

QUANTIFICAÇÃO DE FIBRAS COLÁGENAS COM COLORAÇÃO DE PICROSÍRIUS RED EM FERIDAS CUTÂNEAS ABERTAS TRATADAS COM JUCÁ (*Caesalpinia ferrea* Mart exTul)

ALANA HIJANO¹; SERGIANE BAES PEREIRA¹; CHARLES LIMA², CICIANE PEREIRA MARTEN FERNANDES³; ANTONIO SERGIO VARELA⁴, MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁵

¹Graduanda em Medicina Veterinária/ UFPel – alana.hijano@hotmail.com

²Residente do Hospital de Clínicas Veterinária HCV/ UFPel

³Doutoranda Programa de Pós-Graduação em Veterinária/ UFPel

⁴Professor Universidade Federal do Rio Grande/ FURG

⁵Professor Universidade Federal de Pelotas/ UFPel

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno de cicatrização é um evento que ocorre para a solução da descontinuidade da pele, sendo didaticamente dividido nas fases inflamatória, de reparação e de maturação (MCNEES, 2006). Na fase de inflamação ocorre fagocitose de sujidades e microrganismos, na fase de reparação ocorre a formação do tecido de granulação, que enquanto na fase de maturação o tecido de granulação é substituído por tecido epitelial imaturo. Para a formação deste tecido é necessário haver uma proliferação dos fibroblastos, que sintetizarão colágeno, responsável pela resistência da cicatriz (WITTE & BARBUL, 1997).

A planta jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart exTul) é uma árvore leguminosa (BRAGANÇA 1996) encontrada em várias regiões do Brasil, sendo utilizada a casca, o fruto e a raiz com fins terapêuticos (OLIVEIRA et al., 2010), despertando o interesse dessa planta para estudos biotecnológicos e farmacológicos (XIMENES, 2004).

Considerando que a cicatrização de feridas é um processo complexo e os insucessos relacionados ao tratamento continuam sendo um problema clínico importante há um crescente interesse em produtos medicinais naturais que auxiliem no processo de cicatrização, portanto objetivou-se quantificar e caracterizar as fibras colágenas para classificação do colágeno em tipo I e tipo III em feridas cutâneas abertas em ratos tratadas com *Caesalpinia ferrea* Mart exTul.

2. METODOLOGIA

Para realização do experimento foram utilizados 15 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, fêmeas, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UFPel, mantidos em caixas específicas conforme as condições de bem-estar animal. O trabalho foi aprovado pela comissão de ética e bem estar animal da UFPel, CEEA nº 8525.

Para realização das feridas cutâneas, os animais foram submetidos ao protocolo anestésico com atropina 5mg/kg por via subcutânea e associação de xilazina (10 mg/kg) e quetamina (100mg/kg) por via intramuscular. Após a anestesia foi realizada tricotomia com limpeza da pele com álcool etílico hidratado 70° e realização de duas incisões paralelas a coluna vertebral do animal com *punch* número 8.

Os animais foram divididos em três grupos aleatoriamente, sendo cada um deles com 5 animais. O grupo controle recebeu o tratamento de 0,1 ml de vaselina e grupo J20 e J50 pó de *Caesalpinia férrea* Mart exTul (jucá) diluídos em veículo vaselina nas concentrações de 20% e 50% respectivamente. Os tratamentos eram realizados imediatamente após a realização das lesões e em intervalos de 24 horas durante todo o período experimental. Aos 21 dias de experimento realizou-se a eutanásias dos animais (Resolução nº 1000 de 12 de maio de 2012 do CFMV) para avaliação de colágeno.

Para o estudo histológico das fibras colágenas, as 10 amostras de cada grupo de tratamento, foram coletadas através de biopsia excisional da área cicatricial e acondicionadas em frascos contendo solução de formol a 10%. Os tecidos foram inclusos em parafina e cortados com 5 μ de espessura e submetidos a coloração por Picrosirius red e tricômio de Masson. Na coloração de Picrosirius red foi utilizada microscopia polarizada para definir a presença de colágeno tipo I e tipo III, sendo as fibras de colágeno tipo I identificadas em vermelho intenso e fibras de colágeno tipo III identificadas com a coloração verde. Na coloração de Masson, o colágeno é observado pela coloração em azul, porém não é possível observar a diferenciação entre os tipos de colágenos (I e III). Para caracterização do tipo de colágeno e sua quantificação nas amostras foi utilizado o programa ImageJ®, sendo utilizado a ferramenta *k-means clustering*, que permite a segmentação de cores (Red, Green e Blue – RGB) obtendo-se a média de *pixels* de cada cor (Miot; Brianezi, 2010, BENEDETTI, 2013). Para avaliação dos dados utilizou-se teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, utilizando programa Statistics 9.0

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação ao colágeno maduro (tipo I) observou-se que os grupos J20%, J50% e controle apresentaram respectivamente a média de 21,2, 18,9 e 19,5 de pixels de coloração vermelha, tendo todos os grupos a mesma quantidade de colágeno maduro, sem apresentar diferença estatística entre os grupos ($p=0,5643$) (Fig. 1). Em relação ao colágeno imaturo (tipo III) o grupo J20% apresentou maior média de pixels de coloração verde (7,5) em relação aos grupos J50% (5,2) e controle (4,9) com diferença estatística ($p=0,0034$).

