

Distribuição ultraestrutural de colágeno tipo IV em feridas experimentais após tratamento com papaína

Ultrastructural distribution of type IV collagen in experimental wounds after treatment with papaine

Lacy Cardoso de Brito Júnior¹ , Ian Eliezer Levy² 

RESUMO

Modelo do estudo: Experimental. **Objetivo:** Investigar a distribuição de fibras colágeno tipo IV, por microscopia eletrônica de transmissão, em feridas experimentais tratadas com soluções de papaína. **Metodologia:** Ratos Wistar (n=18), machos, adultos, foram submetidos a procedimento cirúrgico para a retirada de seção quadrada de pele da região cervical, e posteriormente separados em dois grupos: Grupo I (n = 9), sem tratamento; e Grupo II (n = 9), tratado com soluções de papaína a 10% (até o 7º dia), 6% (do 8º ao 14º dia) e 4% (do 15º ao 21º dia). Todos os animais foram sacrificados com 7, 14 e 21 dias, e as áreas lesadas retiradas, lavadas em PBS e fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído recém preparado, em solução tamponada contendo 60 mM Pipes, 20 mM HEPES, 10 mM etilenoglicol-bis- (B-aminoetiléter) - Ácido N, N, N'-tetraacético, KCl 70 mM e MgCl₂ 5 mM pH 7,2 por 1h; pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM; desidratados em acetona graduada e embebidos em Epon® para confecção de seções finas, coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo, e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss LEO EM 906 (TEM). **Resultados:** A distribuição das fibras colágeno tipo IV das lesões tratadas com papaína (Grupo II), com 14 e 21 dias, mostraram-se mais organizadas que as fibras do Grupo I. **Conclusões:** A papaína mostrou-se um importante facilitador para a organização de fibras colágeno tipo IV em feridas experimentais.

Palavras-chave: Cicatrização de Feridas; Papaína; Úlcera; Epidemiologia Experimental; Colágeno Tipo IV.

ABSTRACT

Study model: Experimental. **Objective:** Investigate the distribution of type IV collagen fibers by transmission electron microscopy, in experimental wounds treated with papaine solutions. **Methodology:** Adult male Wistar rats (n = 18) underwent a surgical procedure to remove a square section of skin from the cervical region, and then separated into two groups: Group I (n = 9), without treatment; and Group II (n = 9), treated with papain solutions of 10% (up to the 7th day), 6% (from the 8th to the 14th day) and 4% (from the 15th to the 21st day). All animals were sacrificed at 7, 14 and 21 days, and the injured areas removed, washed in PBS, and fixed in 2.5% glutaraldehyde, 4% freshly prepared formaldehyde in buffered solution containing 60 mM Pipes, 20 mM HEPES, 10 mM ethyleneglycol-bis- (B-aminoethylether) -N, N, N'-tetraacetic acid, 70 mM KCl, and 5 mM MgCl₂ pH 7.2 for 1h; post-fixed in solution containing 1% osmium tetroxide, 0.8% ferrocyanide, and 5 mM calcium chloride; dehydrated in graduated acetone and soaked in Epon® to make thin sections stained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Zeiss LEO EM 906 (TEM) transmission electron microscope. **Results:** The distribution of type IV collagen fibers from papaine-treated lesions (Group II) at 14 and 21 days was more organized than Group I fibers. **Conclusions:** Papaine has proven to be an important facilitator for the organization of type IV collagen fibers in experimental wounds.

Keywords: Wound Healing; Papaine; Ulcer; Epidemiology, Experimental; Collagen Type IV.

1. Resp. pelo Lab. de Patologia Geral - Imunopatologia e Citologia, Biomédico, Prof. Dr. Associado II, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém (PA), Brasil.

2. Biomédico, Especialista em Hematologia Clínica com ênfase em Citologia Hematológica, UFPA, Belém (PA), Brasil.

✉ Lacy Cardoso de Brito Junior. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Lab. de Patologia Geral - Imunopatologia e Citologia. Av. Augusto Corrêa, 01 - Bairro Guamá. CEP: 66075-900. Belém (PA), Brasil. lcdbrito@ufpa.br
lcdbrito2@gmail.com | Recebido em: 08/11/2019 | Aprovado em: 02/06/2020



INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização tecidual pode ser dividido didaticamente em quatro fases: (1) a fase de coagulação, de início imediato ao trauma e que se caracteriza pela formação de um tampão hemostático primário (crosta hemato-fibrinosa); (2) a fase inflamatória, responsável pelas alterações vasculares e de influxo de células inflamatórias para o sítio da lesão; (3) a fase de proliferação tardia, caracterizada pela proliferação das células endoteliais dos vasos sanguíneos (angiogênese), fibroblastos e pela produção de matriz colágeno que levam a formação do tecido de granulação; e (4) a fase reparadora, responsável pela proliferação das células epiteliais, remodelação tecidual e pela substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo denso com recomposição da epiderme¹⁻⁶.

