

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

GEFERSON ANTONIO FIORAVANTI JUNIOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRATA NANOCRISTALINA E DA PAPAÍNA
SOBRE O PROCESSO CICATRICAL EM RATOS.**

Porto Alegre

2012

GEFERSON ANTONIO FIORAVANTI JUNIOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA PRATA NANOCRISTALINA E DA PAPAÍNA
SOBRE O PROCESSO CICATRICAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Maria Martha Campos

Co-orientadora: Prof^ª. Temis Webber Furlanetto Corte

Porto Alegre

2012

GEFERSON ANTONIO FIORAVANTI JUNIOR

**AValiação DOS EFEITOS DA PRATA NANOCRISTALINA E PAPAÍNA SOBRE
O PROCESSO CICATRICIAL EM RATOS.**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Farmacologia Bioquímica e Molecular, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 28 de março de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Examinador 1:

Dr. Andréia da Silva Gustavo

Examinador 2:

Dr. Sandra Leal

Examinador 3:

Dr. Vinícius Duval da Silva

F517a Fioravanti Junior, Geferson Antonio

Avaliação dos efeitos da prata nanocristalina e da papaína sobre o processo cicatricial em ratos. / Geferson Antonio Fioravanti Junior. – Porto Alegre, 2012.

60 f.

Dissertação (Mestrado) – PUCRS, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Orientador: Prof^a. Dra. Maria Martha Campos

Co-orientadora: Prof^a. Temis Webber Furlanetto Corte.

1. Cicatrização de Feridas. 2. Prata Nanocristalina. 3. Papaína. 4. Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular. 5. Ratos de Wistar I Fioravanti Junior, Geferson Antonio. II. Campos, Maria Martha. III. Corte, Temis Webber Furlanetto. IV. Título.

CDD 617.14

Bibliotecária Responsável:

Elisete Sales de Souza, CRB 10/1441

Dedico esse trabalho a memória de meus avôs e avós que foram pessoas muito importantes na minha vida e que com certeza estão prestigiando esse momento.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof. Dr. Maria Martha Campos, pela acolhida desde a fase de seleção e por todo o apoio durante a realização do mestrado.

A Prof. Dr. Temis Weber Furlanetto Corte e a Farmacêutica Letícia Maia pelo apoio durante a realização desse trabalho.

A Enf. Liele Ceolin e a futura enfermeira Priscila Saavedra Scherer pela colaboração durante os experimentos.

A toda equipe e colegas do INTOX e do Laboratório de Farmacologia, no nome da Prof. Dr. Fernanda Bueno Morrone, pela sua disponibilidade.

Ao Sr. Ruben Scherer Junior e a Sr^a Irene Saavedra Scherer por investirem e acreditarem no meu potencial, flexibilizando horários e tarefas e sempre oportunizando crescimento pessoal e profissional. A todos os colegas e amigos do trabalho que sempre entenderam minhas ausências e vibraram junto comigo em cada vitória.

A Henriete Lichtenfels por me ajudar a acreditar no meu potencial.

Aos meus pais, Geferson e Arlete e meus irmãos, Leticia, Priscila e Antony pelo brilho no olhar a cada objetivo alcançado e pelo apoio que recebi durante toda a minha vida. Divido essa conquista com vocês.

E por fim, agradeço a essa força maior que rege e guia minha vida, e me prova diariamente que mesmo os sonhos impossíveis, podem ser sempre realizados.

RESUMO

O processo de cicatrização representa uma cascata de eventos dinâmicos iniciados e influenciados por diversos fatores. A prata nanocristalina tem demonstrado uma ação antimicrobiana e anti-inflamatória em diversos estudos, enquanto a papaína, além da ação anti-inflamatória, é usada no desbridamento de feridas, por ser uma enzima proteolítica. A ação da papaína depende da sua concentração que varia de 1% a 10%. Esse estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a ação da prata nanocristalina e da papaína gel 2% sobre o processo de cicatrização em ratos e o impacto dessas substâncias sobre a expressão de VEGF. Foram randomizados 48 ratos Wistar em 4 grupos. Grupo 1: tratado com solução salina; grupo 2: tratado com prata nanocristalina; grupo 3: tratado com gel excipiente; grupo 4: tratado com papaína gel a 2%. Foi realizado uma excisão de espessura total no dorso do animal, medindo de 1,5 x 1,5 mm. Foi respeitada técnica asséptica rigorosa e o animal foi anestesiado com xilazina e quetamina por via intraperitoneal. Todos os animais foram avaliados no 3º, 6º, 9º, 12º e 15º dia. As lesões foram fotografadas e analisadas pelo Programa Image J para estimar a área. Foram recolhidas amostras das lesões nos diferentes períodos de avaliação para análise histológica e imuno-histoquímica para VEGF. A análise estatística foi feita pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo Teste de Bonferroni, utilizando programa Graphped 4. O grupo tratado com a prata nanocristalina, apresentou cicatrização completa ao final de 15 dias, diferente dos outros grupos. O grupo tratado com papaína gel 2% apresentou uma maior taxa de cicatrização no 3º e 6º dia, que se manteve estável a partir do 9º dia. A avaliação histológica mostrou um tecido de granulação maduro no grupo da prata nanocristalina. Os outros grupos apresentaram uma epiderme espessa com extenso infiltrado inflamatório. Foi evidente a imunopositividade para VEGF no grupo da prata nanocristalina, principalmente no 9º dia de tratamento. Nesse trabalho, baseado tanto na análise quantitativa como qualitativa, o grupo tratado com prata nanocristalina mostrou uma melhor taxa de cicatrização, evidenciado por uma mais rápida contração da ferida, comparada com os outros grupos. Além disso, evidenciamos que a ação pró cicatrização da prata nanocristalina está associada com a modulação da expressão de VEGF.

Palavras - chave: prata nanocristalina; cicatrização; VEGF; papaína 2% gel

ABSTRACT

Wound healing represents a dynamic physiological process initiated and influenced by many factors. Nanocrystalline silver have been demonstrated to have antimicrobial and anti-inflammatory properties, whereas papain is a proteolytic enzyme, which has been used in different formulations for wound treatment in clinics. Objectives This study was conducted to further evaluate the wound healing activity of nanocrystalline silver dressings as compared to that obtained with 2% papain gel, for the treatment of acute wounds in rats and the impact on VEGF expression. Forty-eight male Wistar rats were randomly divided into four groups. Group 1: treated with saline solution (NaCl 0.9%); group 2: treated with nanocrystalline silver; group 3: treated with the excipient gel; group 4: treated with 2% papain gel. A full-thickness wound of 1.5 x 1.5 cm² was excised from the back of the rats, under aseptic conditions and were anesthetized by a mixture of ketamine and xylazine. All the animals were evaluated on the 3rd, 6th, 9th, 12th and 15th days for wound-healing rating and histological evaluation and immunohistochemistry for VEGF. The statistical analysis was performed ANOVA, followed by Bonferroni's test. The group treated with the nanocrystalline silver dressing, showed a healing ratio superior, in all periods, when compared to control group and was the unique showing complete wound healing at 15 days of evaluation. The 2% papain gel group, a significantly higher wound healing rate was observed only at the 3th and the 6th days, but the wound showed a bleeding and decrease of wound healing ratio from the 9th day on. Histological evaluation showed a fully matured and compact granulation tissue on the nanocrystalline silver group. The others groups displayed thickened epidermis, with extensive areas of inflammation. Evident immunopositivity for VEGF was also seen in the granulation tissue layer at the 9th day, the nanocrystalline silver group showed a higher VEGF expression in blood vessels, epidermal cells and granulation tissue. In this work, based on both the qualitative and the quantitative analysis, the nanocrystalline silver group showed a better wound healing effect in view of a rapid contraction of wound, compared with the others groups. Furthermore, we show for the first time that pro-healing activities of nanocrystalline silver dressings are likely associated to the modulation of VEGF expression.

Keywords: nanocrystalline silver; wound healing; VEGF; papain 2% gel; rat

ABREVIACOES

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

TGF β : Fator de transformao do crescimento beta

EGF: Fator de crescimento epidérmico

TGF α : Fator de transformação do crescimento alfa

VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

IL 1 β : Interleucina 1 beta

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

MMP: metaloproteinases da matriz

MRSA: Staphilococcus aureus resistente a metilicina

VRE: enterococcus resistente a vancomicina

MMP₂: metaloproteinases da matriz 2

IL 8: Interleucina 8

IL 4: Interleucina 4

KGF: fator de crescimento para queratinócitos

KGF₂: fator de crescimento para queratinócitos 2

FDA: Food and Drug administration

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. ARTIGO CIENTÍFICO	28
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
6. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

As feridas são definidas como alterações da integridade da pele, resultantes de qualquer tipo de trauma, sendo o seu tratamento definido por vários aspectos sistêmicos e locais e por profissionais de diferentes áreas. O curativo é o tratamento local que auxilia o processo de cicatrização tecidual, recuperando a integridade e a função da pele¹.

O tratamento de feridas sofreu grandes avanços nas últimas décadas, tanto no que diz respeito ao conhecimento da interação molecular para o processo de cicatrização, quanto às tecnologias empregadas nos curativos utilizados como tratamento².

Atualmente, o conceito de curativo ideal está focado na manutenção da umidade apropriada, para promover o aumento da taxa de re-epitelização. Além disso, deve manter a ferida livre de infecções e ser biocompatível, não citotóxico, garantindo a distribuição e a proliferação celular^{3,4}.

O tratamento de lesões de pele é longo e oneroso. No Brasil, a seleção de produtos para o tratamento de feridas tem grande importância, pois o custo mínimo fica em torno de R\$ 200,00 por mês/por paciente, segundo o IBGE. Em função dessa problemática, tornam-se necessários estudos experimentais com o objetivo de identificar produtos ou substâncias que promovam a cicatrização, em apresentações que sigam as características do curativo ideal e que favoreçam os processos bioquímicos e moleculares envolvidos na cicatrização^{5,6}.

O papel do curativo é fornecer o ambiente propício para que o organismo, através de seus processos fisiológicos, promova re-epitelização e cicatrização das lesões. Muitas substâncias como fitoterápicos, nutracêuticos ou, até mesmo, proteínas de insetos têm-se mostrado eficientes na cicatrização¹.

Existe uma grande quantidade de produtos que são utilizados como curativos para o tratamento de feridas, sendo comercializados atualmente. Dentre eles, cabe ressaltar os

alginatos, as espumas hidrocelulares, os curativos impregnados com prata, os hidrogéis, os ácidos graxos e os filmes transparentes, entre outros. Muitas dessas terapias, apesar de serem amplamente utilizadas e apresentarem bons resultados, ainda não têm mecanismos de ação conhecidos, bem como, não possuem estudos com nível de evidência que recomendem seu uso¹.

O tratamento de feridas envolve a avaliação do portador da lesão, a avaliação local da ferida e a escolha do produto ideal. O conhecimento dos mecanismos envolvidos no processo de cicatrização é fundamental para que se possa compreender a ação dos curativos sobre as lesões de pele⁴.

1.1. Fisiologia da Cicatrização

O processo de cicatrização é bastante complexo, envolvendo o recrutamento de vários tipos de células e a produção de diferentes mediadores inflamatórios, como citocinas, fatores de crescimento e elementos da matriz. É dividido sistematicamente em três fases principais: fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação².

1.1.1. Fase Inflamatória:

Hemostasia e Inflamação (Imediatamente após a lesão até o 6º dia)

Compreende a fase inicial após o dano cutâneo, caracterizada por reações inflamatórias mediadas por citocinas, fatores de crescimento e sua ação com os receptores celulares⁷. Hemostasia é o evento imediato, que ocorre dentro de segundos a minutos, em resposta às lesões teciduais. Resulta em vasoconstrição pela liberação de tromboxano e prostaglandinas².