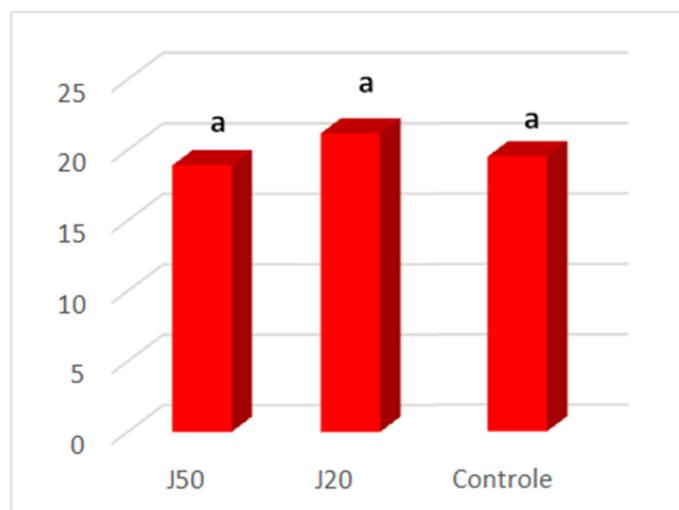


Figura 1- Quantificação das fibras de colágeno tipo I através da coloração de Picrosirius red.

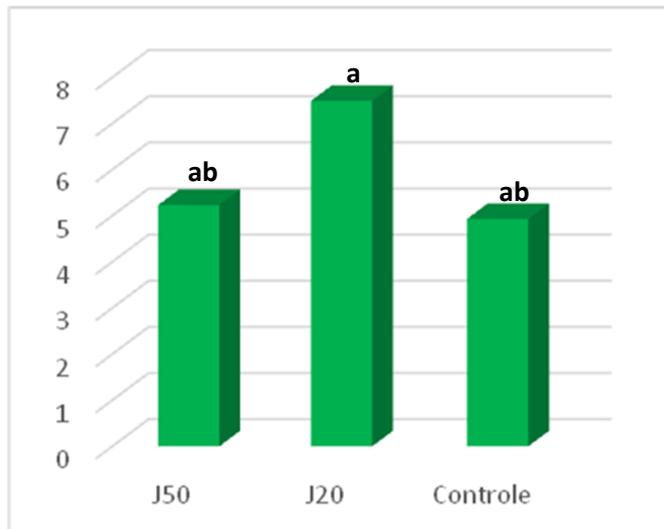


Figura 2 - Quantificação das fibras de colágeno tipo III através da coloração de Picrosirius red.

O colágeno do tipo I é a fibra colágena mais densa e mais abundante, fornecendo uma alta resistência à pele (ROCHA, 2004). Esta resistência é dada pela quantidade de colágeno depositada e pela forma como as fibras estão organizadas (BALBINO et al., 2005). O colágeno tipo III está presente em locais que resiste a grandes pressões e em lesões recentes, que conforme o amadurecimento do processo cicatricial esse tende a desaparecer (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Pelos resultados obtidos no estudo, os grupos tratados com jucá apresentaram resultados similares ao grupo controle na estimulação e produção de colágeno tipo I. Em relação ao colágeno imaturo (tipo III), o grupo J20% apresentou maior estimulação em relação aos demais grupos, sendo importante esse tipo de colágeno para permitir a reformulação do colágeno em tipo I e fornecer uma cicatriz mais resistente. Estudos fitoquímicos avaliando a composição do jucá (Oliveira et al., 2010) foi observado a presença de taninos, que possivelmente podem agir estimulando a mitose celular (SANCHEZ NETO et al., 1993) aumentando a produção de fibras colágenas.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se com o presente estudo que feridas tratadas com *Caesalpinia ferrea* Mart exTul. a 20 e 50% apresentam resultados similares ao grupo controle na caracterização do colágeno tipo I e com colágeno tipo III apresentam melhor resultado na concentração de 20%.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, p27-51, 2005.

BENEDETTI, L. **Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de Spot Tests**. 2013. 94 f.

Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2013.

BRAGANÇA, L.A.R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: EDUFF, 1996. 300p.

GEBARA, K. S.; FIORATTI, A. B.; GUZZO, F. C. B.; GIOLO, M. P.; REZENDE, J. R.; FRANCO, S. L. Estudo da viabilidade de utilização do óleo de canola em formas farmacêuticas de aplicação tópica. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC** - Fortaleza, CE, 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004

MCNEES, P. Skin and wound assessment and care in oncology. **Seminars in Oncology Nursing**, Pensilvânia, v.22, p. 130-143, 2006.

OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Planta Médica**, Botucatu, v12, n.3, p.302-310, 2010.

ROCHA, J.C.T. Terapia laser, cicatrização tecidual e angiogenese. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.17, p 44-48, 2004.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVES, D. C.; SIMÕES, M. J.; NOVO, N. F.; JULIANO, Y. – Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta Cir. Bras.**, 8(1);18-23, 1993

WITTE, M.B., BARBUL, A. Princípios gerais da cicatrização das feridas. In: BARBUL, A. **Clínicas Cirúrgicas da América do Norte**. Rio de Janeiro : Interlivros, 1997. V.3, p.509-527.

XIMENES, N.C.A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem da *Caesalpinia ferrea* (CfePL): aplicação biológica**. 2004. 53p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica - Departamento de Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife.