

# Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos

Analysis of the concentration of collagen type I and III in the wound of rat's skin treated with Mitomycin C

Fernando de Andrade Quintanilha Ribeiro<sup>1</sup>, Maria de Fátima Pereira de Carvalho<sup>2</sup>, Celina Siqueira Barbosa Pereira<sup>2</sup>, Daniela Akemi Tateno<sup>3</sup>

## Resumo

**Introdução:** A cicatrização de feridas envolve três fases: inflamação, proliferação e maturação. A falha ou prolongamento de uma destas fases pode causar um retardo ou não oclusão da ferida. Na fase proliferativa ocorre deposição de colágeno tipo III e na fase de maturação o colágeno tipo III é substituído pelo tipo I. A Mitomicina C é um quimioterápico com ação citotóxica e pode ser usada em feridas cirúrgicas para retardar o processo de cicatrização e inibir estenoses.

**Objetivo:** Comparar histologicamente, sob luz polarizada, a ação da Mitomicina C na cicatrização de feridas cirúrgicas no dorso de ratos, em dois momentos distintos, em relação à concentração de colágeno tipo I e III. **Material e Método:** O estudo foi constituído por 35 ratos da raça Wistar, submetidos a procedimento cirúrgico com realização de uma ferida circular no dorso do animal, retirada da pele e cicatrização por segunda intenção. No grupo controle, com 13 animais, a ferida foi lavada com solução salina apenas. Nas feridas dos 22 ratos do grupo caso foi colocada uma gaze embebida com Mitomicina C. Após 30 e 60 dias os animais foram sacrificados e as cicatrizes retiradas cirurgicamente e submetidas a estudo histológico com a coloração de picrossirius red. As lâminas foram analisadas com microscópio óptico sob luz polarizada para avaliar a concentração de colágeno tipo I e tipo III. **Resultados:** Quanto ao colágeno I, houve um

aumento de sua concentração em 60 dias quando comparada à de 30 dias, em ambos os grupos, porém sem significância estatística. Em relação ao colágeno III observou-se que a sua concentração foi maior em 60 dias do que em 30 dias no grupo caso, sendo essa diferença estatisticamente significativa ( $p=0,013$ ). O mesmo não ocorreu em relação ao grupo controle. **Conclusão:** A concentração do colágeno III no grupo tratado com Mitomicina C foi maior com o aumento do tempo, sugerindo a ação retardadora da Mitomicina C no processo de cicatrização.

**Descritores:** Cicatrização, Mitomicina, Colágeno, Ratos Wistar

## Abstract

**Introduction:** Wound healing involves three phases: inflammation, proliferation and maturation. The failure or extension of these stages can cause a delay or not occlusion of the wound. In the proliferative phase occurs deposition of collagen type III and maturing type III collagen is replaced by type I. Mitomycin C is a drug with cytotoxic action and can be used in surgical wounds to slow the healing process and inhibit stenosis. **Objective:** To compare histologically, through polarized light, the effect of Mitomycin C in the healing of surgical wounds on the back of rats, at two different times, for the concentration of collagen type I and III. **Methods:** The study consisted of 35 mice of the Wistar's race that underwent surgery performed through a circular wound on the animal's back, removed the skin and healing by secondary intention. In the control group, 13 animals had the wound washed with saline only. In the case group, 22 mice had the wound treated with Mitomycin C. After 30 and 60 days the animals were sacrificed and the scars surgically removed and sent for histological study with picrossirius red. The slides were analyzed with optical microscope under polarized light to assess concentration of collagen type I and type III. **Results:** As for collagen I, there was an increase in its concentration in 60 days compared to 30 days in both groups, but without statistical significance. Towards collagen III, in 60 days the concentration was

1. Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - Departamento de Otorrinolaringologia

2. Professora Adjunta da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - Departamento de Morfologia

3. Acadêmica da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo - 6º Ano do Curso de Graduação em Medicina

**Trabalho realizado:** Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Otorrinolaringologia e Departamento de Morfologia

**Endereço para correspondência:** Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Morfologia. Celina Siqueira Barbosa Pereira. Dr. Cesário Mota Júnior 112 - Santa Cecília - 01221-020 - São Paulo, SP - Brasil. Telefone: (11) 3226-7000 / Ramal: 5509. E mail: celina.pereira@yahoo.com.br

higher than 30 days in the case group and the difference was statistically significant ( $p = 0.013$ ). This was not seen in the control group. **Conclusion:** The concentration of type III collagen in the group treated with Mitomycin C was higher with increasing time, suggesting the retarding action of Mitomycin C in the healing process.