O sucesso do processo de cicatrização, porém, depende de fatores locais, como a extensão da lesão e a quantidade de tecido necrótico, e de fatores sistêmicos. Assim, em situações em que a lesão apresenta excesso de tecido necrótico torna-se necessária a utilização de substâncias capazes de debridar e auxiliar na reconstituição tecidual como a papaína, uma enzima proteolítica complexa de origem vegetal constituída por 17 aminoácidos diferentes e pode ser encontrada comercialmente sob as formas liofilizada, em géis ou cremes⁷⁻¹⁴. Contudo, o uso destas substâncias não garante o sucesso do processo de cicatrização¹⁵⁻²².

Dentre as ações benéficas da papaína no tratamento de feridas, podemos destacar sua capacidade antiinflamatória, bactericida, bacteriostática, debridante do tecido necrosado e, aceleradora e modeladora do tecido de granulação^{8,10,11,12,13,21,22,23}. Como desvantagens ao uso dessa enzima, destacam-se sua baixa estabilidade quando exposta a agentes oxidantes, a íons de ferro, ou a luminosidade intensa por longos períodos¹⁰⁻¹³.

Assim, objetivo deste estudo foi mostrar a distribuição de fibras colágeno tipo IV, por microscopia eletrônica de transmissão, em feridas experimentais tratadas com soluções de papaína em diversas concentrações.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais de experimentação

Foram utilizados 18 ratos (Wistar), machos, com peso entre 200 g e 250 g, oriundos do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Esses animais foram separados em gaiolas individuais com livre acesso à água e dieta padrão e posteriormente divididos ao acaso em dois grupos: Grupo I (n= 9) formado por animais que passaram por procedimento cirúrgico e não receberam nenhum tipo de tratamento (grupo controle); e Grupo II (n=9) formado por animais que foram submetidos a procedimento cirúrgico e tratamento com papaína.

Procedimento Cirúrgico

Todos os animais foram anestesiados com 100 ml quetamine e Xilazina Kg/peso (i.p.), imobilizados em decúbito ventral, tricotomizados na região dorsal (1,5 cm abaixo do pavilhão auricular na região cervical), submetidos a assepsia dessa área com álcool 70% e posterior procedimento cirúrgico com bisturi para a retirada de uma seção quadrada de aproximadamente 1,5 cm X 1,5 cm de pele, até a exposição da fáscia muscular. Cessados os efeitos da anestesia os animais foram novamente acondicionados em gaiolas individuais com alimentação e água *ad libitum*.

Preparação das soluções de Papaína

As soluções de papaína foram preparadas para as concentrações de 4% (2 g/50 ml), 6% (3 g/50 ml) e 10% (5 g/50 ml) em água destilada deionizada através do uso de papaína liofilizada 6.000 UI/MG (certificada) proveniente da Índia (lote de fabricação EXC280212).

Tratamento das Lesões

Os animais do Grupo II foram tratados, uma vez ao dia, com solução de papaína a 10% pelos

primeiros sete dias pós-cirurgia, com solução de papaína a 6% no período entre o 8º e o 14º dia e com solução de papaína a 4% no período entre o 15º e o 21º dia, sendo utilizados como critérios para a variação das concentrações de papaína dados da literatura^{15,16,18,20,21,26,27,28} e as características macroscópicas das lesões, isto é, presença ou não de tecido necrosado, crosta hemato-fibrinosa, processo inflamatório, tecido de granulação e distanciamento das bordas da lesão.

Sacrifícios dos animais

Todos os animais dos Grupos I e II foram anestesiados com 350 ml quetamine e Xilazina Kg/peso (i.p.) e, posteriormente, submetidos a deslocamento cervical com 07, 14 e 21 dias pós-cirurgia para avaliação do processo de cicatrização tecidual de acordo com o tratamento adotado.

