



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA SAÚDE



**Rosana Soares Araújo Doci**

**Efeitos farmacológicos da triancinolona associada à cola cirúrgica  
na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar**

SOROCABA

2024

**Rosana Soares Araújo Doci**

**Efeitos farmacológicos da triancinolona associada à cola cirúrgica  
na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar**

Dissertação de Mestrado apresentada à Banca Examinadora da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Biomateriais e Medicina Regenerativa.

Orientadora: Profa. Dra. Priscila Randazzo de Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Komatsu

SOROCABA

2024

Sistemas de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo -  
Ficha Catalográfica com dados fornecidos pelo autor

Doci, Rosana Soares Araújo

Efeitos farmacológicos da Triancinolona associada à cola cirúrgica na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar / Rosana Soares Araújo Doci. -- Sorocaba, SP: [s.n.], 2023.

p ; cm.

Orientador: Priscila Randazzo de Moura.  
Dissertação (Mestrado)-- Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em Biomateriais e Medicina Regenerativa.

1. Corticosteroide. 2. 2-octil-cianoacrilato. 3. Biomateriais. I. Moura, Priscila Randazzo de . II. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Programa de Estudos Pós-Graduados em em Biomateriais e Medicina Regenerativa. III. Título.

CDD

BANCA EXAMINADORA

---

---

---

Marcio, sua compreensão, paciência e constante encorajamento foram um farol em meio aos desafios. Seu apoio emocional e prático foram pilares que sustentaram não apenas este trabalho, mas toda a trajetória até aqui. Suas palavras de estímulo foram um impulso valioso nos momentos de dúvida, e sua presença foi o refúgio que renovou minhas energias nos momentos mais intensos.

Agradeço por compartilhar não apenas os triunfos, mas também as adversidades, tornando esta jornada não apenas minha, mas nossa. Sua colaboração foi mais do que um suporte logístico; foi uma parte fundamental da conquista que celebramos agora.

Este trabalho é dedicado a você, Marcio, como um testemunho do nosso compromisso mútuo com o crescimento e a realização pessoal. Que este seja o início de muitas vitórias compartilhadas.

Com amor e gratidão,  
Rosana Doci

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de sabedoria e inspiração, que guiou meus passos durante toda esta jornada. A Ele, agradeço pela força que me sustentou nos momentos de desafio e pela luz que iluminou o caminho rumo ao conhecimento.

À minha amada família, esteio inabalável ao longo dos anos. Cada membro é um pilar que sustenta as minhas conquistas. A gratidão que sinto por vocês transcende as palavras, pois é o amor que nutrimos uns pelos outros que torna possível cada vitória.

Aos meus pais, Vete e Néu, que tornaram tudo possível, meu eterno agradecimento. Vocês são minha fonte de inspiração e apoio constante.

Quero expressar um agradecimento especial ao meu esposo, Marcio, cujo apoio incondicional e colaboração incansável foram alicerces essenciais para a realização desta jornada acadêmica.

Aos meus filhos Benício e Betina, agradeço por serem minha fonte constante de inspiração, paciência e alegria. Seu apoio silencioso e sorrisos luminosos tornaram cada desafio mais leve e cada vitória mais significativa.

À minha orientadora, Dra. Profa. Priscila Randazzo de Moura, cuja orientação dedicada e sabedoria foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. Seu apoio constante e valiosas contribuições moldaram não apenas este trabalho, mas também o meu crescimento como pesquisador.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Daniel Komatsu, pelo seu suporte incansável e visão crítica, que enriqueceram sobremaneira este estudo. Sua orientação foi uma bússola que norteou os passos na busca pela excelência acadêmica.

Aos animais utilizados nesse estudo que, com sua presença, permitiram avançar em nosso entendimento e contribuíram para o progresso da ciência, expresso minha sincera apreciação. Seus sacrifícios e contribuições são inestimáveis, e reconheço a responsabilidade ética associada ao uso de seres vivos em estudos científicos.

A Profa. Dra. Eliana Duek, por acreditar no programa, em seus professores, sua equipe e seus alunos.

A Prof. Dr. Nelson Brancaccio que acreditou no meu potencial para essa jornada, incentivando-me ao conhecimento de Biomateriais e Medicina Regenerativa, além da parceria e contribuição de seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Reinaldo Gianini pela sua notável disponibilidade, vasto conhecimento e contribuições valiosas durante todo o processo desta pesquisa.

A Profa. Dra. Moema Hausen por suas aulas desafiadoras e repletas de conhecimento. Sua disponibilidade e contribuição foram fundamentais.

Ao veterinário Dr. Fábio Nakabashi, agradeço sinceramente pelo ensinamento exemplar no trato com respeito aos animais. Sua ética profissional e cuidado dedicado aos seres vivos não apenas enriqueceram este estudo, mas também influenciaram positivamente minha abordagem em relação ao bem-estar animal.

Aos professores, mentores e educadores que contribuíram para o meu crescimento acadêmico, minha sincera gratidão. Suas orientações, ensinamentos e feedbacks foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Cada lição compartilhada foi uma luz que guiou meu caminho no vasto mundo do conhecimento.

Aos colegas do programa de Biomateriais e Medicina Regenerativa, turmas 2021/2 e 2022/1, pela amizade, trocas e parceria.

Aos colegas do Laboratório de Biomateriais, pelo constante apoio e contribuições preciosas para o desenvolvimento das práticas.

Um agradecimento especial aos meus amigos, o Biólogo e Mestrando Filipe Feitosa, o Dr. Rodrigo Gomes e a Mestre Jéssica Asami, pelo generoso investimento de tempo e valiosas contribuições. Sua amizade e suporte foram pilares essenciais ao longo desta jornada, enriquecendo não apenas o trabalho, mas também minha experiência acadêmica.

Ao Laboratório de Patologia pela colaboração, infraestrutura e ambiente propício à pesquisa. Sua contribuição foi vital para o desenvolvimento deste trabalho.

À Vera Lucia de Jesus Mescoki, pela orientação crucial na minha dissertação. Sua ajuda foi essencial para atender aos padrões exigidos.

Ao corpo docente na banca de qualificação e defesa, agradeço a significativa colaboração.

À Pontifícia Universidade Católica Campus Sorocaba - Campus Sorocaba e à Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde, meu sincero agradecimento pela oportunidade, suporte e ambiente propício ao aprendizado e à pesquisa, além do auxílio nos materiais.

Agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste projeto. Seu apoio foi mais do que acadêmico; foi uma parte essencial da minha jornada de descoberta e crescimento.

Aos meus amigos, verdadeiros companheiros de todas as horas, agradeço por compartilharem risos, apoio e encorajamento. Vocês foram a fonte de ânimo nos momentos desafiadores, e a jornada foi mais leve e significativa com a presença de cada um. A amizade de vocês é um tesouro que levarei para toda a vida.

Que este trabalho contribua, de alguma maneira, para o enriquecimento do conhecimento e para a promoção do aprendizado contínuo. A todos vocês, amigos e professores, o meu mais profundo agradecimento.

*Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro." - Jeremias 29:11*

## RESUMO

Doci, R.S.A., Efeitos farmacológicos da triancinolona associada à cola cirúrgica na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar.

**Introdução:** A cola cirúrgica de 2-octil-cianoacrilato é amplamente utilizada no fechamento de feridas cirúrgicas cutâneas. Entretanto, efeitos colaterais como dermatite de contato, deiscência e alterações de cicatrizes são comuns e provocadas pelo próprio polímero. Os corticoides exógenos são amplamente empregados por suas propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora. **Objetivos:** Avaliar macro e microscopicamente os efeitos farmacológicos do corticoide acetinado de triancinolona (AT) incorporada a cola cirúrgica 2-octil-cianoacrilato (C+AT) na fase inicial do processo de cicatrização de ferida cirúrgica em ratos Wistar. **Material e Método:** O corticoide de AT foi adicionado à cola cirúrgica (C) e caracterizada físico-quimicamente por diferentes métodos como Ensaio de Liberação (EL), Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Através dos estudos *in vivo* os efeitos do processo de cicatrização, da cola ou C+AT no mesmo rato foi avaliado pelas análises macroscópica e microscópicas (histologia e imuno-histoquímica) no período de 7 e 14 dias pós-operatório. **Resultados:** O EL mostrou liberação do AT adicionado à cola nas concentrações de 5mg/mL, 10mg/mL e 20mg/mL até 120h. No FTIR observou-se que não houve interação entre as moléculas de AT e a cola, porém, identifica a presença do fármaco na concentração de 20mg/mL, eleita para a fase *in vivo*. A análise de TG mostrou que a adição do corticoide AT à cola não alterou a resistência térmica desse polímero, assim como o ensaio de DSC não alterou os eventos térmicos da cola para causar uma instabilidade, podendo coexistir de forma segura. Entretanto, na MEV, houve uma perda na homogeneidade da cola. Nos estudos *in vivo*, macroscopicamente, não houve alteração da coaptação das bordas, secreção, deiscência, infecção ou diferença na cicatrização de todos os ratos que mantiveram o curativo. Na histologia, com a coloração de Hematoxilina-eosina os seguintes parâmetros foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ): menor fibrose no tratamento C+AT (14 dias); menor neovascularização no C+AT (7 dias); maior presença de macrófagos no tratamento C+AT (14 dias) e maior presença de neutrófilos no tratamento C+AT (7 dias). Já com a coloração de Tricrômico de Masson, as fibras colágenas foram mais expressivas no tratamento C+AT (7 e 14 dias,  $p > 0,05$ ). A análise imuno-histoquímica não obteve resultado estatisticamente diferente, porém, com o marcador CD68 foi observado um discreto aumento de macrófago no tratamento C+AT (7 e 14 dias); com o marcador  $\alpha$ -SMA foi observado mais miofibroblastos no tratamento C+AT (7 dias) e menos no C+AT (14 dias) e aumento discreto da presença de fibronectina no tratamento C+AT (7 e 14 dias). **Conclusão:** A combinação de 2-octil-cianoacrilato com triancinolona tem potencial promissor na medicina translacional e pode ser um novo biomaterial a ser considerado para novos testes pré-clínicos e clínicos, já que não houve alterações nas características químico-físicas, nos testes realizados. Além da confirmação dos efeitos anti-inflamatório e imunomodulador do corticoide, atenuando a fase inflamatória da cicatrização, e proporcionando um remodelamento adequado da matriz extracelular e recomposição da atividade funcional do tecido.

**Palavras-chave:** Corticoide. 2-octil-cianoacrilato. Biomateriais.

## ABSTRACT

Doci, R.S.A., Pharmacological effects of triamcinolone associated with surgical glue on wound healing in Wistar rats.

**Introduction:** The surgical glue of 2-octyl-cyanoacrylate is widely used in the closure of cutaneous surgical wounds. However, side effects such as contact dermatitis, dehiscence, and scar alterations are common and caused by the polymer itself. Exogenous corticosteroids are widely employed for their anti-inflammatory and immunomodulatory properties. **Objectives:** To evaluate macroscopically and microscopically the pharmacological effects of the corticosteroid triamcinolone acetone (TA) incorporated into 2-octyl-cyanoacrylate surgical glue (C+TA) in the initial phase of the surgical wound healing process in Wistar rats. **Material and Methods:** TA corticosteroid was added to the surgical glue (C) and characterized physicochemically by different methods such as Release Assay (RA), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA), Differential Scanning Calorimetry (DSC), and Scanning Electron Microscopy (SEM). Through in vivo studies, the effects of the healing process, glue, or C+TA on the same rat were evaluated by macroscopic and microscopic analyses (histology and immunohistochemistry) on postoperative days 7 and 14. **Results:** RA showed release of TA added to the glue at concentrations of 5mg/mL, 10mg/mL, and 20mg/mL up to 120h. In FTIR, it was observed that there was no interaction between TA molecules and the glue, however, the presence of the drug was identified at a concentration of 20mg/mL, chosen for the in vivo phase. TGA analysis showed that the addition of TA corticosteroid to the glue did not alter the thermal resistance of this polymer, as well as the DSC assay did not alter the thermal events of the glue to cause instability, being able to coexist safely. However, in SEM there was a loss of glue homogeneity. In the in vivo studies, macroscopically, there was no alteration in the coaptation of the edges, secretion, dehiscence, infection, or difference in the healing of all rats that maintained the dressing. In histology, with Hematoxylin-eosin staining, the following parameters were significantly different ( $p < 0.05$ ): less fibrosis in the C+TA treatment (14 days); less neovascularization in C+TA (7 days); a higher presence of macrophages in the C+TA treatment (14 days) and higher presence of neutrophils in the C+TA treatment (7 days). With Masson's Trichrome staining, collagen fibers were more expressive in the C+TA treatment (7 and 14 days,  $p > 0.05$ ). Immunohistochemical analysis did not yield statistically different results, however, with the CD68 marker, discrete increase in macrophages was observed in the C+TA treatment (7 and 14 days); with the  $\alpha$ -SMA marker, more myofibroblasts were observed in the C+TA treatment (7 days) and less in the C+TA (14 days) and a discrete increase in the presence of fibronectin in the C+TA treatment (7 and 14 days). **Conclusion:** The combination of 2-octyl-cyanoacrylate with triamcinolone has promising potential in translational medicine and may be a new biomaterial to be considered for new preclinical and clinical tests, since there were no alterations in the physicochemical characteristics in the tests performed. In addition to confirming the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of the corticosteroid, attenuating the inflammatory phase of healing, and providing adequate remodeling of the extracellular matrix and recomposition of tissue functional activity.

**Keywords:** Corticosteroid. 2-octyl-cyanoacrylate. Biomaterials.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das estruturas das camadas e anexos cutâneos na pele humana .....	17
Figura 2 -Histologia (HE) da pele apresentando as camadas córnea, epiderme, derme e anexos cutâneos. ....	18
Figura 3 - Esquema das camadas e células da pele. ....	19
Figura 4 - Fases da cicatrização e deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.....	20
Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação dos glicocorticoides. ....	22
Figura 6 - Fio de sutura agulhado de Nylon. ....	24
Figura 7 - Dermabond® Cola cirúrgica na apresentação de 0,5mL da Ethicon.....	25
Figura 8 - Esquema do cálculo de liberação de fármaco AT no filme 2-octil-cianoacrilato. ....	31
Figura 9 - Fotografia da experimentação animal .....	34
Figura 10 - Ensaio de Liberação modificada do AT na cola de 2-octil-cianoacrilato...	40
Figura 11 - Ensaio de Liberação modificada do AT na cola de 2-octil-cianoacrilato...	41
Figura 12 - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR) .....	42
Figura 13 -Curvas Termogravimétricas (TG).....	44
Figura 14 - Derivada da curva termogravimétrica (DTG).....	45
Figura 15 - Análise Termogravimétrica (TG) com ensaio de degradação. ....	46
Figura 16 - Análise Termogravimétrica (TG) com ensaio de degradação. ....	47
Figura 17 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	48
Figura 18 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	49
Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	50
Figura 20 - Rato Wistar macho após 7 dias do procedimento. ....	51
Figura 21 - Painel histológico de Hematoxilina-Eosina dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias. ....	55
Figura 22 - Painel histológico de Tricrômico de Masson dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias. ....	57
Figura 23 - Painel imunohistológico – marcador CD68 dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias .....	60

Figura 24 - Painel imunohistológico – marcador $\alpha$ -SMA dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias. ....	63
Figura 25 - Painel imunohistológico – marcador fibronectina dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos experimentais .....	33
Tabela 2 - Análise histológica das lâminas coradas em HE, nos diferentes grupos experimentais dos tecidos cicatriciais.....	52
Tabela 3 - Análise histológica das lâminas coradas em TM, nos diferentes grupos experimentais dos tecidos cicatriciais.....	56
Tabela 4 - Análise dos Marcadores de imuno-histoquímica (CD68, $\alpha$ -SMA e fibronectina) do tecido cicatricial nos diferentes grupos experimentais.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Anti Microbial Peptides
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$\alpha$ -SMA	Alfa-actina de Músculo Liso
AT	Acetonido de Triancinolona
ATR	Attenuated Total Reflectance
BSA	Bovine Serum Albumin
CD68	Cluster of Differentiation 68
CLA	Cutaneous Leukocyte Antigen
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTG	Derivative Thermogravimetry
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
HMDS	Hexametildizilazano
HE	Hematoxilina-Eosina
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina 1
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFs	Miofibroblastos
MHC	Major Histocompatibility Complex
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffer Solution
PRR	Pathogen Recognition Receptors
RG	Receptores de Glicocorticoides
SNC	Sistema Nervoso Central
TG	Termogravimétrica
TM	Tricrômico de Masson
TLR	Toll-like Receptor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Estrutura da pele e anexos cutâneos .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2 Componentes imunológicos da pele .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3. Fases da cicatrização da pele .....</b>	<b>20</b>
<b>1.4. Corticoides.....</b>	<b>21</b>
<b>1.5. Biomaterial para fechamento da ferida cirúrgica .....</b>	<b>24</b>
<b>1.6. Bases científicas para formulação de um novo Biomaterial .....</b>	<b>26</b>
<b>1.7. Justificativa.....</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Geral .....</b>	<b>29</b>
<b>2.2 Específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Fármaco, Produto e Reagentes.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Animais .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3. Caracterização da cola cirúrgica associada a AT.....</b>	<b>30</b>
3.3.1 Ensaio de Liberação .....	30
3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada De Fourier (FTIR) .....	31
3.3.3 Análise Termogravimétrica (TG) .....	32
3.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	32
3.3.5 Análise microscópica da cola cirúrgica associada a AT por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	32
3.3.6 Manutenção da Cola cirúrgica .....	32
<b>3.4. Delineamento do Estudo Pré-Clínico.....</b>	<b>33</b>
3.4.1 Estudo com experimentação animal .....	33
<b>3.5 Análise macroscópica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 Análise microscópica.....</b>	<b>35</b>
3.6.1 Coloração - Hematoxilina-Eosina (HE) .....	35
3.6.2 Coloração - Tricrômico de Masson (TM).....	36
3.6.3 Análise Imuno-histoquímica .....	36
<b>3.7. Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Caracterização da cola cirúrgica associada ao corticoide .....</b>	<b>40</b>
4.1.1 Ensaio de Liberação .....	40

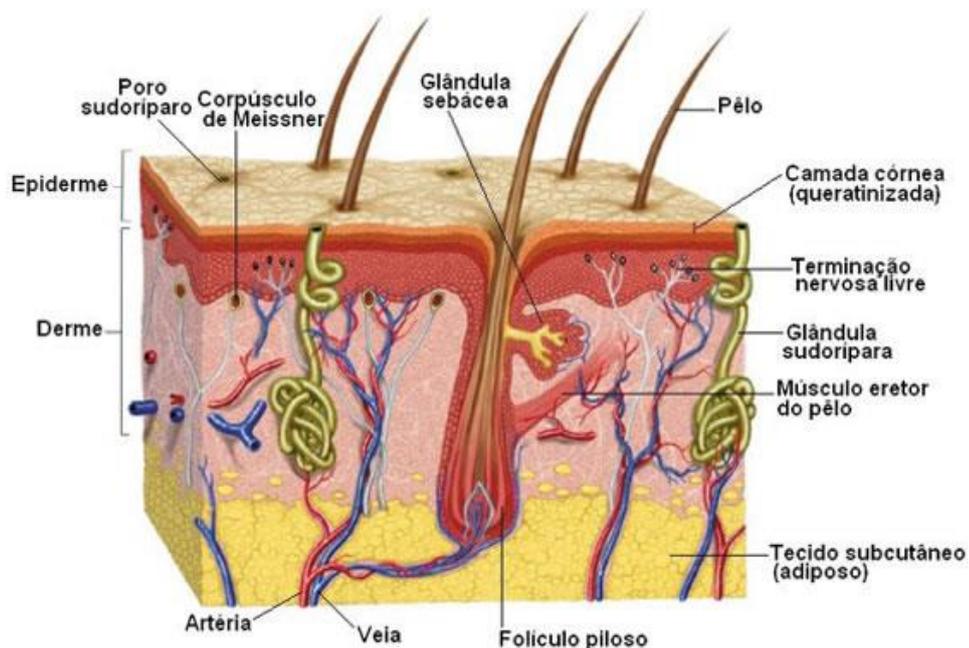
4.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	42
4.1.3 Análise Termogravimétrica (TG) .....	44
4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	47
4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	49
<b>4.2. Análise macroscópica.....</b>	<b>51</b>
<b>4.3. Análise microscópica.....</b>	<b>52</b>
4.3.1 Análise Histológica - Coloração Hematoxilina-Eosina (HE) .....	52
4.3.2 Análise Histológica - Coloração Tricrômico de Masson (TM).....	56
<b>4.4. Análise Imuno-histoquímica.....</b>	<b>58</b>
<b>4.5. Sumarização dos Resultados.....</b>	<b>66</b>
<b>5. PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>67</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Estrutura da pele e anexos cutâneos

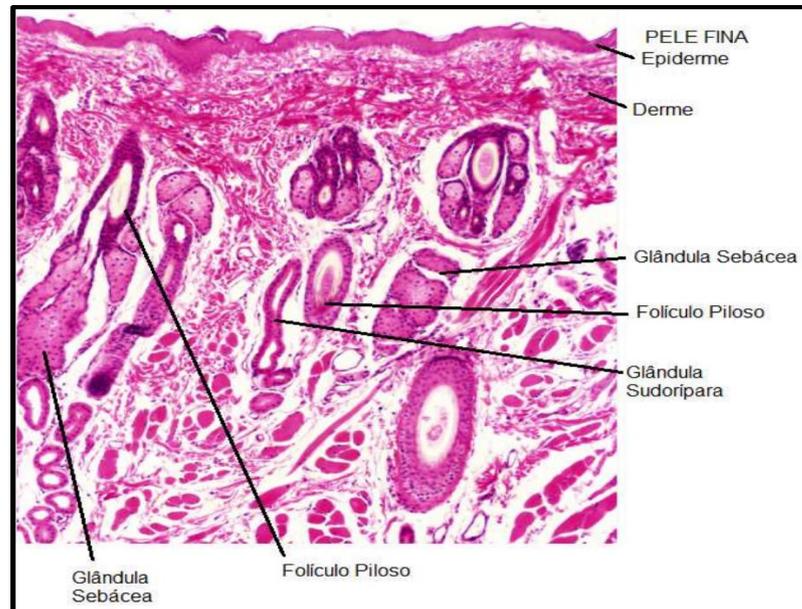
A pele é o maior órgão do organismo humano, desempenhando um papel vital na defesa contra atrito, evaporação de líquidos, exposição à radiação ultravioleta e entrada de microrganismos. Além disso, desempenha uma função significativa no controle da temperatura corporal e na sensação tátil, pressão, frio e calor. A Figura 1 representa a pele composta por duas camadas: a epiderme mais superficial que também apresenta uma camada córnea queratinizada, e a derme que contém os anexos cutâneos (glândulas sebácea e sudorípara, além folículo piloso), possui terminações nervosas, redes vasculares, fibras colágenas e elásticas, músculo erector do pelo, além do sistema de receptores sensoriais de tato e vibrações (Corpúsculo de Meissner), representados na Figura 2. O fornecimento sanguíneo da pele é restrito à derme e é composto por um plexo profundo conectado a um plexo superficial. Esses plexos seguem uma trajetória paralela à superfície da pele e são conectados por vasos comunicantes organizados perpendicularmente (Rivitti, 2014). Subjacente à pele encontra-se um tecido adiposo, o subcutâneo.

