

WESLEY SANTOS DORNELLAS

**COLÁGENO DE PEIXE NA REPARAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
COELHOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2023

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D713c

Dornellas, Wesley Santos, 1992-

Colágeno de peixe na reparação de feridas cutâneas em 2023
coelhos / Wesley Santos Dornellas. – Viçosa, MG, 2023.
1 dissertação eletrônica (46 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.008>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Medicina regenerativa. 2. Peixe - Histologia. 3. Materiais biomédicos. 4. Regeneração tecidual guiada. 5. Ferimentos e lesões - Tratamento. 6. Colágeno. 7. Cicatrização de ferimentos. I. Borges, Andréa Pacheco Batista, 1961-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.08971

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

WESLEY SANTOS DORNELLAS

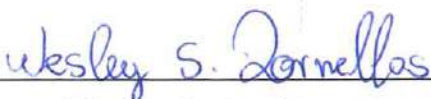
**COLÁGENO DE PEIXE NA REPARAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM
COELHOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges

APROVADO: 23/10/2023

Assentimento:



Wesley Santos Dornellas

Autor



Documento assinado digitalmente

ANDREA PACHECO BATISTA BORGES

Data: 15/01/2024 14:16:52-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Andréa Pacheco Batista Borges

Orientadora

DEDICATÓRIA

À minha família, meus maiores incentivadores e exemplos de vida.

Devo tudo o que sou a vocês.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço aos meus pais, Tereza Cristina Santos Dornellas e Willian de Oliveira Dornellas por serem meus maiores incentivadores, por me darem todo o apoio, carinho e compreensão, não só durante esta fase, mas em toda a minha vida.

Às minhas irmãs, Jaqueline Santos Dornellas Moraes e Jéssica Santos Dornellas, pela força, apoio e cumplicidade em todos os momentos.

Aos meus familiares e amigos, que sempre me apoiaram e me incentivaram e que compreenderam minha ausência durante este período.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária do Departamento de Veterinária (DVT/UFV), pela oportunidade de cursar o mestrado.

À CAPES por ter concedido a bolsa de pesquisa durante o período do mestrado.

À professora e orientadora Andréa Pacheco Batista Borges, exemplo de profissional, por todo o apoio, compreensão, paciência, orientação, ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos do laboratório de Histopatológica da UFV, Adão e Cláudio, muito obrigado pelo acolhimento, apoio e ensinamentos durante este período.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação, em especial à Rosi que sempre se mostrou disponível para ajudar e tirar as minhas dúvidas.

Aos professores Carlos Eduardo do DVT-UFV pela atenção e ensinamentos compartilhados.

Aos (Andréa Pacheco Batista Borges, Carlos Eduardo Real Pereira e Tatiana Schmitz Duarte), por aceitarem o convite para participar da minha banca de mestrado e contribuir com seus conhecimentos na pesquisa.

Aos funcionários e técnicos do Hospital Veterinário e do DVT-UFV pela atenção e disponibilidade.

À todos os animais que, em vida ou após a morte, contribuíram com meu aprendizado.

RESUMO

DORNELLAS, Wesley Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2023. **Colágeno de peixe na regeneração de feridas cutâneas**. Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges.

A reparação de feridas cutâneas, principalmente aquelas com significativas perdas teciduais, ainda é um desafio na medicina. Assim, objetivou-se com este projeto testar e avaliar um biomaterial formulado com colágeno obtido de peixe, buscando a comprovação da eficácia desse produto no processo de regeneração de feridas de forma eficaz e mais rápida, utilizando o coelho (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo experimental. Foi utilizado biomaterial preparado com colágeno de pirarucu, fabricado na JHS Laboratório Químico, sob a forma de malha porosa com 2 cm x 2cm x 0,5 cm de dimensão. Para tal, foi conduzido um ensaio clínico com utilização de 60 coelhos da raça Nova Zelândia, com idade entre 6 e 7 meses, aleatoriamente distribuídos em dois grupos (controle e tratado) com 30 indivíduos cada. Foi induzida uma lesão cutânea de aproximadamente 2 cm x 2 cm, na região do dorso dos animais. Nos animais pertencentes ao grupo tratado foram implantadas 2 malhas do biomaterial cobrindo toda a área lesionada. Enquanto o grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento. Foram realizadas análises clínicas de todos os animais nos 7 primeiros dias pós cirurgia. No sétimo dia foi realizado eutanásia de 10 animais do grupo tratado e 10 do controle, para coleta de material e realização do estudo histopatológico e histomorfométrico. O mesmo fato se repetiu aos 30 e 60 dias. Foi utilizado o Statistical Analysis System para análise estatística, com nível de significância adotado de $\alpha = 0,05$. Os resultados histológicos revelaram ausência de regeneração da ferida aos 7 dias de tratamento; 65% de regeneração aos 30 dias e 100% de regeneração aos 60 dias. Já o estudo morfométrico revelou uma maior espessura da epiderme e da queratina do grupo tratado em relação ao controle e a pele sadia. Conclui-se que o biomaterial não acelerou o processo de reparação tecidual, não causou infecção e não sofreu rejeição.

Palavras-chave: Medicina regenerativa. Biomaterial. Compósito. Cicatrização.

ABSTRACT

DORNELLAS, Wesley Santos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2023.
Fish collagen in skin wound regeneration. Adviser: Andrea Pacheco Batista Borges.

The wound repair still a challenge in medicine, especially when those have a significant tissue loss. So, the objective of this project was testing a biomaterial made with fish collagen, to prove the effectiveness of the product in the wound healing in an efficient and faster way, using the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as an experimental model. The biomaterial was prepared with pirarucu collagen, manufactured by JHS Chemical Laboratory, as a porous mesh with 2 cm x 2cm x 0,5 cm of dimensions. So, a clinical trial was conducted using 60 New Zealand rabbits, aged between 6 and 7 months, randomly distributed into two groups (control and treated) with 30 individuals each. A skin wound with approximately 2 cm x 2 cm was induced in dorsal region of the animals. In the treated group was implanted 2 biomaterials mesh covering the entire lesion. In the control group have not received any treatment. The clinical analyses happened in all animals at the first 7 days after the surgery. On the seventh day 10 animals from control group and 10 from tread group have been euthanized, to collect material and realize the histopathological and histomorphological study. The Statistical Analysis System was used for statistical analysis, with the adopted significance level being $\alpha = 0.05$. Histological results revealed no wound regeneration after 7 days of treatment, 65% regeneration after 30 days and 100% regeneration after 60 days. The morphometric study revealed a greater thickness of the epidermis and keratin in the treated group compared to the control and healthy skin. It is concluded that the biomaterial was not able to accelerate the process of wound repair, did not produce infection and was not rejected.

Keywords: Regenerative medicine. Biomaterial. Composite. Healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Biomaterial de colágeno de peixe	25
FIGURA 2	Campo cirúrgico dos grupos controle e tratado	27
FIGURA 3	Biomaterial implantado	31
FIGURA 4	Evolução da lesão	32
FIGURA 5	Observações microscópicas para ambos os grupos nos três momentos (7, 30 e 60 dias)	34

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores de Epiderme e Queratina nos tecidos regenerado e normal, nos grupos Controle e Tratado, nos dias 30 e 60 (média \pm erro-padrão)..	35
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRMV-MG	MG Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais
Cm	Centímetros
DVT	Departamento de Medicina Veterinária
D0	Dia 0
D7	Dia 7
D30	Dia 30
D60	Dia 60
DZO	Departamento de Zootecnia
HAP	Hidroxiapatita
Kg	Quilograma
mg/Kg	Miligrama por quilo
Mm	Milímetro
µm	Micrômetros
PRN	Tampas puncionáveis
UFV	Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE SÍMBOLOS

μ .	Micro
%.	Porcentagem
β .	Beta
α .	Alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO GERAL	14
2.1	Objetivos específicos	14
3.	HIPÓTESE	15
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4.1	Cicatrização	16
4.1.1	Fase inflamatória	16
4.1.2	Fase de desbridamento	17
4.1.3	Fase de proliferação ou reparação	17
4.1.4	Fase de maturação ou remodelação	18
4.2	Considerações sobre dificuldade na cicatrização da ferida	18
4.3	Biomaterial	19
4.3.1	Colágeno de peixe	21
5.	MATERIAL E MÉTODOS	23
5.1	Aspectos éticos	23
5.2	Delineamento experimental	23
5.2.1	Biomaterial	23
5.2.2	Animais	24
5.2.3	Grupos experimentais	25
5.2.4	Protocolo anestésico	25
5.2.5	Intervenção cirúrgica	26
5.2.6	Período pós-operatório	27
5.3	Avaliação clínica e macroscópica das feridas	27
5.4	Avaliação histopatológica e histomorfométrica	28
5.4.1	Eutanásia	28
5.4.2	Análise histopatológica	28
5.4.3	Análise histomorfométrica	29
5.4.4	Análise dos dados	29
6.	RESULTADOS	31
6.1	Análise clínica e macroscópica da ferida	31
6.2	Análise histopatológica	33
6.3	Análise histomorfométrica	34
7.	DISCUSSÃO	36
8.	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

Frequentemente os animais são vítimas de diversos tipos e origens de lesões teciduais, tais como acidentes por queimaduras, atropelamentos e brigas, colocando a medicina veterinária como alvo de estudos voltados para a cicatrização e tratamento de feridas cutâneas (TILLMAN et al., 2015; COSTA et al., 2020). Sendo que o reparo tecidual para essas lesões irá depender do tamanho da injúria, bem como a resposta adequada do organismo para recuperá-la. Quando os limites biológicos de reparação são ultrapassados, alguns recursos podem ser utilizados para uma melhor recuperação, incluindo neste caso os biomateriais (SILVA et al., 2021).

Um ferimento é definido como sendo a interrupção da integridade anatômica, fisiológica e funcional dos tecidos do corpo (LEAL et al., 2018), podendo ser produzido, por fatores extrínsecos, como lesões acidentais e ferimentos cirúrgicos ou por fatores intrínsecos, que inclui úlceras crônicas, neoplasias, lesões por alterações vasculares, infecções e defeitos metabólicos (WENDT et al., 2005).

A partir do momento em que a ferida é instalada o organismo tende a promover um processo de cicatrização, visando reconstituir o tecido lesado. Todavia, esse processo pode ser influenciado por diversos fatores, incluindo fatores locais e sistêmicos. Logo uma avaliação global do paciente e não apenas da ferida, torna-se fundamental para a determinação do método de tratamento adequado (BUSANELLO et al., 2018).

O manejo de feridas é um campo que sofre modificações a todo momento dentro da Medicina Veterinária, principalmente com o advento de novas terapias celulares e desenvolvimento de novos curativos tópicos ocorrendo a todo instante. Com isso o que é utilizado hoje provavelmente se tornará obsoleto e menos eficaz do que a tecnologias que virão na sequência, fazendo necessário a constante atualização do profissional a fim de verificar e analisar o benefício para o cliente, com a utilização dessas novas tecnologias (VICENTE et al., 2019).

Atualmente o objetivo de inúmeras pesquisas desenvolvidas na área é a possibilidade de orientar o processo de cicatrização e o fechamento das lesões

cutâneas, utilizando para isso recursos químico-medicamentosos ou físicos (BEHEREGARAY et al., 2009).

Define-se biomaterial como sendo um composto oriundo da natureza ou sinteticamente produzido, que pode ser aplicado na biomedicina de forma a interagir com sistemas biológicos, aumentando ou substituindo tecidos, órgãos ou restaurando funções comprometidas por processos degenerativos ou traumáticos (GUTIERRES et al., 2005; ONG et al., 2014). Mediante essa aplicabilidade dos biomateriais, faz com o que os conhecimentos da ciência dos materiais, química, biologia, engenharia e medicina sejam cada vez mais aplicados para o desenvolvimento de novos produtos a fim de restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos vivos, alavancando ainda mais os estudos relacionados com a bioengenharia ou engenharia tecidual (DERKUS et al., 2015).

Dentre as diversas opções disponíveis atualmente, o colágeno de peixe ganha seu valor, visto que estudos têm demonstrado sua baixa imunogenicidade, baixa capacidade de causar doenças, quando utilizado em seres humanos se comparado ao colágeno oriundo de mamíferos (JIN et al., 2019).

Nesse contexto, propôs-se com o presente trabalho testar biomaterial formulado com colágeno derivado de peixe no processo de reparação de feridas em coelhos, com o objetivo de buscar uma alternativa eficaz para o tratamento de feridas, a fim de levar à uma regeneração do tecido lesionado de forma eficiente e orientada, e reduzir assim, o tempo necessário para o restabelecimento do paciente.

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a influência do biomaterial de colágeno derivado da pele de peixe, em feridas de pele de coelho criadas experimentalmente.

2.1 Objetivos específicos

Comparar o processo de reparação de feridas cutâneas entre o grupo experimental e o grupo controle, em 3 intervalos de tempo, bem como avaliar as diferenças observadas entre os tempos dentro de um mesmo grupo.

Avaliar se a utilização do biomaterial na forma de malha é um método eficaz e aplicável à medicina veterinária.

Avaliar de forma macroscópica, histológica e histomorfométrica o processo de reparação tecidual em ambos os grupos, nos três diferentes intervalos de tempo.

3. HIPÓTESE

A hipótese é que a utilização do biomaterial derivado do colágeno de peixe, tendo coelhos como modelo experimental, irá permitir uma regeneração da ferida em menor tempo em comparação ao grupo controle e, sem a ocorrência de infecções ou reação de rejeição ao implante testado.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Inflamação, desbridamento, proliferação e remodelação, compõem as principais fases do processo de reparação de feridas (GOSAIN; DIPIETRO, 2004; GUO; DIPIETRO, 2010). Uma vez estabelecido um dano tecidual, inicia-se um processo de inflamação aguda induzida pela própria lesão, seguido de uma fase de regeneração das células parenquimatosas, migração, proliferação e remodelação do tecido conjuntivo, seguido de síntese proteica, formação de colágeno, até por fim a aquisição de força tênsil (BOLGIANI et al., 2013). Entretanto, diversos fatores podem afetar cada uma dessas fases e desencadear reparações inadequadas, como um mal fluxo sanguíneo e infecções, causando um atraso na regeneração tecidual (LIMA et al., 2019).

Na medicina veterinária a reparação de feridas extensas ainda é um desafio, principalmente aquelas que iniciam com processo de reparação inadequada. Exemplo disso são as feridas traumáticas com grandes perdas teciduais ou com comprometimento sistêmico em pacientes de pequeno porte (FERREIRA et al., 2006).

Entende-se por cicatrização como um processo dinâmico e regulado por mecanismos humorais, celulares e moleculares, restaurando as estruturas originais, porém com deposição de colágeno e formação de uma cicatriz ao final do processo. Já a regeneração é caracterizada pela restituição dos componentes idênticos àqueles removidos, em tecidos que ainda possuem células com capacidade de proliferação ou que tenham ainda células tronco (BUSANELLO et al., 2014)

Para se escolher a melhor forma de tratamento para uma determinada ferida faz-se necessário conhecer e entender detalhadamente as etapas do processo de cicatrização, bem como cada etapa pode ser beneficiada por um determinado tratamento (BUOTE, 2022).

4.1 Cicatrização

4.1.1 Fase inflamatória

Essa fase inicia-se imediatamente após a ocorrência do ferimento e continua até a fase de desbridamento, que ocorre em média entre 6 e 12 horas após o início

da injúria. Caracteriza-se pela presença de calor, eritema, edema e dor (TELLER et al., 2009).

Como primeira etapa está a vasoconstrição local visando reduzir a perda sanguínea na ferida e é imediatamente substituída por um estado de vasodilatação. À medida que ocorre a vasodilatação substâncias vasoativas, proteínas adesivas, enzimas e fatores de crescimento extravasam por meio das vênulas, funcionando como uma chave para os eventos inflamatórios subsequentes. Ao mesmo tempo a via extrínseca da cascata de coagulação e agregação plaquetária é iniciada, mediante a liberação de tromboplastina e levam a formação do coágulo no leito da ferida (KANJI et al., 2017).

4.1.2 Fase de desbridamento

Tal fase é marcada pela presença de um exsudato séptico ou asséptico. Nessa etapa o leito da ferida recebe a migração de monócitos e neutrófilos, graças ao aumento da permeabilidade vascular, permitindo a ocorrência de fagocitose de bactérias e demais organismos que contaminam a ferida. Macrófagos transformados a partir de monócitos, são considerados as células mais importantes dessa fase, pois além de estimular a angiogênese e produção da matriz da ferida, sintetizam e secretam fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento do tecido de granulação (SNYDER et al., 2017).

4.1.3 Fase de proliferação ou reparação

Essa etapa é responsável pelo encontro das bordas da lesão e pode ser dividida em três subfases: fibroplasia, angiogênese e epitelização. Na subfase fibroblástica, fibroblastos oriundos da borda da ferida iniciam sua migração para o coágulo de fibrina e são extremamente importantes para formação do tecido de granulação, além de produzirem colágeno, fibronectina, dentre outros componentes. Tal processo normalmente se inicia por volta do quinto dia pós injúria, quando a tensão que atua sobre a ferida começará a reorientar os fibroblastos, os novos vasos sanguíneos e a matriz celular.

Em conjunto com a formação do tecido de granulação a subfase de angiogênese é a mais importante para suprir a demanda de oxigênio e metabólitos para a lesão. Nessa etapa, novos capilares são formados na área lesada, a partir de capilares preexistentes em áreas não danificadas (CHITTURI et al., 2015).

E por fim, a subfase de epitelização é mais evidente quando queratinócitos migram sobre o tecido de granulação, perdurando até que comece a existir o contato direto entre as células epiteliais (inibição por contato). Tal subfase tem como função restabelecer a integridade da derme e epiderme, caracterizando-se pela granulação e epitelização do tecido lesado. O novo tecido epitelial formado é desprovido de folículos piloso ou glândulas e normalmente é mais fino e frágil (CHITTURI et al., 2015).

4.1.4 Fase de maturação ou remodelação

Essa é considerada a última fase, tendo início aproximadamente 1 semana após a ocorrência da lesão e pode perdurar por meses ou anos. Essa etapa é responsável por diminuir o tamanho da cicatriz e do eritema, além de permitir que a nova pele formada aumente sua força de tensão. Isso graças a reformulação das fibras de colágeno que se tornam mais grossas e mais intimamente ligadas entre si. A neovascularização da cicatriz diminui até um momento em que se torna avascular, chegando a atingir cerca de 80% da força de tensão da pele normal (CHITTURI et al., 2015).

4.2 Considerações sobre dificuldade na cicatrização da ferida

Muitos fatores podem interferir no processo de cicatrização tecidual, dessa forma identificar não só a causa da injúria, mas também a cronicidade, a localização anatômica e comorbidades associadas, tornam-se cruciais na determinação do prognóstico para o paciente (DISSEMOND et al., 2020).

A idade avançada muitas vezes vem associada a uma série de alterações metabólicas, nutricionais, imunológicas, dentre outros fatores, tornando o paciente mais susceptível a ocorrência de traumas e infecções. Sem contar a existência da

redução da microcirculação e espessura dérmica à medida que a idade avança (STANLEY, et al. 2018).

Dentre as principais afecções observadas nos animais inclui doenças renais e hepáticas, neoplasias, hiperadrenocorticismos e diabetes mellitus, que por mecanismos diretos ou indiretos, podem influenciar negativamente o processo de reparação dos tecidos e predispor maiores riscos de desenvolvimento de lesões. Entretanto, a causa ainda não é muito bem esclarecida, visto que a cicatrização de feridas é multifatorial, devendo levar em consideração não só fatores locais, mas também fatores sistêmicos (WINKLER et al., 2012).

O medicamento mais comum capaz de retardar a cicatrização das feridas é o esteroide, graças a sua capacidade de provocar atrofia da derme e do tecido de granulação, impedir a atividade macrofágica e proliferação fibroblástica, além de prejudicar a síntese de colágeno. Mecanismos semelhantes ocorrem com os quimioterápicos e terapias radioativas (AMSELLEM, 2011).

4.3 Biomaterial

Biomaterial é definido como qualquer substância de ocorrência natural ou sintetizada, que possa ter aplicações biomédicas e interação com sistemas biológicos, de forma a tratar, modificar ou substituir tecidos, órgãos ou restaurar funções comprometidas por traumatismos ou processos degenerativos, além de possuir características que o permita ser utilizado de forma permanente ou transitória (GUTIERRES et al., 2005).

A depender da resposta produzida no organismo, o biomaterial pode ser classificado como bionerte, biotolerável ou bioativo, sendo esta última característica, a mais desejável, por possibilitar a interação direta entre o implante e o tecido (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; MONDAL et al., 2016), além de ser classificado como degradável e/ou absorvível, de modo que favoreça o crescimento do tecido onde é implantado. Tais características vão depender tanto das propriedades químicas, quanto físicas do material, devendo ser compatíveis com a fisiologia do tecido ou órgão em que serão aplicados (HEIMANN, 2013; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003).

A escolha de um biomaterial também requer a verificação de algumas características importantes para alcançar a cura da ferida, de forma mais rápida e

eficiente. A escolha desse material deve incluir a capacidade de a) produzir um ambiente adequado b) melhorar a migração epidérmica c) promover a angiogênese e síntese do tecido conjuntivo d) fornecer proteção contra infecção e) deve ser estéril, não tóxico e não carcinogênico f) deve fornecer ação de desbridamento para permitir melhor migração de leucócitos e favorecer acúmulo de enzimas g) permitir trocas gasosas entre o tecido e a ferida h) manter a temperatura adequada do tecido para melhorar o fluxo sanguíneo até a ferida e a migração epidérmica (DHIVYA et al., 2015).

Dentre as propriedades dos biomateriais que se buscavam inicialmente no processo de cicatrização de feridas, estava a biocompatibilidade, podendo substituir um tecido danificado e promover um suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente (ONG et al, 2014). Posteriormente, focou-se no desenvolvimento de materiais biodegradáveis, tendo então a capacidade de serem absorvidos ou incorporados pelo hospedeiro. E por fim, atualmente tem-se trabalhado com o conceito de biomimética, buscando materiais que possam atuar de forma mais ativa e específica no processo de recuperação tecidual, como a estimulação a nível celular (PIRES et al., 2015).

Segundo Faleiros-Santos (2019) uma série de características devem ser levadas em consideração para elaboração de um biomaterial, incluindo propriedades mecânicas como flexibilidade, alongamento e tensão de ruptura; propriedades químicas, como resistência a esterilização, densidade e forma de degradação quando em contato com o organismo; propriedades físicas, como permeabilidade, morfologia da superfície e porosidade; além de biocompatibilidade, de forma que o sistema imunológico reconheça o biomaterial como parte integrante do meio fisiológico.

A síntese de biomateriais para aplicações biomédicas tem despertado a atenção nos últimos anos, especialmente em função das propriedades físicas e químicas significativas que estes materiais demonstram, além da facilidade de obtenção, custo e facilidade de manuseio. Esses avanços no desenvolvimento de diversos tipos de biomateriais, representam um significativo crescimento no campo da medicina regenerativa (PIRES et al., 2015).

4.3.1 Colágeno de peixe

Além de ser considerado um produto de alto valor comercial, o colágeno é definido como sendo um polímero natural muito utilizado na obtenção de biomateriais, dado suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Material este, encontrado no tecido conjuntivo de animais, sobretudo na pele, ossos, cartilagem, tendões e ligamentos, bem como na matriz extracelular de diversos animais, incluindo suínos, bovinos, ovinos, peixes, anfíbios, dentre outros (GONÇALVES et al. 2015). Entretanto, em consequência da possibilidade de transmissão de patógenos e a alta imunogenicidade, podendo desencadear reações de rejeição, a extração do colágeno de tecido de mamíferos, vem perdendo lugar para a extração oriunda de peixes e frutos do mar (JIN et al., 2019; KUMAR et al. 2014; WANG et al., 2017).

O colágeno constitui-se como um dos principais componentes dos biomateriais utilizados como curativos biológicos de feridas, em consequência de sua importante característica de orientar e de definir a maioria dos tecidos (CEN et al., 2008). Dentre as características vantajosas, oriundas do colágeno derivado de peixes, pode-se destacar a biocompatibilidade, alta afinidade celular, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade, tornando-o adequado para a uso em implantes teciduais (JIN et al., 2019). Isso faz com que a extração do colágeno a partir da pele de pirarucu (*Arapaima gigas*), seja considerada uma área promissora para utilização na medicina.

Dentre outras aplicabilidades do colágeno de peixe destaca-se também a elaboração de biopolímeros na produção de filmes e embalagens biodegradáveis, além de material para cápsulas e emulsificantes, por apresentar excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade (HUANG et al., 2017; ZHANG et al., 2020).

Atualmente a literatura reporta a existência de pelo menos 19 tipos de colágeno, sendo o colágeno tipo I o mais abundante, constituindo cerca de 80% do colágeno do organismo. Sendo então o mais desejado pelas indústrias, graças a suas propriedades físico-químicas e mecânicas (OLIVEIRA et al., 2017).

A literatura relata diversos tipos de extração do colágeno, entretanto, o método mais comum utiliza soluções ácidas-alcálicas e hidrólise enzimática. Devendo estar atento que caso a hidrólise ou a extração for muito vigorosa, o produto ao final do processo pode apresentar uma proteína degradada, se aproximando mais de uma

gelatina do que apresentando as verdadeiras características do colágeno (HUANG et al., 2016).

O colágeno tipo I presente na pele de peixe, estimula fatores de crescimento e fibroblastos, os quais expressam e liberam Fator de Crescimento de Queratinócitos. Tais processos são imprescindíveis para o fechamento de feridas (TANG et al., 2015).

Diversos tecidos biológicos de origem animal, como pele de porco, pele de rã, pericárdio bovino e submucosa de intestino de porco são utilizados como curativos oclusivos biológicos no tratamento de lesões cutâneas, como nos casos de queimadura em humano (KUA et al., 2012). Entretanto, alguns fatores como elevado custo de importação, possibilidade de transmissão de doenças animais e falta de estudos, são fatores limitantes para utilização desses produtos. Nesse contexto, a pele de peixe surge como um possível subproduto com aplicabilidade clínica de um novo biomaterial, trazendo consigo algumas características vantajosas, incluindo elevada resistência à tração e características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana (FRANCO, et al. 2013).

5. MATERIAL E MÉTODOS

Para realização dessa dissertação foi conduzido um ensaio clínico utilizando coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo experimental, seguindo as diretrizes propostas em 2020, para utilização de animais em pesquisas (PERCIE DU SERT et al., 2020).

Esse estudo foi desenvolvido no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), localizado no município de Viçosa – MG.

5.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos adotados neste trabalho estão de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente, e foram avaliados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa para deliberação. O trabalho foi aprovado por essa Comissão, sob o número de processo 32/2021 e de responsabilidade da professora médica veterinária Andréa Pacheco Batista Borges (CRMV-MG 2772-7), sendo conduzido pelo médico veterinário Wesley Santos Dornellas.

5.2 Delineamento experimental

5.2.1 Biomaterial

Foi utilizado biomaterial preparado com colágeno derivado da pele de peixe de *Arapaima gigas*, fabricado pela JHS Laboratório Químico Ltda (Figura 1). Para fabricação desse produto foi realizada extração do colágeno, seguida de um processo de liofilização, com elaboração de uma malha porosa com dimensões de 2 cm x 2 cm e aproximadamente 3-5 mm de espessura. Tal malha foi mantida em envelopes individuais de papel grau cirúrgico esterilizados por óxido de etileno e conservado em temperatura ambiente, desde o seu recebimento até o início do experimento. Os protocolos detalhados para extração do colágeno não foram fornecidos pela empresa.

5.2.2 Animais

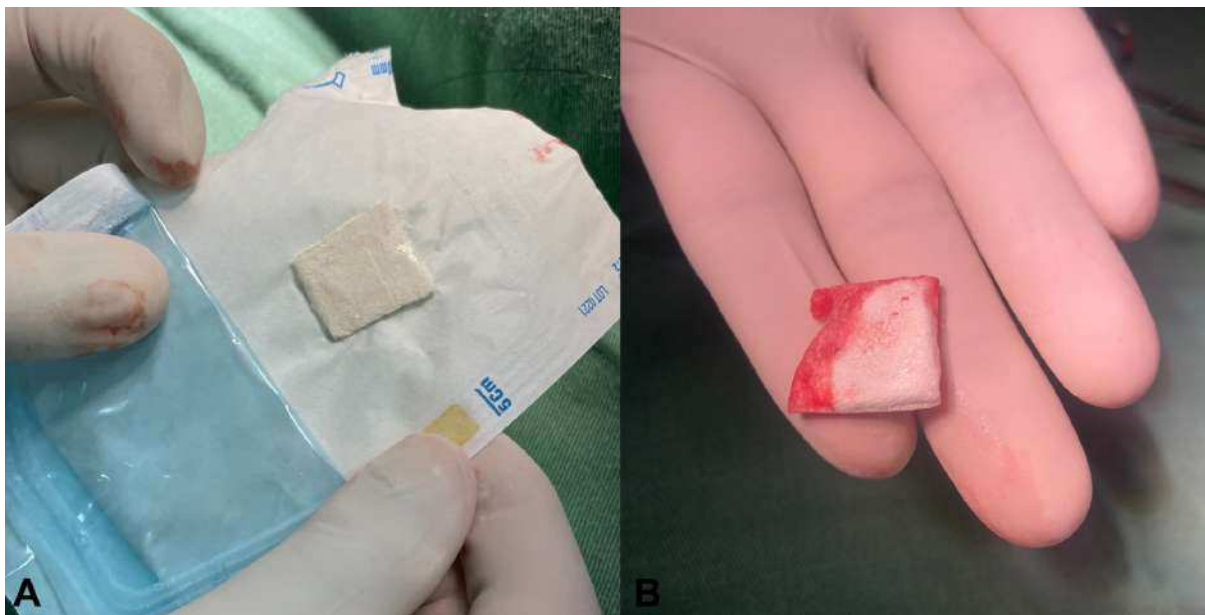
Foram utilizados 60 coelhos da raça Nova Zelândia, com peso médio de 3,5 Kg e idade entre 6 e 7 meses, provenientes da Coelheira Experimental do Departamento de Zootecnia da UFV (DZO – UFV). Os animais foram acondicionados na Coelheira Experimental do DVT da UFV, durante um mês para aclimatação e adaptação ao novo ambiente e foram alojados em gaiolas individuais com 60 cm de comprimento, 48 cm de largura e 35 cm de altura. Foram alimentados com mix de ração e feno fornecido uma vez ao dia e água *ad libitum*.

Dentre os 60 animais, houve perda de um, pertencente ao grupo de tratamento de 7 dias, em consequência de parada cardiorrespiratória após realização da medicação pré-anestésica, não passando, portanto, por cirurgia para indução da lesão cutânea.

Os animais foram manejados diariamente e monitorados desde a sua aquisição até o procedimento de eutanásia, ao final do experimento. Essa espécie é considerada padrão para estudo *in vivo* de biocompatibilidade.

Os animais não foram submetidos a um jejum hídrico e alimentar antes da realização do procedimento cirúrgico.

Figura 1 - Biomaterial de colágeno de peixe



Legenda: Compósito preparado com colágeno de peixe. **A.** Material estéril em embalagens individuais e pronto para aplicação na ferida. **B.** Material após contato com fluidos corporais e antes de ser fixado a ferida. Centro cirúrgico experimental DVT - UFV.

5.2.3 Grupos experimentais

Foram utilizados 59 coelhos, organizados aleatoriamente em dois grupos, controle (sem adição do biomaterial) e tratado (com adição do biomaterial), sendo 30 pertencente ao grupo controle e 29 ao tratado. Os animais foram avaliados comparando-se os dois grupos, quanto ao processo de reparação da ferida em três diferentes momentos (7, 30 e 60 dias após a realização do procedimento cirúrgico).

