6	4,19	0,54	
	6%	6	4,42	1,26	
	8%	6	3,96	0,75	
	10%	6	4,16	0,84	
	12%	6	4,94	0,94	
Dia 7	Controle	6	2,21	0,60	0,001
	4%	6	6,57	2,34	
	6%	6	4,87	1,02	
	8%	6	6,32	1,68	
	10%	6	6,78	0,94	
	12%	6	5,50	0,70	
Dia 14	Controle	6	4,59	0,98	0,524
	4%	6	3,89	0,71	
	6%	6	4,30	1,00	
	8%	6	3,66	0,94	
	10%	6	3,80	0,38	
	12%	6	4,14	1,13	

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

Na avaliação intergrupo experimento, foi encontrado no terceiro dia predomínio do colágeno III no grupo GE V (12%) em relação ao GE III (8%) ($p=0,026$).

No sétimo dia houve diferença na comparação entre os grupos experimentos, com maior concentração de colágeno III no grupo GE I (4%) em relação ao GE II (6%) ($p=0,032$). Também há predomínio deste colágeno no grupo GE IV (10%) comparado ao GE II (6%) ($p=0,003$) e ao GE V (12%) ($p=0,035$), demonstrado em tabela 6.

Tabela 6 - Comparação dos grupos experimento entre si no décimo quarto dia, em relação ao colágeno tipo III.

Grupos comparados	Valor de p	
	Dia 3	Dia 7
4% x 6%	0,943	0,032
4% x 8%	0,322	0,785
4% x 10%	0,803	0,333
4% x 12%	0,193	0,232
6% x 8%	0,289	0,058
6% x 10%	0,748	0,003
6% x 12%	0,218	0,314
8% x 10%	0,456	0,218
8% x 12%	0,026	0,352
10% x 12%	0,124	0,035

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

DISCUSSÃO

Os trabalhos experimentais com ferida aberta no dorso do animal, com cicatrização por segunda intenção, realizados por Prasad *et al.*¹¹ e Rao *et al.*¹², referiram que na avaliação por planimetria da contração da ferida houve maior redução desta com o uso do metronidazol oral, na dose de 160 mg/kg/dia e 180 mg/kg/dia, respectivamente. Borden *et al.*²⁰ com uso de metronidazol intraperitoneal na dose de 20 mg/kg/dia e Trindade *et al.*² com uso de metronidazol tópico 50 mg/kg/dia, não encontraram diferença significativa na contração da ferida aberta.

No presente estudo, observou-se que as feridas de todos os grupos experimento e controle diminuíram suas áreas de modo significante com o decorrer do tempo. Porém quando os grupos foram comparados entre si, não houve diferença em nenhum dos momentos analisados, demonstrando que o metronidazol nas doses de 40mg/kg/dia, 60mg/kg/dia, 80mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 120mg/kg/dia em uso tópico, não interfere na taxa de redução do tamanho da ferida em cicatrização por segunda intenção, repetindo os resultados de Borden *et al.*²⁰ e Trindade *et al.*², mesmo utilizando doses superiores a estes trabalhos.

Segundo Grinnell e Petroll²¹, várias células, além do fibroblasto, podem contrair uma matriz de colágeno como células musculares lisas, células epiteliais e endoteliais. Estes autores referem que o fibroblasto da matriz extracelular, estimulado por citocinas como o Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF), contrai melhor que o fibroblasto da derme. Os mesmos autores afirmaram que em relação a contração da matriz extracelular tem sido proposto dois mecanismos: um centrado na capacidade contrátil celular do fibroblasto adquirindo o fenótipo miofibroblasto, e o outro mecanismo seria a força contrátil exercida pela migração das células que ocorrem das margens da ferida em substituição do tecido de granulação.

Ehrlich e Hunt²² referiram que a organização do colágeno, no tecido de granulação, realizada pelo fibroblasto pode gerar força de tração similar a realizada pelos miofibroblastos.

Em se tratando da produção de colágeno, Borden *et al.*²⁰ com a dose de 20mg/kg/dia intraperitoneal, encontraram diminuição da força tensil da cicatriz da parede abdominal na avaliação da 2ª e 3ª semana pós-operatória, porém na 5ª semana esta cicatriz apresentou a mesma resistência que o grupo controle.

Prasad *et al.*¹¹ com a dose de 160mg/kg/dia via oral, avaliaram o conteúdo do tecido de granulação das feridas dos animais no 10º dia da lesão, referiram diminuição da produção da hidroxiprolina neste período, com prejuízo da fase de colagenização nos ratos tratados com metronidazol.

Girish e Patil¹³, que usaram no trabalho metodologia similar ao Prasad *et al.*¹¹, porém com a dose de metronidazol de 108 mg/kg/dia por via oral, afirmaram justamente o contrário, que houve maior produção de hidroxiprolina no grupo tratado com metronidazol. Girish e Patil¹³ creditaram que o resultado negativo encontrado por Borden *et al.*²⁰ foi devido à baixa dose usada do metronidazol, 20mg/kg/dia, e o tempo menor de administração, que foi de apenas 7 dias, e a divergência em relação ao resultado encontrado por Prasad *et al.*¹¹ seria exatamente o contrário, ou seja, a alta dose de metronidazol usada por estes autores, 160mg/kg/dia.

Rao *et al.*¹² avaliaram as feridas com 10 dias após a lesão, e referiram maior organização do colágeno nas lesões dos grupos que foram tratados com metronidazol por via oral na dose 180mg/kg/dia e por via tópica, porém nesta última via a base possuía alantoína em sua formulação, o que levanta a hipótese de ter um segundo

componente com interferência na cicatrização além do metronidazol, neste caso a alantoína.

Sampaio *et al.*³ fizeram trabalho com metodologia similar à atual pesquisa, referiram maior concentração de colágeno I em 3, 7, 14 e 21 dias, porém com diferença significativa no 7º dia ($p=0,020$) e 21º dia ($p=0,016$). Em relação ao colágeno III foi predominante no 21º dia ($p=0,005$). Entretanto, estes autores mantiveram cinco ratos por gaiola, podendo ter ocorrido manipulação das feridas pelos ratos da mesma gaiola, o que levaria a uma menor concentração tópica do metronidazol e não apresentar significância nos períodos avaliados.

O presente estudo encontrou aumento significativo do colágeno III nos grupos experimento em todas as concentrações no terceiro e sétimo dia. O colágeno I apresentou a mesma evolução, com predomínio nos grupos experimento igualmente no terceiro e sétimo dia. O provável aumento do colágeno tipo I e III nestes períodos precoces, divergente de Sampaio *et al.*, possa ser decorrente do uso de gaiolas individuais, o que não foi utilizado por estes autores. Desta forma, o animal isolado permanece com o metronidazol por maior período na ferida aberta no dorso sem manipulação da medicação feita por outro animal da mesma gaiola.

O colágeno tipo I é a principal proteína encontrada na fáscia e o fibroblasto é a célula primariamente responsável por sua síntese, mas diversos parâmetros estão envolvidos no controle desta síntese, como densidade do colágeno no tecido ou na ferida, tensão da matriz extracelular e fatores de crescimento²³.

Na reparação aguda de uma ferida, a fibronectina inicialmente depositada provem do plasma sanguíneo. A fibronectina e a fibrina criam uma matriz provisória que promove a migração e adesão celular nesta matriz. A fibronectina é uma glicoproteína adesiva encontrada no plasma sanguíneo, mas também sintetizada pelas células que migram para ferida como o fibroblasto²⁴.

O fibroblasto produz e deposita fibronectina e colágeno na matriz extracelular provisória da ferida em processo de cicatrização²⁵.

A matriz extracelular pode liberar algumas citocinas como o Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), que induz crescimento de fibroblasto e células endoteliais^{24,25}. Entretanto, o Fator de Crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), que é uma citocina secretada primariamente pelos neutrófilos e macrófagos

presentes na lesão, demonstra possuir o maior envolvimento no processo de produção de colágeno e remodelação da nova matriz extracelular^{26,27}.

Chéret *et al.*²⁸ referiram que a alteração da inervação sensorial periférica e a concomitante alteração na concentração de neuropeptídeos na ferida, como substância P, calcitonina e peptideo intestinal vasoativo (VIP), interferem na produção do colágeno e na remodelação da ferida que ocorre com a substituição progressiva do colágeno tipo III para tipo I.

Simões *et al.*²⁹, em estudo experimental em ratos albinos, com ferida em cicatrização por segunda intenção, observaram por microscopia eletrônica o comportamento dos fibroblastos nos períodos de 3, 7, 14 e 21 dias. Notaram a presença de fibroblastos típicos sintetizando fibrilas colágenas tipo I e III ao mesmo tempo mas sem orientação, sendo este fenômeno mais exacerbado no 7º dia. Na sequência observaram a reabsorção de fibrilas colágenas, resultando na substituição do colágeno tipo III pelo tipo I.

Na atual pesquisa a maior densidade de colágeno tipo III e I nas fases precoces das feridas dos grupos experimento, sugere maior número ou atividade intensa dos fibroblastos residentes. Este fato poderia ser decorrente da uma ação promotora que o metronidazol apresentaria na ferida, com estímulo da produção de colágeno por aumento da expressão de bFGF ou TGF- β 1 na lesão, sendo que ambas citocinas possuem ação no fibroblasto e na produção de colágeno.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o metronidazol solução a 4% (40mg/kg/dia), 6% (60mg/kg/dia), 8% (80mg/kg/dia), 10% (100mg/kg/dia) e 12% (120mg/kg/dia), aplicado de forma tópica, nas feridas com cicatrização por segunda intenção em ratos, não interfere na taxa de redução da ferida e aumenta a concentração de colágeno I e III nas fases precoces.