Figura 1 - Esquema das estruturas das camadas e anexos cutâneos na pele humana.



Fonte: Xavier (2022).

Figura 2 -Histologia (HE) da pele apresentando as camadas córnea, epiderme, derme e anexos cutâneos.



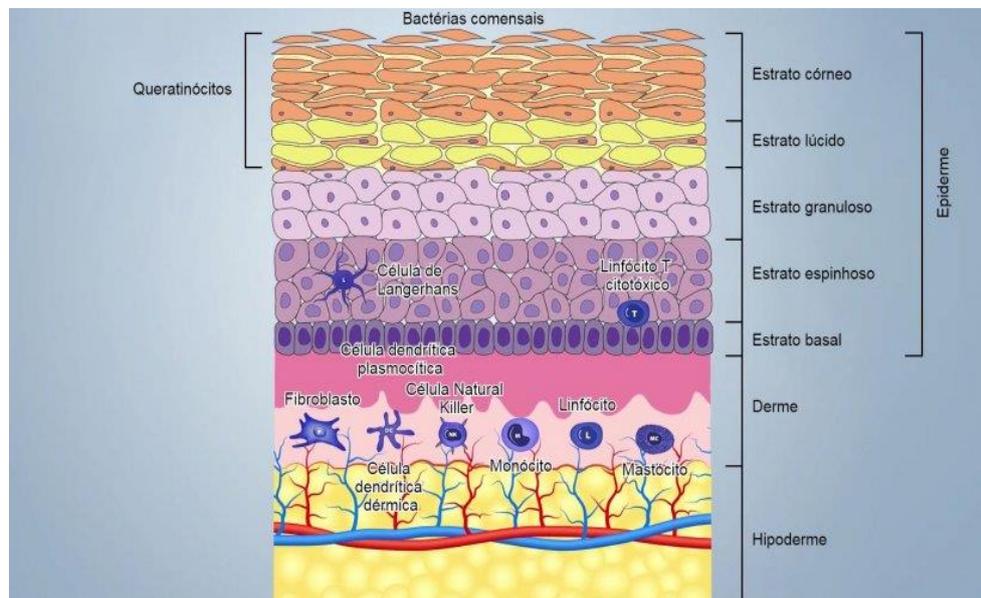
Fonte: Abrahamsohn; Freitas *et al.* (2020).

## 1.2 Componentes imunológicos da pele

O sistema imunológico da pele apresenta células especializadas tanto na epiderme quanto na derme (Fig. 3). Na epiderme, os queratinócitos desempenham um papel crucial como as primeiras linhas de defesa, expressando uma ampla variedade de PRR (Receptores de Reconhecimento de Patógenos), como TLR (Receptor Toll-like) (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 e TLR-6), juntamente com lectinas de tipo c. Essas células também liberam diversas citocinas pró-inflamatórias e péptidos antimicrobianos (AMP). Os queratinócitos têm a capacidade de identificar PAMP (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) por meio de PRR, desencadeando inflamação e secretando interleucinas (IL-1), interferon (IFN), citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas e defensinas. Adicionalmente, podem expressar o complexo principal de histocompatibilidade MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) classe II, apresentando antígenos. Células de Langerhans, predominantemente localizadas na camada espinhosa da epiderme, são ricas em moléculas MHCII (Martelli *et al.*, 2021). Linfócitos T CD8, situados na camada basal, atuam de forma citotóxica na eliminação de células infecciosas ou neoplásicas, desempenhando um papel crucial no controle de infecções, lisando células infectadas por vírus, protozoários e alguns fungos (Cruvinel *et al.*, 2010).

Na derme há uma concentração significativa de linfócitos, estimada como superior ao número de células na circulação sanguínea. As células dendríticas CD1+ assumem uma posição destacada como as principais células imunes na derme, apresentando antígenos e desencadeando a resposta primária das células T nos gânglios linfáticos. Elas também produzem uma quantidade considerável de interferon tipo I em resposta ao reconhecimento de ácidos nucleicos virais. As células T são direcionadas à derme pelo antígeno leucocitário cutâneo (CLA - Antígeno Leucocitário Cutâneo). Os subconjuntos principais de células T incluem CD4+, Th1, Th2 e Th17. Embora os macrófagos (CD14+) sejam escassos na derme, os monócitos, que se diferenciam rapidamente em macrófagos, são eficientemente recrutados após lesões ou inflamações. As células Natural Killers (NK) desempenham um papel na eliminação de células infectadas por vírus e células cancerosas, apresentando citotoxicidade não restrita por MHC. Os mastócitos (MC) também desempenham um papel crucial na resposta inflamatória a agentes patogênicos, agindo como células sentinelas capazes de reconhecer sinais de perigo por meio de TLR e liberando rapidamente mediadores da inflamação, como histamina, leucotrienos, prostaglandina, citocinas pró-inflamatórias e imunomoduladoras (IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, GM-CSF, IL-4, IL-10, IL-13), além de atuarem como células apresentadoras de antígeno MHC II (Martelli et al., 2021). Os fibroblastos, principais células envolvidas na cicatrização, têm como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, sintetizando componentes da matriz extracelular (Junqueira; Carneiro, 2017).

Figura 3 - Esquema das camadas e células da pele.

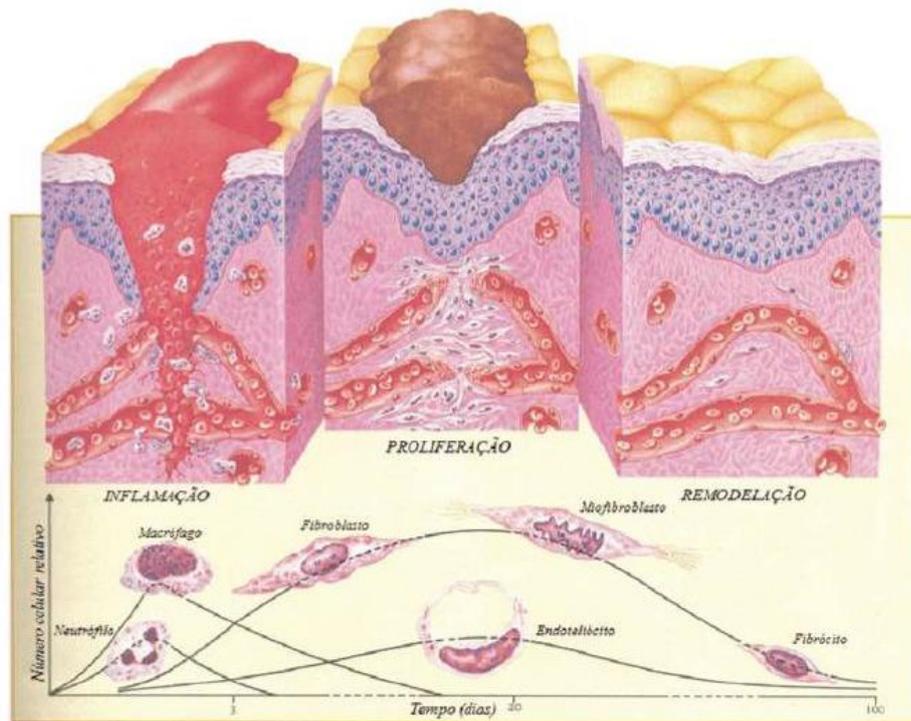


Fonte: Martelli et al. (2021).

### 1.3. Fases da cicatrização da pele

O processo de cicatrização da pele após um ferimento, pode afetar sua fisiologia, em especial se acometer a camada dérmica (Isaac *et al.*, 2010). Essa cicatrização consiste em processos organizados da cascata de eventos celulares e bioquímicos que interagem para o reparo do tecido lesionado (Campos; Borges-Banco; Groth, 2007). A Figura 4 representa as fases da cicatrização e deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.

Figura 4 - Fases da cicatrização e deposição dos componentes da matriz cicatricial ao longo do tempo.



Fonte: Carvalho (2021).

A etapa inflamatória é uma resposta local não específica que se desencadeia em decorrência de lesões teciduais, surgindo imediatamente após o trauma ou a lesão. Nesse estágio, observa-se vermelhidão (rubor), dor, aumento da temperatura local e inchaço (edema) na região afetada. Essa fase pode persistir por cerca de 72 horas e é marcada pelo aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, migração de células brancas do sangue, como neutrófilos e macrófagos, para o local da lesão, e liberação de mediadores químicos. A fase proliferativa, que tem início durante a fase

inflamatória, é caracterizada por uma atividade celular intensa na região afetada e pode se estender por um período de 1 a 14 dias. Durante essa fase, ocorrem processos como formação de novos vasos sanguíneos, produção de colágeno e regeneração do tecido epitelial, além de um aumento na presença de macrófagos M2, que liberam citocinas com propriedades anti-inflamatórias para regular o processo de cicatrização. Durante esse estágio, a atividade inflamatória diminui, porém a ferida continua apresentando vermelhidão e inchaço. Esse período é conhecido também como fase fibroblástica. A fase de remodelação tem início aproximadamente no 21º dia e pode estender-se por até 6 meses. Durante essa fase, há uma redução na quantidade de fibroblastos, ocorre reorganização das fibras de colágeno e diminuição da vermelhidão do tecido. O tecido cicatricial formado anteriormente passa por um processo de remodelação, com realinhamento das fibras para aumentar a resistência do tecido e reduzir a espessura da cicatriz, o que contribui para minimizar deformidades (Carvalho, 2021).

Alguns pesquisadores classificaram de uma forma mais completa, dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Em um determinado período as fases coincidem e acontecem simultaneamente, permitindo assim, o sucesso da cicatrização (Fazio *et al.*, 2000).

#### **1.4. Corticoides**

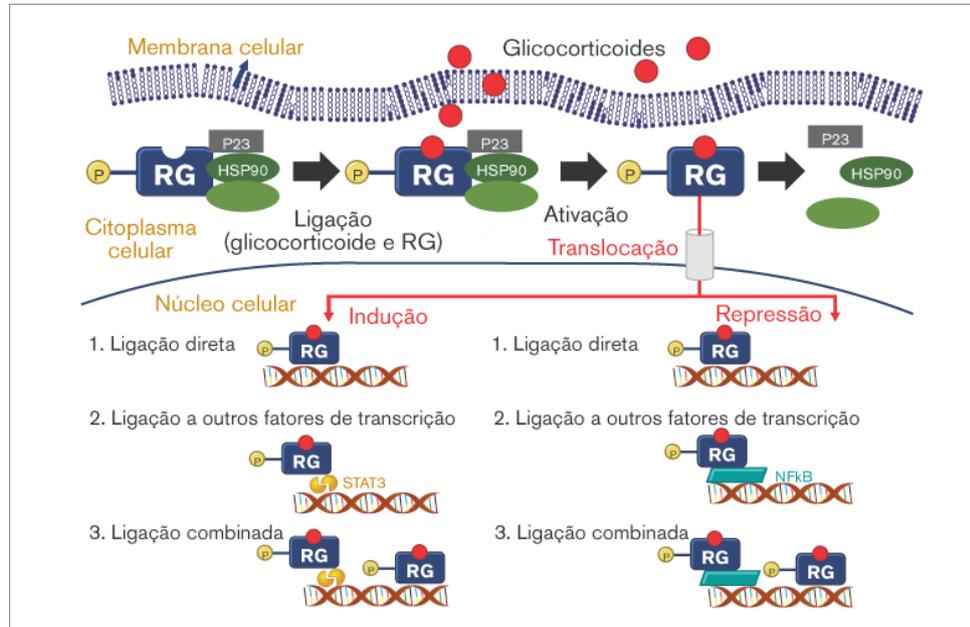
Os corticoides também chamados de corticosteroides ou glicocorticoides, são moléculas que o organismo sintetiza para regular muitos mecanismos fisiológicos imunes e metabólicos. Os corticoides exógenos são amplamente empregados por suas propriedades anti-inflamatória e imunomoduladora (Campagnolo *et al.*, 2008).

Os corticosteroides atenuam a inflamação por meio de diversos mecanismos celulares e moleculares. Suas influências sobre as células inflamatórias compreendem: desencadeamento de apoptose, supressão de citocinas e inibição da migração celular (Torres; Insuela; Carvalho, 2012).

Na figura 5 está representado os efeitos dos corticoides mediados por receptores de glicocorticoides (RG), designados como tipo 1 (mineralocorticoides) ou tipo 2 (corticosteroides). Os receptores do tipo 1 estão localizados principalmente no fígado e em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo

responsáveis pela regulação basal da atividade adrenocortical. Os receptores do tipo 2 estão presentes em quase todas as células do organismo e irão mediar as principais ações dos corticoides localizados principalmente no citoplasma das células.

Figura 5 - Esquema do mecanismo de ação dos glicocorticoides.



Fonte: (Vasconcelos, 2019).

A ativação da transcrição de genes codifica proteínas que levarão aos efeitos metabólicos, enquanto a repressão da transcrição codifica citocinas (moléculas regulatórias que participam dos processos inflamatórios e sistema imune), que resultarão em ações anti-inflamatórias e imunossupressoras; estes não são efeitos imediatos, surgindo após várias horas ou dias (Vasconcelos, *et al.* 2019).

Os corticoides tópicos podem ser usados para tratar exacerbações de dermatite de contato alérgica por seus efeitos anti-inflamatório e imunomodulador, mas devem ser evitados no tratamento a longo prazo devido aos efeitos colaterais (Nassau *et al.*, 2019).

As formas de administração dos corticoides descritas na literatura são inúmeras, dentre elas: via oral, intramuscular, endovenosa, inalatória e intralesional, porém, os estudos existentes não são suficientes para a determinação da superioridade entre diferentes corticoides, a dose e a melhor forma de administração (Mishra; Rosen; Murry, 2000, Li *et al.*, 2011). O corticoide acetinado de triancinolona (AT) tem um efeito empírico, fórmula de  $C_{24}H_{31}FO_6$  e um peso molecular de 434,50 Da. A duração prolongada da ação da AT é devido ao fato de que é uma forma

insolúvel e, portanto, age como depósito quando injetado. A meia-vida biológica de administração parenteral é de 18-36h. Os níveis séricos após a injeção, são praticamente indetectáveis (Cáceres-del-Carpio *et al.*, 2015).

A injeção intralesional de acetinado de triancinolona (AT) tem sido defendida e empregada de forma segura e com sucesso como base do tratamento para queloides e cicatrizes hipertróficas desde a década de 1960 (Berman; Bielely, 1995). Quando administrado isoladamente, a taxa de resposta das injeções intralesionais de corticoides é altamente variável, variando em relatórios publicados entre 50% e 100%, enquanto manifesta uma taxa de recorrência entre 9% e 50%. (Grumbine; Dobrowolski; Bernstein, 1998) (Abdel-Fattah, 1976). Taxas mais altas de sucesso foram observadas quando as injeções intralesionais de AT foram combinadas com outras terapias, como cirurgia, cobertura de gel de silicone e terapia de pressão localizada (Fredman; Tenenhaus, 2013).

A síndrome de Cushing resultante de AT intralesional, como efeito colateral, foi relatada inúmeras vezes na literatura. A literatura publicada sugere que o AT administrado dentro das recomendações mais recentes não parece colocar os pacientes adultos em risco aumentado de desenvolver a síndrome de Cushing. A dosagem intralesional não deve exceder 30 mg por mês em crianças (Fredman; Tenenhaus, 2013).

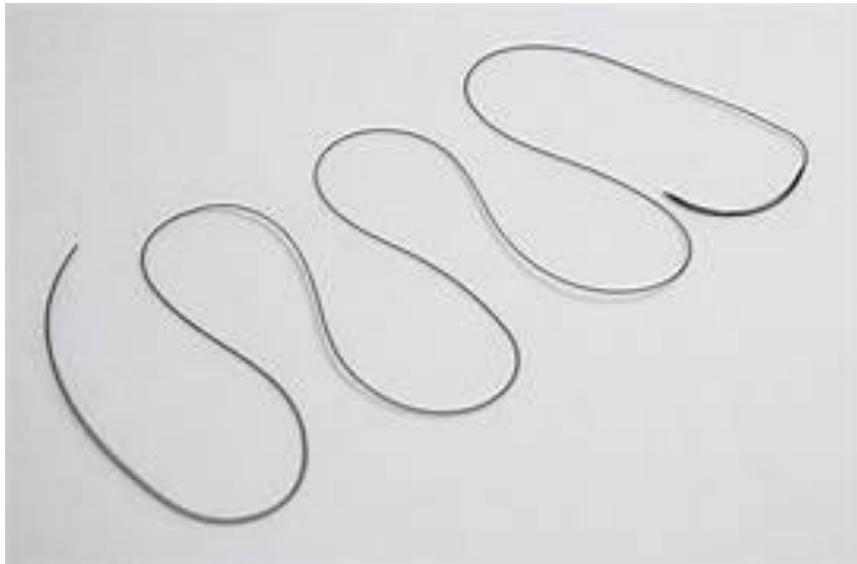
Embora diversas preparações estejam disponíveis, as triancinolonas apresentam características físicas mais aceitáveis. A absorção sistêmica e os consequentes efeitos adversos raramente são um problema devido à baixa dosagem administrada. Os efeitos adversos locais, cujo mais proeminente é a atrofia, nas injeções intralesionais, dependem da dosagem da preparação, da quantidade utilizada, da área do corpo e da condição da pele a ser tratada (Callen, 1981).