Estudo Histológico

Todas as áreas das lesões dos animais dois grupos foram retiradas por procedimento cirúrgico, seccionadas ao meio e separadas para estudo histológico ou de microscopia eletrônica de transmissão. A parte dos fragmentos de pele encaminhada para estudo histológico foi fixada em formol tamponado a 10% por 6 horas, seguido de desidratação em álcool a 70% e posterior processamento histológico padrão para confecção de cortes histológicos de 5m de espessura e coloração com Hematoxilina-eosina, com a avaliação histológica tendo sido realizada através de estudo "duplo cego" em microscópio de luz comum.

Estudo por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Os fragmentos de pele encaminhados para estudo por microscopia eletrônica de transmissão foram lavados em PBS e fixada com 2,5% de glutaraldeído, 4% de formaldeído recém preparado, em solução tamponada contendo 60 mM Pipes, 20 mM HEPES,

10 mM etilenoglicol-bis- (B-aminoetiléter) - Ácido N, N, N'-tetraacético, KCl 70 mM e MgCl₂ 5 mM, pH 7,2; durante 1h a temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram lavados na mesma solução tampão e pós-fixados em solução contendo tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM durante 1 h, desidratados em acetona graduada e embebidos em Epon®. Em seguida, foram feitas secções finas, coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo, para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss LEO EM 906 (TEM).

RESULTADOS

Macroscopicamente as lesões teciduais experimentais dos animais dos grupos I (não tratado) e II (tratados com papaína) obedeceram à mesma sequência de eventos conforme os dias analisados.

A análise histológica das lesões nos animais dos grupos I e II com sete dias pós-cirurgia mostraram a presença de exsudato inflamatório mononuclear difuso e tecido de granulação frouxo (dados não mostrados). E a análise da distribuição das fibras colágeno tipo IV, por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 1) para o mesmo período, mostrou-se semelhante nos grupos I (não tratados) (Figura 1A) e II (tratados com solução de papaína a 10%) (Figura 1B).

Com 14 e 21 dias pós-cirurgia a análise histológica das lesões dos animais dos grupos I (não tratados) e II (tratados com soluções de papaína a 6% e 4%) evidenciou a formação de tecido de granulação e proliferação de células epiteliais (dados não mostrados). Porém, quando esta análise das lesões foi feita com base nos dados obtidos por microscopia eletrônica de transmissão, com 14 (Figura 1C) e 21 (Figura 1E) dias pós-cirurgia, observou-se que os animais do grupo I ainda apresentavam fibras colágeno tipo IV desorganizadas, enquanto as lesões dos animais do grupo II com 14 (Figura 1D) e 21 (Figura 1F) dias pós-cirurgia já apresentavam fibras colágeno tipo IV mais organizadas.

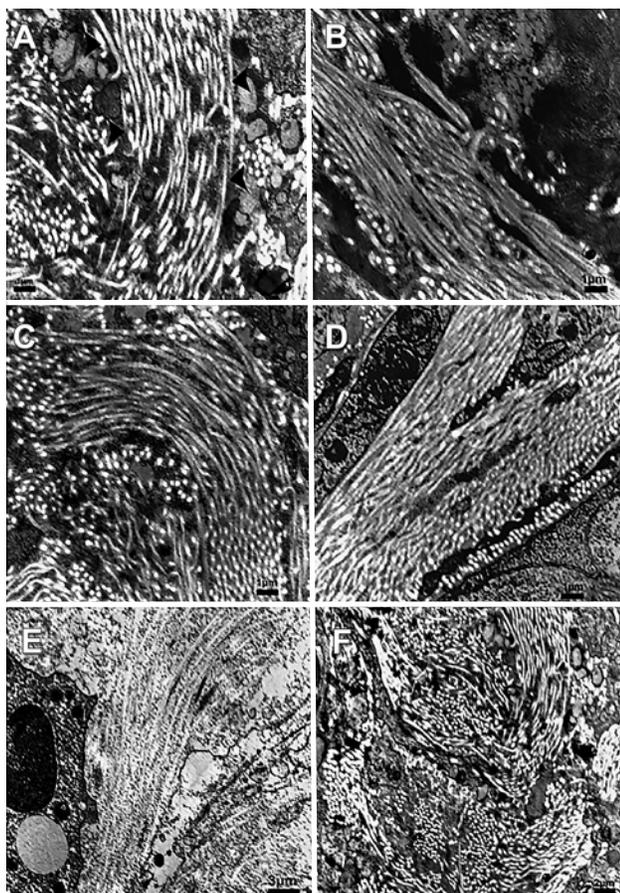


Figura 1: Aspectos ultraestruturais da distribuição das fibras colágeno tipo IV em úlceras experimentais em ratos Wister separados em dois grupos: grupo I (não tratado) com 7 (A), 14 (C) e 21 (E) dias pós-cirurgia; e grupo II tratados com papaína em várias concentrações (10%, 6% e 4%) com 7 (B), 14 (D) e 21 (F) dias pós-cirurgia, respectivamente.

DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se que os animais submetidos a úlceras experimentais assépticas e tratados com diferentes concentrações de papaína apresentaram melhor organização das fibras colágeno tipo IV que a observada nas lesões do grupo controle. Corroborando com outros autores^{8,12,17,23,24,25,26,27,28} que apontam a papaína como uma substância capaz de estimular a fibroplasia durante a fase proliferativa da cicatrização tecidual e ainda como substância com potencial para auxiliar no alinhamento das fibras colágeno.

Masini e Calamo¹¹, Monette²⁵, e Bertassoni e Marshall²² em seus estudos clínicos sobre os efeitos

da papaína no tratamento de feridas observaram, de forma empírica, que a papaína auxiliava no alinhamento das fibras colágeno. Para esses e outros autores²⁵ a papaína agiria sobre as fibras colágeno neutralizando e induzindo a ruptura de pontes entre os aminoácidos recém-formados, que se encontravam de forma espiralar e de disposição aleatória², fazendo com que as fibras colágeno se organizassem e se dispusessem em cadeias lineares, impedindo, desta forma, a formação de queloides em feridas^{13,14,25,28}.

Em seus estudos com úlceras teciduais experimentais tratadas com papaína a 2%, também SANCHEZ *et al.*²³ observaram o aumento do número de fibras colágeno (desorganizadas) com 3, 7 e 14 dias pós-tratamento em relação ao grupo controle (não-tratados). E também que o tecido de granulação nas lesões tratadas por 21 dias apresentava fibras colágeno mais organizadas, corroborando com os dados observados em nossos estudos com microscopia eletrônica.

Rocha, Gurjão e Brito Junior²⁶ e Brito Junior e Ferreira²⁷ em seus estudos randomizados com úlceras teciduais experimentais, assépticas ou infectadas, tratadas com soluções de papaína em várias concentrações, também observaram a ação da papaína no auxílio da modulação do processo inflamatório, formação e amadurecimento do tecido de granulação, organização das fibras colágeno e aceleração da proliferação das células da epiderme dos animais tratados.

Nesse estudo com microscopia eletrônica de transmissão, e conforme já descrito por outros autores em observações com microscopia de luz comum^{15,16,18,19,20,23,24,26,27}, foi possível observarmos a capacidade da papaína em promover a organização das fibras colágeno em feridas experimentais.

CONCLUSÕES

O presente estudo é pioneiro ao mostrar, por microscopia eletrônica de transmissão, a capacidade da papaína em induzir a organização estrutural de fibras colágeno tipo IV durante o processo de cicatrização de úlceras experimentais, reforçando e complementando pesquisas anteriores que sugeriam este efeito à papaína.

CONFLITO DE INTERESSES

Não há.

FONTE DE FINANCIAMENTO

Universidade Federal do Pará.

REFERÊNCIAS

- Balbino CA, Pereira LME, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2005; 41: 27-51.
- Silva TF, Penna ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2012; 71(3): 530-9.
- Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol.* 2003; 78: 393-408.
- Mandelbaum SH, Di Santis EP, Mandelbaum MHS. Cicatrização: current concepts and auxiliary resources - Part II. *An Bras Dermatol.* 2003; 78: 521-2.
- Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M. Keratinocyte derived granulocyte macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularization. *J Invest Dermatol.* 2001; 117: 1382-90.
- Clark RAF. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. *Invest Dermatol.* 1993; 11: 647- 61.
- Rogenski NMB, Baptista CMC, Sofia MH. O uso da papaína a 2% nas lesões provocadas pela Síndrome de Fournier: a propósito de 14 casos. *Rev Paul Enferm.* 1998; 17: 39-45.
- Monetta L. Utilização de novos recursos em curativos num consultório de enfermagem. *Rev Paul Enferm.* 1992; 11: 19-26.
- Lima MB, Matins Filho ES, Carvalho RG, Brito Junior LC. Estudo in vitro da ação bactericida e/ou bacteriostática da papaína. *Rev Para Med.* 2009; 23(2). Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0101-5907/2009/v23n2/a2008.pdf>
- Udod VM, Storojuk VT. Use of papain in treating suppurative postoperative soft tissue complications and diseases. *Khirurgiia.* 1981; 5: 99-101.
- Masini E, Calamo MA. Uma forma de tratamento de lesões cutâneas com papaína e sacarose. *Rev Bras Clin Terap.* 1986; 15: 245-8.
- Otuka ES, Pedrazzani ES, Pioto MP. Uso da papaína na úlcera plantar. *Rev Bras Enferm.* 1996; 49: 207-14.
- Alvarez OM, Fernandez-Obregon AC, Rogers RS, Bergamo L, Masso J, Black M. Chemical debridement of pressure ulcers: a prospective, randomized, comparative trial of collagenase and papain/urea formulations. *Wounds.* 2001; 12: 15-25.
- Rogenski NMB, Guedes ML, Baptista CMC, Costa LDF. Uso de papaína em infecções de vísceras. *Rev Bras Enferm.* 1995; 48: 140-3.
- Carvalho FIC, Silva JPN, Bittencourt MC, Brito Junior LC. Uso de papaína no tratamento de lesões ulcerativas de pacientes portadores de pé diabético: relato de cinco casos. *Rev Para Med.* 2010; 24(2): 65-70. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0101-5907/2010/v24n2/a2126.pdf>.
- Leite AP, Oliveira BGRB, Soares MF, Barrocas DLR. Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática. *Rev Gaúcha Enferm.* 2012; 33(3): 198-207. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1983-14472012000300026>
- Leite AP, Oliveira BGRB, Futuro DO, Castilho SR. Effectiveness of using the gel of papain in the wound healing: clinical trial. *Brazilian Journal of Nursing.* 2011; 10(2): 1-3.
- Ribeiro APL, Oliveira BGRB, Soares MF, Barreto BMF, Futuro DO, Castilho SR. Efetividade dos géis de papaína a 2% e 4% na cicatrização de úlceras venosas. *Rev Esc Enferm USP.* 2015; 49(3): 395-402. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-623420150000300006>
- Sant'Ana SMSC, Bachion MM, Santos QR, Nunes CAB, Ma-laquias SG, Oliveira BGRB. Úlceras venosas: caracterização clínica e tratamento em usuários atendidos em rede ambulatorial. *Rev Bras Enferm.* 2012; 65(4): 637-44.
- Rodrigues ALS, Oliveira BGRB, Futuro DO, Secoli SR. Efetividade do gel de papaína no tratamento de úlceras venosas: ensaio clínico randomizado. *Rev. Latino-Am. Enfermagem.* 2015; 23(3): 458-65
- Ferreira AM, Watanabe E, Nascimento AP, Andrade D, Ito IY. Atividade antibacteriana in vitro de géis com diferentes concentrações de papaína. *Rev. Eletr. Enf.* 2008; 10(4): 1035-40.
- Bertassoni LE, Marshall GW. Papain-gel Degrades intact nonmineralized type I collagen fibrils. *Scanning.* 2009; 31(6): 253-258. doi:10.1002/sca.20171.
- Sanchez Neto R, Barone B, Teves DC, Simões MJ, Novo NF, 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.* 1993;8:18-23.
- Martins MD, Fernandes KPS, Pavesi VC, França CM, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK. Healing properties of papain-based gel on oral ulcers. *Braz J Oral Sci.* 10(1):120-123, 2011.
- Monetta L. A importância da atuação científica do enfermeiro na execução dos curativos feitos com papaína. *Rev Bras Enferm.* 1990;9:83-7.
- Rocha RPA, Gurjão WS, Brito Junior LC. Cicatrização de úlceras teciduais não infectadas tratadas com papaína. *Rev. Para. Med.* 23(4), 2009.
- Brito Junior LC, Ferreira PL. Cicatrização de feridas contaminadas tratadas com papaína. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2015;48(2):168-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v48i2p168-174>
- Souza MCA, Franco ROM, Oliveira PSC, Souza ERP. Úlcera crônica tratada com gel de papaína 10% na Estratégia Saúde da Família: relato de experiência. *Rev Bras Med Fam Comunidade.* 2017; 12(39):1-8.