**Keywords:** Wound healing, Mitomycin, Collagen, Wistar rats

## Introdução

A Mitomicina C é um antimetabólito que foi isolado do caldo do *Streptomyces caespitosus* por Wakaki et al\* (1958) citado por Miyamura et al (1967)<sup>(1)</sup>. Caracteriza-se por apresentar cristais azul-violeta, peso molecular de 334 e solubilidade em água e solventes orgânicos. Sua atividade antitumoral relaciona-se a três grupos carcinostáticos (anel de aziridina, o grupo quinona e o grupo octano). Apresenta efeito inibitório da síntese do DNA e do RNA celular e de proteínas<sup>(1-3)</sup>. É utilizada na quimioterapia endovenosa no tratamento de corioepitelioma, sarcoma de células reticulares, seminoma e tumores epiteliais, além de tumores da cavidade oral, pulmões, intestino, pâncreas e estômago. Também, em alguns casos, é usada topicamente em tratamento anti-neoplásico, principalmente em tumores vesicais, uma vez que praticamente não é absorvida pela mucosa após administração intravesical<sup>(1-3)</sup>. Como efeitos colaterais graves notaram-se aplasias medulares em doses endovenosas acima de 50 mg e necroses teciduais locais quando do extravasamento da droga no tecido celular subcutâneo.

Estudos anteriores evidenciaram a eficácia da Mitomicina C na inibição do crescimento tumoral por sua ação direta sobre o DNA<sup>(2,3)</sup>. Outros trabalhos "in vitro" demonstraram sua capacidade de inibição de fibroblastos<sup>(4)</sup> e esta característica determinou, após estudos experimentais em animais<sup>(5,6)</sup>, o início de seu uso em oftalmologia para o controle de recidivas nas cirurgias de pterígeo e de glaucoma, e na otorrinolaringologia para tratamento das estenoses<sup>(7-9)</sup>. Ainda em relação a essa última especialidade médica citada, trabalhos experimentais em animais foram feitos para observar o processo cicatricial de traumas laríngeos induzidos<sup>(10-14)</sup>, assim como para retardar a cicatrização de paracenteses na membrana timpânica, o que poderia ser usado como alternativa para a cirurgia de colocação de tubos de ventilação<sup>(15-19)</sup>. Alguns autores comentaram a possibilidade do uso tópico desta droga no saco endolinfático para tratamento da doença de Ménière<sup>(20,21)</sup>. Na área da cirurgia geral, a substância foi estudada no sentido de inibir sinéquias intra-abdominais<sup>(22-24)</sup>.

A cicatrização é a resposta restaurativa que ocorre fisiologicamente após uma lesão tecidual. Esse reparo é composto por três fases distintas: inflamação, proliferação e maturação. A fase proliferativa ocorre de três a cinco dias a lesão tecidual e se caracteriza por elevação na concentração de fibroblastos, que produzem e depositam grande quantidade de colágeno tipo III. Posteriormente ocorre a maturação, com remodelação e substituição das fibras colágenas do tipo III por fibras colágenas do tipo I<sup>(25,26)</sup>.

Carvalho (2012)<sup>(27)</sup>, pesquisou o colágeno tipo I em feridas no dorso de ratos tratadas com mitomicina C e propionato de clobetasol pelo método imunohistoquímico, usando anticorpo anticolágeno tipo I, mas não foi observada reação positiva ao anticorpo nas áreas da cicatriz dos animais de nenhum grupo. Segundo a autora essa reação negativa dever-se-ia à imaturidade do colágeno que, nesta condição, apresentaria uma configuração antigênica diferente<sup>(27)</sup>.

A coloração histológica pelo picrosírius red é o método mais utilizado na literatura para avaliar a presença de fibras colágenas, corando-as em vermelho<sup>(28,29)</sup>. Essas fibras, quando visualizadas ao microscópio óptico com lente polarizadora, assumem colorações distintas. Ficam alaranjadas, se forem fibras de colágeno tipo I, ou esverdeadas, caso sejam de colágeno tipo III<sup>(26,27)</sup>.

As especialidades médicas que realizam procedimentos em cavidades podem se deparar com a presença de estenoses acidentais ou iatrogênicas, sendo fundamental não somente o seu tratamento como a sua prevenção. Na otorrinolaringologia, as estenoses laríngeas e as de meato acústico externo merecem atenção e o manuseio dessas complicações motivou os autores a realizarem este estudo.

## Objetivo

Analisar, com o auxílio da microscopia óptica, a ação da Mitomicina C na cicatrização de feridas cirúrgicas no dorso de ratos, em dois momentos distintos, em relação à concentração de fibras colágenas dos tipos I e III.

## Material e método

Foram selecionados 35 ratos da linhagem Wistar, adultos, machos e com peso acima de 200 g. Os animais foram submetidos à anestesia geral, tiveram seu dorso depilado e, nesta região, foi realizada uma ferida cirúrgica circular, de 1 cm de diâmetro, com retirada da pele e do tecido celular subcutâneo.

\* Wakaki et al (1958) APUD Miyamura S, Shigeno N, Matsui M, Wakaki S, Uzu K. The biological studies on mitomycin I. Antibacterial activities of mitomycin derivatives. J Antibiot (Tokyo). 1967; 20:72-6.<sup>(1)</sup>

No grupo controle, de 13 ratos, a ferida cirúrgica foi lavada com soro fisiológico. Seis ratos foram sacrificados após 30 dias e sete, após 60 dias.

O grupo tratado com Mitomicina C, de 22 ratos, recebeu aplicação tópica de 2 ml da droga a 0,5 mg/ml (Mitocin, Bristol-Myers Squibb, São Paulo, Brasil), gotejados em uma gaze mantida sobre a ferida por cinco minutos. Após este tempo, a ferida foi lavada com 10 ml de soro fisiológico a 0,9%. Dez animais foram sacrificados em 30 dias e 12, em 60 dias.

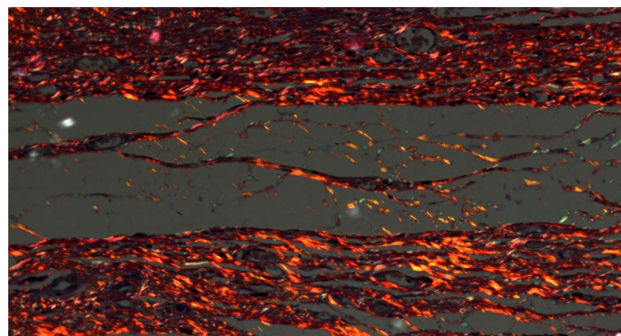
Após o sacrifício, também sob anestesia geral, a região dorsal que incluía a cicatriz e a área adjacente a ela foi depilada, fotografada e removida cirurgicamente. Os fragmentos foram fixados em formol a 10% e processados pelas técnicas histológicas habituais com inclusão em parafina e preparo de lâminas com cortes de 3 µm de espessura para o exame histológico pela coloração picrossirius red.

As lâminas coradas com o picrossirius red foram observadas ao microscópio óptico Axioskop 4.0, da marca Carl Zeiss, sob luz polarizada, para determinar a concentração de fibras colágenas do tipo I e do tipo III na área correspondente à cicatriz. As imagens digitalizadas das cicatrizes visualizadas com a lente polarizadora foram submetidas à avaliação pelo programa Image Pro Plus 4.5®, que reconheceu regiões coradas de cor alaranjada (colágeno tipo I) e cor esverdeada (colágeno tipo III), calculando a concentração destes subtipos de colágeno na área estudada (Fig. 1 e 2).

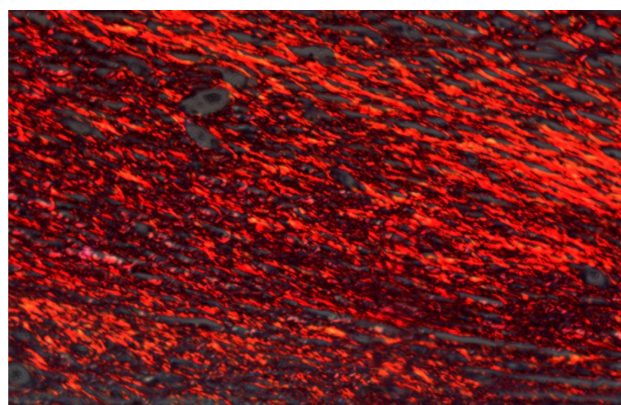
## Resultados

A concentração média de colágeno tipo I nas lâminas do grupo controle foi de 16,8% após 30 dias e de 22,4% após 60 dias. No grupo tratado com Mitomicina C a concentração do colágeno I também aumentou de 30 para 60 dias, porém os valores foram menores (10,9% e 11,9%, respectivamente). Apesar dos valores terem sido maiores com o aumento do tempo em ambos os grupos, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

A análise do colágeno tipo III mostrou concentrações mais baixas do que as do colágeno tipo I no intervalo de tempo avaliado, nos dois grupos. O grupo



**Figura 1.** Presença de fibras de colágeno I (alaranjadas) e de colágeno III (esverdeadas) em lâmina do grupo tratado com Mitomicina C.



**Figura 2.** Presença de fibras de colágeno I (alaranjadas) em lâmina do grupo controle.

controle apresentou, após 30 dias, 0,003%, e essa concentração aumentou para 0,019% após 60 dias. Já no grupo tratado com Mitomicina C não foi encontrado colágeno tipo III aos 30 dias e apenas 0,006% após 60 dias. A diferença entre a concentração de fibras de colágeno III em 30 e 60 dias para o grupo tratado com a Mitomicina C foi estatisticamente significativa. O mesmo não ocorreu em relação ao grupo controle.

## Discussão

A análise da concentração de fibras colágenas com a utilização da microscopia óptica sob luz po-

**Tabela 1**

Análise da concentração de colágeno tipo I em animais do grupo controle após 30 (n=6) e 60 dias (n=7) e em animais tratados com Mitomicina C após 30 (n=10) e 60 dias (n=12), de acordo com o \* Teste t-Student/ \*\* Mann-Whitney

Grupo	Tempo	Média	Mediana	Desvio	Mínimo	Máximo	p
Controle	30	16,8%	14,8%	14,9%	4,2%	45,2%	0,063**
	60	22,4%	19,5%	8,0%	15,8%	37,4%	
Mitomicina	30	10,9%	11,3%	5,6%	3,3%	19,0%	0,650*
	60	11,9%	12,6%	5,4%	4,0%	18,8%	

Tabela 2

Análise da concentração de colágeno tipo III em animais do grupo controle após 30 (n=6) e 60 dias (n=7) e em animais tratados com Mitomicina C após 30 (n=10) e 60 dias (n=12), de acordo com o Teste de Mann-Whitney\*\*

Grupo	Tempo	Média	Mediana	Desvio	Mínimo	Máximo	p
Controle	30	0,003%	0,000%	0,007%	0,000%	0,017%	0,351**
	60	0,019%	0,003%	0,044%	0,000%	0,119%	
Mitomicina	30	0,000%	0,000%	0,000%	0,000%	0,002%	0,013**
	60	0,006%	0,003%	0,012%	0,000%	0,040%	

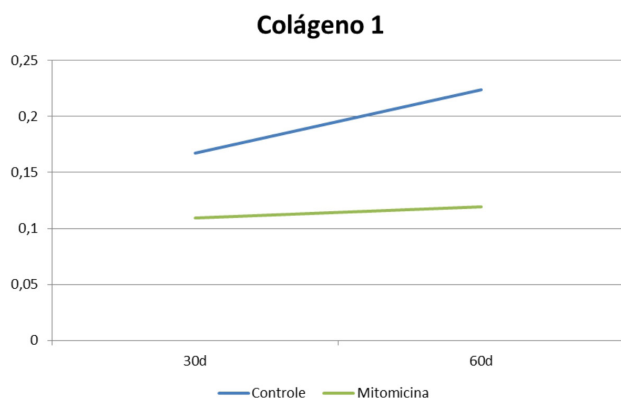


Figura 3. Porcentagem de Colágeno I em relação ao tempo no grupo controle e no grupo tratado com Mitomicina C.

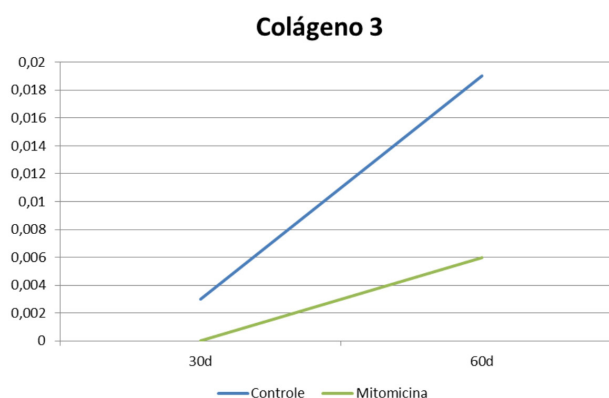


Figura 4. Porcentagem de Colágeno III em relação ao tempo no grupo controle e no grupo tratado com Mitomicina C.

larizada, nos dois momentos estudados, demonstrou que, tanto no grupo controle como no grupo caso, a concentração de fibras de colágeno I e de colágeno III aumentaram com o tempo. No grupo de animais que utilizou a Mitomicina C, o aumento de fibras de colágeno III de 30 para 60 dias foi estatisticamente significativo. As fibras de colágeno III são as primeiras a serem formadas durante o processo cicatricial, sendo posteriormente substituídas por fibras de colágeno I. O aumento de fibras de colágeno III, no grupo caso, mesmo após 60 dias da injúria, indica a ação retardadora da Mitomicina C no processo cicatricial. Outros estudos também mostraram a redução da deposição de colágeno após uso de Mitomicina C em 30 dias em outros animais, como pregas vocais de caninos e de suínos<sup>(28,29)</sup>, porém esses estudos analisaram apenas a concentração de colágeno total e não dos subtipos de colágeno. Além disso, as análises ocorreram em períodos de até 30 dias.

Ribeiro et al(2003)<sup>(30)</sup> observaram inibição do processo de fibrose em cicatrizes cirúrgicas em dorsos de ratos tratados com a mitomicina C tópica, em quatro semanas. Tais achados corroboram os resultados encontrados no presente estudo, no qual o uso da Mitomicina C mostrou uma menor concentração de fibras colágenas maduras (tipo I) em relação ao grupo controle, em 30 dias<sup>(29,30)</sup>.

## Conclusão

A Mitomicina C aplicada topicamente retardou o processo cicatricial em feridas cirúrgicas no dorso de ratos.

Esse achado contribui para a indicação do uso da Mitomicina C em cirurgias nas quais a contenção cicatricial seja fundamental para bons resultados pós-operatórios, como em cirurgias otorrinolaringológicas de estenoses e sinéquias.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Departamento de Morfologia da Faculdade da Santa Casa de São Paulo e o apoio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

## Referências bibliográficas

1. Miyamura S, Shigeno N, Matsui M, Wakaki S, Uzu K. The biological studies on mitomycin I. Antibacterial activities of mitomycin derivatives. J Antibiot (Tokyo). 1967; 20:72-6.
2. Bradner WT. Mitomycin C: a clinical update. Cancer Treat Rev. 2001; 27:35-50.
3. De Bruijn EA, Sleeboom HP, van Helsdingen PJ, van Oosterom AT, Tjaden UR, Maes RA. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravesical mitomycin C upon different dwelling times. Int J Cancer. 1992; 51:359-64.

4. Hu D, Sires BS, Tong DC, Royack GA, Oda D. Effect of brief exposure to mitomycin C on cultured human nasal mucosa fibroblasts. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2000; 16:119-25.
5. Manuskhatti W, Fitzpatrick RE. Treatment response of keloid and hypertrophic sternotomy scars: comparison among intralesional corticosteroid, 5-fluorouracil, and 585-nm flashlamp pumped pulsed-dye laser treatments. *Arch Dermatol*. 2002; 138:1149-55.
6. Gray SD, Tritle N, Li W. The effect of mitomycin on extracellular matrix proteins in a rat wound model. *Laryngoscope*. 2003; 113:237-42.
7. Ingrams DR, Volk MS, Biesman BS, Pankratov MM, Shapshay SM. Sinus surgery: does mitomycin C reduce stenosis? *Laryngoscope*. 1998;108:883-6.
8. Spector JE, Werkhaven JA, Spector NC, Huang S, Page RN, Baranowski B, et al. Preservation of function and histologic appearance in the injured glottis with topical mitomycin-C. *Laryngoscope*. 1999; 109:1125-9.
9. Garrett CG, Soto J, Riddick J, Billante CR, Reinisch L. Effect of mitomycin-C on vocal fold healing in a canine model. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110:25-30.
10. Rahbar R, Shapshay SM, Healy GB. Mitomycin: effects on laryngeal and tracheal stenosis, benefits, and complications. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2001; 110:1-6.
11. Coppit G, Perkins J, Munaretto J, Nielsen R, McKinney L, Ulnick K. The effects of mitomycin-C and stenting on airway wound healing after laryngotracheal reconstruction in a pig model. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2000; 53:125-35.
12. Simpson CB, James JC. The efficacy of mitomycin-C in the treatment of laryngotracheal stenosis. *Laryngoscope*. 2006; 116:1923-5.
13. Roh JL, Lee YW, Park CI. Can mitomycin C really prevent airway stenosis? *Laryngoscope*. 2006; 116:440-5.
14. Ubell ML, Ettema SL, Toohill RJ, Simpson CB, Merati AL. Mitomycin-c application in airway stenosis surgery: analysis of safety and costs. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006; 134:403-6.
15. Jassir D, Buchman CA, Gomez-Marin O. Safety and efficacy of topical mitomycin C in myringotomy patency. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001; 124:368-73.
16. Estrem SA, Batra PS. Preventing myringotomy closure with topical Mitomicin C in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 120:794-8.
17. O'Reilly RC, Goldman SA, Widner SA, Cass SP. Creating a stable tympanic membrane perforation using mitomycin C. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2001;124:40-5.
18. Chung JH, Cosenza MJ, Rahbar R, Metson RB. Mitomycin for the prevention of adhesion formation after endoscopic sinus surgery: A randomized, controlled study. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2002; 126: 468-74.
19. Jones LM, Guillory VL, Mair EA. Total nasopharyngeal stenosis: treatment with laser excision, nasopharyngeal obturators, and topical mitomycin-c. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133:795-8.
20. Yazawa Y, Suzuki M, Kitano H, Kitajima K. Intraoperative mitomycin-C in endolymphatic sac surgery for Ménière's disease: a pilot study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 1999; 61:188-94.
21. Aydin E, Uckan S, Ozdemir BH, Uyar P. Mitomycin C effect on fibrous adhesions of rabbit temporomandibular joint. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133:672-6.
22. Cubukcu A, Alponat A, Gonullu NN, Ozkan S, Ercin C. An experimental study evaluating the effect of Mitomycin C on the prevention of postoperative intra-abdominal adhesions. *J Surg Res*. 2001; 96:163-6.
23. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997; 77:509-28.
24. Simon PE, Meyers AD, Moutran AI, Romo T 3<sup>rd</sup>, Terris DJ, Talavera F, et al. Wound healing skin. Medscape. [on line]. Updated: Apr 17, 2014. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/884594-overview> [10 Dec 2014]
25. Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA. Analysis of healing after myocardial infarction using polarized light microscopy. *Am J Pathol*. 1989; 134:879-93.
26. Baptistella E, Malafaia O, Czezko NG, Ribas-Filho JM, Nassif PAN, Nascimento MM, Pachnicki JPA. Estudo comparado da cicatrização da prega vocal de suínos após exérese de fragmento com laser de CO2 e aplicação tópica pós-operatória de mitomicina e 5-fluorouracil. *Acta Cir Bras*. 2009; 24:13-8.
27. Carvalho MFP. Estudo histológico e imunohistoquímico comparativo da cicatrização de feridas em dorso de ratos tratadas com mitomicina C ou propionato de clobetasol. Tese (Doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2012.
28. Pereira MC, Repka CD, Camargo PA, Rispoli DZ, Campos AC, Matias JE. Efeito da mitomicina-C tópica sobre os depósitos de colágeno total na submucosa das pregas vocais íntegras de suínos. *Rev Col Bras Cir*. 2009, 36:236-40.
29. Camargo PAM, Campos ACL, Matias JEF, Rispoli DZ, Przysieszny PE, Fonseca VR. Efeito da mitomicina C tópica na cicatrização de prega vocal em modelo suíno. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2006; 72:601-4.
30. Ribeiro FAQ, Borges JP, Zacchi FFS, Guaraldo, Lusiele. O comportamento clínico e histológico da pele do rato submetida ao uso tópico e injetável de mitomicina C. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003, 69:151-8.

Trabalho recebido: 27/02/2015

Trabalho aprovado: 23/04/2015