### 1.5. Biomaterial para fechamento da ferida cirúrgica

A intervenção cirúrgica é fundamental para o tratamento de várias condições que impactam a saúde, e sua relevância no âmbito da saúde pública global é inquestionável. Evidências indicam que aproximadamente 11% dos anos de vida perdidos devido à incapacidade podem ser mitigados por meio da cirurgia (Meara *et al.*, 2015). Nesse contexto, a pele é o primeiro e o último órgão a ser abordado num procedimento cirúrgico, necessitando de cuidados pós-operatórios, a fim de evitar complicações como deiscência e infecção do local.

A técnica de sutura com fios agulhados ainda é amplamente empregada para o fechamento de feridas cirúrgicas devido à sua segurança e eficácia comprovadas (Dumville *et al.*, 2014) (Fig. 6). No entanto, é comum que esses fios precisem ser removidos durante o período pós-operatório, pois sua presença pode aumentar o risco de infecções na pele (Rufai *et al.*, 2016).

Figura 6 - Fio de sutura agulhado de Nylon.



Fonte: Shalon (2022).

Utilizada como uma alternativa para o fechamento de feridas, a cola cirúrgica de cianoacrilato é uma substância química com propriedades bactericidas e bacteriostáticas, desenvolvida durante a Segunda Guerra Mundial e sintetizada em 1949, mas somente na década de 60 começou a ser empregada em procedimentos cirúrgicos (D'Assumpção, 2008).

A ação da cola cirúrgica ocorre por meio de polimerização, desencadeada pela exposição a ânions provenientes da umidade da pele ou do exsudato da ferida. Os monômeros de 2-octil-cianoacrilato polimerizam rapidamente em uma reação exotérmica, aderindo ao epitélio mais superficial e formando uma barreira de água sobre as bordas da ferida, criando uma ponte de cianoacrilato que permite a cicatrização contínua da ferida. Isso resulta na formação de uma crosta sobre a superfície aplicada, mantendo os tecidos conectados (Perera *et al.*, 2023). O cianoacrilato de 2-octil também demonstrou possuir atividade antimicrobiana intrínseca contra bactérias gram-positivas (incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) e bactérias gram-negativas não-pseudomonas (Rushbrook *et al.*, 2014).

Por estes motivos, alguns procedimentos cirúrgicos vêm substituindo a sutura tradicional pelas colas (adesivas) de cianoacrilato, evidenciado na Figura 7 (Barbalinardo *et al.*, 1986; Carvalho; Marchi, 2013; Mobley; Hilinski; Toriumi, 2002; Shapiro, Dinsmore, North; 2001, Kemper *et al.*, 2015).

Entre as suas vantagens, destacam-se a praticidade de sua execução e a dispensa de retorno para remoção do fio de sutura (Dumville *et al.*, 2014). Os resultados estéticos, no entanto, são controversos, tendo sido descritas também complicações locais, incluindo maior possibilidade de deiscências, quando comparada às suturas tradicionais (Dumville *et al.*, 2014; Bowen *et al.*, 2014).

Figura 7 - Dermabond® Cola cirúrgica na apresentação de 0,5mL da Ethicon.



Fonte: Dermabond® (2022).

Para a maioria dos pacientes, os adesivos médicos são bem tolerados e preferíveis aos métodos que requerem cuidados de acompanhamento mais frequentes. Em uma minoria selecionada de pacientes, entretanto, pode ser observada sensibilização e subsequente dermatite de contato alérgica (Hivnor; Hudkins, 2008).

### **1.6. Bases científicas para formulação de um novo Biomaterial**

Conhecer cada ativo isoladamente, sua eficácia e segurança é fundamental para a escolha e formulação de um novo biomaterial e conseqüentemente, avaliar a caracterização e interação desses ativos como um novo composto.

Um estudo prospectivo, randomizados com 151 pacientes, elegíveis para 133 foram divididos para uso da cola cirúrgica (2-octil-cianoacrilato) e fio de sutura monofilamentar. Não houve diferença no escore cosmético nem nas complicações no intervalo de 6 meses ou 1 ano. A cola cirúrgica é eficaz e confiável no fechamento da pele para cirurgia de mama, com resultados semelhantes aos da sutura padrão, A satisfação do paciente e o tempo de aplicação foi estatisticamente significativo no grupo da cola, além de menor custo com o cuidado, nesse intervalo de tempo (Gennari *et al.*, 2004).

Um outro estudo prospectivo randomizado investigou se a administração local do agente anti-inflamatório triancinolona poderia prevenir o acúmulo de seroma, principal complicação na abdominoplastia, e pode representar um processo inflamatório em resposta ao trauma cirúrgico. A administração local de 80 mg de triancinolona reduziu significativamente o acúmulo de seroma pós-abdominoplastia. Sob tratamento com triancinolona, foram observados níveis suprimidos de IL-6 e MMP-9 no fluido seroma. Notavelmente, a supressão de marcadores inflamatórios correlacionou-se clinicamente com uma diminuição ao acúmulo de seroma (Anker *et al.*, 2021).

Burusapat e colaboradores (2021) também realizaram um estudo prospectivo, randomizado e controlado com pacientes que apresentaram queloides após a perfuração da orelha, dividindo-os em grupos com injeção imediata ou tardia de AT após a excisão intraqueloidal. Os autores concluíram que a injeção imediata de AT é uma opção aceitável para o tratamento do quelóide auricular, pois foi associado a uma

taxa de recorrência menor do que com a injeção tardia e não resultou em complicações.

Nessa mesma linha, Kauh *et al.* (1997) fizeram um estudo prospectivo e controlado em seis pacientes com queloides não tratados previamente. Três foram tratados com 10 mg/mL de AT imediatamente após a excisão do queleide (grupo experimental); os outros três pacientes não foram tratados com AT até 2 semanas após a excisão (controle). Os autores concluíram que a regulação negativa da expressão do gene do colágeno tipo I é provocada pela injeção imediata de AT após a excisão do queleide, sugerindo que a prevenção do crescimento recorrente de queleide é possível se a excisão cirúrgica for acompanhada por injeção imediata de AT no leito da ferida e que a cicatrização da ferida não seja aparentemente comprometida pela inibição da expressão do gene do colágeno tipo I.

### **1.7. Justificativa**

Atualmente, pesquisas com sistema de liberação modificada de fármacos, sendo veiculados por biomaterial têm alcançado interesse clínico, com maior potencial terapêutico e maior adesão ao tratamento (Manadas, *et al.*, 2002). Neste sentido, vale ressaltar que os biomateriais envolvem um campo multidisciplinar, podendo ser utilizados isoladamente ou associados a fármacos ou com interação celular, que possam cumprir os requisitos para proceder aos tratamentos necessários individualizados.

A procura por biomateriais associados à fármacos tem crescido exponencialmente e, muitas vezes, faltam evidências clínicas, o que justifica a originalidade e importância deste estudo em analisar clinicamente a associação de um corticoide sintético incorporado à cola cirúrgica de 2-octil-cianoacrilato, ambos autorizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). É de suma importância clínica um estudo comparativo que analisa desde a compatibilidade químico-física do biomaterial associado ao fármaco (estudo *in vitro*) até os resultados *in vivo*, com um estudo pré-clínico, em animais, avaliando a existência de alteração na fase inicial da cicatrização. Dessa forma, o novo composto poderá tornar-se um grande diferencial na aplicação clínico/cirúrgico-terapêutico, evidenciando o aspecto biotecnológico do presente estudo.

O intuito deste estudo, alcançando a pesquisa translacional é demonstrar que a combinação de uma cola cirúrgica (2-octil-cianoacrilato) associada ao corticosteroide AT potencializa o processo cicatricial de feridas cirúrgicas intradérmicas em sua fase inicial, diminuindo o processo inflamatório, porém sem interferir no processo de cicatrização final, além de promover menores complicações pós-cirúrgicas, como deiscência, dermatite de contato e aumento inadequado de formação de colágeno causando cicatrizes inestéticas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar os efeitos farmacológicos do corticoide acetonido de triancinolona associada à cola cirúrgica comercial no processo cicatricial de feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar machos.

### **2.2 Específicos**

- Caracterizar o biomaterial, a cola cirúrgica comercial (2-octil-cianoacrilato) incorporado com o corticoide acetonido de triancinolona.
- Avaliar a existência de cinética de liberação modificada da acetonido de triancinolona veiculada à cola cirúrgica comercial.
- Avaliar a evolução do processo cicatricial de lesões de pele, contralateral, no dorso de ratos Wistar machos, através de estudo pré-clínico.
- Avaliar macro e microscopicamente (análises histológicas e imuno-histoquímicas) a cicatrização da ferida cutânea superficial.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Fármaco, Produto e Reagentes**

A cola cirúrgica (2-octil-cianoacrilato) comercial foi adquirida da Empresa Johnson & Johnson, marca Dermabon<sup>®</sup> Ethicon, lote RGBACA e validade 31/05/2023. Cada frasco da cola cirúrgica tem o volume de 0,5mL. O corticoide acetinado de triancinolona (AT) em pó, foi doado pela Empresa Phito Fórmulas – Sorocaba/SP, adquirido da Lepuge Insumos Farmacêuticos Eireli, com certificado de análise, lote BD-09-191201 e validade 14/12/2023. Todos os reagentes e sais com alto grau de pureza foram obtidos dos laboratórios (Sigma-Aldrich, Synth e Labsynth).

#### **3.2. Animais**

Os animais utilizados foram 20 ratos Wistar machos, com idade aproximada de 3 meses, pesando entre 200 e 250g, fornecidos pelo Biotério da FCMS–PUC/SP. Os animais foram mantidos em gaiolas abastecidas com água e ração *ad libitum*, em ambiente com temperatura constante e iluminação controlada (12h com luz e 12h sem luz). O projeto foi aprovado em 27/02/2022 pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCMS – PUC/SP, protocolo n°2022/132 (ANEXO A), de acordo com os preceitos da Lei n°11.794 (8 de outubro de 2008), do Decreto n°6.899 (15 de julho de 2009) do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

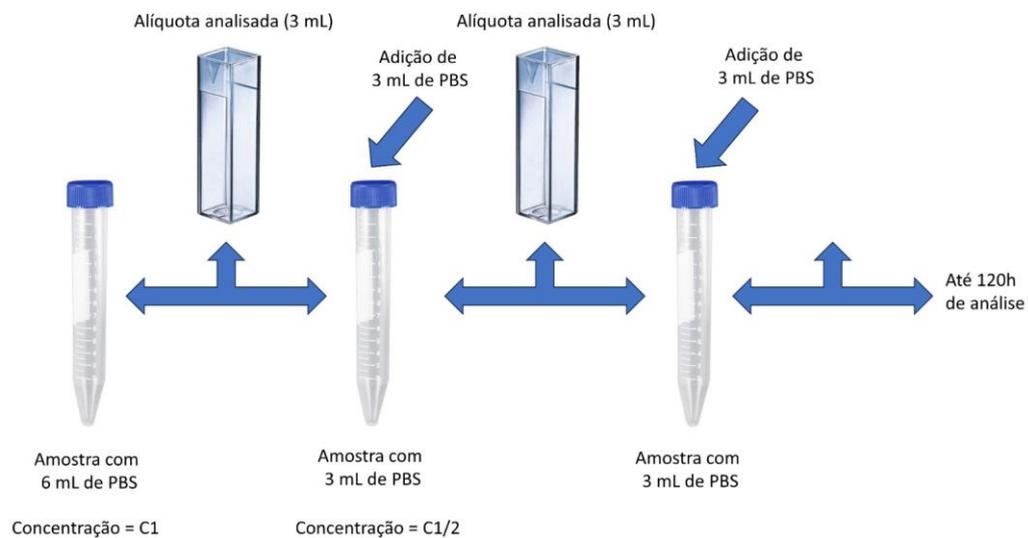
#### **3.3. Caracterização da cola cirúrgica associada a AT**

##### **3.3.1 Ensaio de Liberação**

O ensaio de liberação foi realizado em duplicata, com três concentrações diferentes de corticoide, filmes de 5mg/mL (2,5mg de AT), 10mg/mL (5mg de AT) e 20mg/mL (10mg de AT). As amostras foram imersas em tubos Falcon com 6 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS) 0,01M e mantidas a 37°C em banho termostático. Em seguida, as alíquotas de 3 mL foram coletadas inicialmente após 1, 9, 20, 30, 40, 50, 60 min, seguidas por coletas em 2, 3, 4 e 5h. Após essa etapa inicial, as alíquotas foram coletadas a cada 24h até completar 120h de ensaio. A quantidade retirada em cada alíquota foi de 3mL e repostada com solução de PBS após cada coleta.

As amostras coletadas foram analisadas em um espectrofotômetro da marca Femto, modelo Cirrus 80, no comprimento de onda de 274 nm. A partir da absorbância obtida para cada amostra, calculou-se a quantidade de AT liberada em cada intervalo de tempo. Para este cálculo, utilizou-se uma curva de calibração com o fármaco em teste, obtendo-se um valor na concentração em cada tempo. Os resultados foram somados, após serem divididos por dois e subtraídos do tempo anterior, gerando a concentração final (Figura 8).

Figura 8 - Esquema do cálculo de liberação de fármaco AT no filme 2-octil-cianoacrilato.



Cálculo para liberação do fármaco:  $C_1 + (C_2 - C_1/2) + C_2 (C_2 - C_3/2) + C_3 (C_3 - C_4/2)$  e assim por diante. Fonte: Próprio Autor.

### 3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada De Fourier (FTIR)

As amostras de cola pura (C), AT puro e cola modificada (C+AT) nas concentrações de 2,5mg (5mg/mL), 5mg (10mg/mL) e 10mg (20mg/mL) foram analisadas em um equipamento de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, com modo ATR (Attenuated Total Reflectance), Spectrum 65 (Perkin Elmer). Os espectros de absorção foram obtidos na faixa de  $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $600 \text{ cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$  e com 32 scans de varredura.

### 3.3.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A estabilidade térmica das amostras foi avaliada utilizando o equipamento TA Instruments modelo Discovery TGA 55. As amostras com massa de aproximadamente 10mg foram submetidas ao aquecimento na faixa de temperatura de 25 a 700°C, com uma razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

### 3.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial foi realizada utilizando o equipamento TA Instruments modelo Discovery DSC 25. As amostras com massa de aproximadamente 7 mg foram submetidas ao aquecimento no intervalo de 25°C até 250°C, com razão de aquecimento de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio.

### 3.3.5 Análise microscópica da cola cirúrgica associada a AT por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras em duplicata foram fixadas em solução Karnovsky (2,5% de glutaraldeído + 2% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio à 0,2 M, acrescido de 18uM de cloreto de cálcio, pH 7,4) à 4°C por pelo menos 2 horas, submetidas à tratamento para assumir eletrondensidade com tetróxido de ósmio a 1% por 1 h. Em seguida, foi realizada a desidratação em séries crescentes de etanol até a concentração de 100% e secagem equivalente a ponto crítico utilizando séries crescentes de etanol e hexametildizilazano (HMDS) até secagem final a temperatura ambiente contendo apenas HDMS. Finalmente, foi realizado cobertura por plasma de ouro na espessura de 40nm, seguido da montagem em porta amostra para MEV e analisado ao MEV analítico JEOL JSM-6490LV sob tensão de 5kV utilizando elétrons secundários.

### 3.3.6 Manutenção da Cola cirúrgica

A associação da AT à cola cirúrgica de 2-octil-cianoacrilato foi realizada de maneira antisséptica. Em eppendorf, pesou-se a AT em balança analítica as concentrações de 10mg e, posteriormente, incorporou 0,5mL da cola cirúrgica. A

mistura foi homogeneizada em vórtex mixer da marca Fisher Scientific® e, na sequência, a cola modificada (20mg/mL) foi embalada para uso no mesmo dia do procedimento cirúrgico.

### 3.4. Delineamento do Estudo Pré-Clínico

#### 3.4.1 Estudo com experimentação animal

Este estudo foi realizado como ensaio pré-clínico, contralateral e controlado pelos pesquisadores. Este ensaio possui a vantagem de ter o mesmo animal como controle dele mesmo, ou seja, análise pareada ao invés de grupos independentes. A maior vantagem desse processo é o aumento do poder estatístico e redução do número de animais, porém, com uma amostra significativa (Souza, 2009).

Para a realização dos experimentos, todos os 18 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) foram selecionados aleatoriamente e alocados em grupos experimentais (Tab. 1).

Tabela 1 - Grupos experimentais.

Grupo	Tratamento contralateral	Duração do experimento
A (n= 8)	Somente Cola (C) e Cola+AT (C+AT)	7 dias
B (n=10)	Somente Cola (C) e Cola+AT (C+AT)	14 dias
C (n= 3) do próprio animal em estudo	Naïve (N, pele intacta/integra)	7 ou 14 dias

Fonte: Próprio Autor.

Em seguida, para a realização cirúrgica, os animais foram pesados e anestesiados com cetamina 100mg/Kg e xilazina 6mg/Kg por via intraperitoneal. Após realização prévia da tricotomia e antisepsia com solução de clorexidina a 2% e limpeza com solução fisiológica da superfície a ser incisionada, o experimento seguiu com a realização de 2 feridas no dorso do animal (3 cm cada). Estas feridas foram paralelas e separadas entre si pela distância de 4 cm e com profundidade de aproximadamente 2mm (Figura 9).

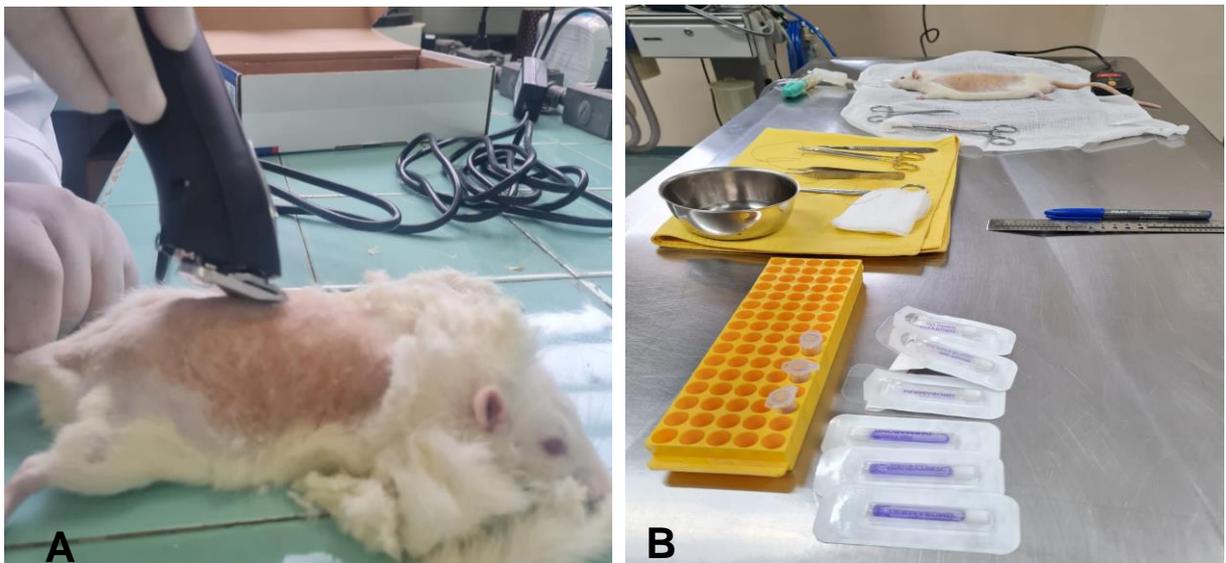
Para ação hemostática, utilizou-se a técnica de compressão digital com gaze estéril por 2 min (Kemper *et al.*, 2015). Após alcançada a hemostasia, as feridas na região dorsal esquerda foram submetidas à aplicação da cola cirúrgica 2-octil-cianoacrilato.

Já para as feridas na região dorsal do lado direito foram utilizadas a C+AT, preparada e utilizada no mesmo dia do experimento. O biomaterial (somente cola ou C+AT) foi aplicado diretamente sobre a linha da incisão, sendo as bordas mantidas bidigitalmente em aproximação por 60 segundos.

Em seguida, os animais foram distribuídos aleatoriamente nas gaiolas, sendo 1 animal/gaiola, para avaliação diária. Fim do período de 7 ou 14 dias, todos os animais foram submetidos à eutanásia com dose letal de isoflurano inalatório e biopsiados os tecidos de ambas as incisões, para as análises histológica e imunohistoquímica.

Ainda em tempo, inicialmente a proposta eram utilizar 20 ratos, divididos em 2 grupos (10 em cada), mas no decorrer dos experimentos, dois animais do grupo 7 dias precisaram ser eliminados do projeto, por deiscência completa da ferida cirúrgica decorrente da falta de adesão do curativo e movimentação dos animais.

Figura 9 - Fotografia da experimentação animal.



(A) Realização da tricotomia com máquina de tosa Oster®. (B) Preparo para realização da cirurgia.  
Fonte: Próprio Autor.

### 3.5 Análise macroscópica

Na análise macroscópica, os ratos de todos os grupos foram observados quanto aos seguintes parâmetros do processo cicatricial: coaptação das bordas, secreção, deiscência e infecção, durante todo o período da experimentação (7 ou 14 dias).

### 3.6 Análise microscópica

As lâminas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol (10 min cada); hidratadas em série decrescente de etanol (100%, 95%, 80% e 70%) e água destilada, e coradas em: Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), cada lâmina com um total de três cortes histológicos e o total de lâminas para cada coloração e imuno-histoquímica foram iguais a 39 lâminas:

#### **Grupo A**

- 8 ratos 7 dias = **C** e **C+AT**, total de 16 lâminas;

#### **Grupo B**

- 10 ratos 14 dias= **C** e **C+AT**, total de 20 lâminas;

#### **Grupo C**

- Naïve (**N**) (do próprio animal em estudo), total de 3 lâminas.

#### 3.6.1 Coloração - Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas foram coradas com Hematoxilina, por 5 minutos, lavadas em água corrente, coradas com Eosina, por 3 minutos, e finalmente lavadas em água corrente. Os exames histológicos das secções do neotecido foram analisados em 6 campos, na objetiva de aumento de 40X, e os seguintes parâmetros foram avaliados:

- 1) presença ou não de crosta: presente ou ausente;
- 2) grau de fibrose: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 3) tecido de neovascularização: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 4) presença de linfócitos/plasmócitos: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 5) presença de macrófagos: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 6) presença de neutrófilos: ausente, leve, moderado ou intenso;
- 7) presença de células gigantes: ausente, leve, moderado ou intenso.

Foram utilizados os seguintes escores:

- 0= ausente;
- 1= leve (1-5);
- 2= moderado (6-10);
- 3= intenso (11 ou mais).

Esta análise foi realizada sob a supervisão do Patologista Dr. Nelson Brancaccio dos Santos, que desconhecia os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam.

### 3.6.2 Coloração - Tricrômico de Masson (TM)

As lâminas foram mantidas, por 1 hora, na estufa, resfriadas, lavadas em água corrente até clarear completamente, lavadas em água destilada, por 3 vezes, e tratadas com solução Escarlata de Biebrich, por 3 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada, mantidas em ácido fosfotúngstico, por 8 minutos, lavadas em água corrente e destilada, mantidas em azul de anilina, por 3 minutos e finalmente lavadas em água corrente. Tricrômico de Masson (TM) foi usado para identificação das fibras de colágeno em todos os grupos experimentais. Foram analisados 6 campos, na objetiva de aumento de 40X, sob a supervisão do Patologista Dr. Nelson Brancaccio dos Santos, que desconhecia os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam. Foram utilizados os seguintes escores:

- 0= ausente;
- 1= leve (menor ou igual a 25%);
- 2= moderado (de 25% a 50%);
- 3= intenso (mais que 50%).

### 3.6.3 Análise Imuno-histoquímica

Para a imuno-histoquímica, as lâminas sinalizadas foram desparafinizadas em dois banhos de xilol (10 min cada); alcoolizadas em série decrescente de etanol (100%, 95%, 80% e 70%), hidratadas em água destilada, submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10%, por 30 minutos, lavadas em PBS 0,05M, tratadas em solução de PBS/BSA 1% (BSA, Sigma-Aldrich Chemical Co, Mo,

USA) por uma hora para bloqueio das proteínas inespecíficas, e novamente lavadas em PBS 0,05M.

A técnica de imuno-histoquímica da imunoperoxidase indireta foi realizada pela Dra. Camilla Fanelli, do Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP-SP). Para esta técnica foi empregada a identificação de macrófagos, detectados através da positividade para o marcador de superfície CD68; miofibroblastos, detectados pela presença da proteína alfa-actina de Músculo Liso ( $\alpha$ -*Smooth Muscle Actin* =  $\alpha$ -SMA); e fibronectina. Após a desparafinização, foi realizada a recuperação antigênica por calor úmido, utilizando-se uma solução de Ácido Cítrico a 10 mM, tamponado a pH 6, em microondas, por 15 minutos. As lâminas foram resfriadas e mergulhadas em solução tampão TBS (Tris buffer saline) pH 7,6.

Os cortes foram delimitados com a caneta hidrofóbica (PAP PEN) e as incubações foram feitas em câmara úmida, protegida da luz, a fim de evitar o ressecamento dos cortes. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de peroxidase endógena (Peroxidase Block #ACA015, ScyTek Laboratories, USA) seguido pelo bloqueio contra marcação inespecífica (Super Block #AAA125, ScyTek Laboratories, USA). Para a detecção de macrófagos, os tecidos foram incubados com 50 mL de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti-CD68 clone ED-1* (Serotec, #MCA341R), na diluição de [1:200], para a identificação de miofibroblastos, os cortes foram incubados com 50 mL de solução de anticorpo primário *Monoclonal Mouse Anti  $\alpha$ -SMA* (Sigma, #A5228), na diluição de [1:1000] e para identificação de fibronectina, usamos o anticorpo primário *Polyclonal Rabbit Anti-Fibronectin* (Sigma, #F3648), na diluição de [1:200].

Os anticorpos foram diluídos em solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% em TBS e as incubações foram realizadas em câmara úmida, a 4°C, tendo duração entre 12-16 horas (*Over Night*). No dia seguinte as lâminas foram lavadas em TBS e incubadas com a solução de anticorpos secundários marcados com peroxidase ENVISION Flex Mouse & Rabbit HRP (Dako #K4061) por 45 minutos. Sequencialmente, os cortes foram mais uma vez lavados em TBS e submetidos à revelação com solução a base de Dab (Diaminobenzidine, Dab Chromogen + Substrate Kit #ACB030, ScyTek Laboratories, USA), seguida de contra-coloração com Hematoxilina de Harrys. Findo essa etapa, as lâminas foram analisadas, na PUC-SP, em microscopia óptica, observação de 6 campos na objetiva de aumento de 40X, sob

a supervisão do Patologista, Dr. Nelson Brancaccio dos Santos, que desconhecia os grupos experimentais aos quais os animais pertenciam.

Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Marcador de superfície CD68: identificação de macrófagos, detectados através da positividade. Foram utilizados os seguintes escores:

- 0= ausente;
- 1= leve (1-5);
- 2= moderado (6-10);
- 3= intenso (11 ou mais).

- Marcador da proteína Alfa-actina de Músculo Liso ( $\alpha$ -Smooth Muscle Actin -  $\alpha$ -SMA): presença de miofibroblastos.

- Marcador da Fibronectina: presença da proteína fibronectina

Foram utilizados os seguintes escores:

- 0= ausente;
- 1= leve (menor ou igual a 25%);
- 2= moderado (de 25% a 50%);
- 3= intenso (mais que 50%).

### 3.7. Análise estatística

#### 3.7.1. Cálculo do tamanho da amostra

Para tanto, fez-se necessário o cálculo do tamanho da amostra para uma estimativa confiável. Então, tamanhos de amostra estimados para um teste de médias de 2 amostras:

teste t, assumindo  $SD1 = SD2 = SD$

$H_0: M2 = M1$  versus  $H_a: M2 \neq M1$

A referência utilizada para o cálculo do tamanho da amostra foi o artigo que realizou a análise histológica comparativa do reparo tecidual após síntese com fio de nylon e adesivo de Etil-2-cianoacrilato em feridas cutâneas de ratos. (Ramos *et al.*, 2020).

Cálculo de amostra para comparar 2 médias:

M1=78,25 (cola+AT)?

M2=75,5 (cola)?

(power two means 78.25 75.5 - STATA)

Parâmetro de estudo:

alpha = 0,0500

power = 0,8000

delta = -2,7500

m1 = 78,2500

m2 = 75,5000

sd = 1,0000

*Tamanho da amostra estimado:*

N = 8 amostras (ratos)

N por grupo = 4 ratos (2 amostras/rato)
---

### 3.7.2. Testes estatísticos utilizados para as Análises histológica e imuno-histoquímica

A análise estatística foi realizada com a utilização do comando WSAnova no programa STATA, que procede a Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas entre amostras dependentes. Isto porque foram feitas 6 contagens por rato para cada tratamento, e 2 tipos de tratamento no mesmo rato, a saber Cola e C+AT. Utilizou-se o mesmo procedimento para todas as variáveis analisadas, de histopatologia e de imuno-histoquímica. Descreveu-se a média, o desvio-padrão, o valor do F de Snedecor e o p, assim como o número de contagens e ratos, em cada teste estatístico. Considerou-se um  $p < 0,05$ . Para a utilização da ANOVA assumiu-se que os dados apresentam distribuição normal após aplicação do teste de Shapiro-Wilk, realizado com o comando swilk no STATA e precedeu-se a confirmação de homocedasticidade, ou seja, razão entre variâncias das amostras menor do que 4.

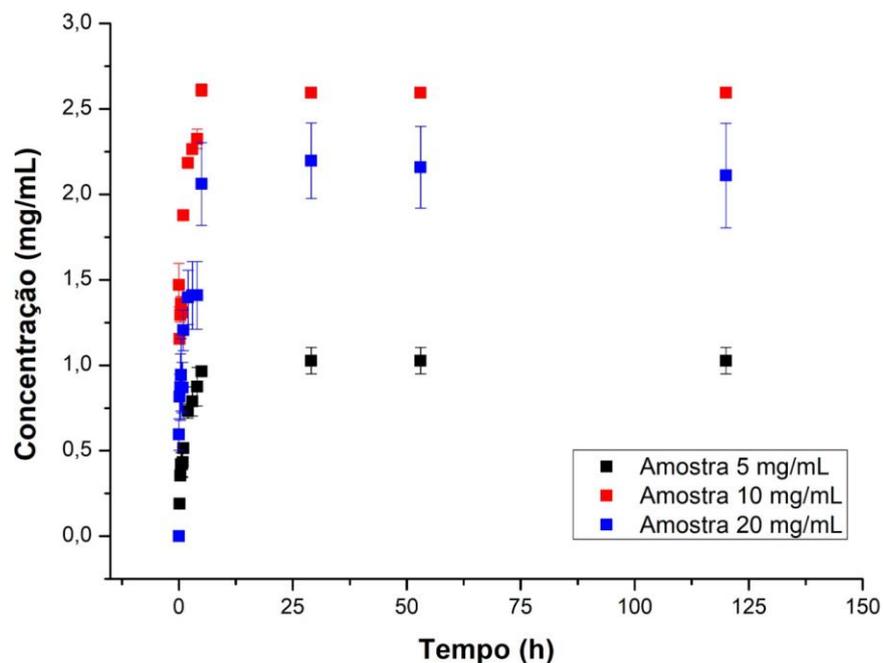
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização da cola cirúrgica associada ao corticoide

#### 4.1.1 Ensaio de Liberação

A Figura 10 ilustra as curvas médias de liberação da AT em função do tempo. Esta é uma análise, *in vitro*, utilizada para avaliar o perfil de liberação da amostra de interesse para o meio e objetivo deste ensaio foi escolher a concentração do corticosteroide para ser incorporado à cola, a fim de que a liberação do fármaco ocorresse em aproximadamente 5 dias, uma vez que este é o tempo que o corticosteroide atua no processo de inflamação, sem interferir na cicatrização final. (Mulder *et al.*, 1998; Carlson, 1997). Assim, o limite de cinco dias foi definido para evitar um possível efeito do corticosteroide no processo de imunossupressão ou atrofia da lesão, assegurando apenas o seu efeito anti-inflamatório. Foram analisados os filmes de cola com 2,5 mg (5 mg/mL), 5 mg (10 mg/mL) e 10 mg (20 mg/mL).

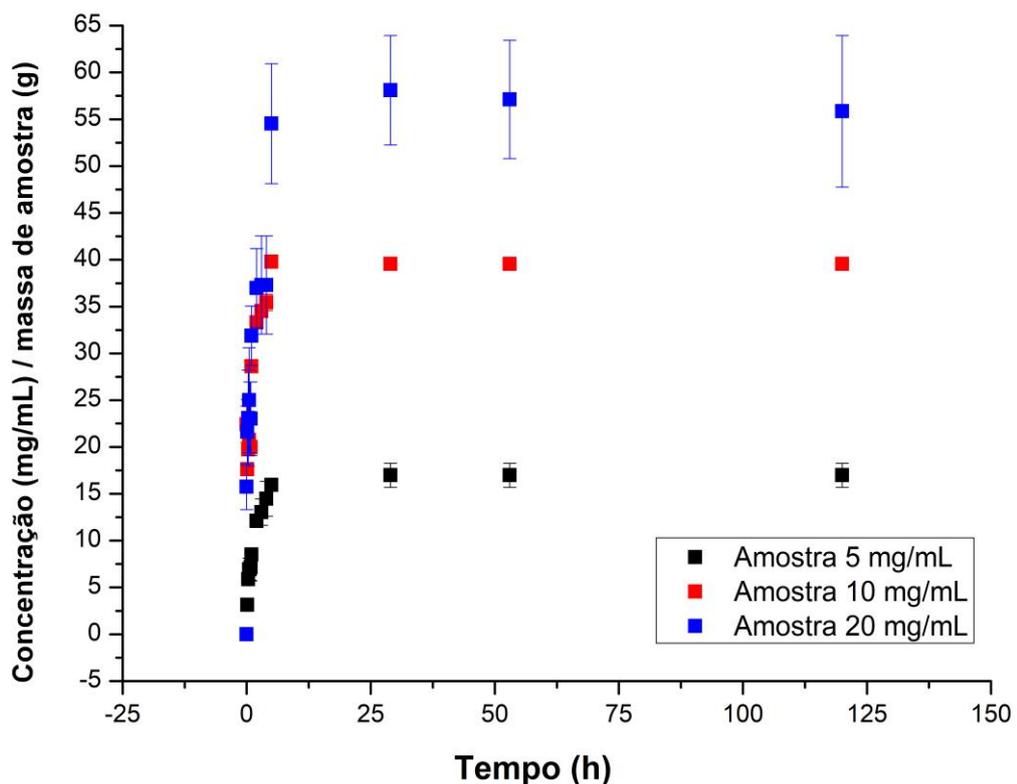
Figura 10 - Ensaio de Liberação Modificada do AT na cola de 2-octil-cianoacrilato.



Curvas de Liberação em função do tempo em diferentes concentrações de AT.  
Fonte: Próprio Autor.

É possível observar na Figura 10 que o filme de 5mg/mL de AT apresentou a menor quantidade de AT liberada. Este resultado se faz coerente, pois era a amostra com a menor quantidade de AT. Entretanto, nesse gráfico, o filme com 20mg/mL de AT não apresentou a maior concentração, sendo o filme de 10mg/mL de AT que apresentou a maior quantidade liberada. Esse resultado se deu por diferença de massa das amostras analisadas. Neste caso, as amostras do filme de 10mg/mL de AT tinham maior massa do que as amostras de filme com 20mg/mL de AT. Para confirmar esta explicação, a liberação de forma proporcional em relação à massa das amostras, o resultado foi dividido pela massa de cada amostra analisada e o resultado é apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Ensaio de Liberação Modificada do AT na cola de 2-octil-cianoacrilato.



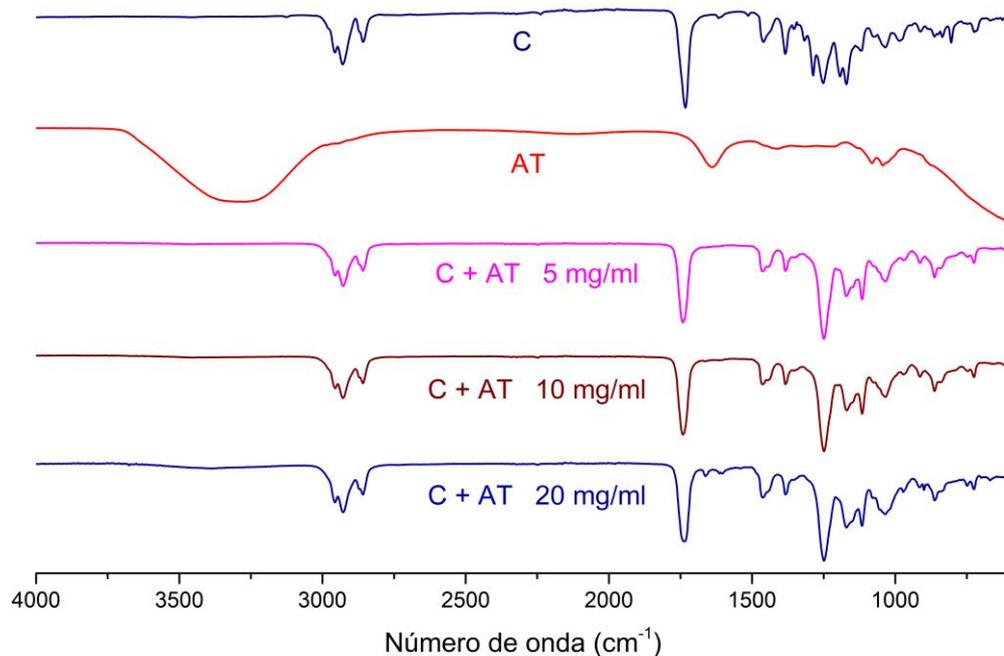
Curvas de Liberação em função do tempo em diferentes concentrações de AT proporcional a massa.  
Fonte: Próprio Autor.

Portanto, o resultado ilustrado na Fig. 11 mostra que quanto maior a quantidade de AT incorporada à cola, a maior é quantidade de AT liberada para o meio. Além disso, a quantidade de AT liberada, normalizada em função da massa de filme de cola analisada, mostrada na Fig. 11, o que corrobora com a explicação da Fig. 10.

#### 4.1.2 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 12 ilustra os espectros de FTIR das amostras de filme de cola pura, corticosteroide AT e os filmes com diferentes quantidades de AT.

Figura 12 - Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR).



FTIR – Com a cola pura (C), corticoide (AT) e C+AT nas concentrações de 5mg/mL, 10mg/mL e 20mg/mL.

Fonte: Próprio Autor.

O filme de cola pura (C) apresenta um pico em 3120 cm<sup>-1</sup> referente aos estiramentos da ligação =CH<sub>2</sub>; 2930 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação –CH<sub>3</sub>; 1732 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação C=O e 1250 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento da ligação C-O-C (Santos, 2021; Villarreal-Gómez; Torregrosa-Coque; Martín-Martínez, 2013).

Já o corticosteroide AT puro apresenta um pico entre 3500 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  atribuído ao estiramento da ligação O-H; um pico em 1704  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento da carbonila (C=O); um pico em 1662  $\text{cm}^{-1}$  atribuído à ligação C=C e uma um pico em 1050  $\text{cm}^{-1}$  referente ao alongamento vibracional da ligação C-F presente (Nascimento, 2020; Dandamudi, *et al.*, 2021).

Para as amostras com C+AT nas três concentrações testadas não foram observados o surgimento de novos picos no FTIR, além dos já existentes, após a adição da AT à cola, sendo um indicativo da não existência de uma ligação química entre a estrutura da cola e o AT. Isto é uma característica desejável para que as moléculas de AT sejam liberadas.

Além disso, após a adição de AT a cola pura, nas diversas concentrações, os espectros das formulações se mantiveram praticamente iguais ao do filme de cola pura, sem evidência de presença do fármaco para todas as concentrações. Uma possível explicação para tal fato está relacionado a pequena quantidade de AT presente na formulação, a qual pode estar alocada no interior do filme de cola seca e não na superfície dele, dificultando a sua identificação.

Entretanto, no filme de cola 20 mg/mL foi possível observar picos em 1704  $\text{cm}^{-1}$  e 1662  $\text{cm}^{-1}$ , os quais estão relacionados à presença das moléculas de AT na superfície do filme da cola seca. Isto corrobora com a explicação de que em concentrações abaixo de 10 mg de AT, estas moléculas estão alocadas no interior do filme de cola seca, devido à concentração da mesma ser baixa.

Portanto, a existência de moléculas de AT na superfície da cola seca e evidenciada pelo FTIR é um fator determinante para a escolha da amostra com 20mg/mL para ser utilizada no ensaio pré-clínico.

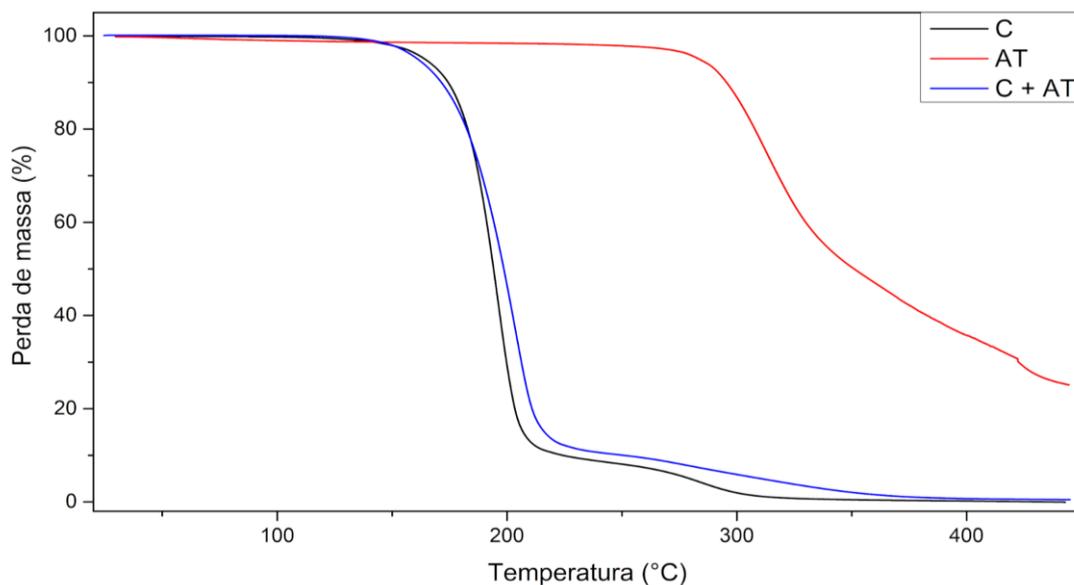
#### 4.1.3 Análise Termogravimétrica (TG)

A Figura 13 ilustra as curvas termogravimétricas das amostras do filme de cola pura, corticoide AT e filme de 20mg/mL de AT. Nela foi possível observar que o filme de cola pura mostrou uma perda de massa próximo a 200 °C. Segundo Villarreal-Gómez e colaboradores (2013) o octil-2-cianoacrilato inicia sua degradação térmica entre 150 e 200 °C, sendo que a degradação total ocorre antes de 250 °C, de modo que o resultado aqui apresentado está em consonância com a literatura científica.

Por sua vez, o corticosteroide AT apresentou uma perda de massa próxima a 300 °C a qual está relacionada à degradação desta molécula. Em seu trabalho de encapsulamento de AT em nanopartículas de PLGA e quitosana, Dandamudi e colaboradores (2021) relatou a perda de massa próximo às 290 °C, tal como encontrado neste trabalho.

E por fim, o filme de 20mg/mL apresentou uma perda de massa próximo a 210°C. Neste caso, observa-se que não houve uma variação significativa na curva termogravimétrica, em relação à cola pura, quando incorporado o corticosteroide de AT. Assim, este resultado mostra que a presença da AT não influenciou a estabilidade térmica do filme cola pura.

Figura 13 -Curvas Termogravimétricas (TG).

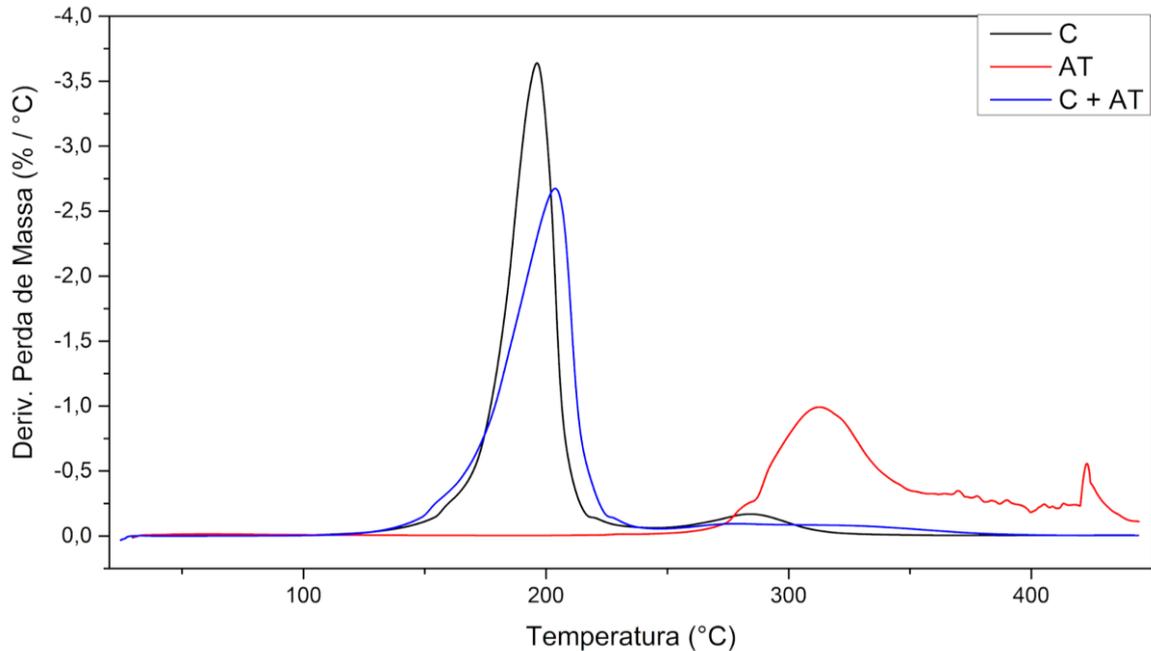


TG do filme de cola pura, AT e filme de 20mg/mL de AT.

Fonte: Próprio Autor.

A Figura 14 ilustra as curvas da derivada da curva termogravimétrica (DTG) das amostras do filme de cola pura, AT e filme de 20mg/mL de AT.

Figura 14 - Derivada da curva termogravimétrica (DTG).

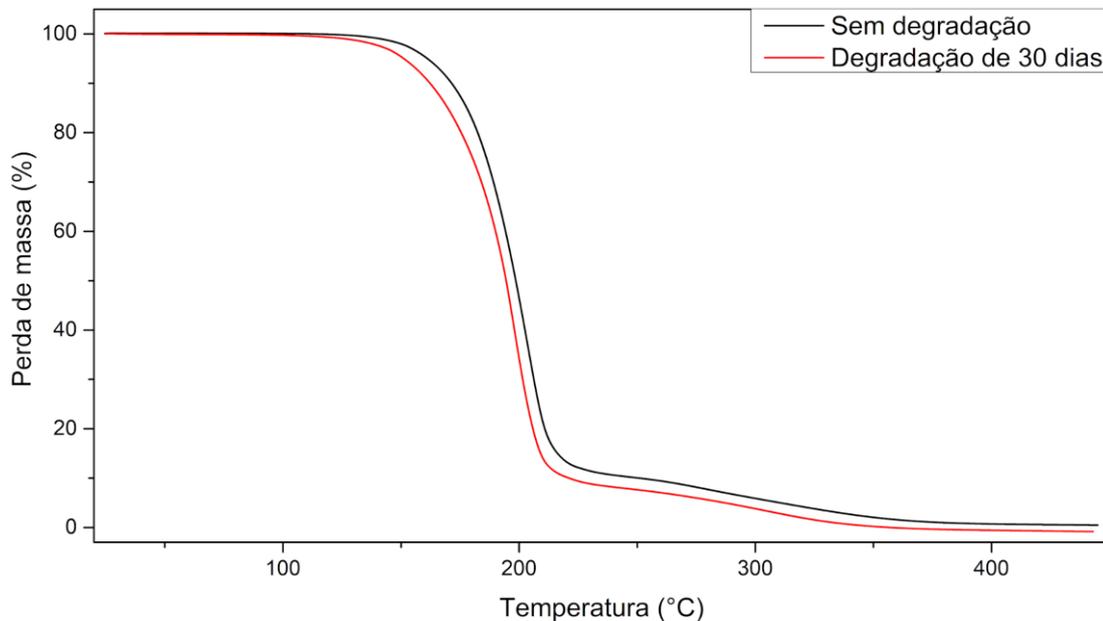


DTG das amostras do filme de cola pura, AT e filme de 20mg/mL de AT.  
Fonte: Próprio Autor.

Em relação às curvas de DTG, Figura 14, a cola pura apresentou dois picos. O primeiro próximo à 190 °C e o outro, menos intenso, próximo à 280 °C, que estão relacionados à degradação térmica da cola pura. A amostra de C+AT apresentou um único pico próximo à 210 °C que está relacionado à degradação térmica da cola pura, porém, quando se compara a intensidade deste pico com o encontrado para a cola pura (190 °C), ele é menos intenso. Portanto, isto sugere que a adição da AT deixa o processo de degradação mais lento quando comparado ao processo do filme de cola pura. E por fim, a amostra de AT apresentou um único pico de DTG, o qual está relacionado à degradação dessa molécula.

A Figura 15 ilustra um comparativo entre os termogramas do filme da cola com AT antes e após 30 dias imersos em água destilada.

Figura 15 - Análise Termogravimétrica (TG) com ensaio de degradação.



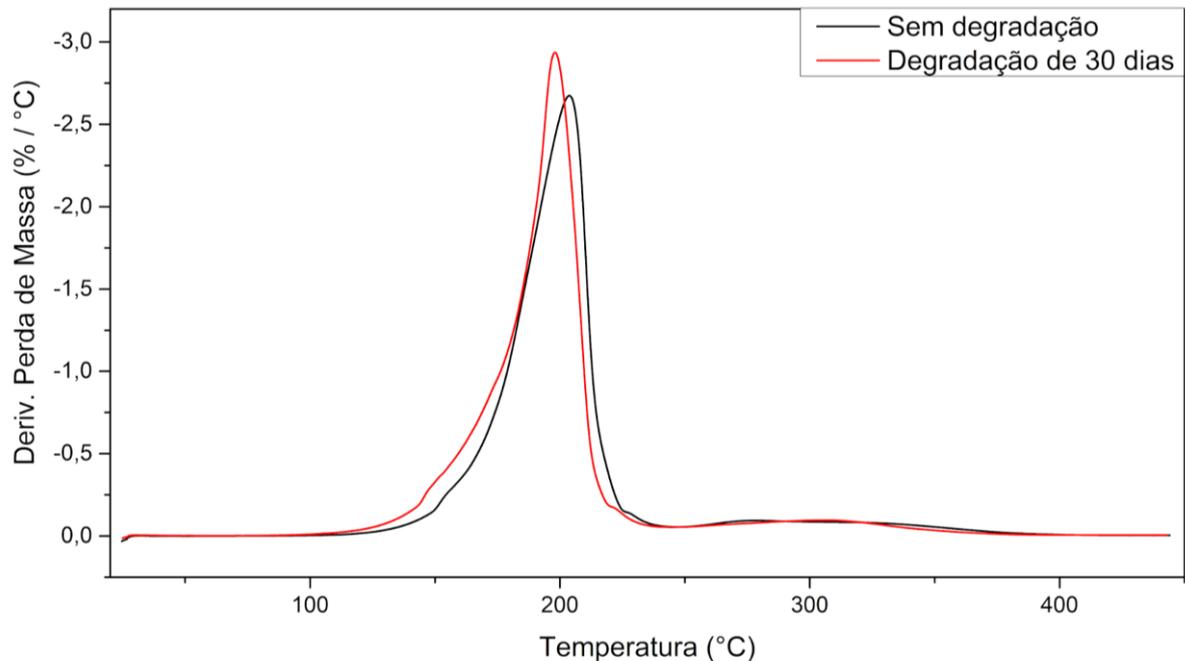
TG do filme de 20mg/mL antes e após 30 dias em banho termostático à 37 °C.  
Fonte: Próprio Autor.

Assim, é possível observar que houve uma leve diferença na curva termogravimétrica do filme degradado em solução de água destilada, quando comparado ao filme que não passou por esse processo. Neste caso, o filme degradado apresentou uma ligeira redução na estabilidade térmica, quando comparado ao não degradado, devido à quebra das cadeias poliméricas durante o período de imersão. Apesar disso, esta redução não compromete a utilização da cola, pois o início da perda de massa ( $T_{onset}$ ) ocorre em temperaturas acima de 130°C.

A Figura 16 ilustra as curvas da derivada da curva termogravimétrica (DTG) dos filmes de 20mg/mL de AT antes e após 30 dias imersos em solução de água destilada. Neste caso, observando a Fig. 16, foi possível verificar que a cola não degradada apresentou um pico próximo à 210 °C, enquanto a amostra imersa em solução de água destilada por 30 dias apresentou um pico próximo à 185 °C. Assim como na análise da Fig. 15, o processo de degradação reduz a estabilidade térmica da cola. Além disso, o pico menos intenso da cola sem degradação quando comparado ao filme degradado sugere que a exposição do filme por 30 dias em solução de água destilada fragiliza a estrutura do polímero, deixando o processo de

degradação mais rápido quando comparado ao processo da cola não imersa na solução.

Figura 16 - Análise Termogravimétrica (TG) com ensaio de degradação.



TG (Derivação da perda de massa) do filme 20mg/mL de AT antes e após de 30 dias em banho termostático à 37 °C.

Fonte: Próprio Autor.

#### 4.1.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

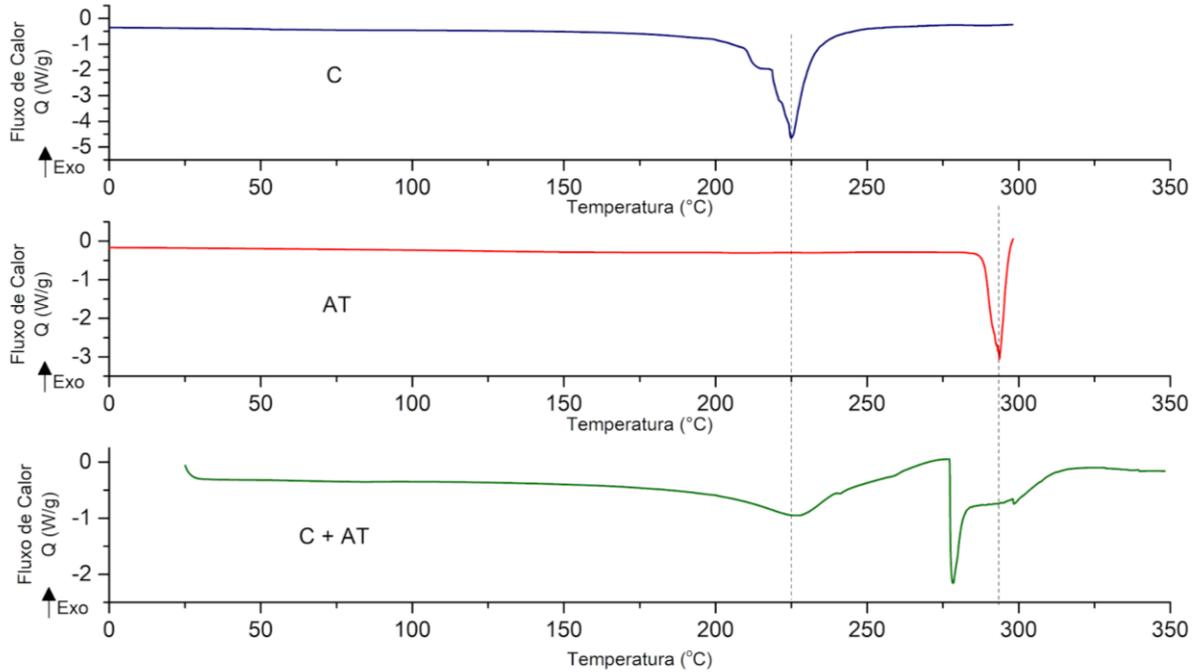
A Figura 17 ilustra as curvas de DSC do filme da cola cirúrgica pura, o corticoide AT puro e o filme 20mg/mL de AT. Todas as amostras foram submetidas ao ensaio de DSC, a fim de se observar seus eventos térmicos.

O filme de cola pura mostrou um pico em 225 °C, temperatura esta que é próxima ao que foi encontrado no TG, na região de grande perda de massa, podendo ser, portanto, este evento endotérmico atribuído à degradação do filme da cola pura. Por sua vez, a amostra de AT apresentou um pico em 290 °C que também está relacionado à degradação desta amostra, uma vez que essa temperatura se encontra na região de grande perda de massa, observado na curva termogravimétrica.

Ao se analisar a curva de DSC do filme de cola com AT verifica-se dois picos endotérmicos: o primeiro acontece em 225 °C e o segundo acontece em 280 °C. O primeiro evento está relacionado à degradação do filme de cola pura e o segundo

evento está relacionado à degradação da AT (Santos, 2021; Nascimento, 2020; Barkan *et al.*, 2017).

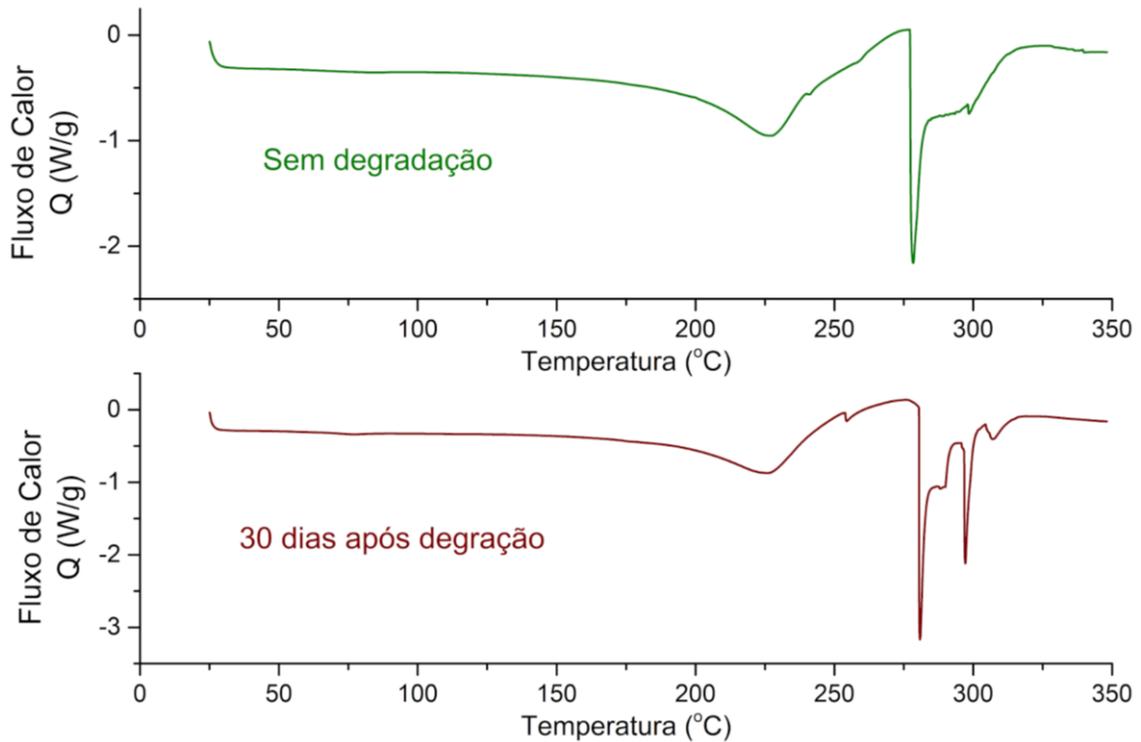
Figura 17 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).



DSC da cola cirúrgica (2-octil-cianoacrilato) pura, corticosteroide AT e filme 20mg/mL  
Fonte: Próprio Autor.

A Figura 18 ilustra as curvas de DSC dos filmes de 20mg/mL de AT antes após 30 dias imersos em água destilada.

Figura 18 - Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).



DSC do filme 20mg/mL de AT antes e após de 30 dias em banho termostático à 37°C  
 Fonte: Próprio Autor.

É possível observar na Figura 18 que as respectivas amostras, degradada após 30 dias em solução de água destilada e não degradada, não apresentaram diferenças nos picos de temperaturas antes de 225 °C, referente ao evento térmico do filme de 20mg/mL. A partir dessa temperatura qualquer pico evidenciado no gráfico corresponde a degradação do polímero e não possui efeito significativo nos resultados.

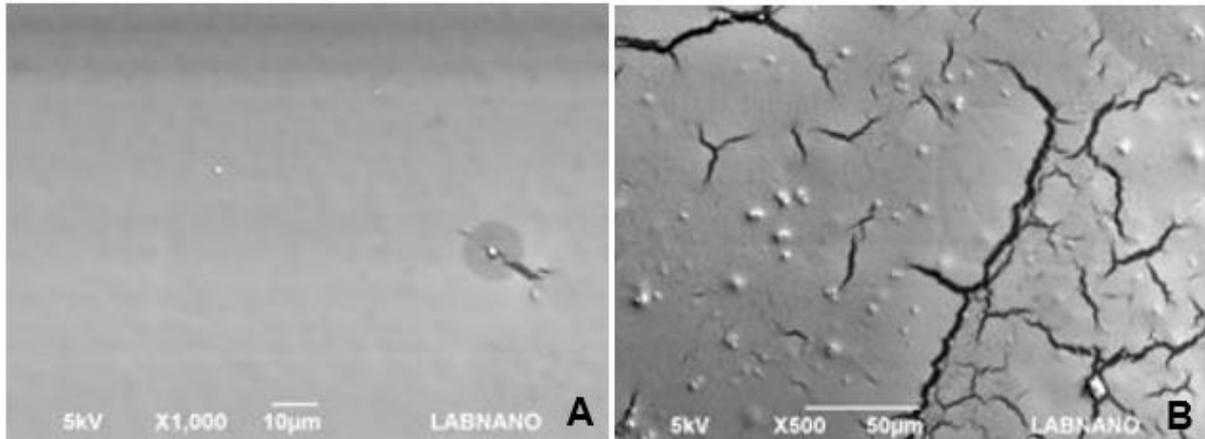
#### 4.1.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica foi utilizada para avaliar as imagens em alta resolução e aumento da superfície das amostras, o qual demonstram detalhamento das características da área 3D da superfície.

Para a caracterização do novo composto formado pelo polímero C+AT (20 mg/mL), foi realizado a MEV comparando-o com o polímero não modificado. Na cola pura, exposta na Figura 19 A, a superfície aparece de forma homogênea, uniforme, apresentando uma estrutura molecular organizada.

Na cola modificada com filme de 20mg/mL de AT, conforme mostrado na Figura 19B, a superfície parece irregular, sugerindo que a coesão molecular foi interrompida devido à presença do AT, que possui baixa solubilidade. Isso resulta em uma diferença de fase e um aspecto de ressecamento, embora não haja perda de água.

Figura 19 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



(A) MEV da cola pura reticulada apresentando superfície lisa e homogênea.

(B) MEV Do filme 20 mg/mL identificou-se perda da coesão e apresentação heterogênea granulosa.

Fonte: Próprio Autor.

A molécula de corticosteroide de AT se apresenta na forma de nanoagregados e tem baixa solubilidade (Formica *et al.*, 2023). No entanto, quando associado à cola, os nanoagregados se mostraram dispersos na cola reticulada, conferindo um aspecto granuloso observado no MEV.

Nessa mesma linha, Yao *et al.* (2019) estudaram nanopartículas biodegradáveis de poli(butil-2-cianoacrilato), uma cola cirúrgica polimérica como adesivo tecidual para fechamento de feridas cutâneas, associadas ao dodecil sulfato de sódio (SDS) e avaliaram através do MEV as transições morfológicas de nanopartículas esféricas para nanofios cilíndricos alongados afetadas pelo SDS, evidenciando que adição de novos ativos em polímeros de adesivo tecidual pode interferir nas características de área de superfície 3D identificadas pela microscopia eletrônica de varredura.

## 4.2. Análise macroscópica

A análise macroscópica realizada não evidenciou diferença na cicatriz cirúrgica de ambas as incisões, tratada com a cola pura (C) e com corticoide (C+AT), apresentando boa coaptação de bordas, ausência de secreção, ausência de infecção e deiscência, evidenciando que a incorporação do AT (20mg/mL) não alterou a propriedade mecânica da adesividade da cola (Figura 20).

Entretanto, mais da metade dos ratos operados apresentaram algum grau de deiscência, em ambas as incisões, possivelmente pela impossibilidade de restrição do nível de atividade laboral dos ratos após uma cirurgia, corroborando com a observação de outros estudos com modelo animal (Freitas-Junior *et al.*, 2008).

Vale ressaltar que nenhum rato apresentou secreção ou infecção da ferida cirúrgica em ambas as lesões, validando com estudos que sugerem que o 2-octil cianoacrilato possa diminuir a taxa de infecção operatória (Singer; Thode, 2004; Quinn *et al.*, 1997), mesmo com a adição do AT no sistema de liberação modificada do corticoide em 5 dias. Os cianoacrilatos supostamente exercem um efeito protetor contra microorganismos formando uma barreira antimicrobiana no local da ferida (Rushbrook *et al.*, 2014).

Figura 20 - Rato Wistar macho após 7 dias do procedimento.



Presença coaptação de bordas, ausência de secreção, ausência de infecção e ausência de deiscência nessa amostra. Cola (C). Cola com acetinado de triancinolona no filme 20mg/mL (C+AT).  
Fonte: Próprio Autor.

### 4.3. Análise microscópica

#### 4.3.1 Análise Histológica - Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

As 39 lâminas obtidas das amostras de tecido cicatricial das lesões cirúrgicas induzidas no dorso dos ratos foram analisadas estatisticamente, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Análise histológica das lâminas coradas em HE, nos diferentes grupos experimentais dos tecidos cicatriciais.

Variável/Tempo	Grupos Experimentais				P
	Cola (C)		Cola+AT (C+AT)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
<b>Fibrose</b>					
7 dias	1,88	0,73	1,80	0,63	0,87
14 dias	2,00	0,88	1,61	0,94	<b>0,01*</b>
<b>Neovascularização</b>					
7 dias	2,17	0,91	1,86	0,65	<b>0,01*</b>
14 dias	1,31	1,08	1,17	1,03	0,35
<b>Linfócitos/Plasmócitos</b>					
7 dias	2,00	0,90	1,95	0,73	0,63
14 dias	1,05	0,91	1,27	1,06	0,11
<b>Macrófagos</b>					
7 dias	1,85	1,03	1,76	0,98	0,76
14 dias	0,92	0,91	1,18	0,97	<b>0,04*</b>
<b>Neutrófilos</b>					
7 dias	1,79	0,97	2,26	0,70	<b>0,01*</b>
14 dias	1,05	0,98	1,17	1,06	0,40

Análise histológica dos tecidos cicatriciais nos diferentes grupos experimentais, na coloração de HE. Escores: 0: ausente; 1: Leve; 2: Moderado; 3: Intenso. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo cola (contralateral). Fonte: Próprio Autor.

A presença de fibrose foi significativamente menor no grupo C+AT comparado com a cola não modificada na avaliação de 14 dias (Tab. 2). Os corticoides diminuem a síntese de colágeno e glicosaminoglicanos, reduzindo o processo inflamatório na ferida, diminuindo a proliferação de fibroblastos e aumentando a hipóxia (Roques *et al.*, 2008). A menor quantidade de fibrose sugere uma melhor cicatrização

principalmente na fase de remodelamento, com conseqüente fechamento da ferida mais próxima da pele íntegra, conforme visto na Figura 21 F.

A neovascularização foi significativamente menor no grupo C+AT comparado com a cola não modificada na avaliação de 7 dias (Tab. 2). Os corticoides atuam na diminuição na produção de citocinas inflamatórias, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e interleucina-1 (IL-1) (Seibold; Sherwood; Kahook, 2012).

A inflamação e a resposta angiogênica final parecem estar ligadas a cicatrização da ferida. Portanto, tanto a diminuição da inflamação como a diminuição da neovascularização são características de uma cicatrização ótima e de uma redução da formação de cicatrizes (DiPietro *et al.*, 2016).

Com relação a avaliação de linfócitos e plasmócitos não houve diferença significativa em ambos os grupos avaliados (C e C+AT) em 7 ou 14 dias, embora apresentou diminuição dessas células na fase inicial e aumento com 14 dias (Tab. 2). Já a presença de macrófagos foi significativamente maior no grupo C+AT (14 dias), estudos apontam que uma cicatrização ideal de feridas depende de uma resposta altamente regulada por macrófagos M2, enquanto uma resposta deficiente de macrófagos M2 leva ao fechamento prejudicado da ferida (Borthwick *et al.*, 2015). Numerosos sinais solúveis e celulares instruem a ativação de macrófagos para os estágios finais da cicatrização de feridas como remodelação tecidual e resolução da inflamação que incluem respostas Th2 com citocinas que medeiam um programa de remodelação tecidual e células apoptóticas que induzem um fenótipo anti-inflamatório de macrófagos (Kim; Nair, 2019).

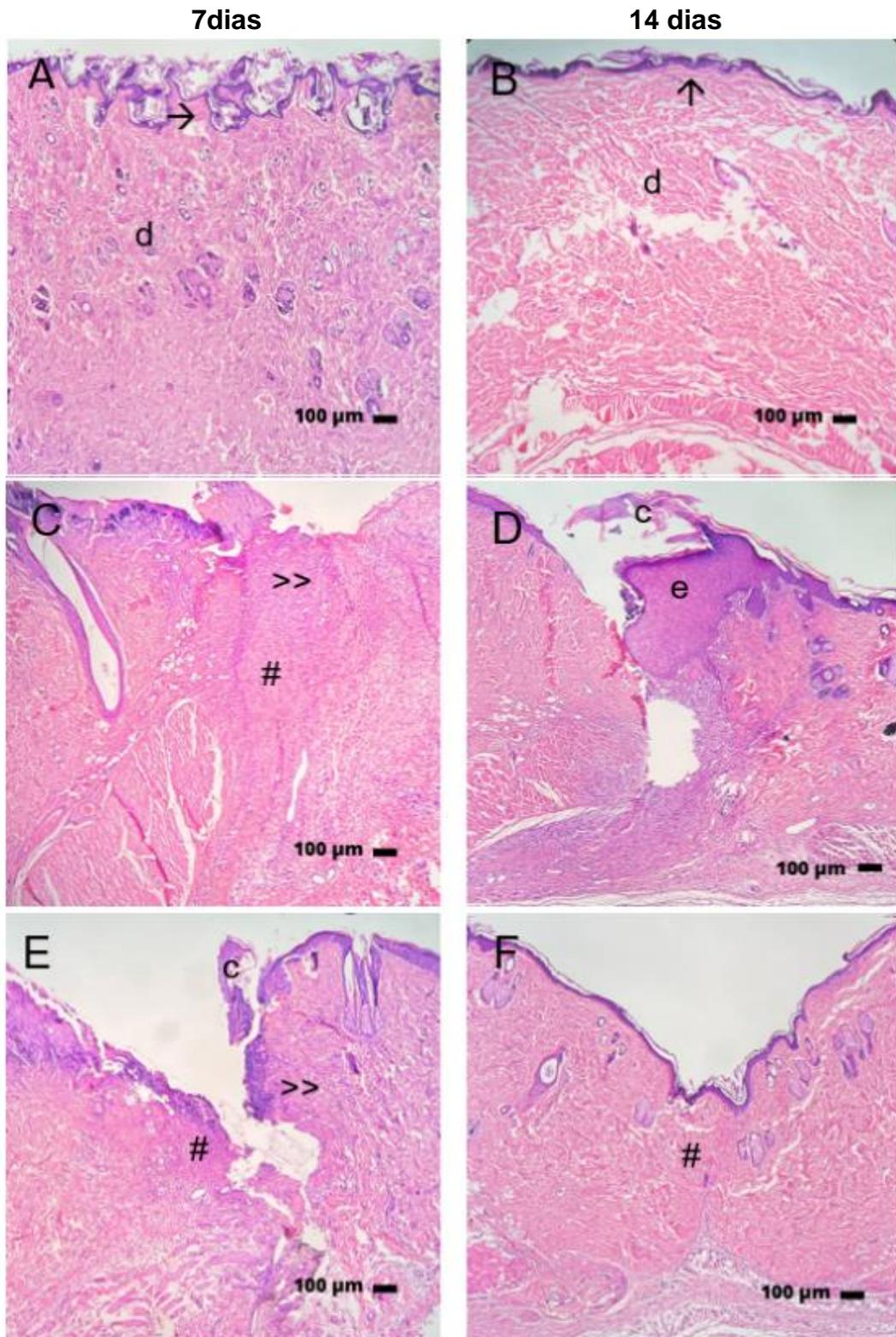
A presença de neutrófilos foi significativamente maior no grupo C+AT na avaliação de 7 dias, uma vez que os neutrófilos são as primeiras células a chegar à ferida, com maior concentração em 24hs após a lesão e são atraídos por substâncias quimiotáticas liberadas por plaquetas. Os neutrófilos aderem à parede do epitélio mediante ligação com as selectinas (receptores de membrana endotelial) e produzem citocinas que auxiliam na destruição bacteriana, no processo inicial da cicatrização e são gradativamente substituídos por macrófagos (Broughton; Janis; Attinger, 2006; Campos, Borges-Branco; Groth, 2007), corroborando com a presença aumentada de macrófagos no tratamento C+AT (14 dias) (Tab. 2). As expressões aumentadas de neutrófilos em 7 dias e macrófagos em 14 dias sugeriu um resultado positivo do

processo cicatricial, já que ambos liberam citocinas e mediadores anti-inflamatórios que permitem regular o processo de cicatrização.

Durante a resposta inflamatória, a metaloproteinase-9 (MMP-9) é produzida por células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos. Sua função é remodelar a matriz extracelular para permitir a migração de células imunológicas para o local da inflamação. Ela também desempenha um papel importante na remodelação tecidual durante as fases de reparo e cicatrização. Ela ajuda na degradação de tecido danificado e na remodelação da matriz extracelular (MEC) para permitir a regeneração de tecido saudável (Anker *et al.*, 2021).

Na análise microscópica também foi observado densamente o tecido de granulação (início do reparo tecidual) nos dois períodos de experimentação (7 e 14 dias) (Fig. 21), este achado concorda com os mecanismos da cicatrização, que em sequência ordenada de eventos, foram descritos por Carrel em 1910, e divididos posteriormente em cinco elementos principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelamento da ferida (Orgill; DemLing, 1988).

Figura 21 - Painel histológico de Hematoxilina-Eosina dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias.



A) Naïve 7 dias; B) Naïve 14 dias; C) somente Cola 7 dias; D) somente Cola 14 dias; E) C+AT 7 dias; F) C+AT 14 dias. Parâmetros: (→) Epiderme normal; (d) Derme; (c) Crosta fibrinoleucocitária; (e) Epiderme espessada; (>>): tecido de granulação; (#) fibrose. Aumento de 200X. Barra = 100µm. Fonte: Próprio Autor.

#### 4.3.2 Análise Histológica - Coloração Tricrômico de Masson (TM)

As 39 lâminas obtidas das amostras de tecido cicatricial das lesões cirúrgicas induzidas no dorso dos ratos foram analisadas estatisticamente conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Análise histológica das lâminas coradas em TM, nos diferentes grupos experimentais dos tecidos cicatriciais.

Variável/Tempo	Grupos Experimentais				P
	Cola (C)		Cola+AT (C+AT)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
<b>Fibras de Colágeno</b>					
7 dias	1,71	0,50	1,86	0,52	0,14
14 dias	1,78	0,96	1,85	0,78	0,64

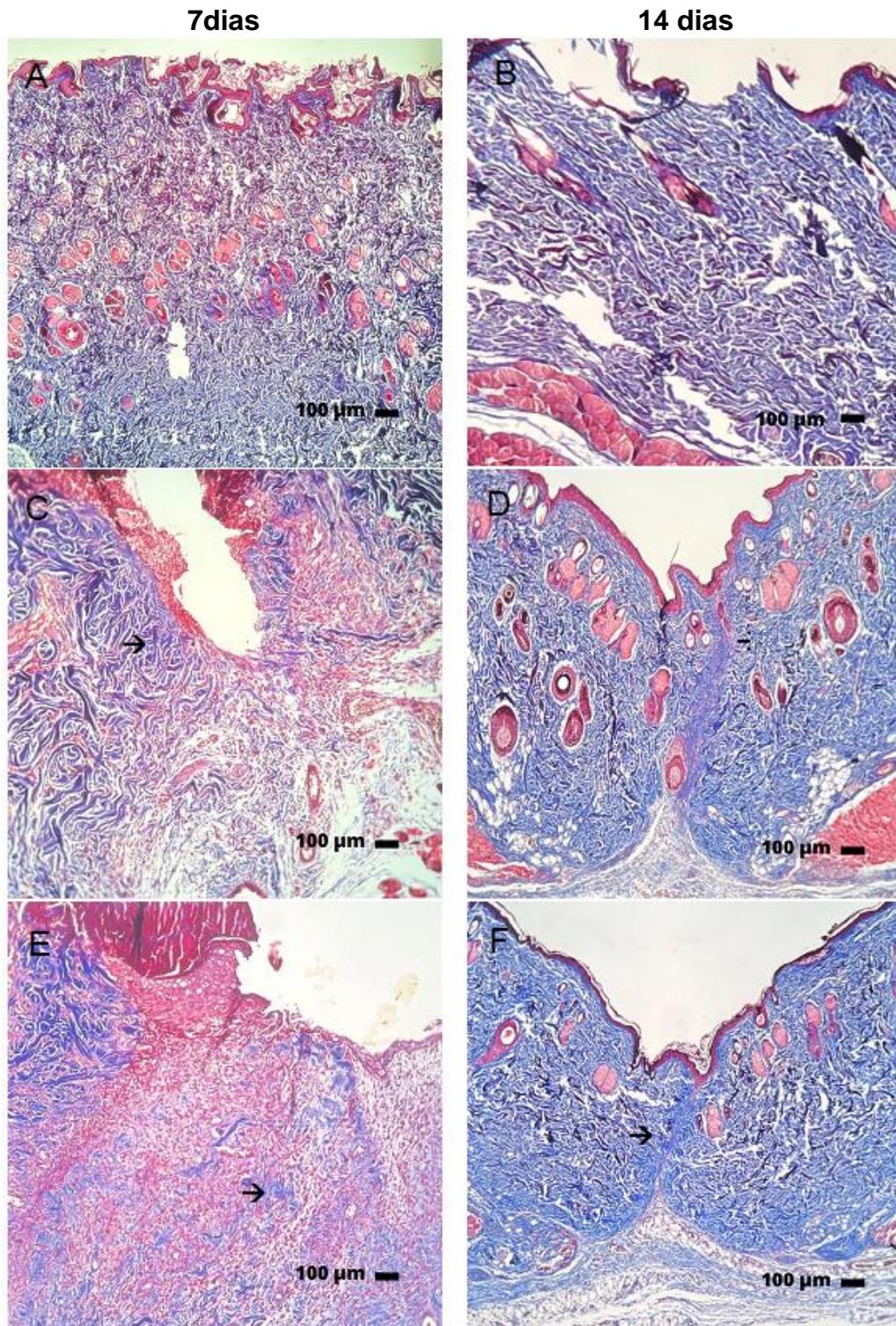
Escores histopatológicos do tecido cicatricial nos diferentes grupos experimentais, na coloração de Tricrômico de Masson. Escores: 0: ausente; 1: Leve; 2: Moderado; 3: Intenso. \* $p > 0,05$  em relação ao grupo cola (contralateral).

Fonte: Próprio Autor.

Na análise histológica pela coloração do TM para avaliação das fibras colágenas não houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 7 e 14 dias, entretanto, é possível observar um aumento na quantidade das fibras colágenas no tratamento de C+AT (7 e 14 dias) (Tab. 3, Fig. 22E e F). Mesmo com aumento na densidade de colágeno, as fibras aparecem de maneira organizada e sem aumento da espessura no tratamento C+AT, sugerindo uma ação regulatória do corticoide liberado, controlando o processo inflamatório, e conseqüentemente, evitando a formação de fibras colágenas desorganizadas.

Segundo Kauh *et al.* (1997) feridas pós-cirúrgicas que receberam injeção de AT após a remoção do queleide expressaram diminuição de colágeno tipo I, em comparação com a pele não tratada com 10mg/mL de AT, sugerindo uma regulação negativa da expressão do gene do colágeno tipo I em tecidos patológicos para formação de cicatrizes inestéticas. Nesse caso, a dose utilizada possui um maior efeito imunossupressor do que anti-inflamatório. Os feixes de colágeno também eram mais finos e menos densos na pele tratada com AT.

Figura 22 - Painel histológico de Tricrômico de Masson dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias.



A) Näive 7 dias; B) Näive 14 dias; C) somente Cola 7 dias; D) somente Cola 14 dias; E) C+AT 7 dias; F) C+AT 14 dias. Parâmetros: (→) Fibras colágenas. Aumento de 200X. Barra = 100µm.  
Fonte: Próprio Autor.

#### 4.4. Análise Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica da imunoperoxidase indireta foi empregada na identificação de macrófagos, detectados através da positividade para o marcador de superfície CD68; presença de miofibroblastos, detectados através do marcador da proteína alfa-actina de Músculo Liso ( $\alpha$ -*Smooth Muscle Actin* –  $\alpha$ -SMA); e fibronectina. As 39 lâminas obtidas das amostras de tecido cicatricial das lesões cirúrgicas induzidas no dorso dos ratos foram analisadas estatisticamente conforme Tabela 4.

Tabela 4 - Análise dos Marcadores de imuno-histoquímica (CD68,  $\alpha$ -SMA e fibronectina) do tecido cicatricial nos diferentes grupos experimentais.

Variável/Tempo	Grupos Experimentais				P
	Cola (C)		Cola+AT (C+AT)		
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	
<b>CD68</b>					
7 dias	1,71	1,05	1,74	0,89	0,39
14 dias	1,37	1,06	1,50	1,00	0,36
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>					
7 dias	1,77	0,59	1,93	0,64	0,18
14 dias	1,95	1,01	1,83	0,85	0,45
<b>Fibronectina</b>					
7 dias	1,63	0,70	1,74	0,54	0,47
14 dias	1,99	0,95	2,15	0,78	0,24

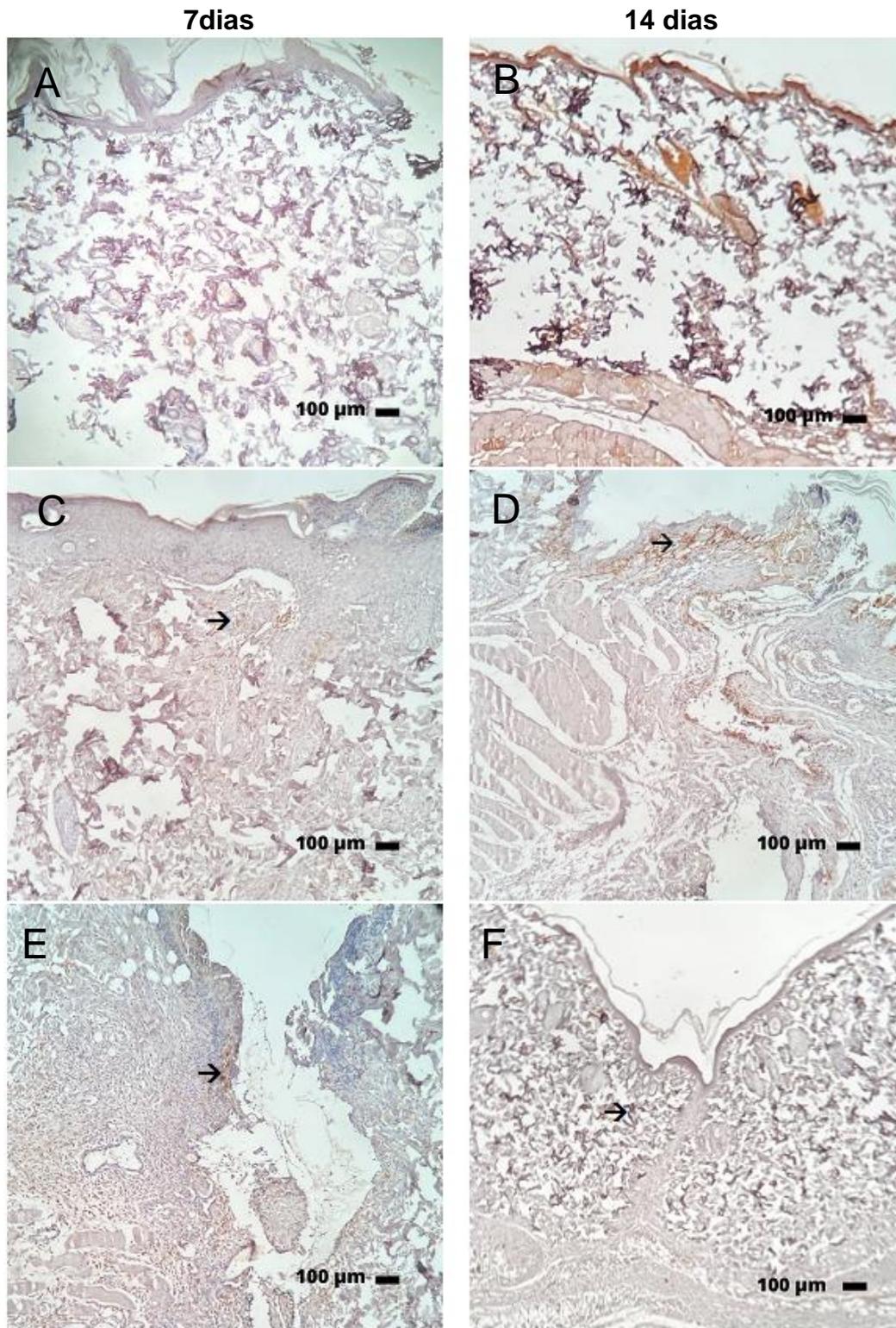
Marcadores de imuno-histoquímica - CD68, fibronectina e alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Escores: 0: ausente; 1: Leve; 2: Moderado; 3: Intenso. \* $p > 0,05$  em relação ao grupo cola (contralateral).  
Fonte: Próprio Autor.

Na análise imuno-histoquímica para o marcador de superfície CD68 não foi evidenciado resultado estatisticamente significativo (Tab. 4), porém foi observado um aumento de macrófago no tratamento C+AT (7 e 14 dias) (Fig. 23), dados na literatura mostram que resposta deficiente de macrófagos causam prejuízo na cicatrização e fechamento das feridas, pois a participação expressiva de macrófagos leva ao tecido fibrótico e eficiente reparo tecidual, onde macrófagos residentes podem se replicar e aumentar em número e orquestrarem os estágios da cicatrização de feridas (Borthwick *et al.*, 2015 e Davies *et al.*, 2013).

A molécula CD68, uma glicoproteína intracelular altamente glicosilada de 110 kD, é amplamente expressa em macrófagos e outros fagócitos mononucleares. Seu papel como marcador citoquímico tem sido tradicionalmente explorado em análises histoquímicas de tecidos inflamados, tumorais e em diversas aplicações imuno-histopatológicas (Chistiakov *et al.*, 2016).

Em uma abordagem recente, pesquisadores como Kuninaka e colegas (2022) investigaram a dinâmica da expressão gênica dos marcadores de macrófagos M1 e M2 durante o processo de cicatrização de feridas em ratos. Eles observaram que a expressão dos marcadores de macrófagos M1 foi positivamente regulada logo após a lesão, atingindo o pico em 1 ou 3 dias, enquanto a expressão do marcador M2 atingiu o pico 6 dias após a lesão. Esses achados sugerem que a avaliação dos marcadores de macrófagos M1 e M2 pode ser uma ferramenta promissora na determinação da fase de cicatrização de feridas na pele humana. Nesse estudo, foi observado um aumento de macrófago no tratamento C+AT (7 e 14 dias), porém não foi avaliado a polaridade deles. A análise da Figura 21 F pode sugerir uma superioridade de M2 pelo desfecho da cicatrização bem próximo de uma pele normal.

Figura 23 - Painel imunohistológico – marcador CD68 dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias.



A) Náive 7 dias; B) Náive 14 dias; C) somente Cola 7 dias; D) somente Cola 14 dias; E) C+AT 7 dias; F) C+AT 14 dias. Nota-se a presença de macrófagos corados em castanho. Parâmetro: (→) macrófagos. Aumento de 200X. Barra = 100µm.

Fonte: Próprio Autor.

A  $\alpha$ -SMA é o marcador molecular mais comum para se referir ao miofibroblasto (Duscher *et al.*, 2014; Hinz, 2013; Tomasek *et al.*, 2002).

Com o marcador  $\alpha$ -SMA, que evidencia a presença de miofibroblastos, também não detectou diferença significativa entre os tratamentos nos diferentes tempos (Tab. 4), porém foi perceptível mais miofibroblastos no tratamento com C+AT (7 dias) do que com C+AT (14 dias), comparados com seus respectivos contralaterais (Fig. 24 E e F). Durante o processo de cicatrização, os miofibroblastos são encontrados em todo o tecido de granulação, e seu número e distribuição ao longo do tempo se correlacionam com a taxa de contração da ferida (Gabbiani; Ryan; Majno, 1971 e Mcgrath; Hundahl, 1982).

Durante a cicatrização de feridas, as células de fibroblastos ativadas, como células componentes essenciais do tecido conjuntivo neoformado, são moduladas e transformadas no fenótipo de miofibroblastos (MFs) que se caracteriza pela neoexpressão de  $\alpha$ -SMA. Em resposta à estimulação do fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), os fibroblastos diferenciam-se em MFs, marcados pela  $\alpha$ -SMA, que levam à aceleração da cicatrização de feridas. (Klingberg; Hinz; White, 2012; Putra *et al.*, 2020).

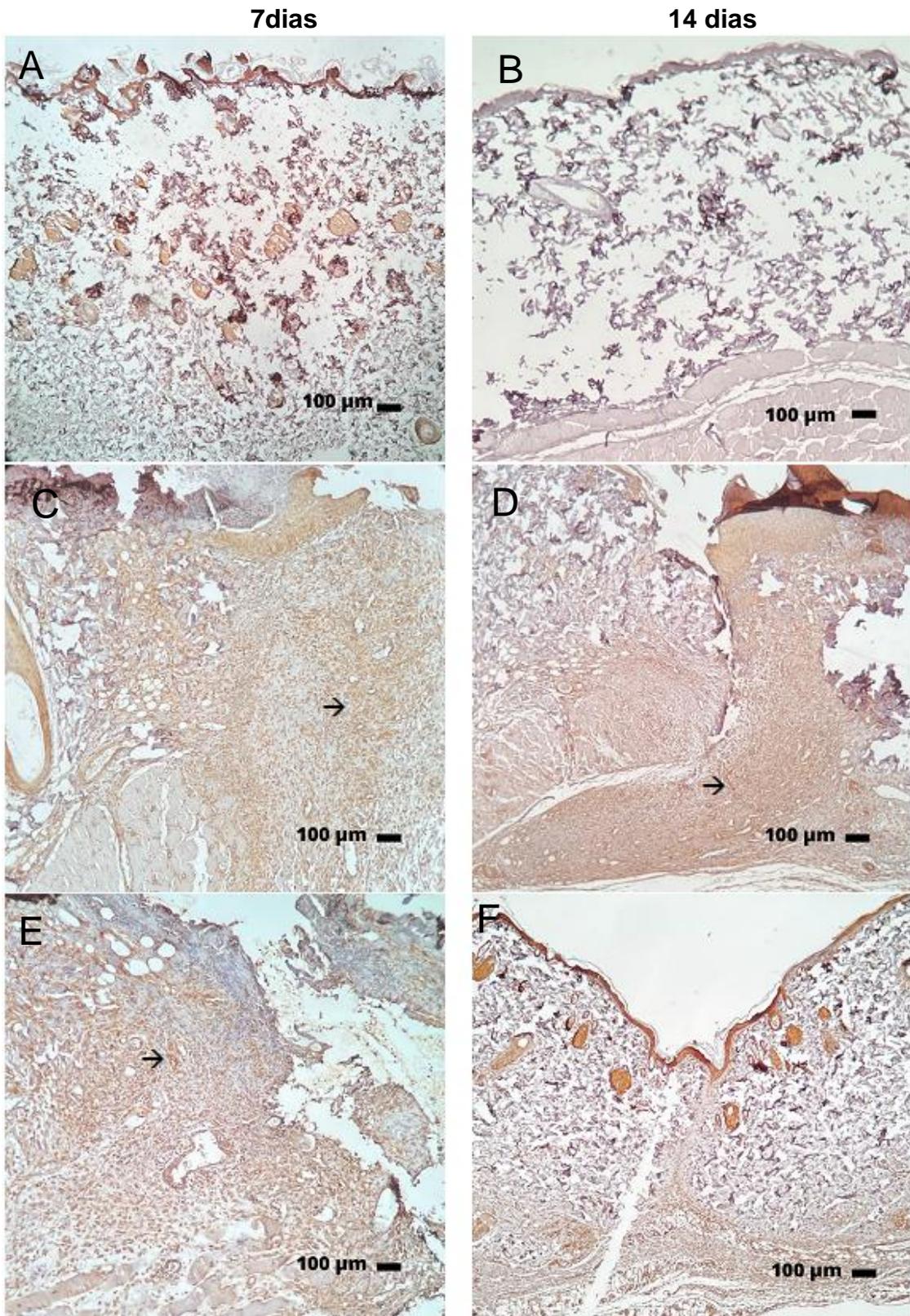
Os MFs e seu microambiente formam uma rede em evolução durante o reparo tecidual, com ações recíprocas que levam à diferenciação celular, proliferação, quiescência ou apoptose, e ações na biodisponibilidade do fator de crescimento por ligação, sequestro e ativação. Além da secreção da MEC, os MFs, ao secretarem metaloproteinases de matriz e inibidores teciduais de metaloproteinases, são capazes de remodelar essa MEC (Darby *et al.*, 2014).

A importância da cicatrização adequada de feridas na pele torna-se evidente quando os mecanismos de reparação do nosso corpo falham, levando a feridas que não cicatrizam (crônicas) ou reparo excessivo (fibrose). A busca da terapia alvo no contexto da reparação tecidual desregulada é a tentativa de manter os MFs em equilíbrio (Hinz, 2016).

Sob inflamação controlada, a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) podem promover uma formação de tecido de granulação caracterizada pelos MFs expressando  $\alpha$ -SMA. O TGF- $\beta$  pode induzir os MFs a produzir uma matriz extracelular (ECM) excessiva que potencialmente causa a formação de cicatriz (Mokos *et al.*, 2017).

Em síntese, na Figura 24 observa-se além de um aumento do marcador  $\alpha$ -SMA no tratamento C+AT (7 dias) como descrito anteriormente, o que sugere uma maior quantidade de MFs acelerando o processo cicatricial, e uma diminuição em 14 dias, sugerindo um efeito inibitório do corticoide, quando comparado ao tratamento contralateral somente com cola, corroborando com o estudo de Seibold *et al.* (2012), que sugerem à atuação dos corticoides na diminuição na produção de citocinas inflamatórias, como VEGF, TGF- $\beta$  e IL-1. Esse resultado sugere uma cicatrização com equilíbrio dos MFs, alvo para uma cicatrização adequada.

Figura 24 - Painel imunohistológico – marcador  $\alpha$ -SMA dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias.



A) Nãive 7 dias; B) Nãive 14 dias; C) somente Cola 7 dias; D) somente Cola 14 dias; E) C+AT 7 dias; F) C+AT 14 dias. Nota-se a presença da proteína alfa-actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) coradas em castanho. Parâmetro: (→)  $\alpha$ -SMA. Aumento de 200X. Barra = 100 $\mu$ m.

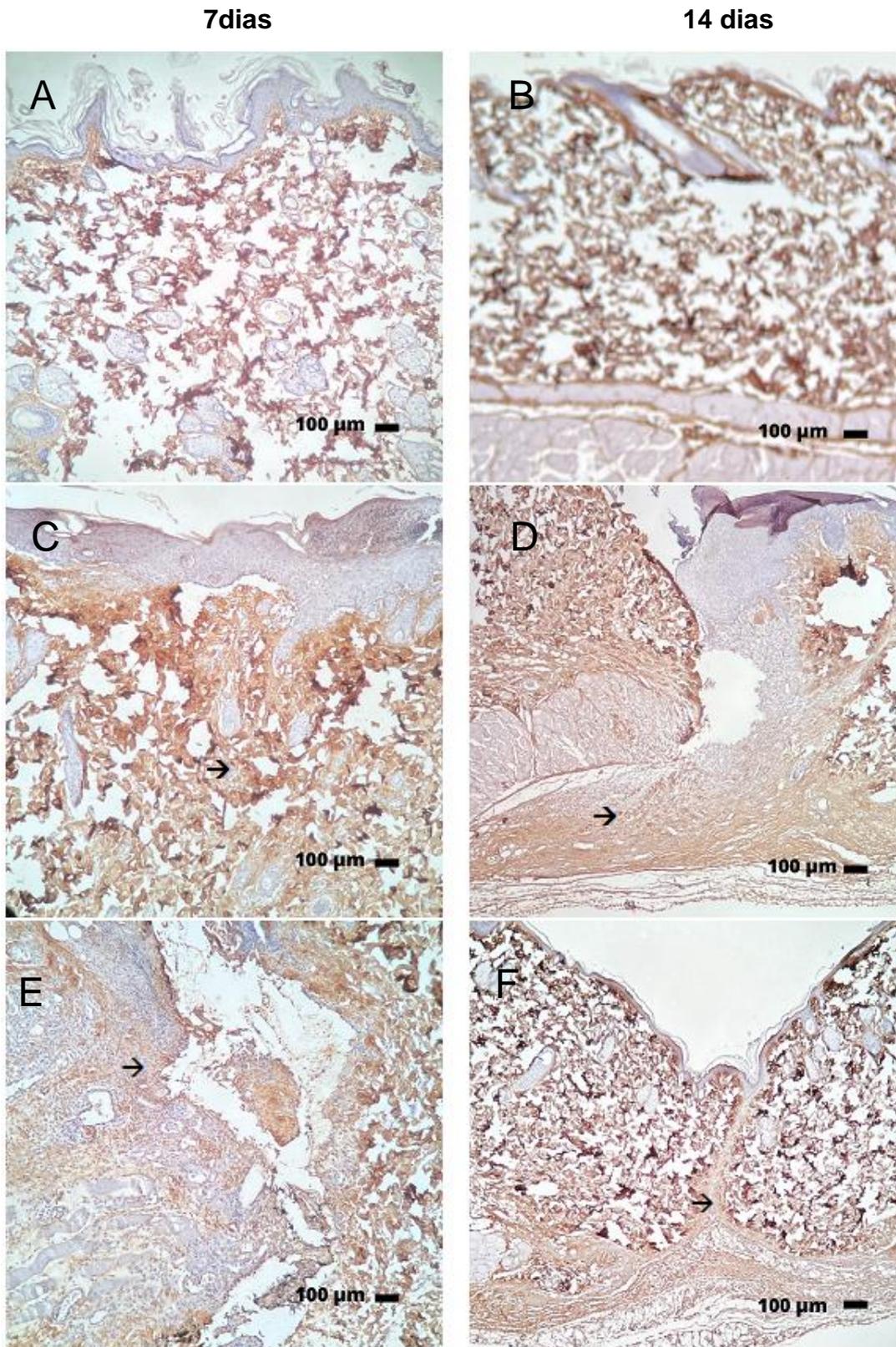
Fonte: Próprio Autor.

Na imunohistoquímica, com o marcador de fibronectina, nenhum resultado foi estatisticamente diferente (Tab. 4), mas observou-se um discreto aumento visual desta glicoproteína no tratamento C+AT em 7 e 14 dias evidenciado nas Figuras 25 E e 25F. A literatura aponta sua importância na fase inflamatória, onde a fibronectina é capaz de opsonizar detritos da matriz extracelular, além de ativar macrófagos para que possam fagocitar esses detritos (Clark, 1996).

Até o momento, a literatura é escassa em pesquisas *in vivo* com a proteína fibronectina (glicoproteína produzida pelos fibroblastos, que participa da MEC), embora várias funções sejam bem descritas e conhecidas. A fibronectina é uma glicoproteína adesiva que desempenha um papel crucial na cicatrização de feridas, particularmente na formação da matriz extracelular (MEC) e na reepitelização. A fibronectina interage com diferentes tipos de células, de citocinas e desempenha um papel inicial na formação de uma matriz temporária, composta por fibrina e fibronectina. Essa matriz provisória é posteriormente substituída por uma matriz extracelular mais madura que contém fibronectina tecidual (Lenselink, 2013).

Dos vários componentes da MEC, a fibronectina é uma proteína de adesão celular que ajuda na migração celular e no depósito de colágeno e, conseqüentemente, acelera a cicatrização de feridas (Raghow, 1994 e Donaldson; Mahan, 1983). Wangoo e colaboradores (1996) observaram que diferentes concentrações de triancinolona podem interferir na expressão de pró colágeno tipo 1 e de fibronectina, sugerindo que concentrações menores do corticoide, promovam menos alterações na expressão dessas proteínas, que são também cruciais no reparo tecidual. Um estudo-piloto demonstrou que concentrações menores, como 2,5mg/mL, mostraram-se tão eficazes quanto concentrações maiores, e com menor risco de atrofia quando injetadas diretamente em lesões de alopecia areata, evidenciando mais um papel anti-inflamatório do que imunomodulador (Chu, *et al.*, 2015).

Figura 25 - Painel imunohistológico – marcador fibronectina dos tecidos cicatriciais de ratos Wistar, dos diferentes grupos experimentais por 7 ou 14 dias.



Nota-se a presença da fibronectina coradas em castanho. Parâmetro: (→) Fibronectina. Aumento de 200X. Barra = 100µm.

Fonte: Próprio Autor.

#### 4.5. Sumarização dos Resultados

O ensaio de liberação modificada mostrou liberação do fármaco adicionado à cola nas concentrações de 5mg/mL, 10mg/mL e 20mg/mL, e a quantidade de fármaco liberada foi dependente da massa da amostra. Neste ensaio, a concentração de fármaco liberada de aproximadamente 2,5mg em 5 dias é segura de acordo com a literatura.

No ensaio de FTIR observou-se que não houve interação entre as moléculas de AT e da cola, porém, identifica a presença do fármaco na concentração de 20mg/mL, a qual foi escolhida para fase *in vivo*.

A análise TG mostrou que a adição de AT à cola não alterou a resistência térmica desse polímero, resultado repetido com o ensaio de degradação do filme após 30 dias.

O ensaio de DSC demonstrou que a adição do corticosteroide AT não alterou os eventos térmicos da cola para causar uma instabilidade, podendo coexistir de forma segura, resultado repetido com o ensaio de degradação do filme após 30 dias.

Na MEV houve uma perda na homogeneidade da cola quando adicionado à AT, porém esse resultado não impactou a adesividade ou característica mecânica do novo polímero, comprovado pelo ensaio pré-clínico.

Na macroscopia, não houve alteração na adesividade das colas testadas (cola sozinha ou C+AT), observou-se ausências de secreção, de infecção e, sem diferença na cicatrização tecidual dos ratos.

Na microscopia de reparação tecidual com análises histológicas dos parâmetros avaliados, a presença de fibrose foi significativamente menor no tratamento C+ AT (14 dias). A neovascularização foi significativamente menor no tratamento C+AT (7 dias). Não houve diferença significativa na avaliação de linfócitos e plasmócitos. A presença de macrófagos foi significativamente maior no tratamento C+AT (14 dias) e presença de neutrófilos foi significativamente maior no tratamento C+AT (7 dias).

Na análise imuno-histoquímica não foi evidenciado resultado estatisticamente significativo, porém foi observado um aumento CD68, expressão de macrófago, no tratamento C+AT (7 e 14 dias); maior quantidade de  $\alpha$ -SMA, expressão de miofibroblasto, no tratamento C+AT (7 dias) e menor no tratamento C +AT (14 dias). Observou-se um aumento discreto da fibronectina no tratamento C+AT (7 e 14 dias).

## 5. PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse estudo concentra-se nas perspectivas futuras do novo biomaterial formado pela combinação da cola de 2-octil-cianoacrilato e o corticoide AT no tratamento de feridas cutâneas superficiais. Planeja-se realizar um ensaio clínico em humanos para avaliar diversos aspectos, incluindo a cicatrização final para avaliação da incidência de cicatrizes hipertróficas e queloides, além da ocorrência de dermatite de contato.

Diante do exposto, é importante uma análise mais detalhada por meio de imuno-histoquímica para diferenciar os macrófagos M1 e M2 em cada fase do processo de cicatrização. Isso permitirá uma melhor compreensão da dinâmica da resposta imunológica durante a cicatrização e seu impacto no resultado.

Adicionalmente, é crucial realizar uma avaliação dos marcadores específicos que possam distinguir entre o colágeno tipo 1 e o tipo 3 durante o processo de cicatrização. Embora ambos os tipos de colágeno desempenhem um papel nesse processo, é importante destacar que o colágeno tipo 1 é mais prevalente na pele e está intimamente ligado ao processo de cicatrização. Portanto, identificar e monitorar os marcadores que caracterizam cada tipo de colágeno pode fornecer insights importantes sobre a dinâmica e a eficácia do processo cicatricial.

Essa análise mais refinada ajudará a obter resultados mais confiáveis e a compreender melhor os mecanismos subjacentes à cicatrização de feridas cutâneas superficiais fechadas com cola de 2-octil-cianoacrilato modificada, liberando uma concentração anti-inflamatória de AT (2,5mg/mL) em aproximadamente 5 dias pós cirurgia.

## 6. CONCLUSÃO

A combinação de 2-octil-cianoacrilato com triancinolona tem potencial promissor na medicina translacional e pode ser um novo biomaterial a ser considerado para novos testes pré-clínicos e clínicos, já que não houve alterações nas características químico-físicas estudadas. Estudos clínicos futuros serão necessários para fundamentar os achados desta pesquisa.

Triancinolona associada à cola cirúrgica na cicatrização de feridas cutâneas confirmou o efeito anti-inflamatório e imunomodulador do corticoide, com menor neovascularização e fibrose, além do remodelamento da MEC realizado pelo equilíbrio dos miofibroblastos e fibras colágenas menos densas, redução da fase inflamatória cicatricial culminando em regeneração tecidual, além de possível redução de efeitos colaterais do próprio polímero, como dermatite de contato alérgica.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, A. M. Unusual complications of triamcinolone injected keloids: Tissue necrosis and systemic corticosteroid effects. **British Journal of Plastic Surgery**, v. 29, n. 4, p. 283, 1976.
- ABRAHAMSOHN, P.; FREITAS, V. Pele - HISTOLOGIA. Disponível em: <<https://mol.icb.usp.br/index.php/15-3-pele/>>. Acesso em: 14 mar. 2022.
- ANKER, A. *et al.* Local Triamcinolone Treatment Affects Inflammatory Response in Seroma Exudate of Abdominoplasty Patients: A Randomized Controlled Trial. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 147, n. 2, p. 345–354, 2021.
- BARBALINARDO, R. J. *et al.* A comparison of isobutyl 2-cyanoacrylate glue, fibrin adhesive, and oxidized regenerated cellulose for control of needle hole bleeding from polytetrafluoroethylene vascular prostheses. **Journal of Vascular Surgery**, v. 4, n. 3, p. 220–223, 1986.
- BARKAN, Y. *et al.* Comparative evaluation of polycyanoacrylates. **Acta Biomaterialia**, v. 48, p. 390–400, 2017.
- BERMAN, B.; BIELEY, H. C. Keloids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 117–123, 1995.
- BORTHWICK, L. A. *et al.* Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. **Mucosal Immunology**, v. 9, n. 1, p. 38–55, 2015.
- BOWEN, C. *et al.* Allergic contact dermatitis to 2-octyl cyanoacrylate. **Cutis**, v. 94, n. 4, p. 183–186, 2014.
- BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. The Basic Science of Wound Healing. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, n. SUPPLEMENT, p. 12S34S, 2006.
- BURUSAPAT, C. *et al.* The Effectiveness of Immediate Triamcinolone Acetonide Injection after Auricular Keloid Surgery: A Prospective Randomized Controlled Trial. **Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open**, v. 9, n. 8, p. e3729, 2021.
- CÁCERES-DEL-CARPIO, J. *et al.* Corticosteroids: Triamcinolone, Dexamethasone and Fluocinolone. **Developments in ophthalmology**, v. 55, p. 221–231, 2015.
- CALLEN, J. P. Intralesional corticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 4, n. 2, p. 149–151, 1981.
- CAMPAGNOLO, A. M. *et al.* Injeção de corticosteróide em patologias vocais inflamatórias crônicas, revisão da literatura. **Revista Brasileira De Otorrinolaringologia**, v. 74, n. 6, p. 926–932, 2008.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Cicatrização de feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 20, n. 1, p. 51–58, 2007.

CARLSON, M. A. Acute wound failure. **Surgical Clinics of North America**, v. 77, n. 3, p. 607–636, 1997.

CARREL, A. The treatment of wounds. **Journal of the American Medical Association**, v. 55, n. 25, p. 2148, 1910.

CARVALHO, C. Feridas e o Processo de Cicatrização Dicas de Saúde –. Disponível em: <<https://farmaceuticodigital.com/2021/03/feridas-e-o-processo-de-cicatrizacao.html>>. Acesso em: 9 fev. 2023.

CARVALHO, M. V. H. DE; MARCHI, E. Mecanismo de ação dos agentes hemostáticos locais e adesivos tissulares. **Revista médica de Minas Gerais**, v. 23, n. 4, 2013.

CHISTIYAKOV, D. A. *et al.* CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 1, p. 4–13, 2016.

CHU, T. W. *et al.* Benefit of different concentrations of intralesional triamcinolone acetonide in alopecia areata: An intrasubject pilot study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 3, p. 338-340, 2015.

CLARK, R. A. F. The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. 2. ed. New York: **Springer Science & Business Media**, p. 612, 1996.

CRUVINEL, W. M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, 2010.

D'ASSUMPÇÃO, E. A. Cola de cianoacrilato de baixo custo em cirurgia plástica. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 1, p. 22–25, 2008.

DAVIES, L. C. *et al.* Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. **Nature Communications**, v. 4, n. 1, 2013.

DANDAMUDI, M. *et al.* Chitosan-Coated PLGA Nanoparticles Encapsulating Triamcinolone Acetonide as a Potential Candidate for Sustained Ocular Drug Delivery. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1590, 2021.

DARBY, I. A. *et al.* Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. **Clinical, cosmetic and investigational dermatology**, v. 7, p. 301–11, 2014.

DERMABOND mini alta viscosidade 12. 2022. Disponível em: <https://www.materialmed.com.br/hospitalar-e-clinicas/dermabond-mini-alta-viscosidade-12>. Acesso em: 21 set. 2023.

DIPIETRO, L. A. Angiogenesis and wound repair: when enough is enough. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 5, p. 979–984, 2016.

- DONALDSON, D. J.; MAHAN, J. T. Fibrinogen and fibronectin as substrates for epidermal cell migration during wound closure. **Journal of Cell Science**, v. 62, n. 1, p. 117–127, 1983.
- DUMVILLE, J. C. *et al.* Tissue adhesives for closure of surgical incisions. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2014.
- DUSCHER, D. *et al.* Mechanotransduction and fibrosis. **Journal of Biomechanics**, v. 47, n. 9, p. 1997–2005, 2014.
- FAZIO MJ, *et al.* Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. **Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, p. 23-28, 2000.
- FORMICA, M. L. *et al.* Development of Triamcinolone Acetonide Nanocrystals for Ocular Administration. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 2, p. 683–683, 2023.
- FREDMAN, R.; TENENHAUS, M. Cushing's syndrome after intralesional triamcinolone acetonide: A systematic review of the literature and multinational survey. **Burns**, v. 39, n. 4, p. 549–557, 2013.
- FREITAS-JUNIOR, R. *et al.* Estudo experimental comparando o uso do 2-octil ciano Acrilato ao nylon 4-0 na sutura da pele. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 194–198, 2008.
- GABBIANI, G.; RYAN, G. B.; MAJNO, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. **Experientia**, v. 27, n. 5, p. 549–550, 1971.
- GENNARI, R. *et al.* A prospective, randomized, controlled clinical trial of tissue adhesive (2-octylcyanoacrylate) versus standard wound closure in breast surgery. **Surgery**, v. 136, n. 3, p. 593–599, 2004.
- GRUMBINE, N.; DOBROWOLSKI, C.; BERNSTEIN, A. Retrospective evaluation of postoperative intralesional steroid injections on wound healing. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 37, n. 2, p. 135–144, 1998.
- HINZ, B. Matrix mechanics and regulation of the fibroblast phenotype. **Periodontology** 2000, v. 63, n. 1, p. 14–28, 2013.
- HINZ, B. The role of myofibroblasts in wound healing. **Current Research in Translational Medicine**, v. 64, n. 4, p. 171–177, 2016.
- HIVNOR, C. M.; HUDKINS, M. L. Allergic Contact Dermatitis After Postsurgical Repair With 2-Octylcyanoacrylate. **Archives of Dermatology**, v. 144, n. 6, 2008.
- ISAAC, C. *et al.* Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v. 89, n. 3-4, p. 125, 2010.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KAUH, Y. C. *et al.* Major suppression of pro- $\alpha$ 1(I) type I collagen gene expression in the dermis after keloid excision and immediate intrawound injection of triamcinolone acetonide. **Journal of The American Academy of Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 586–589, 1997.

KEMPER, B. *et al.* Análise comparativa entre a cicatrização de ferida cutânea tratada com adesivo de éster de cianocrilato (SuperBonder®) e sutura intradérmica com náilon em ratos da linhagem Wistar. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, n. 2, 2015.

KIM, S. Y.; NAIR, M. G. Macrophages in wound healing: activation and plasticity. **Immunology and cell biology**, v. 97, n. 3, p. 258–267, 2019.

KLINGBERG, F.; HINZ, B.; WHITE, E. S. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 298–309, 2012.

KUNINAKA, Y. *et al.* Macrophage polarity and wound age determination. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022.

LENSELINK, E. A. Role of fibronectin in normal wound healing. **International Wound Journal**, v. 12, n. 3, p. 313–316, 2013.

MANADAS, R. *et al.* A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira De Ciências Farmacêuticas**, 38(4), p. 375–399, 2002.

MARTELLI, P. *et al.* **O sistema imunológico e a imunidade no suíno: a pele**. Disponível em: <[https://www.3tres3.com.br/artigos/o-sistema-imunologico-e-a-imunidade-no-suino-a-pele\\_1166/](https://www.3tres3.com.br/artigos/o-sistema-imunologico-e-a-imunidade-no-suino-a-pele_1166/)>. Acesso em: 21 jul. 2022.

MCGRATH, M. H.; HUNDAHL, S. A. The Spatial and Temporal Quantification of Myofibroblasts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 69, n. 6, p. 975–983, 1982.

MEARA, J. G. *et al.* Global Surgery 2030: Evidence and solutions for achieving health, welfare, and economic development. **The Lancet**, v. 386, n. 9993, p. 569–624, 2015.

MISHRA, S.; ROSEN, C. A.; MURRY, T. Acute management of the performing voice. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 33, n. 5, p. 957–965, 2000.

MOBLEY, S. R.; HILINSKI, J.; TORIUMI, D. M. Surgical tissue adhesives. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 10, n. 2, p. 147–154, 2002.

MOKOS, Z. B. *et al.* Current Therapeutic Approach to Hypertrophic Scars. **Frontiers in Medicine**, v. 4, 2017.

MULDER, G. D. *et al.* Factors complicating wound repair. *In: MCCULLOCH, J. C.; KLOTH, L. C.; FEEDAR, J. A. (ed.). Wound healing alternatives in management.* 2 ed. Philadelphia: CPR, 1998. p. 47-59.

NASCIMENTO, E. G. DO. Desenvolvimento e avaliação físico-química e mecânica de membranas de quitosana contendo sistemas multicomponentes de triancinolona acetona. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) —Centro de Ciências da Saúde**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.

NASSAU, S.; FONACIER, L. Allergic Contact Dermatitis. **Medical Clinics of North America**, v. 104, n. 1, p. 61–76, 2020.

ORGILL, D.; DEMLING, R. H. Current concepts and approaches to wound healing. **Critical Care Medicine**, v. 16, n. 9, p. 899–908, 1988.

PERERA, A. N.; TAVAREZ, M. M. 2-Octyl Cyanoacrylate. **Treasure Island (FL): StatPearls Publishing**, 2023.

PUTRA, A. *et al.* MSC-released TGF- $\beta$  regulate  $\alpha$ -SMA expression of myofibroblast during wound healing. **Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine**, v. 16, n. 2, p. 73–79, 2020.

QUINN, J. *et al.* Octylcyanoacrylate tissue adhesive versus suture wound repair in a contaminated wound model. **Surgery**, v. 122, n. 1, p. 69–72, 1997.

RAGHOW, R. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *The FASEB Journal*, v. 8, n. 11, p. 823–831, 1994.

RAMOS, A. C. *et al.* Análise histológica comparativa do reparo tecidual após síntese com fio de nylon e adesivo de Etil-2-cianoacrilato em feridas cutâneas de ratos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 38394–38405, 2020.

RIVITTI, E. A. Anatomia e fisiologia. *In: Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti.* São Paulo: Editora Artes Médicas, 2014.

ROQUES, C.; TÉOT, L. The Use of Corticosteroids to Treat Keloids: A Review. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 7, n. 3, p. 137–145, 2008.

RUFAL, S. R. *et al.* A National Survey of Undergraduate Suture and Local Anesthetic Training in the United Kingdom. **Journal of Surgical Education**, v. 73, n. 2, p. 181–184, 2016.

RUSHBROOK J.L. *et al.* The antibacterial effect of 2-octyl cyanoacrylate (Dermabond) skin adhesive. **Journal of Infection Prevention**; v. 15, n. 6, p. 236–239, 2014.

SANTOS, M. G. **Desenvolvimento e caracterização termomecânica de adesivos de tecido a base de cianoacrilato.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) —Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2021.

SEIBOLD, L. K.; SHERWOOD, M. B.; KAHOOK, M. Y. Wound Modulation After Filtration Surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 57, n. 6, p. 530–550, 2012.

SHALON. Fio de sutura agulhado de Nylon. 2022. Disponível em: <https://www.suturas.com.br/produtos/nylon>. Acesso em: 12 fev. 2022

SHAPIRO, A. J.; DINSMORE, R. C.; NORTH, J. H. Tensile strength of wound closure with cyanoacrylate glue. **The American Surgeon**, v. 67, n. 11, p. 1113–1115, 2001.

SINGER, A. J.; THODE, H. C. A review of the literature on octylcyanoacrylate tissue adhesive. **The American Journal of Surgery**, v. 187, n. 2, p. 238–248, 2004.

SOUZA, R. F. O que é um estudo clínico randomizado? **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 42, n. 1, p. 3–8, 2009.

TOMASEK, J. J. *et al.* Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 5, p. 349–363, 2002.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V. F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticóides. **Corpus et Scientia**, v. 8, n. 2, 2012.

VASCONCELOS, J. T. S. **Livro da sociedade brasileira de reumatologia**. Barueri: Manole, 2019. p. 788

VILLARREAL-GÓMEZ, A. M.; TORREGROSA-COQUE, R.; MARTÍN-MARTÍNEZ, J. M. Comparative properties of ethyl, n-butyl, and n-octyl cyanoacrylate bioadhesives intended for wound closure. **Biologically responsive biomaterials for tissue engineering**. New York: Springer, 2013. p. 89-106.

WANGOO, A. *et al.* Effect of injection of triamcinolone on type 1 procollagen and fibronectin in scar tissue. **British Journal of Surgery**, v. 83, n. 8, p. 1136–1137, 1996.

XAVIER, F. N. A. Epiderme e derme – camadas da pele. 2022. Disponível em: <http://www.minutosadeestetica.com.br/postagens/2017/12/10/epiderme-e-derme-camadas-da-pele/>. Acesso em: 2 mai. 2022.

YAO, J. *et al.* Novel polymeric biomaterial poly(butyl-2-cyanoacrylate) nanowires: synthesis, characterization and formation mechanism. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 454–462, 2019.

## ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Pontifícia Universidade Católica de São Paulo  
Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde  
Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ **Efeitos farmacológicos da Triancinolona associada à cola cirúrgica na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar** “, protocolo nº2022/132, sob a responsabilidade do pesquisador **Rosana Soares Araújo Doci** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (CEUA-FCMS-PUC/SP), em reunião de **27/09/2022**.

<b>Vigência do Projeto</b>	<b>06/2022 à 06/2023</b>
<b>Espécie/linhagem</b>	<b>Ratos Wistar</b>
<b>Nº de animais</b>	<b>20</b>
<b>Peso/Idade</b>	<b>3 meses 180 a 250 gramas</b>
<b>Sexo</b>	<b>Machos</b>
<b>Origem</b>	<b>CEMIB / UNICAMP</b>

Prof. Dra. Gislaine Ventrucci

Coordenadora CEUA-FCMS-PUC/SP