REFERÊNCIAS

1. Powers JG, Higham C, Broussard K, Phillips TJ. Wound healing and treating wounds: Chronic wound care and management. *J Am Acad Dermatol.* 2016 Apr;74(4):607-25; quiz 625-6. doi: 10.1016/j.jaad.2015.08.070.
2. Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias RE, Pierin RJ, Netto MC. Evaluation of topical metronidazole in the healing wounds process: an experimental study. *Rev Col Bras Cir.* 2010 Oct; 37(5): 358-63.
3. Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Inflammatory alterations provoked by metronidazole in wounds: an experimental study in rats. *J. Vasc. Bras.* 2009; 8(3): 232-237.
4. Edwards DI, Dye M, Carne H. The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclicdrugs. *J.Gen. Microbiol.*1973; 76:135-145.
5. Lindmark DG, Müller M. Antitrichomonad action, mutagenecity and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976;10(3):476-82.
6. O' Brien RW, Morris JG. Effect of metronidazole on hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Microbiol.* 1972; 84:225-33.
7. Löfmark S, Edlund C, Nord CE. Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections. *Clin Infect Dis.* 2010 Jan 1;50 Suppl 1:S16-23. doi: 10.1086/647939.
8. Santos CM da C, Pimenta CA de M, Nobre MRC. A systematic review of topical treatments to control the odor of malignant fungating wounds. *J Pain Symptom Manage.* 2010; 39(6):1065-76.
9. Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clin Infect Dis.* 2009 Nov 15;49(10):1541-9. doi: 10.1086/644732.
10. Zip CM. Innovative use of topical metronidazole. *Dermatol Clin.* 2010 Jul;28(3):525-34. doi: 10.1016/j.det.2010.03.015.
11. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. *Indian J Exp Biol.* 1995; 33(11):845-7.
12. 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.
13. Girish M.B, Patil PA. The influence of some azoles on wound healing in albino rats. *Indian J Pharmacol.* 2005; 37(4):247-50.
14. Mohindra JK, Rauth AM. Increased cell killing by metronidazole and nitrofurazone of hypoxic compared to aerobic mammalian cells. *Cancer Res.* 1976;36(3):930-6.
15. Koch-Weser J, Goldman P. Drug therapy: Metronidazole. *N Engl J Med.* 1980; 303(21):1212-8.

16. Miotti D.A. Metronidazole: its use in clinical dentistry. *J. Clin. Periodontol.* 1984;11(3):145-58.
17. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Sains-Isolan PMB, Oliveira EM, Arruda ECM. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras.* 2006; 21 (Supl 3) 55-65.
18. Branco-Neto MLC, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Oliveira-Filho MA, Czezczko NG, Aoki S, Cunha R, Fonseca VR, Teixeira HM, Aguiar LRF. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cir Bras* 2006; 21 (Supl 2) 17-22.
19. Sharp PE, LaRegina MC. *The laboratory rat.* Washington. CRC Press. 1998; p. 103, 112.
20. Borden EB, Sammartano RJ, Dembe C, Boley SJ. The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgery* 1985; 97(3):331-6.
21. Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:335-61. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113318.
22. Ehrlich HP, Hunt TK. Collagen Organization Critical Role in Wound Contraction. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012 Feb;1(1):3-9.
23. Grinnell F. Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. *J Bodyw Mov Ther.* 2008 Jul;12(3):191-3. doi: 10.1016/j.jbmt.2008.03.005.
24. Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2009 Mar-Apr;17(2):153-62. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x.
25. Kubow KE, Vukmirovic R, Zhe L, Klotzsch E, Smith ML, Gourdon D, Luna S, Vogel V. Mechanical forces regulate the interactions of fibronectin and collagen I in extracellular matrix. *Nat Commun.* 2015 Aug 14; (6:8026): 1-11. doi: 10.1038/ncomms9026.
26. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007;127 (5):998-1008.
27. Kant V, Gopal A, Kumar D, Bag S, Kurade NP, Kumar A, Tandan SK, Kumar D. Topically applied substance P enhanced healing of open excision wound in rats. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep 5;715(1-3):345-53. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.042.
28. Chéret J, Lebonvallet N, Buhé V, Carre JL, Misery L, Le Gall-Ianotto C. Influence of sensory neuropeptides on human cutaneous wound healing process. *J Dermatol Sci.* 2014 Jun;74(3):193-203. doi: 10.1016/j.jdermsci.2014.02.001.
29. Simões MJ, Cabral ACV, Boyaciyan K, Kulay Jr L, Sasso WS. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. *Rev Paul Med.* 1986; 104(3):132-5.

DIFERENCIAÇÃO DE MIOFIBROBLASTOS EM FERIDAS APÓS USO TÓPICO DO METRONIDAZOL: UM ESTUDO EXPERIMENTAL¹

LILIAN CRISTINE TEIXEIRA TRINDADE^I

Jorge Eduardo Fouto Matias^{II}

Cláudia Paraguaçu Pupo Sampaio^I

Rogério Estevam Farias^{III}

Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões^{II}

Conflito de interesse: Não

Recursos de financiamento: CAPES

-
1. Trabalho desenvolvido no Laboratório de Técnica de Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) como parte integrante do doutorado da aluna Lilian Cristine Teixeira Trindade no Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (UFPR)
 - I. Doutoranda 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. Professor Adjunto da Universidade Federal de Juiz de Fora, doutor em Patologia pela Universidade Federal Fluminense

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a ação do metronidazol em solução a 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, tópico, na incidência de miofibroblastos e protomiofibroblastos e sua relação com a contração de feridas em cicatrização por segunda intenção em ratos. **MÉTODOS:** Fez-se feridas circulares com dois centímetros de diâmetro no dorso de ratos e estudou-se a cicatrização em 3, 7, 14 dias. A contração da ferida foi avaliada por planimetria digital e os miofibroblastos e protomiofibroblastos pela imunohistoquímica com α -SMA e CD 34. **RESULTADOS:** Não houve diferença entre os grupos controle e experimentos em relação à contração ferida. Nos grupos tratados com metronidazol, o número de protomiofibroblastos foi maior no 7º dia ($p=0,022$), e de miofibroblastos no 14º dia ($p=0,010$), sendo na concentração de 6% de metronidazol o seu efeito máximo. **CONCLUSÃO:** A aplicação tópica de solução de metronidazol em diferentes concentrações pode favorecer ou inibir o aparecimento de miofibroblastos e protomiofibroblastos locais de acordo com a concentração utilizada, contudo, sem influenciar significativamente a evolução da fase de contração durante a cicatrização cutânea por segunda intenção.

DESCRITORES: Cicatrização. Metronidazol. Administração Tópica. Diferenciação Celular. Miofibroblastos. Ratos.

INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização de feridas é alvo de pesquisas há séculos, mas nas últimas quatro décadas, intensificaram-se os trabalhos visando a fibroplasia com interesse em reabilitação funcional ou cosmético^{1,2,3}.

Após um trauma de pele, acidental ou cirúrgico, os fatores relacionados a reparação tecidual são ativados, evoluindo por fases como coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Mas estas fases poderão ser alteradas em diversas situações, como ocorre em infecções locais que perpetuam o processo inflamatório propiciando a cronificação de uma lesão de pele como ulcera de perna, ou em uso de cremes tópicos e curativos especiais que aceleram o processo de fibroplasia em procedimentos estéticos⁴.

O fenômeno de contração da ferida, ou seja, a relação entre o tamanho da ferida e a taxa de redução durante a cicatrização, completou 100 anos de sua descrição^{5,6}. Entretanto a principal célula responsável por este fenômeno só seria descrita após décadas.

Em 1971 Gabbiani⁷ descreveu os fibroblastos presentes no tecido de granulação que possuíam características em seus citoplasmas semelhantes as encontradas em células musculares lisas, descrevendo assim o miofibroblasto. Em 1990, Darby, Skalli e Gabbiani⁸ em um estudo experimental com feridas abertas em pele de ratos referiram que miofibroblasto era proveniente do fibroblasto local ao desenvolver e apresentar bandas de fibrilas musculares denominadas *alpha smooth muscle actin* (α -SMA).

Trabalhos recentes^{9,10} afirmaram que o conhecimento dos fatores ativadores e bloqueadores dos miofibroblastos são possíveis chaves de tratamento e controle de neoplasias de origem estromal como sarcomas.

O metronidazol foi aplicado de forma tópica para controle de odor de ferida tumoral fungóide pela primeira vez em 1984¹¹. Esta ferida possui como característica elevação acima da pele como um cogumelo, uma superfície com grandes áreas de dobras similares a vilosidades e criptas que propiciam e a proliferação acentuada de bactérias anaeróbicas, sendo esta uma das causas do odor fétido destas lesões. Desde então esta medicação tem sido usada de forma tópica em feridas tumorais extensas para controle de odor¹².

O presente estudo teve como objetivo avaliar, em modelo experimental de cicatrização cutânea por segunda intenção, a influência da aplicação tópica de solução de metronidazol em diferentes concentrações sobre a quantidade de protomiofibroblastos e miofibroblastos e seu potencial papel na fase de contração da cicatrização das feridas.

MÉTODOS

O projeto foi **aprovado** pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - CEUA PUCPR, sob o **protocolo nº 655**.

O estudo experimental utilizou 108 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem *Wistar*, adultos jovens com idade de 110 dias e com peso médio entre 300g e 315g. Foram mantidos em gaiolas apropriadas individuais para a espécie, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e à ração-padrão para a espécie. O tamanho da amostra foi estimado através dos estudos realizados na literatura pesquisada^{4,13,14,15}, e o projeto seguiu as orientações da Lei 11.794/2008 regulamentada pelo decreto número 6899 e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram aleatoriamente divididos em seis grupos, conforme tabela 1, que excetuando o grupo controle (GC), foram submetidos a curativos com o uso de metronidazol em solução a 4%, 6%, 8%, 10% e 12%, tópico, com frequência de uma vez ao dia, sendo que cada grupo foi avaliado em três, sete e quatorze dias após a lesão na pele.