A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea formam um tampão rico em fibrina, que tem a função de restabelecer a hemostasia, formar barreira contra microrganismos e organizar uma matriz extracelular provisória que estimulará a migração celular, principalmente o recrutamento de neutrófilos^{3,8}.

A matriz extracelular provisória é um reservatório de citocinas e fatores de crescimento. As plaquetas, da mesma forma, são responsáveis pela secreção de vários fatores de crescimento: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento transformador α (TGF α) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEFG). Estes são responsáveis pela produção de mediadores vasoativos e fatores quimiotáticos, que têm o papel principal de recrutar células inflamatórias ao leito da ferida. Além disso, são responsáveis pela liberação de glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e a trombospondina que formam a matriz extracelular provisória³.

Os neutrófilos e monócitos chegam ao leito da ferida após a ação dos agentes quimiotáticos. Os monócitos infiltram-se no leito da ferida estimulados pelo PDGF. Somado a isso, dentro de 24 a 48 horas, a fagocitose de bactérias e fragmentos celulares, transformam os monócitos em macrófagos, que são as principais células envolvidas no processo de reparo tissular. Além disso, as proteases secretadas pelos neutrófilos estão envolvidas em mecanismos de controle de oxigênio, que são usados para reduzir a contaminação bacteriana⁹. A função do macrófago, além de degradar o tecido conjuntivo danificado (colágeno, elastina e proteoglicanas), é secretar fatores quimiotáticos, que atraem mais células inflamatórias e produzem prostaglandinas, alterando a permeabilidade microvascular. Na fase inflamatória, os principais agentes que estimulam a formação do tecido de granulação são PDGF, TGF β , FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e VEFG^{2,3}.

A inflamação tem um papel importante no controle bacteriano e na indução da fase proliferativa; porém, havendo prolongamento ou intensificação desse processo, danos ao tecido viável poderão ocorrer. Os efeitos locais da inflamação, por meio da ação dos mediadores inflamatórios, causam uma inflamação sistêmica que resulta na cronificação da ferida².

1.1.2. Fase Proliferativa:

Epitelização, angiogênese e formação da Matriz (Entre 4º e 14º dia)

A atividade metabólica é intensa nessa fase. A re-epitelização é iniciada dentro de algumas horas após o dano ao tecido, sendo que a expressão de fibroblastos e de células epiteliais predomina nesse momento. Além disso, macrófagos interagem com fibroblastos, contribuindo com a produção de colágeno^{7,8}.

A migração de células epiteliais das margens da ferida e das estruturas anexas da derme, como por exemplo, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, é resultado da ação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos, estimulada por TGF α e EGF. As citocinas inflamatórias envolvidas nessa parte do processo são IL-1 β e TNF α , que por sua vez, são produzidas pela ativação das plaquetas e macrófagos^{2,8}.

A fibroplasia e a angiogênese, que resultam na formação do tecido de granulação, ocorrem após quatro dias do início da lesão. O tecido de granulação recebe esse nome em função de sua característica granular devido à presença de capilares neoformados. Os fibroblastos compõem a nova matriz extracelular e os novos vasos sanguíneos provêm o oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local³.

Os novos vasos são formados a partir dos vasos pré-existentes. As células endoteliais localizadas nessas veias intactas são sensibilizadas pelo VEGF para iniciar a formação de

novos capilares. A vasculogênese é o primeiro estágio do desenvolvimento vascular. As células precursoras do endotélio vascular sofrem diferenciação, expansão e coalescência para formar a rede de túbulos primitivos do organismo^{3,8}.

Em resposta à lesão tecidual, sinais químicos provenientes da matriz e do plasma induzem a ação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) na angiogênese, sendo que os macrófagos e células endoteliais são os seus indutores diretos. Outras moléculas angiogênicas como TGF- β , angiogenina, angiotropina e angiopoietina 1, também estão envolvidas nesse processo. As baixas pressões de oxigênio e a alta concentração de lactato estimulam a produção de fatores angiogênicos que produzem novos capilares^{2,3}.

A matriz extracelular é composta de várias substâncias como a fibronectina, colágeno, vibronectina e laminina, tanto no tecido de granulação, quanto na membrana endotelial basal, além de outras proteínas produzidas por fibroblastos. A matriz dá suporte para migração celular e é um reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento. A expressão e ativação de proteases também são necessárias à angiogênese, principalmente na fase de remodelação².

As metaloproteinases da matriz, que são expressas por queratinócitos, fibroblastos, monócitos e macrófagos, em resposta ao TNF α , removem a matriz extracelular danificada, promovendo a penetração dos vasos recém-formados. Em consequência, a pressão de oxigênio aumenta, reduzindo os fatores responsáveis pela angiogênese: vasos que não são mais necessários sofrem apoptose^{3,8}.

Os fibroblastos secretam colágeno Tipo III dentro na matriz extracelular provisória. Esse colágeno é formado por fibras desorganizadas e imaturas. Simultaneamente, alguns

fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos e são responsáveis pela contração da ferida, que continua na fase de remodelação².

Feridas grandes e que cicatrizam por segunda intenção são controladas pelo TGF β , que causa contratura da ferida pela transformação dos fibroblastos da lesão em miofibroblastos⁸.

1.1.3. Fase de Remodelação

Estrutura Tecidual e Colágeno (8º dia a 1 ano)

Nessa fase, ocorre a tentativa de recuperar a estrutura tecidual normal, pela deposição de colágeno em redes organizadas. A maturação e as alterações na matriz favorecem o depósito de proteoglicanos e colágeno. As principais citocinas envolvidas nessa fase são: TNF α , IL-1 β , PDGF e TGF β ³.

Os fibroblastos continuam a produzir colágeno, sendo que as fibras são mais fortes e organizadas, correspondendo ao colágeno Tipo I. A matriz temporária é substituída por uma matriz de colágeno bem organizada, do tipo III, que coincide com a presença da fibronectina. Na pele íntegra, 80 a 90% do colágeno presente é do Tipo I, enquanto 10 a 20 % do tipo III. Já no tecido de granulação, 30 % do colágeno correspondem ao Tipo III².

Parte dos novos vasos, fibroblastos e células anti-inflamatórias desaparecem do local da ferida, mediante processo de emigração, apoptose ou outros processos de morte celular³.

Os queratinócitos migram a partir da periferia da lesão e são regulados principalmente por três grupos de agentes: fatores de crescimento, metaloproteinases e integrinas. Ainda na fase inflamatória, os queratinócitos das margens são ativados pela ação de fatores de crescimento, fibroblastos e macrófagos e neutrófilos⁸.

As metaloproteinases, expressas e ativadas pela integrina, degradam e modificam a estrutura da matriz, facilitando a migração celular. A sua ação proteolítica libera fatores de crescimento que perpetuam a proliferação e migração de queratinócitos³.

Na primeira semana, a ferida alcança apenas 3% da sua força tênsil inicial. Após três semanas, esse valor chega a 30% e, em três meses, a 80%⁷.

1. 2. Princípios Básicos no Tratamento das Feridas

1.2.1. Preparo do Leito da Ferida

O manejo das feridas crônicas é diferente daquele em feridas agudas. O conceito do preparo do leito da ferida está focado nos pontos críticos da ferida crônica, que são o desbridamento de tecido inviável, equilíbrio bacteriano e inflamatório e a manutenção da umidade ideal. O objetivo final é promover a formação de um tecido de granulação de qualidade e favorecer a epitelização total da ferida, de forma fisiológica ou utilizando produtos que facilitem esses processo¹⁰.

O conceito do preparo do leito da ferida, descrito primeiramente em 2000, orienta o profissional de saúde a examinar o paciente de forma ampla. É importante conhecer o estado nutricional, doenças associadas, uso de medicamentos, bem como, avaliar a capacidade do paciente em seguir o tratamento prescrito⁴.

A avaliação do local da ferida, após a determinação do estado clínico e a etiologia da lesão, é peça fundamental na escolha do curativo adequado. Características como tipo de tecido encontrado no leito da ferida, área da lesão, tipo e quantidade do exsudato e níveis de desconforto são sinais e sintomas que servem de parâmetros para que o profissional de saúde defina qual cobertura utilizar nesse tratamento^{4,11}.

O acrônimo TIME é utilizado para guiar a avaliação e o tratamento de lesões de pele. A letra “T” está relacionada com a presença de tecido inviável no leito da ferida. A intervenção proposta é o desbridamento, que é um passo essencial, tanto em feridas agudas, quanto crônicas. A escolha da modalidade do desbridamento depende das condições da ferida. Pode-se optar por desbridamento cirúrgico, mecânico, autolítico ou, enzimático. Esse procedimento reduz a contaminação da ferida e a destruição tissular¹⁰.

A Letra “T” destaca a importância de identificar sinais e sintomas de aumento de carga bacteriana ou inflamação crônica associadas à lesão. A presença de bactérias na ferida nem sempre indica infecção. O diagnóstico pode ser feito por culturas quantitativas na ferida, pois a carga bacteriana no leito da ferida é que vai definir a contaminação, colonização crítica ou infecção¹¹.

As feridas contaminadas ou colonizadas apresentam uma carga bacteriana que não interfere no processo de cicatrização. No caso de colonização crítica e infecção, a carga bacteriana e a capacidade de replicação bacteriana são altas, interferindo drasticamente no processo de cicatrização. Como a cultura quantitativa é pouco utilizada no nosso meio, a avaliação clínica da ferida pode ser muito útil¹⁰.

Os sinais e sintomas da ferida criticamente colonizada ou infectada são: cicatrização retardada, aumento do volume de exsudato seroso, mudanças no padrão da dor, pele adjacente à lesão comprometida, alterações de odor e tecido de granulação friável e irregular. Nesse caso, indica-se a utilização de curativos que sejam capazes de reduzir a inflamação e combater as bactérias. Os mais utilizados atualmente são: alginato de cálcio, curativos impregnados com prata e com prata nanocristalina e carvão ativado⁴.

A letra “M” trata da importância da manutenção da umidade ideal para o reforço do processo de cicatrização. Desde o final dos anos 70, sabe-se da importância em manter a

umidade ideal para promoção da migração celular, um parâmetro difícil de ser medido. Porém, deve-se observar alguns sinais que indicam que a mesma foi mantida: maceração de bordas, lesão por umidade na pele adjacente ou necessidade frequente de trocas de curativos são sinais de que a cobertura escolhida não é adequada para o tipo de ferida. Por outro lado, leito da ferida ressecado, aumento da dor e formação de crostas são sinais e sintomas de falta de umidade na lesão. Os produtos mais utilizados na manutenção da umidade são: hidrogéis, alginato de cálcio, espumas hidrocélulares e terapia compressiva no caso de úlceras venosas¹⁰.

O “E” está relacionado com problemas na epitelização das margens, que ocorrem na fase de proliferação e remodelamento. Os queratinócitos não conseguem migrar para cobrir a lesão, seja por inflamação ou infecção, e, acabam se acumulando nas bordas da ferida, causando um aumento da camada epitelial que impede que a ferida re-epitelize. Nessas situações, devem-se utilizar as intervenções previstas no T, I e M, conforme as características da lesão. Ressalta-se a importância de seguir esse acrônimo, pois ele promove a cicatrização da lesão de forma fisiológica^{4,11}.

1.3. Prata Nanocristalina

Os efeitos da prata no tratamento de feridas são conhecidos há bastante tempo. Durante o Império Romano, o efeito antimicrobiano foi utilizado na purificação da água. Nos anos 1800, existem registros históricos que descrevem a utilização da prata no tratamento de epilepsia, doenças venéreas, acne e úlceras venosas. Da mesma forma, sabe-se da aplicação da prata em procedimentos cirúrgicos, na forma de curativos para melhorar o processo de cicatrização e prevenir infecções, como em procedimentos de retirada de verrugas e desbridamento de úlceras. Em 1884, Crede, um obstetra alemão, usava nitrato de prata a 1% na prevenção de doenças infecciosas no pós-parto. Em meados de 1940, houve um declínio no

uso da prata em função do advento da Antibioticoterapia. Em 1964, passou a se utilizar solução de nitrato de prata a 0,5% em queimaduras; porém, esses curativos necessitavam ser reaplicados muitas vezes ao dia ou umedecidos a cada duas horas. Quatro anos depois, em 1968, foi introduzido o uso da sulfadiazina de prata a 1%, em forma de creme, para o tratamento de queimaduras ou feridas infectadas e que tem sido usado até os dias de hoje^{12,13}.

Os íons de prata têm uma forte ação antimicrobiana, anti-séptica e anti-inflamatória e são amplamente utilizados na prevenção e tratamento de infecção em feridas de diferentes etiologias, como as úlceras por pressão, úlceras diabéticas e úlceras venosas e, muito frequentemente, em queimaduras¹⁴. O curativo com prata nanocristalina é construído pelo processo de deposição física de vapor, dentro de uma câmara de vácuo, onde é introduzido gás argônio. Uma corrente elétrica passa por dentro dessa câmara e os íons do argônio se chocam com os átomos da prata, desenvolvendo os nanocristais de prata e depositando-os na gaze de poliéster. Cada cristal de prata mede 15 nanômetros. Quando essa gaze impregnada com prata nanocristalina é molhada com água destilada estéril, hidrogel ou entra em contato com exsudato da ferida, ocorre a liberação de grande quantidade de cátions de prata, acima de 100 ppm, causando um transporte de elétrons, inativando o DNA da bactéria, danificando a membrana celular e fazendo ligações irreversíveis nos microrganismos. Salienta-se que essa liberação de cátions de prata é sustentada por três dias na mesma concentração inicial, garantindo uma redução na troca de curativos, reforçando sua ação bactericida, anti-inflamatória e antifúngica^{13, 14, 15}.

Os curativos comerciais impregnados com prata nanocristalina consistem em três camadas: uma camada interna com poder de absorção e manutenção da umidade ideal, composta de *rayon* e duas camadas externas de polietileno de baixa aderência¹⁶.

Em revisão sistemática de estudos randomizados comparando sulfadiazina de prata, nitrato de prata e prata nanocristalina, foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação à incidência de infecção e níveis de dor em pacientes com queimaduras de espessura parcial¹⁴.

Curativos que utilizam a prata nanocristalina têm um efeito bactericida de largo espectro, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE) e *Acinetobacter baumannii*, sem causar danos ao processo de cicatrização. Quando se associa a prata nanocristalina com fibras de alginato observa-se um aumento da atividade antimicrobiana, em comparação aos curativos que contêm somente alginato de cálcio, favorecendo a ligação com a metaloproteinase da matriz-2 (MMP2). De forma interessante, este curativo apresentou efeitos anti-oxidantes quando testado em modelos *in vitro*^{14,15}. Os efeitos antimicrobianos da prata nanocristalina, resultam da alteração do DNA microbiano ou do bloqueio respiratório, bem como, as nanopartículas de prata, promovem a cicatrização¹⁶. Além disso, a utilização da prata nanocristalina reduz o tempo de internação, reduz níveis de dor e reforça o processo de cicatrização¹³.

Vários estudos pré-clínicos e clínicos foram realizados, tendo sua metodologia desenhada para avaliar o poder antibacteriano do curativo e seu desempenho geral. Porém, há poucos estudos acerca das ações sistêmicas da prata, ou seja, sobre a segurança da utilização da prata nanocristalina.

Vlachou et al¹⁶ conduziram um estudo prospectivo com o objetivo de avaliar a absorção sistêmica da prata em pacientes com queimaduras parciais e totais, tratados com enxerto de pele e curativos com prata nanocristalina. A mediana do nível máximo de prata no soro foi de 56,8 µg/l (faixa de 4,8-230 µg/l), que está abaixo do nível máximo reportado na literatura (440 µg/l para creme de sulfadiazina de prata). Os pacientes foram acompanhados

durante seis meses e os níveis de prata no soro normalizaram após três meses, sendo que, os pacientes não apresentaram nenhum sinal ou sintoma de toxicidade durante o tratamento. Dessa forma, sugeriu-se que a prata nanocristalina é um produto seguro para tratamento de lesões de pele¹⁶.

A ação anti-inflamatória da prata nanocristalina vem sendo amplamente estudada em modelos consagrados de cicatrização e inflamação. Além de curativos impregnados com nanocristais de prata, soluções com esse metal nobre apresentaram ação anti-inflamatória eficaz em suínos. Em um modelo de inflamação induzida no dorso de suínos, o tratamento com solução aquosa de nanocristais de prata produziu redução visual e histológica do processo inflamatório. Houve redução da expressão de TNF α e IL-8, bem como a indução de apoptose celular de neutrófilos e macrófagos. Além disso, observou-se um aumento na expressão de IL-4, EGF, KGF e KGF2 que têm ação anti-inflamatória. As metaloproteinases da matriz, principalmente a MMP2, tiveram sua expressão significativamente reduzida¹⁷.

1.4. Papaína

O primeiro artigo sobre o uso da papaína foi descrito no ano de 1879, sendo que sua indicação seria unicamente para o desbridamento. Até a II Grande Guerra, pouco se sabia sobre o desbridamento químico, sendo a papaína uma enzima muito utilizada para esse fim⁶.

Trata-se de uma enzima retirada do mamão *Carica papaya*, que é encontrada somente na fruta verde, pois após o amadurecimento as enzimas são perdidas. A papaína é uma cisteína proteinase, cuja família é composta por: quimiopapaína, caricaína, bromelaína, actinidina e ficina^{6,18}. Estas proteinases estão amplamente distribuídas na natureza e são divididas em grupos que não possuem a mesma identidade estrutural e provavelmente sugerem diferentes linhas evolucionárias¹⁹.

Após o seu preparo, a papaína torna-se um pó de cor leitosa, com odor forte e característico, solúvel em soluções aquosas e, insolúvel em álcool, éter ou clorofórmio. É inativada na presença de luz e calor ou por substâncias oxidantes como ferro, oxigênio e nitrato de prata²⁰.

A característica da matéria-prima é a instabilidade em função da temperatura, o que pode levar à perda de eficácia. Apesar de ser utilizada há bastante tempo, não se encontram estudos com nível de evidência, sobre a eficácia do uso da papaína, bem como, qual seria a apresentação mais adequada⁶.

No Brasil, os curativos à base de papaína são utilizados em várias concentrações e formas farmacêuticas, como pó, gel, cremes e soluções. A concentração depende das características da lesão a ser tratada. A solução de papaína a 10% é indicada para desbridamento enzimático em áreas de necrose seca e, em baixas concentrações, que variam de 1% a 4%, tendo função de limpeza e manutenção, bem como papel estimulador do crescimento tecido de granulação⁶.

Ela digere o tecido necrótico, liquefazendo a escara, facilitando a migração de células da margem para o leito da ferida. Além disso, é utilizada para controlar a carga bacteriana, reduzir o exsudato e promover granulação¹⁹. A papaína degrada qualquer proteína que contém resíduos de cisteína, como é o caso dos fatores de crescimento. Auxilia na remoção de exsudatos inflamatórios e células mortas, transformando-os em peptídeos quimiotáticos para os fibroblastos, que estimulam precocemente a fibroplasia e cicatrização²⁰.

Existem diferentes formas de apresentação como em pó, pomadas, géis e *sprays*. A adição de uréia ou clorofila a sua fórmula demonstrou uma aparente melhora clínica, evidenciada pela formação de tecido de granulação saudável, controle da inflamação e redução da dor; porém, não existem evidências que suportem esses achados¹⁸.

Pieper; Caliri⁶ revisaram vários artigos publicados sobre a ação da papaína em diferentes tipos de úlceras e feridas, em populações distintas. Não havia, dentre os trabalhos selecionados, estudos com desenhos metodológicos adequados para fornecerem dados com nível de evidência satisfatório. Porém, há unanimidade no que diz respeito ao desbridamento eficaz, promoção da granulação e facilidade no uso. Foi observada a necessidade de 2 a 3 trocas de curativos por dia, bem como, relatados casos de reação alérgica ao látex, encontrado no mamão papaia⁶.

A solução de papaína associada ao uso de antibioticoterapia em pacientes com feridas viscerais infectadas, apresentou resultados satisfatórios, havendo cicatrização em 30 dias, com melhores resultados nos pacientes que receberam irrigação contínua de papaína a 1%¹.

A ação antibacteriana da papaína foi estudada *in vitro*, utilizando a formulação em gel nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10%, sobre *Staphilococcus aureus* e *Escherichia coli*. A ação bactericida da papaína foi demonstrada em 50% dos casos quando utilizada a concentração de 10%. Acredita-se que esse efeito seja resultante de sua ação proteolítica, capaz de degradar tecidos desvitalizados e, conseqüentemente, reduzir a carga bacteriana²⁰.

Conforme estudos realizados com diferentes excipientes, o gel de polímero carboxivinílico demonstrou ser o melhor excipiente para a papaína, com estabilidade de seis meses a 6° C. No entanto, foi observado no mesmo estudo, que as matérias-primas interferiram diretamente na qualidade do produto final por apresentarem diferentes teores da enzima. A papaína é muito usada na cicatrização de feridas e faltam dados de qualidade e eficácia das matérias-primas e de produtos farmacêuticos preparados a partir das mesmas, o que pode levar a erros de interpretação quanto aos resultados do produto na prática²¹.

A forma em gel é bastante utilizada, bem como, comercializada pela indústria farmacêutica no Brasil e na Europa, embora o seu uso não seja liberado em alguns locais,

como nos Estados Unidos (FDA, 2008). O gel mantém o leito da ferida úmido e é de fácil aplicação e remoção²⁰.

2. JUSTIFICATIVA

A prata é conhecida por suas propriedades antibacterianas. A nanotecnologia desenvolveu curativos impregnados com prata nanocristalina, o que aperfeiçoou sua ação bacteriana e adicionou efeitos anti-inflamatórios. Estudos atuais mostram que a prata nanocristalina é capaz de reduzir a expressão de citocinas, proteases e outras moléculas responsáveis pela perpetuação da resposta inflamatória na ferida crônica. Apesar de ser amplamente utilizada em humanos, os mecanismos relacionados à redução da inflamação não são totalmente conhecidos, bem como, existem dúvidas quanto à toxicidade relacionada ao uso de compostos de prata, mesmo que topicamente. Da mesma forma, a papaína é bastante usada em diversos países, principalmente no Brasil, por suas ações bactericida, anti-inflamatória e desbridante. Seus mecanismos de ação não são bem conhecidos e sua toxicidade ainda não está clara.

A realização desse estudo justifica-se pela necessidade de dados que complementem os já existentes na literatura e a importância em comparar produtos estruturalmente diferentes, porém, que produzem resultados semelhantes no processo de cicatrização de lesões na pele. Além disso, o aproveitamento de recursos naturais no tratamento de feridas é uma tendência observada em todo o mundo, pois apresentam eficiência e poucos efeitos nocivos para o processo de cicatrização²².

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da prata nanocristalina e papaína sobre o processo cicatricial em ratos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a taxa de contração da ferida, através da determinação da área de lesão no 3º, 6º, 9º, 12º e 15º de tratamento em todos os grupos do estudo.
- Descrever a ação dos curativos com prata nanocristalina e papaína sobre o processo cicatricial por meio da avaliação histológica;
- Descrever a ação da prata nanocristalina e papaína sobre o processo cicatricial por meio da análise imuno-histoquímica para VEGF.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados do presente trabalho foram submetidos à revista *British Journal of Dermatology*, fator de impacto 4,31.

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *British Journal of Dermatology*.

Manuscript ID:	BJD-2012-0113
Title:	ADDITIONAL EVALUATION ON THE WOUND HEALING EFFECTS OF NANOCRYSTALLINE SILVER DRESSING AND 2% PAPAIN GEL IN RATS
Authors:	Fioravanti-Jr, Geferson Ceolin, Liele Maia, Leticia Lopes, Tiago Morrone, Fernanda Corte, Temis Campos, Maria
Date Submitted:	18-Jan-2012

 Print  Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2011. All Rights Reserved. ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**ADDITIONAL EVALUATION ON THE WOUND HEALING EFFECTS OF
NANOCRYSTALLINE SILVER DRESSING AND 2% PAPAIN GEL IN RATS**

FIORAVANTI-JR, G. A.¹; CEOLIN, L. D.²; MAIA, L. D. A.³; LOPES, TG²; MORRONE, F.
B.^{3,4}; CORTE, T. W. F.³; CAMPOS, M. M.^{1,4}

¹ PPG em Medicina e Ciências da Saúde PUC RS; ² Hospital São Lucas da PUC RS; ³
Faculdade de Farmácia PUC RS; ⁴Instituto de Toxicologia e Farmacologia.

Running Title: Additional evidence on commonly used dressings in wound healing.

Corresponding Author: Maria Martha Campos, School of Dentistry/Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, Partenon, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone number: 55 51 3320 3562; Fax number: 55 51 3320 3626.

E-mail: camposmmartha@yahoo.com; maria.campos@pucls.br

Number of Text Pages: 24

Number of Figures: 06

Number of Tables: 01

We declare no conflicts of interest.

Summary

Background: Wound healing represents a dynamic process influenced by many factors. Nanocrystalline silver and papain-based products have been largely used in clinics as wound dressings, although additional studies on them are still needed. **Objectives:** We evaluated the wound healing activities of nanocrystalline silver and 2% papain gel dressings, in a rat model of acute wounds. **Methods:** Male Wistar rats were divided into four groups: (1) treated with saline solution (NaCl 0.9%); (2) treated with nanocrystalline silver; (3) treated with excipient gel; (4) treated with 2% papain gel. A full-thickness wound (1.5 cm²) was excised from the rat dorsum. The animals were evaluated on the 3rd, 6th, 9th, 12th and 15th days for wound-healing rating, histological analysis and VEGF expression. **Results:** Nanocrystalline silver dressing showed a superior healing ratio, in all evaluated periods, and it was the unique showing complete wound healing at 15 days. In the 2% papain gel group, a significantly higher wound healing rate was observed at 3 and 6 days, but bleeding and decreased healing ratio were detected since day 9. Histological evaluation showed a fully matured and compact granulation tissue in the nanocrystalline silver group. The other groups displayed thickened epidermis, with extensive inflammatory areas. VEGF expression was higher at the 9th day in the nanocrystalline silver group, but immunelabeling was gradually diminished onward. **Conclusions:** When compared to 2% papain, nanocrystalline silver showed improved wound healing effects in view of a rapid contraction of wound, an action likely associated to the modulation of VEGF expression.

1. INTRODUCTION

Wound healing is a natural restorative response to tissue injury, and represents a dynamic physiological process initiated and influenced by many factors. The wound healing encompasses cell migration, proliferation and differentiation. It can be categorized into four stages: hemostasis, inflammation, proliferation (consisting of granulation, contraction, and epithelization), and finally the remodeling phase. It is well known that wound healing is dependent on the production of a series of cytokines, growth factors, and matrix elements^{1,2,3,4,5}. In some cases, the process of spontaneous wound healing takes longer periods, and a bad outcome is usually observed, with likelihood of developing hypertrophic scarring and unsightly pigmentation changes. Moreover, under unfavorable conditions, the inflammatory cascade may promote tissue destruction and necrosis².

Dressings play an important role in wound healing process to obtain better aesthetic and functional outcomes⁶. The ideal wound dressings are expected to maintain a moist environment around the wound and absorb the exudates from the wound surface. Of note, hydrogel-based dressings have been extensively associated to a significant increase of re-epithelization rates^{7,8}.

Silver-related products have been used for therapeutic purposes for a long time. Silver dressings were originally introduced as antimicrobial burn dressings⁹. Nevertheless, many studies have suggested that these dressings have additional pro-healing and/or anti-inflammatory activities in infected wounds, rashes, and meshed skin grafts. For instance, it was demonstrated that nanocrystalline silver-coated dressings present anti-inflammatory effects independent on its antimicrobial activity, in a porcine model of contact dermatitis. In addition, some studies have shown that nanocrystalline silver is able to reduce inflammation, probably by inducing apoptosis of dermal inflammatory cells, as well as by inhibiting the

expression of gelatinases and pro-inflammatory cytokines^{10,11}. The anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver is likely related to its small grain size and polycrystallinity, which together result in a high percentage of energy grain boundaries, and structures that can dissolve into aqueous solution¹⁰.

Papain is a cysteine proteinase from papaya, which is largely used in food, cosmetic and pharmaceutical industry^{12,13}. Papain is known to digest necrotic tissue by liquefying scars, thus facilitating the migration of cells. It is also useful in reducing the bacterial burden, and also to increase granulation tissue formation^{13,14,15}. The papain concentration varies according to its use. For example, a 10% solution is applied for tissues with black necrosis, whilst less concentrated formulas (1% to 4%) are used for slough or granulating tissues¹⁶. Several studies have indicated that papain dressings reduce the necrotic wound tissues, what is allied to increased re-epithelization. Furthermore, it has been described that papain use results in a decrease of wound exudation, as well as decreased pain and inflammation at the wound site. Therefore, an effective wound cleansing and debridement with papain solution appear to facilitate the healing process^{16,17}. However, a proteolytic enzyme treatment of wounds with substantial bacteria burden is unsafe, unless treated in conjunction with topical antimicrobials. These enzymatic agents induce rapid scar degradation, but allow for significant bacterial proliferation and invasion¹⁴. Moreover, the use of papain products was discontinued in the United States due to adverse events and allergic reactions, although they are still clinically employed worldwide¹⁸. Therefore, additional studies on papain-containing dressings are necessary to better define their potential benefits and disadvantages.

Considering the evidence presented before, this study was conducted to compare the wound healing activity of nanocrystalline silver dressings, with that obtained with 2% papain gel, for the treatment of acute wounds in rats without bacterial burden. We demonstrate, for

the first time, that the nanocrystalline silver-treated group showed a better healing outcome in view of a rapid contraction of wound, compared with the papain or the saline groups, indicating a great pro-healing activity for nanocrystalline silver dressings, which is probably allied to the ability of this kind of medication in modulating vascular endothelium growth factor expression.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Nanocrystalline silver dressing (obtained from Smith&Nephew, UK) was used. This dressing consists of three layers: an absorbent inner core of rayon and polyester fabric sandwiched between two outer layers of nanocrystalline silver-coated, low-adherent polyethylene mesh¹⁹. Two percent papain gel was prepared using papain powder from *C. papaya* L. (30,000 USP-U/mg stabilized with sodium disulfite, obtained from Merck, Germany).

2.2 Animal experiments

Forty-eight male Wistar rats (average weight of 180 g) were obtained from Universidade Federal de Pelotas (UFPEL; Pelotas, RS, Brazil). All the experimental procedures were carried out in accordance with the Guidelines for the Use and Care with Laboratorial Animals from National Institute of Health, and were approved by the Local Animal Ethics Committee (protocol number 10/00202). The number of animals and the intensity of noxious stimuli were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the treatments. The rats were kept in separate cages in order to avoid the displacement of dressings, and were allowed to move freely throughout the test period. They were maintained in controlled temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity (60-70%), under a 12 h light-dark cycle, with food and water *ad libitum*.

The rats were randomly divided into four groups, each one with 12 animals: group 1: treated with saline solution (NaCl 0.9%); group 2: treated with nanocrystalline silver; group 3: treated with the excipient gel; group 4: treated with 2% papain gel.

All surgical procedures were performed under aseptic conditions. Firstly, the rats were anaesthetized with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), by i.p. route.

The rat dorsum was previously shaved and disinfected with 70% ethylic alcohol. A full-thickness wound of 1.5 x 1.5 cm² was excised from the back of the rats, using a pair of sharp scissors and a scalpel. Each wound was covered with the corresponding dressing as described above. In order to improve the fixation of dressings, a portion of Flexifix® (Smith&Nephew, UK) was applied (Figure 1).

In the Group 2, the dressings were changed every 72 h, according to the manufacturer's recommendations, to permit the release of silver nanoparticles^{11,20}. In the other groups, dressing changes were performed every 24 h. All animals showed good general health condition throughout the study.

2.3 Macroscopic examination

Before removing the specimens, the curative conditions of the wound were observed. The wounds were photographed on the 3rd, 6th, 9th, 12th e 15th days with a digital camera from a standard distance of 30 cm. The images were then analyzed, with the image-processing software Image J (NIH, Betehesda, MD, USA), to estimate the wound area (Figure 2). Measurement of the wound closure areas was defined by the limits of epithelization edge. The lesions outline were determined visually and delineated by an observer using a digitizing table. The software was calibrated for each new analysis, according to the method described by Ribeiro et al. (2009)²¹. The degree of healing was expressed as the wound contraction ratio (WCR), which was determined by using the following formula²²: $WCR = [(A_0 - A_t)/A_0] * 100\%$; where A_0 and A_t refer to initial area and the wound area at time t , respectively. Finally, when the specimens were collected, the appearance of the regenerated tissue and the adhesion between the scaffold and the muscle tissue around it were examined.

2.4. Histological and immunohistochemical analysis

Specimens were collected postoperatively at 3rd, 6th, 9th, 12th e 15th days for histological and immunohistochemical analysis. For this purpose, the animals were euthanized by deep inhalation with isoflurane. The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde for 24 h. After conventional ethanol gradient dehydration, the tissues were embedded in paraffin and sectioned at 5 µm. For the histological analysis, the sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histological examination of tissues was performed by a pathologist blinded to the experiment. Histological changes were evaluated considering density of inflammatory cells, thickness of the granulation tissue, and thickness of the epithelial layer²². At least 6 areas of each slide were analyzed.

Additional sections were used to determine the expression of VEGF, by means of immunohistochemistry analysis, according to the method described by Sant'ana et al, (2011)²³. The primary antibody (R & D Systems) was diluted in PBS (1:200). Following quenching of endogenous peroxidase with 1.5% hydrogen peroxide in methanol (v/v) for 20 min, high temperature antigen retrieval was performed by immersing the slides in 10 mM trisodium citrate buffer pH 6.0, which in turn was immersed in a water bath at 95-98 °C for 45 min. The slides were processed using the appropriate biotinylated secondary antibody and the streptavidin-HRP complex (Vector Laboratories, Burlingame, CA), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the sections were developed with the chromogen AEC (Dako Cytomation, Carpinteria, CA), and counterstained with Harris's hematoxylin, followed by a quick washing in 1% ammonia solution. The slides were dried at room temperature and mounted with a coverslip and glicerogel.

2.6 Statistical analysis

Results are expressed as the Mean \pm Standard Error Mean. The statistical analysis was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. *P* values smaller than 0.05 were considered as significant. All tests were performed using the GraphPad® 4 Software (USA).

3. RESULTS

3.1 Macroscopic examination and wound healing ratios

General macroscopic analysis of all experimental groups did not reveal any clinical signal of infection. Concerning the group treated with the nanocrystalline silver dressing, it was possible to observe that the wound was more contractive, mainly since the 6th day, in relation to the saline-treated control group. There was no scar formation, with the presence of slight granulation (Figure 3B and 3C). The growth of new epidermis extending from the border to the center of the wound bed was seen in both groups, but it was slightly higher in the nanocrystalline silver group. Data depicted in the Figure 3A clearly shows that healing ratio was found significantly superior in the nanocrystalline silver group, in all periods of evaluation, when compared to the saline treatment. Of note, the nanocrystalline silver group was the unique showing complete wound healing at 15 days of evaluation (Figure 3C).

In relation to the 2% papain gel group, a significantly higher wound healing rate was observed only at the 3th and the 6th days (Figure 4A). However, marked bleeding and detachment of the wound bed edge were noticed in the 2% papain gel group, at both time-points. There was scab formation on the 6th day, and from day 9 onward, there was a decrease in the depth of the wound, with no contraction of margins (Figure 4B), an effect that was also seen in the plain gel group (Figure 4C).

To further survey our results, we have also performed a comparison of percentages of healing rates, among the experimental groups. Data presented in the Table 1 clearly show that saline and gel excipient displayed similar healing rates from day 6 to 12, although the saline group presented a better wound resolution at the 15th day. At day 3, the healing rate of the 2% papain gel group was higher than the rate of the nanocrystalline silver group (Table 1). On the day 6, the healing rate of the papain group was similar to that seen in the nanocrystalline

silver group. However, from the 9th to the 15th day, the healing rate of the nanocrystalline silver group was visibly superior, when compared to the other groups (Table 1).

3.2 Histological evaluation

Representative images of histological aspects of all experimental groups, throughout the five periods of evaluation (3, 6, 9, 12 and 15 days post-surgery) are presented in the Figure 5. Concerning the assessment 3 days after surgery, there were no great differences among the experimental groups. However, incomplete epithelium was more evident in the 2% gel papain group, at both 3 and 6 days. Of note, the aspect of epithelium was generally improved in the nanocrystalline silver group, when compared to the other experimental groups at 6, 9, and especially on 12 days.

On 15 days of evaluation, both plain gel and 2% papain groups displayed thickened epidermis, with extensive areas of inflammation in the papain group. Nevertheless, the nanocrystalline silver group presented fully matured and compact granulation tissue, with high cellularity and well-organized collagen fibers. Furthermore, it was possible to observe a nearly normal skin in the nanocrystalline silver group, with the greater presence of hair follicles. Finally, the saline group presented a thin epidermis, according to assessment at 15 days.

3.3 Immunohistochemical analysis for VEGF

To extend the evidence on the effects of both nanocrystalline silver and 2% pain gel on wound healing process, we have carried out immunohistochemical analysis for VEGF. Our data show that low immunolabelling for VEGF was detected at the 3rd day of evaluation, in all experimental groups (Figure 6, first column). At the 6th day, 2% papain and excipient gel

groups showed VEGF expression especially on migrated epidermal cells and hair follicles adjacent to the wound bed. In the nanocrystalline silver and saline groups, evident immunopositivity for VEGF was also seen in the granulation tissue layer. At the 9th day, the nanocrystalline silver group showed a higher VEGF expression in blood vessels, epidermal cells and granulation tissue, with most distinct neovascularization compared to the other treatments. The other groups displayed a lower expression of VEGF when compared to the nanocrystalline silver group (Figure 6). The analysis on 12 and 15 days revealed a lower expression of VEGF in the nanocrystalline silver group, whereas the immunolabelling for this growth factor remained noticeable in the other experimental groups, throughout the later periods of evaluation (Figure 6, third and fourth columns) . The immunopositivity for VEGF at 15 days was mainly remarkable in the 2% papain gel group.

4. DISCUSSION

Cutaneous wounds are the result of disrupted skin integrity. The healing process depends on local wound factors, systemic mediators, the underlying disease, and the type of injury²⁴. Advances on the comprehension of mechanisms implicated in wound healing have led to numerous studies on new therapies, products, and modalities of treatment. However, the variety of molecular and cellular targets implicated in wound healing indicates the necessity of constant changes in our approaches on wound management^{24,4}. In this study, a full-thickness wound of 1.5 x 1.5 cm was excised from the back of the rats and covered with silver nanocrystalline dressing or 2% papain gel, in order to compare the effects of both dressings, whereas the control groups were treated with saline and gel excipient, respectively. Data obtained by us point out a very satisfactory profile for nanocrystalline silver dressing, which is probably allied to the ability of stimulating angiogenesis. On the other hand, the evaluation of 2% papain gel revealed some disadvantages for this dressing, especially when considering the late phases of wound cicatrization. Previous studies have suggested that nanocrystalline silver and 2% papain gel might present pro-healing effects, but the molecular and cellular mechanisms of action of these two products have not been fully explored²⁵. Thus, our study brings new evidence on the effects of both dressings, by further investigating their effects in a rat model of non-infected wounds.

In our paper, the macroscopic analysis showed a significantly higher wound healing ratio for the nanocrystalline silver group, when compared to the saline-treated group. In fact, some authors have reported beneficial pro-healing properties for silver-based products. Nevertheless, most of the literature reports lack of data on the mechanisms of action of nanocrystalline silver, being fairly descriptive²⁶. Of note, silver nanoparticles seem to exert their effects by decreasing inflammation, especially by modulating the secretion of

cytokines²⁷. In addition, nanocrystalline silver-treated wounds showed reduced number of inflammatory cells in the extracellular matrix, reduced cellularity and quicker re-epithelization in burning-induced wounds²⁸. Therefore, the present results extend and confirm previous evidence revealing that nanocrystalline silver-treated wounds showed increased contraction at the onset of evaluation, as early as 6 days after surgery, being the sole experimental group presenting complete wound healing at 15 days. Nanocrystalline silver employs nanotechnology to release extremely small and highly reactive silver particles, which are able to cover a great area of the wound. Particularly, nanocrystalline silver liberates Ag₀ clusters and Ag⁺, while other silver sources release only Ag⁺. This feature appears to alter the biological properties of the product, including both antimicrobial and anti-inflammatory activities²⁹. Wrigth et al (2002)³⁰ examined early healing events in full-thickness wounds on the back of the pigs. They have found that nanocrystalline silver promoted rapid wound healing at the first few days post-injury, in agreement with our results. Furthermore, a superior cosmetic appearance was observed in animals treated with silver nanoparticles. Moreover, histological analysis carried out by us also confirmed macroscopic data, indicating that nanocrystalline silver-treated lesions displayed a time-related improvement resulting in nearly normal skin at 15 days.

Regarding the 2% papain gel group, a significantly higher wound healing rate was observed at 3th and 6th, but this group showed visible bleeding and detachment of the wound bed. A study conducted with papain in a burning model in rats demonstrated high counts of fibroblasts during the early events of wound healing, which was followed by a significant decrease of fibroblasts on day 14³¹. This might explain the reason for what the wound healing was better on the 3th and 6th days. Coordinated inflammatory responses require a subtle balance of pro-inflammatory cytokines and chemokines and their antagonists, to result in a

satisfactory outcome²⁴. The histological analysis performed by us showed extensive inflammatory areas, with incomplete epithelization in the 2% papain group, at the 15th day of treatment. Papain is a cysteine proteinase from papaya and it is able to digest necrotic tissue, depending on the used concentration^{12,13}. The use of 0.1 % papain in rat models of burning showed significantly enhanced healing rates when compared to the respective control, but the peak for this response (\cong 80%) was reached only at the 34th day of treatment¹⁵. In our study, the control groups, treated with saline or gel excipient, showed a better wound healing outcome in a shorter time of evaluation. The differences between our results and literature data can be attributed to the different experimental models and the concentration of papain used. Nonetheless, it is time to reconsider the extensive use of papain formulations in clinics by several countries, and the urgent need for additional research on this matter.

To gain further evidence on the mechanisms of action of either nanocrystalline silver or 2% papain gel dressings, we have also assessed the expression of VEGF by immunohistochemistry. Neoangiogenesis is a key process in wound healing, which is mainly coordinated by VEGF-producing cells, such as macrophages³². In our study, the nanocrystalline silver group showed an elevated expression of VEGF since the 3th day of evaluation, with a higher expression at the 9th day, being markedly reduced at 12 and 15 days. In contrast, all the other groups showed a constant expression during all the periods of evaluation, as indicated by immunohistochemical procedures. These pieces of evidence are in complete accord with both macroscopic and histological analysis, and reinforce the notion that nanocrystalline silver is able to modulate mediators involved in wound healing, such as VEGF²⁷. In fact, VEGF has been shown to promote healing, as much higher levels of VEGF are detected at the wound edge at former time-points, probably accounting for wound surface covering. Once VEGF is highly specific for endothelial cells, it likely acts in a paracrine

manner on the sprouting capillaries of the wound edge and granulation tissue. The higher levels of VEGF at the early stages of wound healing stimulate the production of TGF- β , which results in VEGF gene expression by keratinocytes^{27,33}.

Altogether, our data suggests a overall decrease in healing time in wounds treated with nanocrystalline silver, supporting either clinical trials, or *in vitro* and *in vivo* findings on burn wound models²⁸. Furthermore, we provide novel evidence on the ability of nanocrystalline silver in modulating VEGF expression, in a time-related manner, ultimately favoring the cicatrization process. In fact, publications appear to be unanimous in their findings correlating inflammation modulation and nanocrystalline silver, showing its ability to decrease inflammatory mediators and dermal inflammatory cell apoptosis²⁹. Conversely, the profile of 2% papain gel was rather unsatisfactory, as observed by macroscopic and histological evaluation, and somewhat supported by immunohistochemical analysis of VEGF expression. This leads us to think that the use of 2% papain gel for wound treatment should be rethought, taking into consideration the last warnings of FDA¹⁸. In many countries, such as in Brazil, nurses and other health professionals widely employ papain-containing formulations for the treatment of several types of dermal wounds, especially due to economic reasons^{34,16}. However, evidence obtained by us and others clearly indicate that additional studies are quite necessary to control the conditions in which wound dressings are being used in clinics. Even though nanocrystalline silver dressing displayed a suitable profile in our experimental paradigm, additional toxicological analysis on this product, especially long-term evaluation, is still required.

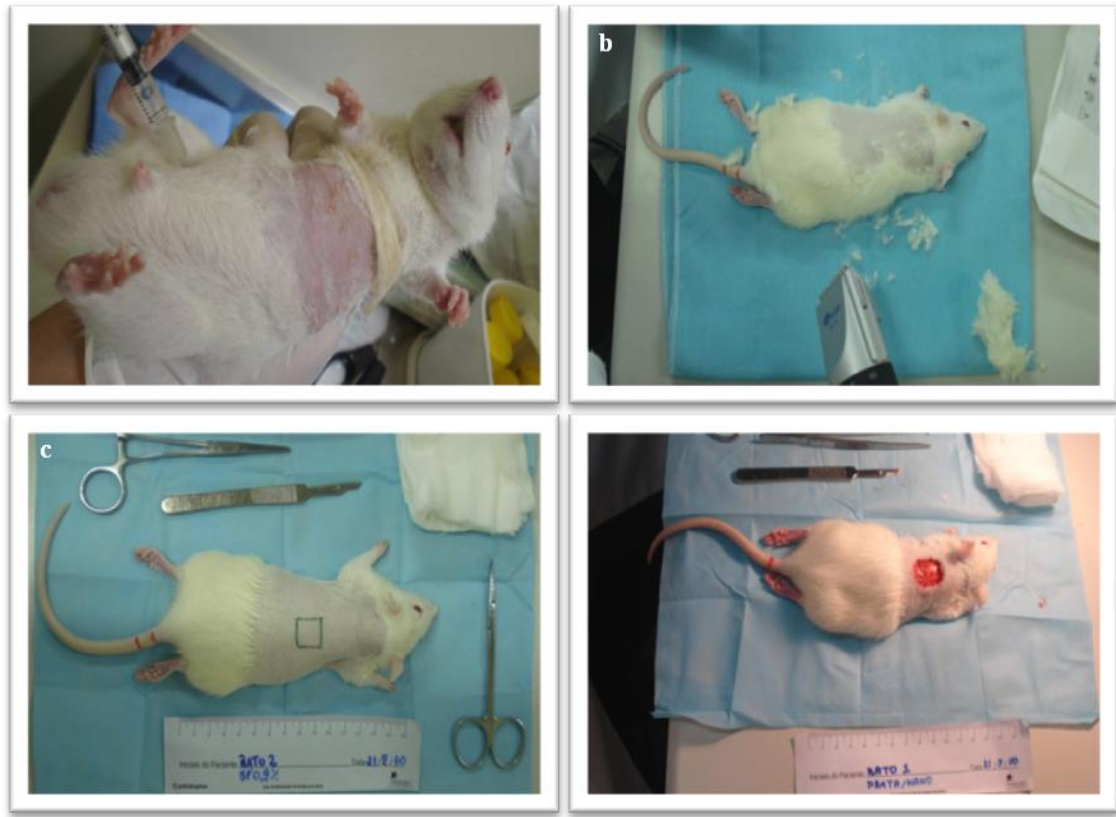
LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1. Representative images showing the general experimental procedures. (A) anesthesia; (B) back shaving; (C) demarcation of the area to be excised; (D) full-thickness wound.

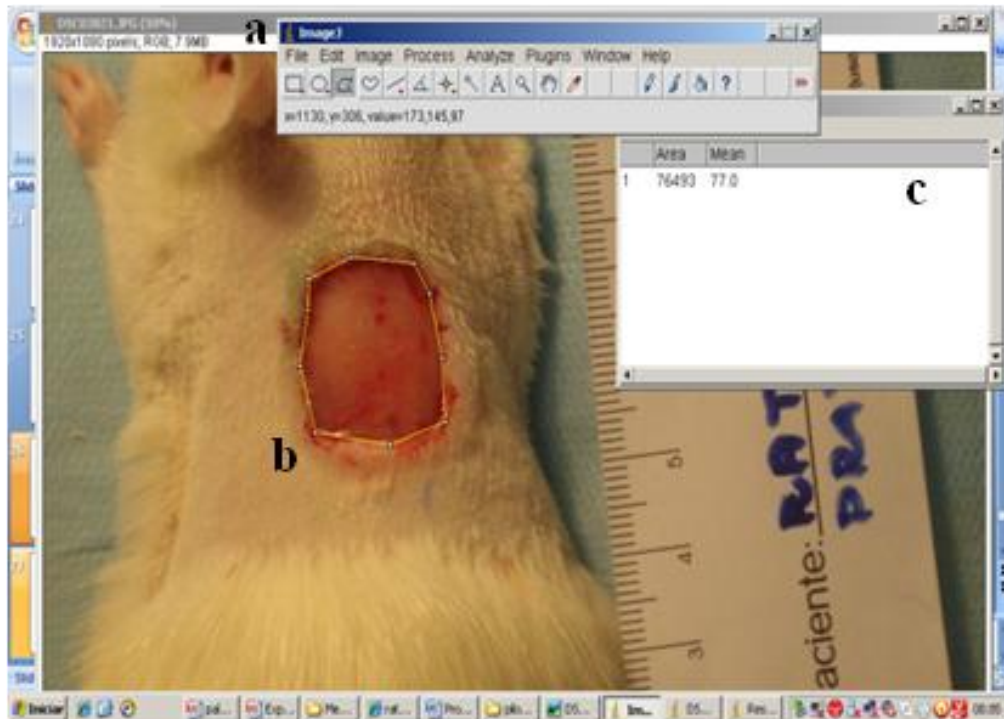


Fig. 2. Wound area analysis with the software Image J. (A) Toolbar to calibrate the software; (B) demarcation of wounds for calculating wound areas, using a slim table and a special pen; (C) software window showing the calculated area.

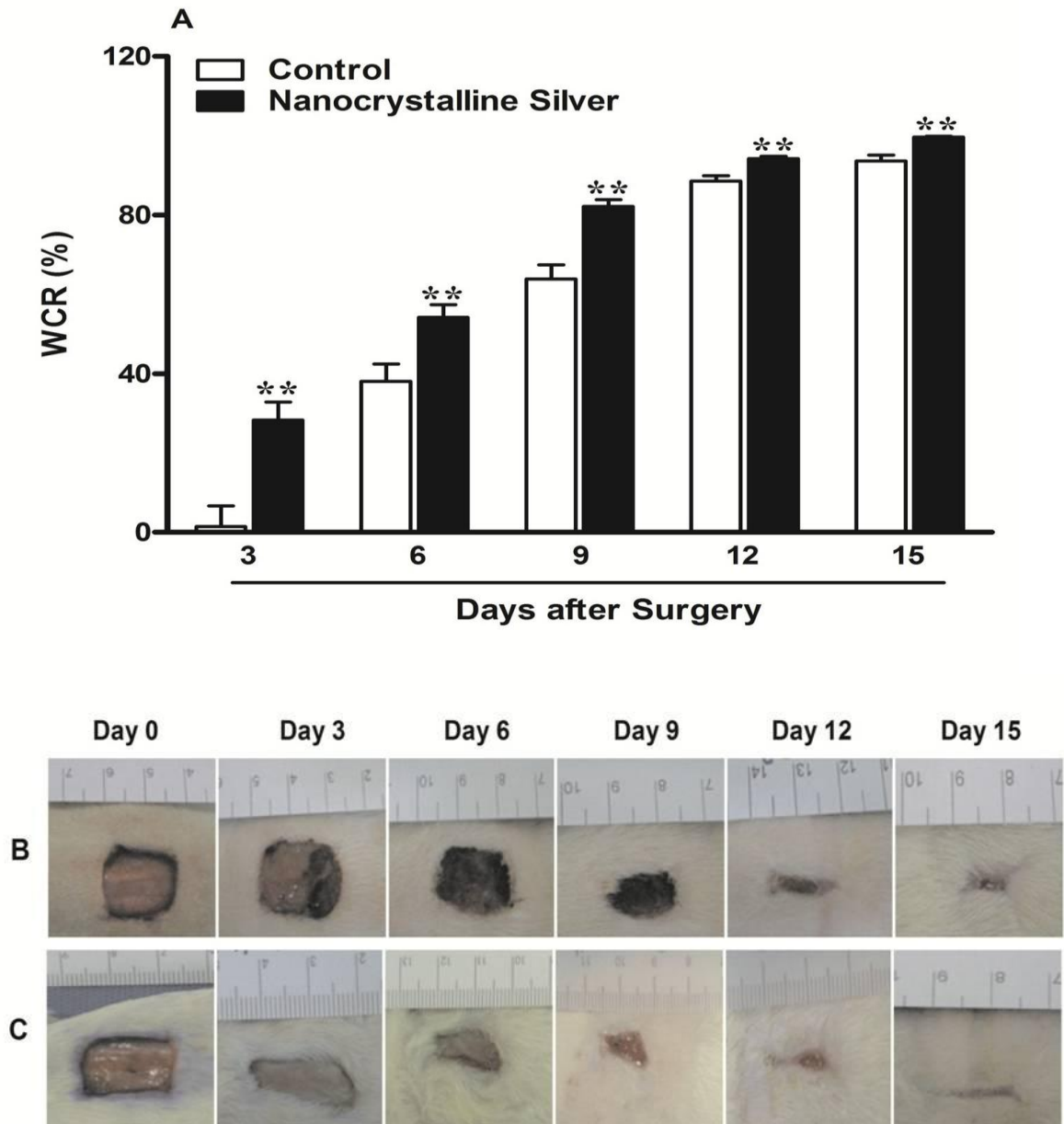


Fig. 3. (A) Rates of wound healing in the Groups 1 (saline) and 2 (nanocrystalline silver dressing) at 3, 6, 9, 12, and 15 days after surgery. (B) Macroscopic appearance of wounds treated with saline (Group 1). (C) Macroscopic appearance of wounds treated with nanocrystalline silver (Group 2). ** $p < 0.01$.

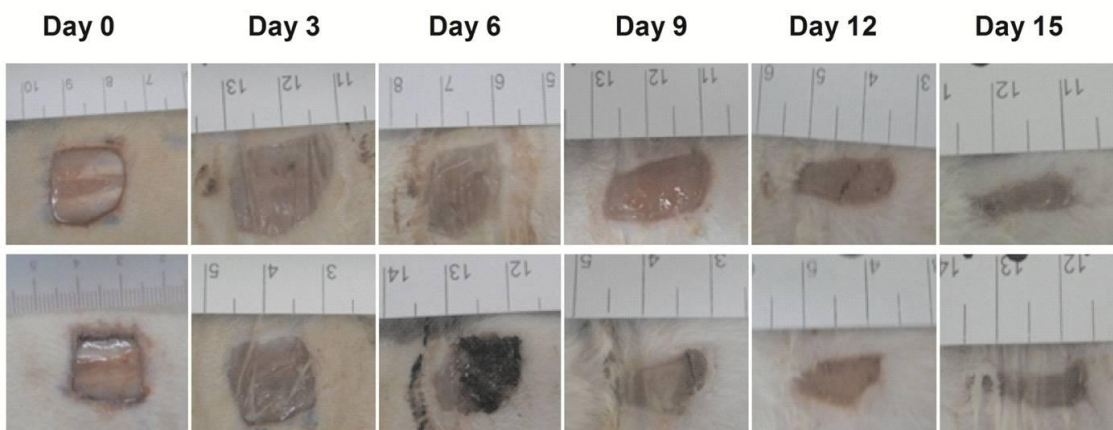
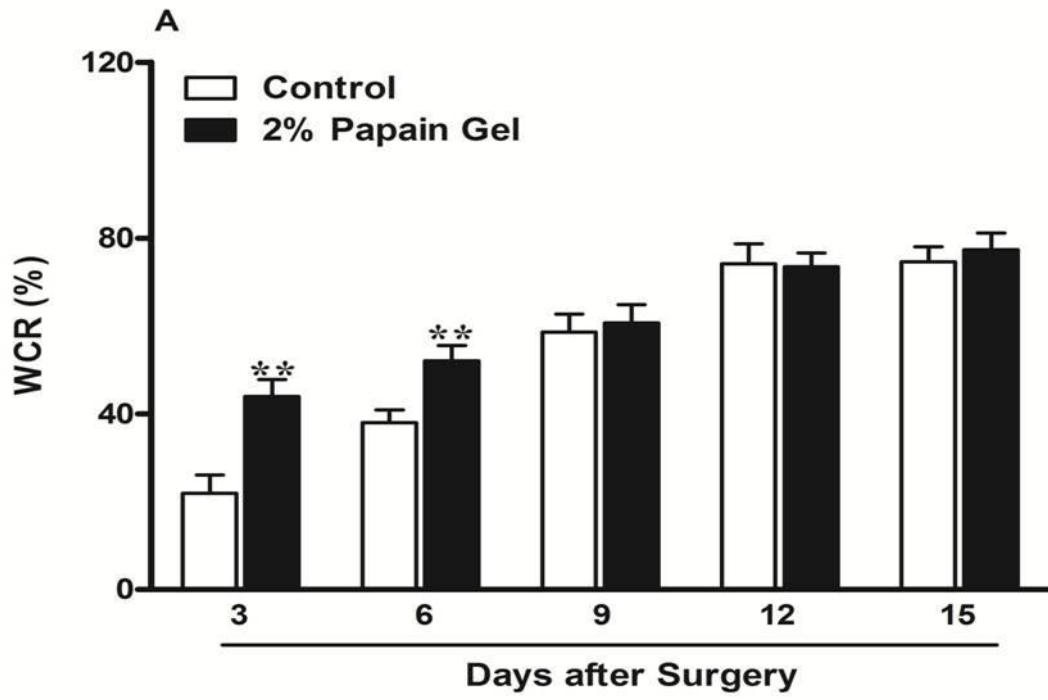


Fig. 4. (A)
 Rates of wound healing in the Groups 3 (plain

gel) and 4 (2% papain gel) at 3, 6, 9, 12, and 15 days after surgery. (B) Macroscopic appearance of wounds treated with excipient gel (Group 3). (C) Macroscopic appearance of wounds treated with 2% papain gel (Group 4). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

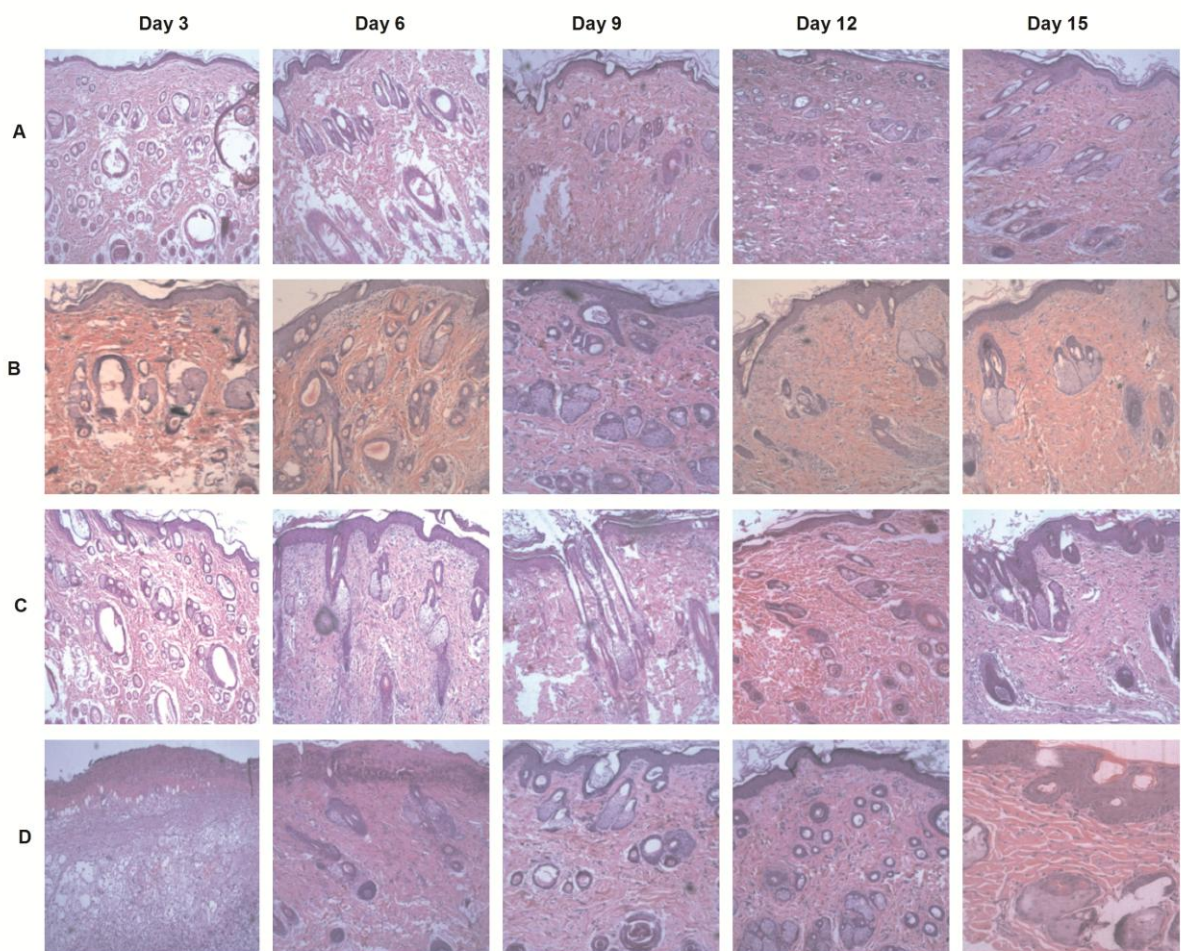


Fig. 5. Representative histology of wound healing in rats: H&E staining between 3 and 15 days after surgery (40x). A) Saline group; B) Nanocrystalline silver group; C) gel excipient group; D) 2% papain gel group.

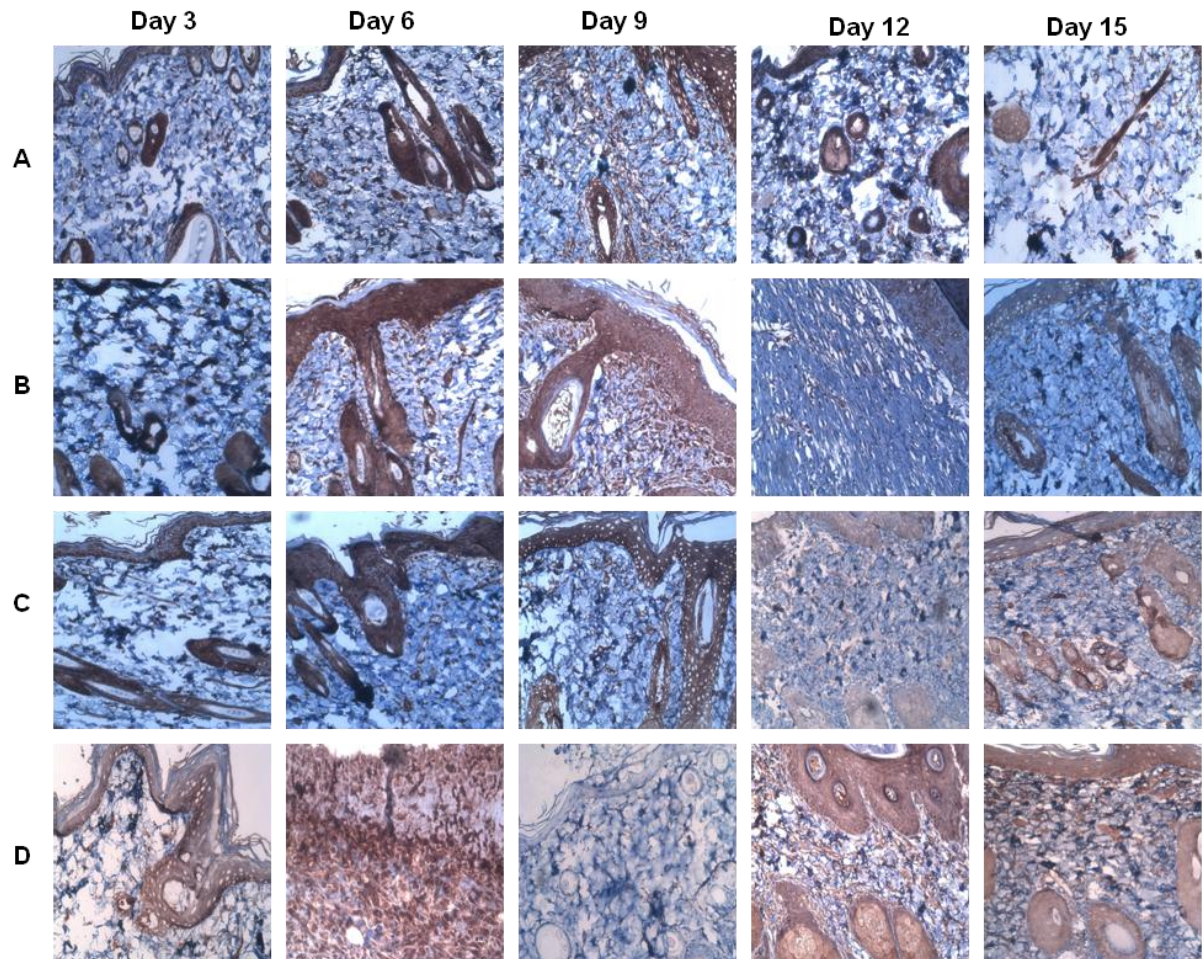


Fig. 6. Representative immunostaining for VEGF throughout wound healing in rats: immunohistochemistry staining between 3 and 15 days after surgery (100x). A) Saline group; B) Nanocrystalline silver group; C) gel excipient group; D) 2% papain gel group.

Table 1. Comparison of healing rates among the different experimental groups

Groups	Day 3	Day 6	Day 9	Day 12	Day 15
Saline	2±0.3%	38±4%	63±3%	88±1.3%	94±1.4%
NCS	28±4%	54±3%	82±2%	94±0.5%	100±1%
<i>P</i>	0.0007**	0.0079**	0.0002**	0.0027**	0.0009**
Gel	22±4%	38± 3%	58±4%	75±4%	74±3%
2% Papain	44±4%	52± 3%	61±4%	73±3%	77±4%
<i>P</i>	0.0007**	0.0054**	0.734	0.9	0.601
NCS	28±4%	54±3%	82±2%	94±0.5%	100±0.1%
2% Papain	44±4%	52±3%	61±4%	73±3%	77±4%
<i>p</i>	0.01	0.66	0.0003**	< 0.0001**	< 0.0001**

REFERENCES

1. Iftikhar F, et al. Effects of acacia honey on wound healing in various rat models. *Phytother Res.* 2010;24(4):583-6.
2. Dai M, et al. Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. *J Biomed Biotechnol.*, 2009:595126.
3. Liu X, et al. C-Ski promotes skin fibroblast proliferation but decreases type I collagen: implications for wound healing and scar formation. *Clin Exp Dermatol.* 2010;35(4):417-24.
4. Janis JE, Kwon RK, Lalonde DH. A practical guide to wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):230e-44e.
5. Gál P, et al. Open Wound Healing In Vivo: Monitoring Binding and Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins in Rat Skin during the Course of Complete Re-Epithelialization. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44(5):191-9.
6. Gravante G, Montone A. A retrospective analysis of ambulatory burn patients: focus on wound dressings and healing times. *Ann R Coll Surg Engl.* 2010;92(2):118-23.
7. Shen X, et al. Development of salmon milt DNA/salmon collagen composite for wound dressing. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(12):3473-9.
8. Sung JH, et al. Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan. *Int J Pharm.* 2010, 15;392(1-2):232-40.
9. Fong J, Wood F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(4):441-9.

10. Nadworny PL, et al. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis. *J Inflamm.* 2010;19;7:13.
11. Moiemens NS, et al. Acticoat dressings and major burns: systemic silver absorption. *Burns.* 2011;37(1):27-35.
12. Ferreira AM, et al. In vitro antibacterial activity of gels with different papain concentrations. *Rev. Eletr. Enf.* 2008;10(4):1035-40.
13. Telgenhoff D, et al. Influence of papain urea copper chlorophyllin on wound matrix remodeling. *Wound Repair Regen.* 2007;15(5):727-35.
14. Payne WG, et al. Enzymatic debriding agents are safe in wounds with high bacterial bioburdens and stimulate healing. *Eplasty.* 2008;7;8:e17.
15. Gomes FS, et al. Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on experimentally induced burn. *Burns.* 2010;36(2):277-83.
16. Pieper B, Caliri MH. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2003; 30(4):175-83.
17. Shi L et al. Study on the debridement efficacy of formulated enzymatic wound debriding agents by in vitro assessment using artificial wound eschar and by an in vivo pig model. *Wound Repair Regen.* 2009;17(6):853-62.
18. Food and Drug Administration. Questions and answers about FDA's enforcement action regarding unapproved topical drug products containing papain. <http://www.fda.gov/cder/news/papain/qa.htm>. 2008.
19. Vlachou E, Chipp E, Shale E, Wilson YT, Papini R, Moiemens NS. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption burns. 2007;33(8):979-85.

20. Acar A, et al. Comparison of silver-coated dressing (Acticoat®), chlorhexidine acetate 0.5% (Bactigrass®) and nystatin for topical antifungal effect in *Candida albicans*-contaminated, full-skin-thickness rat burn wounds. *Burns*. 2011 37(5):882-5.
21. Ribeiro MP, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen*. 2009;17(6):817-24.
22. Baoyong L, et al. Evaluation of a new type of wound dressing made from recombinant spider silk protein using rat models. *Burns*. 2010;36(6):891-6.
23. Sant'Ana EM, et al. Rat skin wound healing induced by alternagin-C, adisintegrin-like, Cys-rich protein from *Bothrops alternatus* venom. *Int Wound J*. 2011;8(3):245-52.
24. Schreml S, et al. Wound healing in the 21st century. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 63(5):866-81.
25. Nadworny PL, et al. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine*. 2008;4(3):241-51.
26. Jain J, et al. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm*. 2009;6(5):1388-401.
27. Tian J, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*. 2007 Jan;2(1):129-36.
28. Khundkar R, Malic C, Burge T. Use of Acticoat dressings in burns: what is the evidence? *Burns*. 2010; 36(6):751-8.
29. Widgerow AD. Nanocrystalline silver, gelatinases and the clinical implications. *Burns*. 2010;36(7):965-74.
30. Wright JB et al. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen*. 2002;10(3):141-51.

31. Sanches N R et al. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cir.* 1993; 8:18-23.
32. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2011, 11;13:e23.
33. Kim CH, et al. Mesenchymal stem cells improve wound healing in vivo via early activation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor. *J Korean Med Sci.* 2011; 26(6):726-33.
34. Ferreira A M, et al. Literature Review on Nursing Clinical Studies: The Use Of Papain For the Treatment of Wounds. *R. Enferm. UERJ.* 2005;13:382-9.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Lesões de pele ou feridas são resultado do rompimento da integridade da pele. O processo de cicatrização depende de vários fatores, locais e sistêmicos, mediadores bioquímicos, doenças prévias, como o diabetes e, etiologia da lesão⁷. Os avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de cicatrização levaram à realização de diversos estudos sobre novas terapias, produtos e modalidades de tratamento. No entanto, a variedade de alvos moleculares implica na necessidade de constantes mudanças no manejo de feridas^{2,7}. Os dados obtidos no presente estudo mostraram que os curativos com prata nanocristalina obtiveram resultados estatisticamente significativos, quando comparados aos outros grupos, no que diz respeito à taxa de contração da ferida, aliado à estimulação da angiogênese. Por outro lado, o uso da papaína 2% gel mostrou algumas desvantagens, especialmente por atrasar as fases da cicatrização. Estudos prévios sugerem que a prata nanocristalina e a papaína 2% apresentam efeitos positivos sobre a cicatrização, mas os mecanismos celulares e moleculares dos dois produtos, ainda não são conhecidos^{1;22}.

Nosso estudo demonstrou, por meio de análise macroscópica, uma maior taxa de cicatrização no grupo tratado com prata nanocristalina, quando comparado ao grupo tratado com solução salina. Alguns autores reportam os efeitos pró-cicatrização da prata nanocristalina. No entanto, a literatura apresenta uma lacuna de dados sobre os mecanismos da prata nanocristalina¹². Porém, são relatados os efeitos da prata nanocristalina sobre o processo de inflamação, especialmente na modulação da expressão de citocinas²³. Além disso, as feridas tratadas com curativos impregnados com nanocristais de prata mostraram redução no número de células inflamatórias na matriz extracelular e rápida re-epitelização, principalmente em queimaduras²⁴. Além disso, os resultados aqui apresentados confirmam as evidências prévias revelando que a taxa de contração da ferida no grupo com prata

nanocristalina foi maior desde o sexto dia após a cirurgia, sendo que somente esse grupo apresentou cicatrização completa no 15º dia de tratamento. Os curativos com prata nanocristalina liberam nanopartículas de prata, que são extremamente pequenas e altamente reativas, quando em contato com a ferida. Esse fato parece estar relacionado com suas propriedades biológicas, incluindo a ação antimicrobiana, bastante estudada e, anti-inflamatória, ainda não totalmente caracterizada²⁵. Em um estudo utilizando modelos suínos, Wrigth et al (2002)²⁶ observou que a prata nanocristalina promove uma rápida cicatrização desde os primeiros dias após a realização da lesão, em concordância com nossos resultados. Além disso, a análise histológica confirmou os dados macroscópicos, indicando que o grupo tratado com prata nanocristalina apresentou re-epitelização completa em 15 dias.

O grupo tratado com papaína 2% apresentou uma melhor cicatrização no 3º e 6º dia; porém, houve sangramento e descolamento das margens da lesão durante o tratamento. Um estudo conduzido com papaína em modelo de queimadura em ratos demonstrou uma alta contagem de fibroblastos nos primeiros dias de cicatrização, com uma redução significativa a partir do 15º dia²⁷. Esse fato pode explicar, porque, em nosso estudo, houve uma melhor cicatrização nos primeiros dias de tratamento com a papaína. Ademais, a análise histológica mostrou um extensivo infiltrado inflamatório, com epitelização incompleta no grupo tratado com papaína 2%, no 15º dia de tratamento. Assim, deve-se reavaliar o uso extensivo da papaína em suas diversas formulações, sendo necessárias novas pesquisas que embasem seu uso.

A fim de elucidar os mecanismos de ação da prata nanocristalina e da papaína, foi avaliada a expressão de VEGF por imuno-histoquímica. Nossos resultados demonstraram que o grupo tratado com prata nanocristalina apresentou uma elevada expressão de VEGF no 3º dia de tratamento, com seu pico de expressão no 9º dia, apresentando uma marcada redução

no 12º e 15º dia. Ao contrário, os outros grupos apresentaram uma expressão não-variável de VEGF, durante todo o período de avaliação. Esses dados corroboram a avaliação macroscópica e a análise histológica e reforçam a idéia que a prata nanocristalina é capaz de atuar na modulação de mediadores envolvidos no processo de cicatrização²³.

Em conjunto, nossos dados sugerem uma redução no tempo de cicatrização nas feridas tratadas com prata nanocristalina, em concordância com outros estudos prévios da literatura²⁴. Além disso, apresentamos novos achados mostrando que a prata nanocristalina modula a expressão de VEGF, favorecendo o processo de cicatrização. A papaína 2% em gel apresentou um resultado relativamente insatisfatório, tanto na avaliação macroscópica, quanto na avaliação histológica, bem como, na avaliação imuno-histoquímica para expressão de VEGF. Nesse caso, cabe ressaltar as restrições do FDA (Food and Drugs Administration) sobre o uso da papaína em feridas e repensar a continuidade do seu uso²⁸. De qualquer forma, esse trabalho reforça a ideia que mesmo produtos tópicos devem ser extensivamente testados quanto à sua eficácia e efeitos indesejados, especialmente em longo prazo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira AL, Bachion MM. Wound treatment: scientific production analysis published in the Revista Brasileira de Enfermagem from 1970-2003]. Rev Bras Enferm. 2005;58(2):208-13.
2. Janis JE, Kwon RK, Lalonde DH. A practical guide to wound healing. Plast Reconstr Surg. 2010;125(6):230e-44e.
3. Mendonça JC, Coutinho Neto J. Aspectos Celulares da Cicatrização. Anais Brasileiros de Dermatologia. 2009;84(3):257– 62.
4. Sibbald RG, Woo K, Ayello EA. Increased bacterial burden and infection: the story of Nerds and Stones. Adv Skin Wound Care. 2006;19(8):447-61.
5. Walker M, Bowler PG, Cochrane CA. In vitro studies to show sequestration of matrix metalloproteinases by silver-containing wound care products. Ostomy Wound Manage. 2007;53(10):32.
6. Pieper B, Caliri MH. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. J Wound Ostomy Continence Nurs. 2003;30(4):175-83.
7. Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. J Am Acad Dermatol. 2010;63(5):866-81.
8. Broughton, G II et al. The basic science of wound healing. Plast Reconstr Surg. 2006;117(7):12S-34S.
9. Dai M, et al. Chitosan-alginate sponge: preparation and application in curcumin delivery for dermal wound healing in rat. J Biomed Biotechnol. 2009;2009:595126.

10. Schultz GS, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen.* 2003;11(1):S1-S28.
11. Panuncialman J, Falanga V. The science of wound bed preparation. *Surg Clin North Am.* 2009;89(3):611-26.
12. Jain J, Arora S, Rajwade JM, Omray P, Khandelwal S, Paknikar KM. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol Pharm.* 2009;6(5):1388-401.
13. Fong J, Wood F. Nanocrystalline silver dressings in wound management: a review. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(4):441-449.
14. Gravante G, Caruso R, Sorge R, Nicoli F, Gentile P, Cervelli V. Nanocrystalline silver: a systematic review of randomized trials conducted on burned patients and an evidence-based assessment of potential advantages over older silver formulations. *Ann Plast Surg.* 2009;63(2):201-5.
15. Wang XQ, Kravchuk O, Kimble RM. A retrospective review of burn dressings on a porcine burn model. *Burns.* 2010;36(5):680-7.
16. Vlachou E, Chipp E, Shale E, Wilson YT, Papini R, Moiemmen NS. The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns.* 2007;33(8):979-85.
17. Nadworny PL, Wang J, Tredget EE, Burrell RE. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver-derived solutions in porcine contact dermatitis. *J Inflamm (Lond).* 2010;19(7):13.
18. Telgenhoff D, et al. Influence of papain urea copper chlorophyllin on wound matrix remodeling. *Wound Repair Regen.* 2007;15(5):727-35.
19. Obregón, WD. et al. Characterization of papain-like isoenzymes from latex of *Asclepias curassavica* by molecular biology validated by proteomic approach. *Biochimie.* 2009;91(11-12):1457-64.

20. Ferreira A M et al. Literature Review on Nursing Clinical Studies: The Use Of Papain For the Treatment of Wounds. R. Enferm. UERJ. 2005;13:382-9.
21. Capucho, HC. Desenvolvimento de formulações contendo papaína para o tratamento de feridas. Ribeirão Preto, 2007. 102f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
22. Nadworny PL, et al. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. Nanomedicine. 2008;4(3):241-51.
23. Tian J, et al. Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. ChemMedChem. 2007 Jan;2(1):129-36.
24. Khundkar R, Malic C, Burge T. Use of Acticoat dressings in burns: what is the evidence? Burns. 2010;36(6):751-8.
25. Widgerow AD. Nanocrystalline silver, gelatinases and the clinical implications. Burns. 2010;36(7):965-74.
26. Wright JB et al. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. Wound Repair Regen. 2002;10(3):141-51.
27. Sanches N R et al. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. Acta Cir. 1993; 8: 18-23.
28. Food and Drug Administration. Questions and answer about FDA's enforcement action regarding unapproved topical drug products containing papain. <http://www.fda.gov/cder/news/papain/qa.htm>.2008.