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

Os animais foram anestesiados com ketamina 80 mg/kg e xilazina 8 mg/kg¹⁶. Foi tricotomizada, na região dorsal de cada animal, uma área de aproximadamente 24 cm². Após a antisepsia com PVPI e a delimitação da área operatória com campo esterilizado fenestrado, foi realizada a demarcação na pele por rotação da borda cortante de demarcador (*punch*) metálico com dois centímetros de diâmetro e efetuada a ressecção do segmento de pele circular demarcada pelo *punch*, até expor a fáscia muscular dorsal^{4,13,15}.

Todos os animais tiveram as feridas limpas com solução de NaCl 0,9%. Em seguida, no Grupo controle (GC) foi aplicado curativo com gazes secas, e nos cinco grupos experimento (GE) foram aplicados curativos com gazes embebidas em metronidazol solução (benzoilmetronidazol) em veículo q.s.p., sendo GE I na concentração de 40 mg/ml (4%), GE II de 60 mg/ml (6%), GE III de 80 mg/ml (8%), GE IV de 100 mg/ml (10%) e GE V de 120 mg/ml (12%).

Após o término do ato operatório os animais receberam dipirona na dose de 10mg/Kg, por via intramuscular com finalidade analgésica¹⁶.

A Ferida permaneceu ocluída até a recuperação anestésica. Após este período, estes animais foram mantidos em gaiolas individuais, as quais foram colocadas em prateleiras à igual distância da fonte de luz, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*.

Nos demais dias, sempre no período da manhã, as feridas foram limpas com solução fisiológica 0,9%. Na sequência o GC recebeu 0,3 ml da mesma solução e os GE 0,3 ml de metronidazol solução, correspondendo a 12 mg/dia no GE I (4%, 40mg/kg/peso), 18 mg/dia no GE II (6%, 60mg/kg/peso), 24 mg/dia no GE III (8%, 80mg/kg/peso), 30 mg/dia no GE IV (10%, 100mg/kg/peso) e 36 mg/dia no GE V (12%, 120mg/kg/peso).

No terceiro, sétimo e décimo quarto dia de tratamento, seis animais dos GE I, II, III, IV, V e GC sofreram eutanásia por dose letal de tiopental sódico intraperitoneal (120 mg/Kg), sendo este o método de eutanásia recomendado para roedores e outros pequenos mamíferos, contido na Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária de 20 de junho de 2002.

Cada animal foi colocado sobre prancha cirúrgica e fotografado por câmera digital, modelo Cyber-Shot P71, Sony®, resolução de 3.2M pixels, mantida em tripé a uma distância constante de 34 cm. Este procedimento foi efetuado na realização da ferida (momento zero) e após eutanásia no 3º, 7º e 14º dia.

A imagem obtida foi importada para o programa de computador *VeV MDmeasurement Documentation*®, para avaliar a contração da ferida por planimetria digital. Para o cálculo da área real, foi utilizado como referência um gabarito fornecido pelo fabricante do programa, quadrado, de três por três centímetros, posicionado ao lado direito da ferida no momento da fotografia, que permitiu a conversão da imagem eletrônica para uma escala em centímetros.

Após os registros fotográficos, as feridas foram ressecadas com margem de um centímetro de pele íntegra em torno da lesão, com profundidade até a musculatura dorsal do rato. O segmento destinado à histologia foi estendido sobre filtro de papel identificado e fixado em formol a 10% por 24 horas. Após este período, foi submetido ao preparo histológico convencional, incluso em bloco de parafina e cortes de cinco micrômetros.

Para a imunistoquímica foi utilizado o método *tissue array*. Do bloco de parafina, da área superficial central da ferida foi retirado um fragmento com um punch número 3. As amostras retiradas foram depositadas em um cassete, conforme determinação do mapa previamente elaborado.

O material foi encaminhado, na sequência, para processamento imunistoquímico, utilizando anticorpo α -SMA e CD 34.

Para a comparação dos grupos em cada momento 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 IBM SPSS v.20.0.

RESULTADOS

Na contração das feridas, observou-se que as áreas destas diminuíram significativamente com o decorrer do tempo no GC ($p=0,001$), nos GE I ($p=0,001$), GE II ($p=0,001$), GE III ($p=0,001$), GE IV ($p=0,002$) e GE V ($p=0,002$). Houve redução progressiva da ferida no 3º, 7º e 14º dia em todos os grupos analisados. Na comparação entre os grupos experimento e o grupo controle, não houve diferença significativa nos mesmos períodos avaliados.

A imunoistoquímica CD 34, utilizada para identificar neovascularização, marcou células estromais na matriz, não relacionadas a neovasos, α -SMA negativas, sugestivas de serem protomiofibroblastos. Na avaliação do 3.º dia nenhum dos grupos examinados apresentou protomiofibroblastos nas feridas. No 14.º dia não houve diferença entre os grupos.

No 7º dia houve diferença entre os grupos ($p=0,022$), conforme tabela 2.

Tabela 2 - Número de protomiofibroblastos nas feridas dos grupos controle e experimento no 7º dia de avaliação

	Grupos	n	Médias	Desvio padrão	Valor de p
Dia 7	Controle	6	0,612	0,853	0,022
	4%	6	1,602	1,469	
	6%	6	2,355	1,602	
	8%	6	1,589	2,052	
	10%	6	0,140	0,310	
	12%	6	0,481	0,407	

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

Comparando-se os grupos dois a dois a diferença significativa ocorreu conforme a tabela 3.

Tabela 3 - Comparação entre os grupos dois a dois em relação a presença de protomiofibroblasto no 7º dia.

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,096
Controle x 6%	0,014
Controle x 8%	0,286
Controle x 10%	0,258
Controle x 12%	0,898
4% x 6%	0,388
4% x 8%	0,532
4% x 10%	0,007
4% x 12%	0,122
6% x 8%	0,142
6% x 10%	0,001
6% x 12%	0,020
8% x 10%	0,033
8% x 12%	0,346
10% x 12%	0,210

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

Com imunistoquímica α -SMA, na avaliação do 3º dia nenhum dos grupos examinados apresentou miofibroblastos nas feridas. No 7º dia a diferença não foi significativa.

No 14º dia houve diferença entre os grupos ($p < 0,010$), conforme tabela 4.

Tabela 4 - Número de miofibroblastos nas feridas dos grupos controle e experimento no 14º dia de avaliação.

Grupos	n	Médias	Desvio padrão	Valor de p
Controle	6	0,186	0,288	0,010
4%	6	1,061	1,136	
6%	6	2,530	1,718	
8%	6	1,287	1,139	
10%	6	0,981	0,417	
12%	6	0,235	0,231	

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

Comparando-se os grupos dois a dois a diferença significativa ocorreu conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Comparação entre os grupos dois a dois em relação a presença de miofibroblasto no 14º dia

Grupos comparados	Valor de p
Controle x 4%	0,045
Controle x 6%	0,001
Controle x 8%	0,021
Controle x 10%	0,008
Controle x 12%	0,776
4% x 6%	0,084
4% x 8%	0,726
4% x 10%	0,464
4% x 12%	0,081
6% x 8%	0,162
6% x 10%	0,304
6% x 12%	0,001
8% x 10%	0,701
8% x 12%	0,039
10% x 12%	0,016

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

DISCUSSÃO

Dos autores que fizeram trabalhos experimentais em ratos com ferida aberta no dorso do animal, com cicatrização por segunda intenção e avaliaram a contração da ferida por planimetria, Prasad *et al.*¹⁷ com o uso do metronidazol por via oral na dose de 160 mg/kg/dia, e Rao *et al.*¹⁸ com o uso da medicação por via tópica na dose de 180 mg/kg/dia, referiram aumento da contração da ferida. Entretanto, Borden *et al.*¹⁹ que fizeram uso de metronidazol intraperitoneal na dose de 20 mg/kg/dia, e Trindade *et al.*⁴ com uso tópico na dose de 50 mg/kg/dia não encontraram diferença significativa na contração da ferida aberta na comparação dos grupos estudados.

Em 2002 Wrobel *et al.*²⁰ em seu trabalho realizado com cultura de fibroblastos e miofibroblastos humanos em substrato passível de contração, produziram força contráteis similares, sugerindo que na ausência da expressão de α -SMA, o fibroblasto poderia produzir força contrátil suficiente para o fechamento de uma ferida aberta. Ibrahim *et al.*²¹, em 2015, avaliaram contração de feridas abertas em cicatrização por segunda intenção em humanos e ratos machos e fêmeas sem interferência medicamentosa. Os autores demonstraram que a expressão da α -SMA dos fibroblastos, ou seja, os miofibroblastos no tecido de granulação contribuíram, mas não foram obrigatórios para a contração da ferida, e concluíram que os fibroblastos *in vivo* podem gerar força contrátil.

Berry *et al.*²² referiram que houve contração efetiva das feridas amplas na ausência de alta densidade de miofibroblastos. Sugeriram que a unidade contrátil possa ser a organização que os fibroblastos promovem das fibrilas colágenas finas na fibra colágena espessa, e a compactação do tecido conjuntivo dentro do tecido de granulação, retraindo a derme e o tecido adiposo ao redor da ferida.

No atual trabalho, observou-se que as feridas dos grupos experimento e controle diminuíram sua área de modo significativo com o evoluir do tempo. Porém quando os grupos foram comparados entre si, não houve diferença em nenhum dos momentos, demonstrando que o metronidazol nas doses de 40mg/kg/dia, 60mg/kg/dia, 80mg/kg/dia, 100mg/kg/dia e 120mg/kg/dia, em uso tópico, não alterou a velocidade da contração da ferida com cicatrização por segunda intenção. Portanto, a taxa de redução do tamanho da ferida durante a cicatrização por segunda intenção demonstrou não ser influenciada pelo metronidazol em uso tópico, independe das doses utilizadas.

Na matriz extracelular há fibroblastos que apresentam em seus citoplasmas bandas de microfilamentos conhecidas como fibras contráteis que expressam actina porém são α -SMA negativos^{1,23,24} e podem ser marcadas por CD 34²⁴.

Nas fases precoces de formação do tecido de granulação da ferida em cicatrização por segunda intenção, os fibroblastos ao redor da ferida migram para o centro da lesão e adquirem em seus citoplasmas bandas de microfilamentos similares as fibras contráteis beta e gama actina, tornando-se protomiofibroblastos, que iniciam a síntese dos componentes da matriz extracelular, tais como fibronectina, colágeno tipo I e III^{23,25}. Estas células, miofibroblastos imaturos, aparecem no tecido de granulação entre o 5 e 6 dias após confecção da ferida²⁶.

Os protomiofibroblastos secretam uma forma de fibronectina denominada ED-A fibronectina que demonstra ser importante na ferida para expressão do fenótipo miofibroblasto^{6,25}.

A transformação do fibroblasto em protomiofibroblasto parece depender da mudança da tensão mecânica da ferida quando comparada com o aumento da rigidez da pele normal. Entretanto, a diferenciação completa em miofibroblastos só ocorrerá com a estimulação do TGF- β na presença da ED-A fibronectina^{6,25}.

O Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o Fator de necrose tumoral – alpha (TNF- α) demonstram ter ação na formação do protomiofibroblasto,

mas estas citocinas isoladas não conseguem induzir a expressão do α -SMA e diferenciação em miofibroblasto *in vitro* ou *in vivo*^{1,26,27}.

Hinz *et al.*²⁸ em experimento com substrato de silicone e matriz colágena tratada com TGF- β , e cultivo de fibroblastos de subcutâneo de ratos, conseguiram aumento da expressão da α -SMA, demonstrando a ação deste fator sobre a atividade contrátil dos fibroblastos.

Masur *et al.*²⁹ e Grinnell³⁰ referiram que o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) age como promotor da diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos.

O TGF- β possui a ação sobre a proliferação e diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, ativação dos queratinócitos, deposição da matriz e angiogênese^{31,32}.

Há fatores inibidores da expressão da α -SMA como Fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) que demonstram antagonizar o TGF- β ¹³³. O Interferon- γ produzido pelas células T suprimem a expressão da α -SMA, deposição de colágeno e contração em modelos animais³⁴. O TGF beta 3 altera a expressão α -SMA mas depende da cultura das células aplicadas³⁵. A Interleucina 1 demonstra antagonizar o TGF- β e após este bloqueio induz o miofibroblasto à apoptose³⁶.

Há relatos na literatura referindo que a relação entre a matriz extracelular e TGF- β determina uma cicatrização normal ou um processo de fibrose^{26,32}.

No atual estudo os grupos experimento com aplicação de metronidazol solução a 4% (40mg/kg/dia), 6% (60mg/kg/dia), 8% (80mg/kg/dia) apresentaram maior número de protomiofibroblastos nas feridas. Os grupos experimento 10% (100mg/kg/dia) e 12% (120mg/kg/dia) apresentaram menor densidade destas células que o grupo controle. Isto sugere que a ação do metronidazol tópico para induzir na ferida a diferenciação do fibroblasto em protomiofibroblasto é dose dependente.

Conhecer os fatores de recrutamento dos fibroblastos e células mesenquimais, diferenciação, proliferação e apoptose dos miofibroblastos são fundamentais para compreender a reparação tecidual normal e patológica⁶.

No que diz respeito aos miofibroblastos, Grinnell³⁰ por meio de análise de marcadores do citoesqueleto, e Darby, Skalli e Gabbiani⁸ com imunofluorescência marcada com anticorpos para detectar todas as isoformas de actina, afirmaram que estas células são provenientes dos fibroblastos que migraram para ferida

demonstrando que os miofibroblastos apareceram no 6º dia de avaliação das feridas, e estavam positivamente presentes do 12º ao 15º dia. Do 16º ao 20º dia houve declínio intenso da presença dos miofibroblastos, e no 30º dia já não havia nenhuma destas células nas feridas. Observaram ainda que figuras apoptóticas nos fibroblastos apareceram entre o 20º e o 25º dia da lesão, sugerindo haver morte programada destas células nos casos de cicatrização de feridas. Os autores enfatizaram que a primeira fase de contração da ferida independe do fenótipo miofibroblasto⁸.

Os miofibroblastos são células que possuem em seu citoplasma bandas de microfilamentos de α -SMA organizadas. Mas outros marcadores de fibras musculares miosina de cadeia pesada, desmina, h-caldesmon e smoothelin são negativos^{3,9,37}.

Tomasek *et al.*¹ afirmaram que o miofibroblasto tem ação na síntese da matriz extracelular e na geração de força responsáveis pela reorganização da matriz e contração da ferida.

Com o aumento dos estudos de linhagem celular e ferramentas genéticas tem sido possível identificar outros precursores de miofibroblastos além dos fibroblastos provenientes da derme intacta adjacente. Tem-se proposto precursores como células da musculatura lisa vascular, pericitos, células mesenquimais, fibrócitos, células hepáticas estreladas, células da medula óssea entre outras^{9,36,37,38}.

MYOFIBROBLAST PROGENITORS

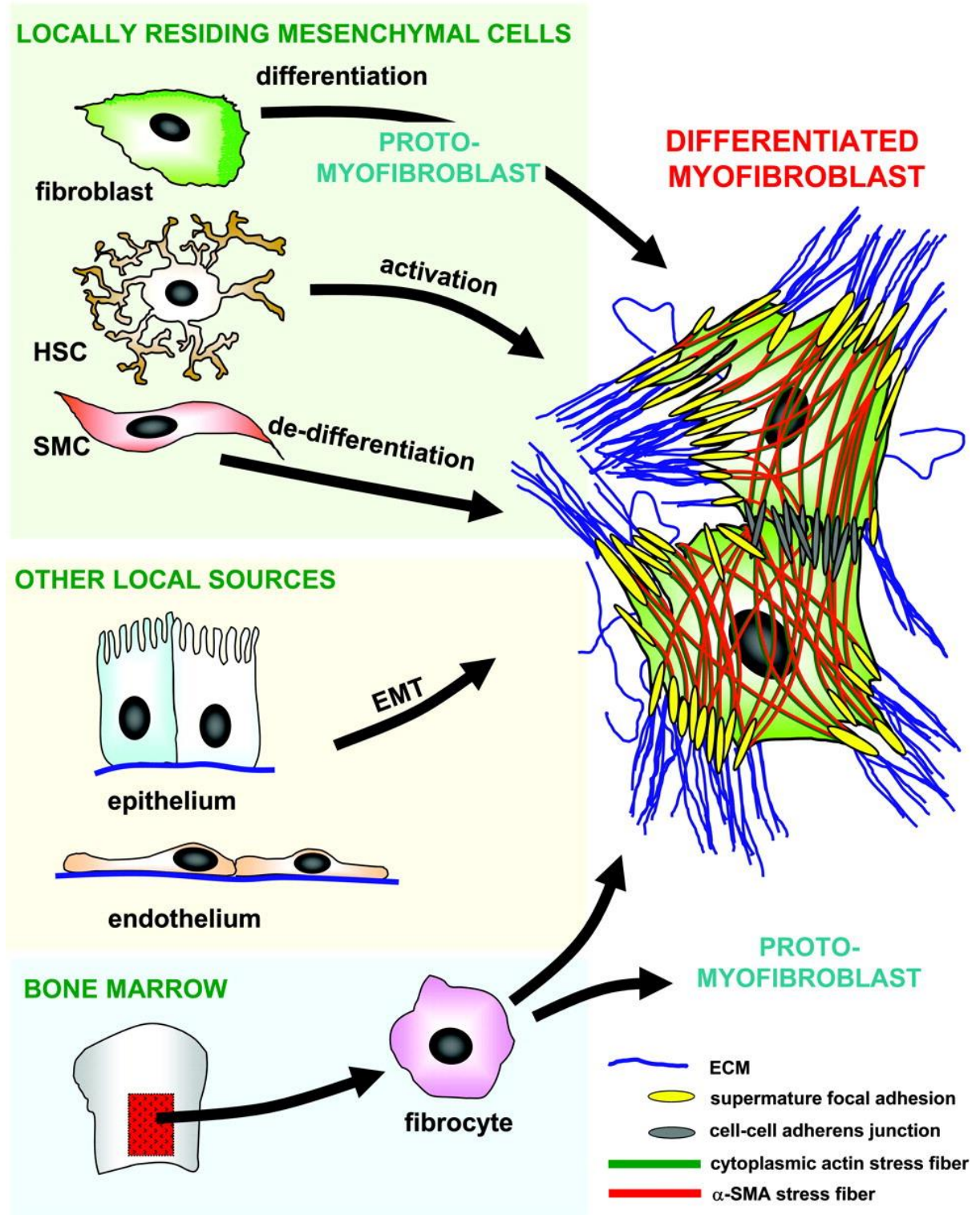


Figura 1: uma célula, múltiplas origens.

Fonte: Imagem obtida sob licença nº 3927950953808 de publicação da Elsevier em *The American Journal of Pathology*, artigo *The Myofibroblast*, volume 170, edição 6, de junho de 2007 em concordância do autor Dr. Boris Hinz.

Segundo Hinz *et al.*²⁶, os miofibroblastos são caracterizados pelo desenvolvimento de fibras contráteis α -SMA e aumento da produção de proteínas da matriz extracelular. Estas células se conectam por meio da adesão focal na matriz e entre as células por junções aderentes (Figura 1). A principal célula para originar o miofibroblasto, após uma lesão dos diferentes tecidos, parece ser o fibroblasto residente na derme ao redor da lesão, diferenciando-se inicialmente em protomiofibroblasto, caracterizado por ser α -SMA negativo.

No fígado, os miofibroblastos são provenientes das células hepáticas estreladas que seguem o processo de ativação de células epiteliais que se submetem a transição de epitelial para mesenquimal²⁶.

No pulmão, ocorre a transição de endotelial para mesenquimal, podendo fornecer outra via de transformação para gerar miofibroblastos²⁶.

Durante a formação da placa de ateroma, as células musculares lisas podem perder suas características e se diferenciarem em miofibroblastos²⁶.

Não está elucidado até o momento a relativa contribuição dos fibrócitos circulantes derivados da medula óssea para a formação de miofibroblastos em diferentes lesões fibróticas. A transdiferenciação celular do fibrócito terminando na fase de protomiofibroblasto é concebível²⁶.

Estudos recentes afirmaram que a matriz extracelular desenvolve e mantém a homeostase tecidual, e a sua disfunção favorece o aparecimento de doenças fibróticas e neoplasias estromais^{6,32,39}. A degeneração tecidual em malignidade pode ser proveniente de casos de doenças fibróticas, tais como cirrose hepática, fibrose pulmonar e renal, caracterizadas por hiperproliferação de fibroblastos, suas diferenciações em miofibroblastos e acúmulo anormal de colágeno^{10,26,39}. O conhecimento do processo complexo de produção, modificação e remodelação da matriz extracelular é a chave para atuar nas respostas celulares e terapias anti-fibróticas e anti-neoplásicas^{2,6,10,24,39,40}.

Hinz e Gabbiani⁴¹ afirmaram que o miofibroblasto é a principal célula envolvida em doenças fibróticas, e a estratégia terapêutica seria interferir na diferenciação desta célula controlando o TGF- β 1 e ED-A fibronectina.

Há relatos de que a tensão mecânica existente na matriz extracelular na ferida seria a responsável pela manutenção da presença dos miofibroblastos^{42,43}.

Considerando os possíveis precursores dos miofibroblastos, em 2010, Hinz⁴⁴ em seu estudo levanta a hipótese de que os miofibroblastos não possuem igual resposta aos fatores mecânicos das lesões, e que provavelmente há outros fatores para a manutenção do fenótipo miofibroblasto além da mudança na tensão da ferida.

Os protomiofibroblastos e miofibroblastos podem ser encontrados em tecidos normais como septo alveolar e criptas intestinais, aonde a tensão tecidual está estável²⁵.

Darby *et al.*³ referiu que observações clínicas indicam que dano ao sistema nervoso periférico influencia o processo de cicatrização de lesões de pele e pode resultar em cronificação de feridas. Isto é observado em paciente com trauma raquimedular, diabéticos, e até mesmo idosos que apresentam deterioração do sistema nervoso periférico a nível de pele.

Trindade *et al.*⁴, em estudo experimental com uso de metronidazol tópico, na dose 50mg/kg/dia, em ferida com cicatrização por segunda intenção, referiram que nas feridas dos grupos experimento, no 7º e 14º dia, que haviam menor quantidade de miofibroblastos em relação ao controle, mas no 21º dia a quantidade destas células é sugestivamente maior no grupo experimento (p=0,06). Esta divergência com o atual estudo pode ser decorrente da permanência de 5 animais por gaiola durante todo o período de curativos diários, o que permite que um animal manipule a ferida do outro, retirando parte do metronidazol aplicado por via tópica.

Na presente pesquisa os grupos experimento com aplicação tópica do metronidazol solução a 4% (40mg/kg/dia), 6% (60mg/kg/dia) e 8% (80mg/kg/dia) também apresentaram maior densidade de miofibroblastos nas feridas, sugerindo que a diferenciação do protomiofibroblasto em miofibroblasto, ou seja, a expressão da α -SMA depende da dose utilizada do metronidazol.

Uma hipótese plausível seria que o metronidazol tópico entre 40 a 80mg/kg/dia apresentaria um aumento da ação do TGF- β na ferida, mas em doses altas, acima 100mg/kg/dia, levaria ao bloqueio desta citocina necessária para expressão do fenótipo miofibroblasto, conforme demonstrado pelos autores supracitados^{26,28-33}. Entretanto, a ação aparentemente tóxica do metronidazol tópico em doses acima de 100mg/kg/dia, em cicatrização de feridas por segunda intenção, passa a ser desejável como terapia antifibrótica em tratamento de cicatriz hipertrófica de pele ou prevenção de formação de quelóide.

Faz-se necessário novos estudos para avaliar a ação do metronidazol em altas doses sobre a expressão do fenótipo miofibroblasto, em uso via oral ou endovenoso, para determinar se doses acima de 100mg/kg/dia, por estas vias de administração, apresentariam igual bloqueio da expressão da α -SMA, constituindo assim uma forma de terapia antifibrótica de ação sistêmica, como sugeriu Hinz e Gabbiani⁴¹ como estratégia terapêutica.

CONCLUSÃO

A aplicação tópica de metronidazol em diferentes concentrações sobre feridas cutâneas em cicatrização por segunda intenção induz proliferação significativa de protomiofibroblastos e miofibroblastos com efeito máximo na concentração de 6%, porém, sem influenciar significativamente a fase de contração da ferida.

REFERÊNCIAS

1. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.
2. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012 Apr;180(4):1340-55. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004.
3. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:301-11. DOI:10.2147/CCID.S50046.
4. Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias RE, Pierin RJ, Netto MC. Evaluation of topical metronidazole in the healing wounds process: an experimental study. *Rev Col Bras Cir.* 2010 Oct; 37(5): 358-63.
5. Carrel A, Hartmann A. Cicatrization of Wounds. *J Exp Med.* 1916 Oct 31;34(5): 425–34.
6. Darby IA, Zakuan N, Billet F, Desmoulière A. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Mar;73(6):1145-57. doi: 10.1007/s00018-015-2110-0.
7. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971 May 15;27(5):549-50.
8. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990; 63(1):21-9.
9. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2016 Jan;142:56-70. doi: 10.1016/j.exer.2015.07.009.
10. Cox TR, Epler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech.* 2011;4(2):165-178. doi: 10.1242/dmm.004077.
11. Ashford R, Plant G, Maher J, Teare L. Double-blind trial of metronidazole in malodorous ulcerating tumours. *Lancet.* 1984;1(8388):1232-3.
12. Da Costa Santos CM, De Mattos Pimenta CA, Nobre MR. A systematic review of topical treatments to control the odor of malignant fungating wounds. *J Pain Symptom Manage.* 2010 Jun;39(6):1065-76. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2009.11.319.
13. Branco-Neto MLC, Ribas-Filho JM, Malafaia O, Oliveira-Filho MA, Czezko NG, Aoki S, Cunha R, Fonseca VR, Teixeira HM, Aguiar LRF. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cir Bras* 2006; 21 (Supl 2) 17-22.
14. Garros IC, Campos ACL, Tâmbara EM, Tenório SB, Torres OJM, Agulham MA, Araújo ACF, Sains-Isolan PMB, Oliveira EM, Arruda ECM. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cir Bras.* 2006; 21 (Supl 3) 55-65.

15. Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Inflammatory alterations provoked by metronidazole in wounds: an experimental study in rats. *J. Vasc. Bras.* 2009; 8(3): 232-7.
16. Sharp PE, LaRegina MC. *The laboratory rat.* Washington. CRC Press. 1998; p. 103, 112.
17. Prasad D, Rao CM. Wound healing profiles of ketorolac, metronidazole and tinidazole administered post-surgically. *Indian J Exp Biol* 1995;33(11):845-7.
18. 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.
19. Borden EB, Sammartano RJ, Dembe C, Boley SJ. The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgery* 1985; 97(3):331-6.
20. Wrobel LK, Fray TR, Molloy JE, Adams JJ, Armitage MP, Sparrow JC. Contractility of single human dermal myofibroblasts and fibroblasts. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2002 Jun;52(2):82-90.
21. Ibrahim MM, Chen L, Bond JE, Medina MA, Ren L, Kokosis G, et al. Myofibroblasts contribute to but are not necessary for wound contraction. *Lab Invest.* 2015 Dec;95(12):1429-38. doi: 10.1038/labinvest.2015.116.
22. Berry DP, Harding KG, Stanton MR, Jasani B, Ehrlich HP. Human wound contraction: collagen organization, fibroblasts, and myofibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 1998 Jul; 102(1):124-31.
23. Chitturi RT, Balasubramaniam AM, Parameswar RA, Kesavan G, Haris KT, Mohideen K. The Role of Myofibroblasts in Wound Healing, Contraction and its Clinical Implications in Cleft Palate Repair. *J Int Oral Health.* 2015 Mar;7(3):75-80.
24. Díaz-Flores L, Gutiérrez R, Díaz-Flores L Jr, Gómez MG, Sáez FJ, Madrid JF. Behaviour of telocytes during physiopathological activation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016 Jul;55:50-61. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.035.
25. Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Hinz B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. *F1000Res.* 2016 Apr 26;5. pii: F1000 Faculty Rev-752. doi: 10.12688/f1000research.8190.1. eCollection 2016.
26. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol.* 2007 Jun;170(6):1807-16.
27. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(1):103-11.
28. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001; 12(9):2730-41.
29. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg DI, Petridou S. Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *J Cell Biol.* 1996; 93(9):4219-23.

30. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994; 124(4): 401-4.
31. Amadeu TP, Coulomb B, Desmouliere A, Alto Costa AM. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models. *Int J Low Extrem Wounds* 2003; 2(2):60-8.
32. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* 2015 Sep;47:54-65. doi: 10.1016/j.matbio.2015.05.006.
33. Cushing MC, Mariner PD, Liao JT, Sims EA, Anseth KS. Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells. *FASEB J.* 2008 Jun;22(6):1769-77. doi: 10.1096/fj.07-087627.
34. Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A, Mertens PR. Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J Biol Chem.* 2006 Jan 20;281(3):1784-95.
35. Huang T, Schor SL, Hinck AP. Biological activity differences between TGF- β 1 and TGF- β 3 correlate with differences in the rigidity and arrangement of their component monomers. *Biochemistry.* 2014 Sep 16;53(36):5737-49. doi: 10.1021/bi500647d.
36. Duffield JS, Lucher M, Thannickal VJ, Wynn TA. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol.* 2013 Jan 24;8:241-76. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163930.
37. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007 Mar;127(3):526-37.
38. Klingberg, F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *J Pathol.* 2013 Jan;229(2):298-309. DOI:10.1002/path.410.
39. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 2014 Dec;15(12):1243-53. doi: 10.15252/embr.201439246.
40. Yu H1, Mouw JK, Weaver VM. Forcing form and function: biomechanical regulation of tumor evolution. *Trends Cell Biol.* 2011 Jan;21(1):47-56. doi: 10.1016/j.tcb.2010.08.015.
41. Hinz B, Gabbiani G. Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives. *F1000 Biol Reports.* 2010 Nov 11; 2:78. DOI:10.3410/B2-78.
42. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 2001; 159(3):1009-20.
43. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol* 2003; 14(5):538-46.
44. Hinz B. The myofibroblast: Paradigm for a mechanically active cell. *J. Biomech.* 2010 Jan 5. 43(1):146-155.

4. CONCLUSÃO

De acordo com a análise dos resultados dos experimentos, conclui-se que a aplicação tópica de solução de metronidazol em diferentes concentrações provoca aumento no depósito precoce de colágeno tipo I e III, podendo favorecer ou inibir o aparecimento de miofibroblastos e protomiofibroblastos locais conforme a concentração utilizada, contudo, sem influenciar significativamente a evolução da fase de contração durante a cicatrização cutânea por segunda intenção.

REFERÊNCIAS

1. Grinnell F. Fibroblast mechanics in three-dimensional collagen matrices. *J Bodyw Mov Ther.* 2008 Jul;12(3):191-3. doi: 10.1016/j.jbmt.2008.03.005.
2. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 1971 May 15;27(5):549-50.
3. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 May;3(5):349-63.
4. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, et al. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol.* 2012 Apr;180(4):1340-55. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.004.
5. Darby IA, Laverdet B, Bonté F, Desmoulière A. Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:301-11. doi:10.2147/CCID.S50046.
6. Hinz B. Myofibroblasts. *Exp Eye Res.* 2016 Jan;142:56-70. doi: 10.1016/j.exer.2015.07.009.
7. Cox TR, Erler JT. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech.* 2011;4(2):165-178. doi: 10.1242/dmm.004077.
8. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm.* 2005; 41(1):27-51.
9. Trindade LCT, Biondo-Simões MLP, Sampaio CPP, Farias RE, Pierin RJ, Netto MC. Evaluation of topical metronidazole in the healing wounds process: an experimental study. *Rev Col Bras Cir.* 2010 Oct; 37(5): 358-63.
10. Flanagan M. The physiology of wound healing. *J Wound Care.* 2000; 6(9):299-300.
11. Baum CL, Arpey CJ. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg.* 2005; 31(6):674-86.
12. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol.* 2015 Sep;47:54-65. doi: 10.1016/j.matbio.2015.05.006.
13. Law JX, Musa F, Ruszymah BH, El Haj AJ, Yang Y. A comparative study of skin cell activities in collagen and fibrin constructs. *Med Eng Phys.* 2016 Sep; 38(9):854-61. doi: 10.1016/j.medengphy.2016.05.017.
14. Kurzer GE, Kurzer AS. Reparación de Heridas de Piel y Mucosas. *Rev Fac Odontol Univ. Antiquoa.* 1999; 11(1):5-14.
15. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43. doi: 10.1159/000339613.

16. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol.* 2003 Aug; 78(4):393-410.
17. Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An Bras Dermatol.* 2003 Oct; 78(5):521-2.
18. Dooley S, Said HM, Gressner AM, Floege J, En-Nia A, Mertens PR. Y-box protein-1 is the crucial mediator of antifibrotic interferon-gamma effects. *J Biol Chem.* 2006 Jan 20;281(3):1784-95.
19. Sampaio CPP, Biondo-Simões MLP, Trindade LCT, Farias RE, Pierin RJ, Martins RC. Inflammatory alterations provoked by metronidazole in wounds: an experimental study in rats. *J. Vasc. Bras.* 2009; 8(3): 232-7.
20. Thakral KK, Goodson WH 3rd, Hunt TK. Stimulation of wound blood vessel growth by wound macrophages. *J Sur Res.* 1979; 26(4):430-6.
21. Martin P. Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997; 276(5309):75-81.
22. Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res.* 2005; 1(304):274-86.
23. Santos MJ, Vianna LAC, Gamba MA. Avaliação da eficácia da pomada de própolis em portadores de feridas crônicas. *Acta Paul Enferm.* 2007; 20(2):199-204.
24. 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):208-13.
25. Darby I, Skalli O, Gabbiani G. Alpha-Smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990;63(1):21-9.
26. Grinnell F. Fibroblasts, Myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biology.* 1994; 124(4):401-4.
27. Hinz B, Mastrangelo D, Iselin CE, Chaponnier C, Gabbiani G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol.* 2001; 159(3):1009-20.
28. Hinz B, Gabbiani G. Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts. *Curr Opin Biotechnol.* 2003; 14(5):538-46.
29. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(9):2730-41.
30. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2011 Jun;92(3):158-67. doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00764.x.
31. Lindmark DG, Müller M. Antitrichomonad action, mutagenicity and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976; 10(3):476-82.

32. Edwards DI, Dye M, Carne H. The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclic drugs. *J Gen Microbiol.* 1973; 76(1):135-45.
33. O'Brien RW, Morris JG. Effect of metronidazole on hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol.* 1972; 84(3):225-33.
34. Ingham HR, Selkon JB, Hale JH. The antibacterial activity of metronidazole. *J Antimicrob Chemother.* 1975; 1(4):355-61.
35. Koch-Weser J, Goldman P. Drug therapy: Metronidazole. *N Engl J Med.* 1980; 303(21):1212-8.
36. Miotti A. Metronidazole in dentistry. *Riv Ital Stomatol.* 1982; 51(4):373-5.
37. Mitchell DA. Metronidazole: its use in clinical dentistry. *J Clin Periodontol.* 1984; 11(3):145-58.
38. Stoltze K, Stellfeld M. Systemic absorption of metronidazole after application of a metronidazole 25% dental gel. *J Clin Periodontol.* 1992; 19(9 Pt 2):693-7.
39. Elewski BE. Percutaneous absorption kinetics of topical metronidazole formulations in vitro in the human cadaver skin model. *Adv Ther.* 2007; 24(2):239-46.
40. Ashford R, Plant G, Maher J, Teare L. Double-blind trial of metronidazole in malodorous ulcerating tumours. *Lancet.* 1984; 1(8388):1232-3.
41. Bower M, Stein R, Evans TR, Hedley A, Pert P, Coombes RC. A double-blind study of the efficacy of metronidazole gel in the treatment of malodorous fungating tumours. *Eur J Cancer.* 1992; 28A(4-5):888-9.
42. Poletti NAA, Caliri MHL, Simão CDST, Juliani KB, Tácito VE. Feridas malignas: uma revisão de literatura *Rev Bras Cancerol.* 2002; 48(3):411-7.
43. Paul JC, Pieper BA. Topical metronidazole for the treatment of wound odor: a review of the literature. *Ostomy Wound Manage.* 2008; 54(3):18-27.
44. Da Costa Santos CM, De Mattos Pimenta CA, Nobre MR. A systematic review of topical treatments to control the odor of malignant fungating wounds. *J Pain Symptom Manage.* 2010 Jun;39(6):1065-76. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2009.11.319.
45. Kalinski C, Schnepf M, Laboy D, Hernandez L, Nusbaum J, McGrinder B, Comfort C., Alvarez OM. Effectiveness of a topical formulation containing metronidazole for wound odor and exudate control. *Wounds [serial on the Internet].* 2005 [cited 2009 Apr 26]; 1(4). Disponível em, URL: <http://www.woundsresearch.com/article/3950>.
46. Von Gruenigen VE, Coleman RL, Li AJ, Heard MC, Miller DS, Hemsell DL. Bacteriology and treatment of malodorous lower reproductive tract in gynecologic cancer patients. *Obstet Gynecol.* 2000;1(96):23-7.
47. Gethin G, Grocott P, Probst S, Clarke E. Current practice in the management of wound odour: an international survey. *Int J Nurs Stud.* 2014 Jun;51(6):865-74. doi: 10.1016/j.ijnurstu.2013.10.013.
48. Sharp PE, LaRegina MC. The laboratory rat. Washington. CRC Press. 1998; p. 103, 112.

49. Junqueira LC, Bignolas G, Bretani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979;11(4):447-55.

NORMAS ADOTADAS

Normativa de Vancouver: Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals do International Committee of Medical Journal Editors (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.

APÊNDICES

APÊNDICE 1: MAPEAMENTO IMUNOISTOQUÍMICA	62
APÊNDICE 2: EXEMPLOS DE AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	63

APÊNDICE 1: MAPEAMENTO IMUNOISTOQUÍMICA

Lâmina 01 - Controle e Experimento 4% Dia 3					Lâmina 02 - Experimento 6% e 8% Dia 3				
D3 C 4%	A	B	C	D	D3 6%8%	A	B	C	D
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		

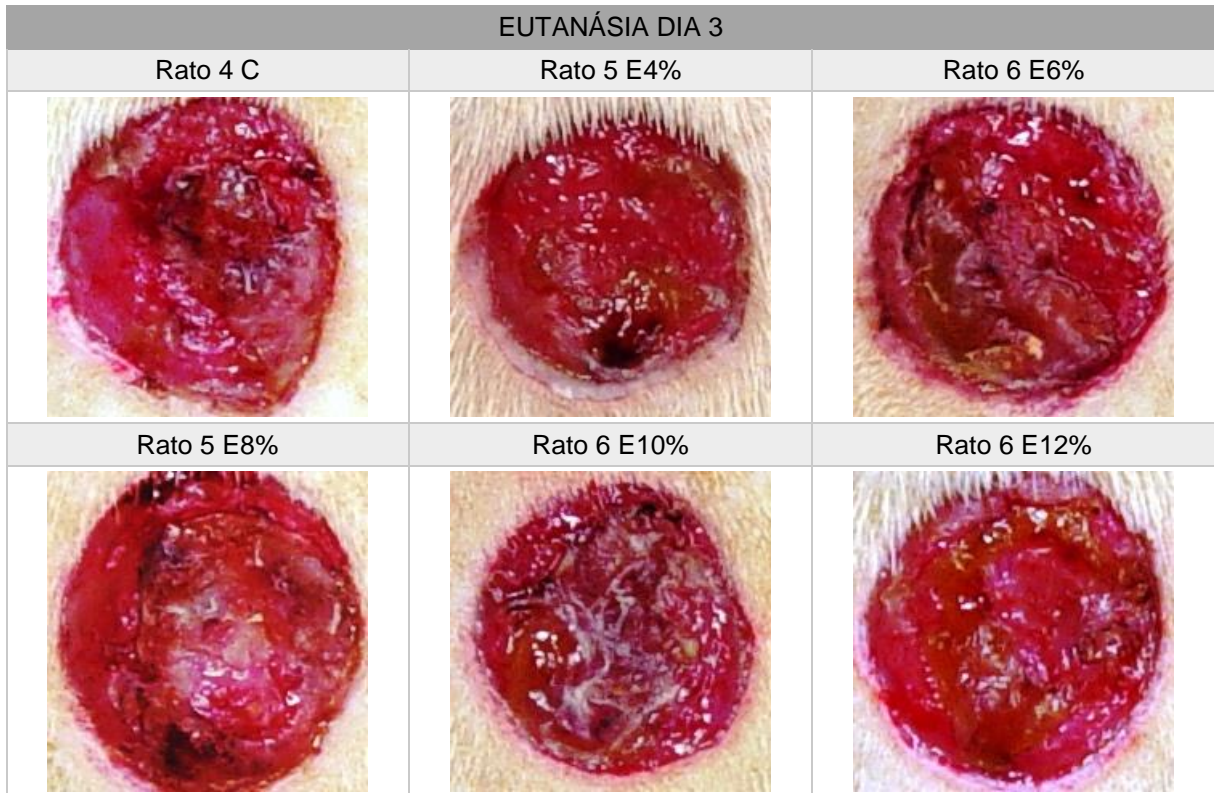
Lâmina 03 - Experimento 10% e 12% Dia 3					Lâmina 04 - Controle e Experimento 4% Dia 7				
D310%12%	A	B	C	D	D7 C 4%	A	B	C	D
1	D3 10%1	D3 10% 2	D3 10% 3	D3 10%4	1	D7 C 1	D7 C2	D7 C3	D7 C4
2	D3 10%5	D3 10% 6			2	D7 C5	D7 C6		
3	D3 12%1	D3 12%2	D3 12%3	D3 12%4	3	D7 4%1	D7 4%2	D7 4%3	D7 4%4
4	D3 12%5	D3 12%6			4	D7 4%5	D7 4%6		

Lâmina 05 - Experimento 6% e 8% Dia 7					Lâmina 06 - Experimento 10% e 12% Dia 7				
D7 6%8%	A	B	C	D	D7 10%12%	A	B	C	D
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		

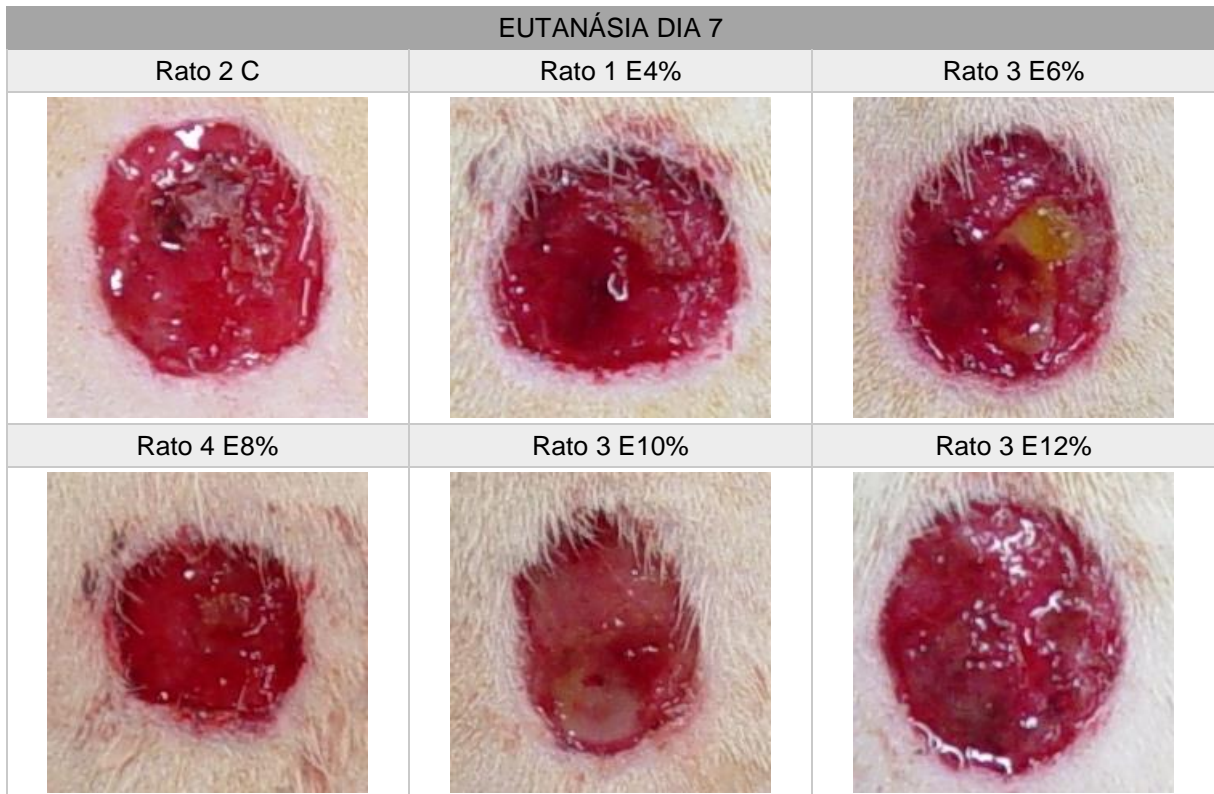
Lâmina 07 - Controle e Experimento 4% Dia 14					Lâmina 08 - Experimento 6% e 8% Dia 14				
D14 C 4%	A	B	C	D	D14 6%8%	A	B	C	D
1	D14 C1	D14 C2	D14 C3	D14 C4	1	D14 6%1	D14 6%2	D14 6%3	D14 6%4
2	D14 C5	D14 C6			2	D14 6%5	D14 6%6		
3	D14 4%1	D14 4%2	D14 4%3	D14 4%4	3	D14 8%1	D14 8%2	D14 8%3	D14 8%4
4	D14 4%5	D14 4%6			4	D14 8%5	D14 8%6		

Lâmina 09 - Experimento 10% e 12% Dia 14				
D14 10%12%	A	B	C	D
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		

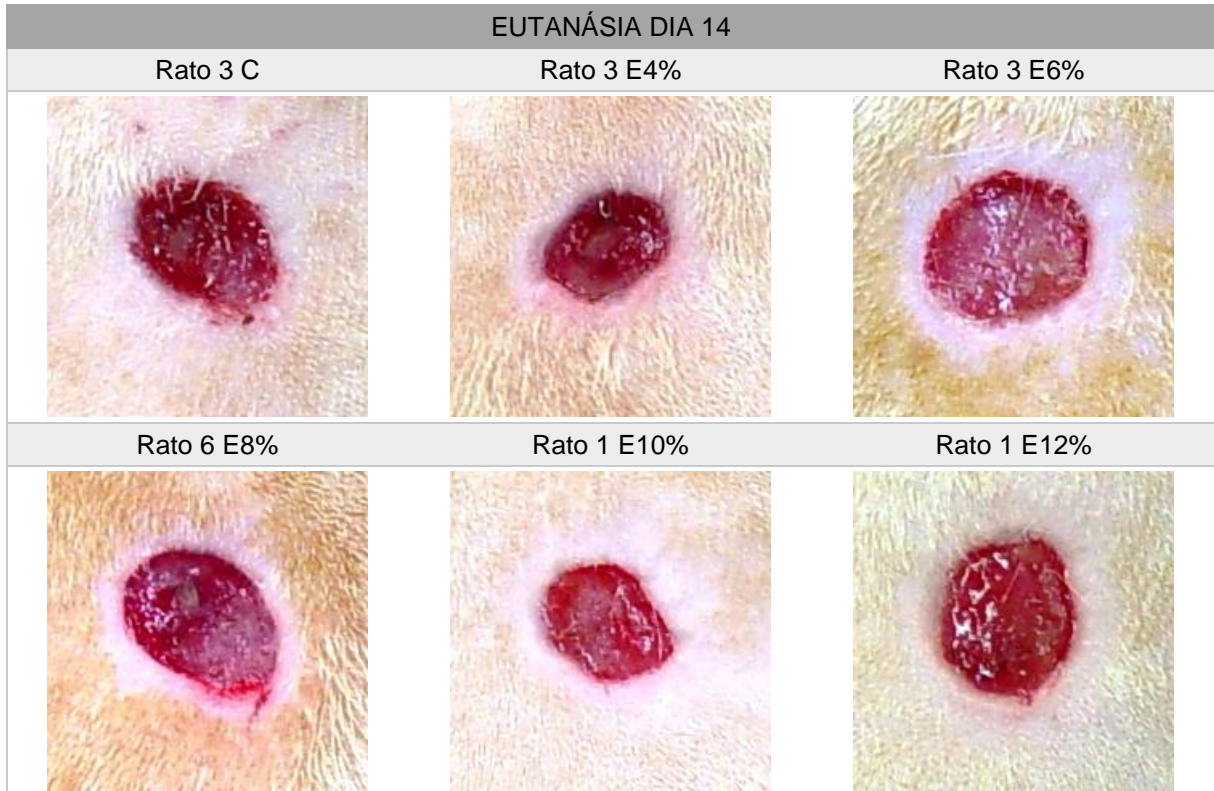
APÊNDICE 2: EXEMPLOS DE AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA



QUADRO 1 - EXEMPLOS MACROSCÓPICOS DAS FERIDAS DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTO NA AVALIAÇÃO DO TERCEIRO DIA
 FONTE: A autora (2015)



QUADRO 2 - EXEMPLOS MACROSCÓPICOS DAS FERIDAS DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTO NA AVALIAÇÃO DO SÉTIMO DIA
 FONTE: A autora (2015)



QUADRO 3 - EXEMPLOS MACROSCÓPICOS DAS FERIDAS DOS GRUPOS CONTROLE E EXPERIMENTO NA AVALIAÇÃO DO DÉCIMO QUARTO DIA
 FONTE: A autora (2015)

ANEXOS

ANEXO 1: PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA.....	66
ANEXO 2: DESCRIÇÃO DA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA REALIZADA..	68
ANEXO 3: ANTICORPO DAKO M0851 PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO...	69

ANEXO 1: PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

PUCPR

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

ANEXO 3: ANTICORPO DAKO M0851 PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

 	
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4 Code No./ Code/ Code-Nr. M0851	
ENGLISH	
Intended use	<p>For in vitro diagnostic use.</p> <p>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.</p>
Introduction	<p>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 50-80% homology in their 18 N-terminal residues. The N-terminal region appears to be a major antigenic region (4). There are different α isoforms specific for muscle tissues, i.e. skeletal muscle α, cardiac muscle α, and smooth muscle α, respectively (1). The β- and γ-actins may be present in muscle cells as well as most other cell types in the body, including non-muscle cells (5).</p>
Reagent provided	<p>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 Na₂S₂O₃.</p> <p><u>Clone:</u> 1A4. The 1A4 clone is identical to the anti-asm-1 described in (4). <u>IsoType:</u> IgG2a, kappa.</p> <p><u>Mouse IgG concentration:</u> see label on vial.</p>
Immunogen	<p>N-terminal synthetic decapeptide of α-smooth muscle actin coupled to keyhole limpet haemocyanin (KLH) (4).</p>
Specificity	<p>In Western blotting and SDS-PAGE immunoblotting of the α-smooth muscle isoform of actin, the antibody labels a band corresponding to α-smooth muscle actin (4).</p> <p>As demonstrated by Western blotting and/or immunocytochemistry, the antibody cross-reacts with the α-smooth muscle actin-equivalent protein in chicken, cow and rat (4).</p>
Precautions	<ol style="list-style-type: none"> For professional users. This product contains sodium azide (NaN₃), 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. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.
Storage	<p>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.</p>
Specimen preparation	<p><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.</p> <p><u>Frozen sections and cell preparations:</u> The antibody can be used for labelling acetone-fixed, frozen sections (1).</p>
Staining procedure	<p><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. S0809. Positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimen.</p> <p><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.</p> <p><u>Automation:</u> The antibody is well-suited for immunocytochemical staining using automated platforms, such as the DakoCytomation Autostainer.</p>
Performance characteristics	<p>Cells labelled by the antibody display a cytoplasmic staining pattern.</p> <p><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).</p>
(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>Abnormal tissues: 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>	
FRANÇAIS	
Intérêt	<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>
Introduction	<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 α spécifiques des tissus musculaires, par exemple α actine des muscles squelettiques, α actine du muscle cardiaque et α actine des muscles lisses, respectivement (1). Les actines β- et γ- 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>
Réactif fourni	<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 Na₂S.</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>
Immunogène	Décapéptide synthétique N-terminal d' α actine du muscle lisse couplé à de l'hémocyanine de patelle (KLH) (4).
Spécificité	<p>Lors d'analyses par Western blot ou SDS-PAGE de l'isoforme α-muscle lisse de l'actine, l'anticorps marque une bande correspondant à l'actine α-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'α-actine du muscle lisse chez le poulet, la vache et le rat (4).</p>
Précautions d'emploi	<ol style="list-style-type: none"> Pour utilisateurs professionnels. Ce produit contient de l'azide de sodium (Na₂S), 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. Comme pour tout dérivé biologique dangereux à manipuler, une précision s'impose. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau. Les solutions inutilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.
Stockage	<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>
Préparation de l'échantillon	<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>
Procédure d'immunomarquage	<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>
Performances	<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>	
DEUTSCH	
Zweckbestimmung	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.
Einleitung	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 α -Isoformen, die für Muskelgewebe spezifisch sind, d. h. Skelettmuskel- α , Herzmuskel- α beziehungsweise Glattmuskel- α (1). Die β - und γ -Actine können in Muskelzellen ebenso wie in den meisten weiteren Zelltypen des Körper vorliegen, einschließlich von nicht zum Muskelgewebe gehörenden Zellen (5).
Geliefertes Reagenz	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 ₃ . <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.
Immunogen	An KLH (keyhole limpet haemocyanin) gekoppeltes N-terminales synthetisches Decapeptid des α -Glattmuskel-Actin (4).
Spezifität	Beim Western-Blott und SDS-PAGE-Immun-Blotting der α -Glattmuskel-Isoform des Actin markiert der Antikörper eine Bande, die dem α -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 α -Glattmuskel-Protein eingeht (4).
Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	1. Für geschultes Fachpersonal. 2. Dieses Produkt enthält Natrium-Azid (NaN ₃), 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.
Lagerung	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.
Probenvorbereitung	<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 Gewebeprobereitung mit Proteinase K zur Zerstörung des Epitops führt. Während der Gewebeprobereitung 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).
Färbeprozedur	<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.
Leistungseigenschaften	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 α -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

 REF	Catalogue number Référence du catalogue Bestellnummer	 2°C - 8°C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich	 Manufacturer Fabricant Hersteller
 IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-Vitro-Diagnostikum	 LOT	Batch code Code du Lot Chargenbezeichnung	
 i	Consult instructions for use Consulter les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten		Use by Utiliser jusque Verwendbar bis	

ANEXO 4: CERTIFICADO DE ANÁLISE DO METRONIDAZOL

6014

1 xcf

CERTIFICADO DE ANÁLISE
#####

PRODUTO... METRONIDAZOL BASE EMISSAO...: 07/12/10
FABRIC...: 01/12/09 PROCED...: CHINA N.FISCAL...: 058562
VALIDADE...: 01/12/13 ORIGEM...: CHINA
LOTE FAB/INTERNO...: 09120101

NOME DO PRODUTO: METRONIDAZOL
FORMULA MOLECULAR: C6H9N3O3
PESO MOLECULAR: 171.2
CAT. TERAPEUTICA: ANTIPROTOZOARIO (TRICAMONAS)
D.C.B.: 5902 (METRONIDAZOL)
FABRICANTE: HUBEI HONGYUAN PHARMACEUTICAL


BOLETIM DE ANALISE: G 228/10 DATA DE ANALISE: 04/03/10 No OP:12.361/10

TESTES	ESPECIFICACOES	RESULTADOS
*~****	*****	*****
ASPECTO FISICO:	PO CRISTALINO BRANCO OU AMARELADO	DE ACORDO
SOLUBILIDADE:	POUCO SOLUVEL EM AGUA, ACETONA, ETANOL E EM CLORETO DE METILENO.	DE ACORDO
FAIXA DE FUSAO:	159oC A 163oC	160-161.5oC
IDENTIFICACAO:	IR/FAIXA DE FUSAO/UV/AMINAS AROMATICAS PRIMARIAS	DE ACORDO
PERDA POR SECAGEM:	MAX. 0.5%	0.08%
RESIDUO POR IGNIÇÃO:	MAX. 0.1%	0.05%
METAIS PESADOS:	MAX. 20 PPM	< 20 PPM
**TAMANHO DA PARTICULA:	40 - 60MESH	DE ACORDO
+SOLVENTES RESIDUAIS:	ETANEDIOL MAX. 620PPM	190PPM
APARENCIA DA SOLUÇÃO:	A SOLUÇÃO NAO E MAIS OPALESCENTE QUE A SUSPENSÃO II, E NAO E MAIS INTENSAMENTE COLORIDA QUE A SOLUÇÃO REFERENCIA GY 6	DE ACORDO
SUBST. RELATADAS:	IMPUREZA MAX. 0.1%	< 0.1%
	IMPUREZAS TOTAIS: MAX. 0.2%	< 0.2%
DESEMPENHO METRONIDAZOL:	99,0% A 101,0%	100.75%(B.A)

OBS.: RESULTADOS DE ACORDO COM ANALISES REALIZADAS NO LABORATORIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENIX (BP 2007)
+ TESTES ADICIONAIS REALIZADOS DE ACORDO COM ORIENTAÇÃO DO FABRICANTE (BP2007)
* RESULTADO TRANSCRITO DO LAUDO DE ANALISE DO FABRICANTE
DISPOSIÇÃO: APROVADO

Dra. LUCIANA PEREIRA
FARM. RESP. CRF-GO No 2400

SERVIÇO DE ATENDIMENTO GENIX: sag@genix.ind.br 08007715008



Genix Indústria Farmacêutica Ltda
V.P. - 1-E, Quadra 03, Módulo 01 e 02, DAIA - Anápolis - GO
CEP 75132-040 Fone: (62) 4014 9000 Fax: (62) 4014 9001
e-mail: genix@genix.ind.br

T833 Trindade, Lilian Cristine Teixeira.

Cicatrização cutânea por segunda intenção: influência da aplicação tópica de diferentes concentrações de metronidazol sobre a diferenciação fibroblástica e maturação colágena locais / Lilian Cristine Teixeira Trindade. -- Curitiba, 2016.

73 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a 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. Fibroblastos. 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