5.2.4 Protocolo anestésico

Utilizou-se como método pré-anestésico a aplicação por via intramuscular da associação de cetamina (15 mg/kg), midazolam (1 mg/kg) e cloridrato de tramadol (4 mg/kg). Em seguida os animais foram transportados para o bloco cirúrgico, onde foi realizada a preparação de toda região do dorso e pinas com tricotomia ampla.

Realizou-se acesso venoso com cateterização da veia marginal da orelha com um cateter 24G associado a um adaptador PRN.

Visando a analgesia transoperatória foi realizado bloqueio loco regional em L₁, por via subcutânea, na região interescapular, com o uso de lidocaína com

vasoconstritor (5 mg/kg). Os animais foram pré-oxigenados por cerca de três minutos, seguido da indução anestésica com utilização do propofol (2 mg/kg), por via intravenosa. A manutenção em máscara com isoflurano diluído em oxigênio a 100%, segundo os protocolos recomendados para a espécie, por meio de um circuito Baraka.

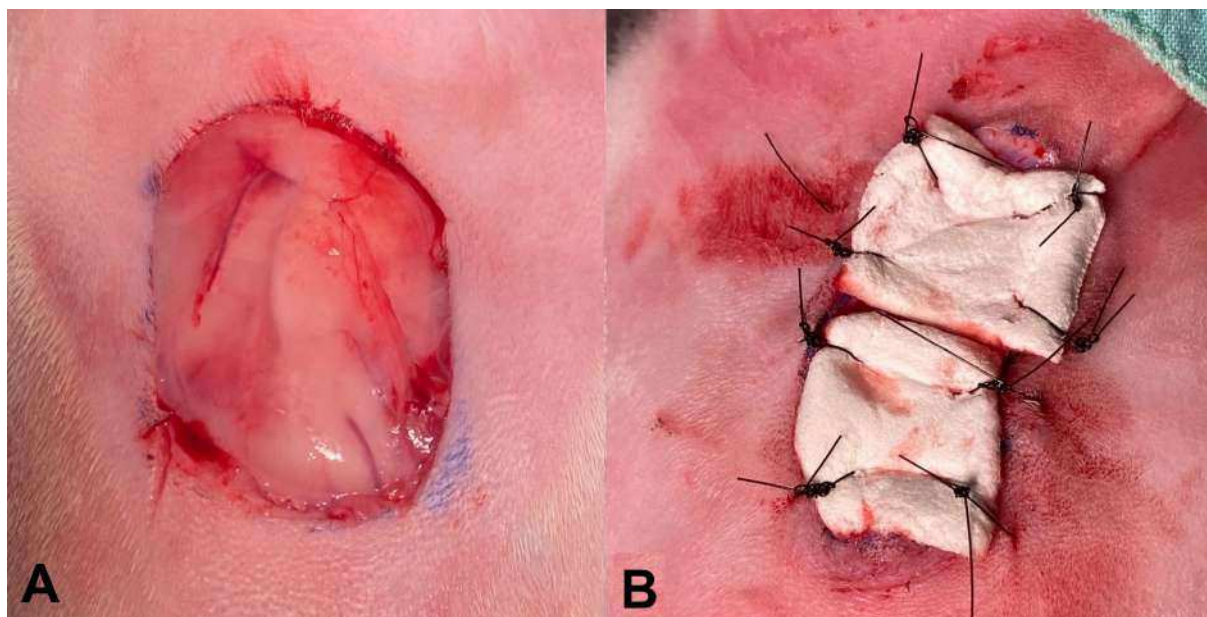
5.2.5 Intervenção cirúrgica

Para realização do procedimento cirúrgico os animais, foram posicionados em decúbito esternal, com os membros estendidos e a antissepsia foi realizada com clorexidina degermante 2% e clorexidina alcoólica. Todos os procedimentos cirúrgicos foram sempre realizados pelo mesmo médico veterinário.

O campo operatório foi preparado com realização da antissepsia, colocação do pano de campo e delimitação a área de incisão. Foi criado um defeito quadrangular (2 cm x 2 cm) na pele do dorso do animal com bisturi de 8 mm de comprimento, imediatamente caudal às escápulas, até exposição da musculatura (Figura 2A), seguido de descarte do fragmento de pele removido. Os animais do grupo tratado receberam o biomaterial que foi colocada sobre o local da lesão criada. A malha foi fixada ao defeito cutâneo criado por meio de sutura em padrão simples interrompido utilizando-se fio não absorvível de náilon 3-0 junto das bordas da malha (Figura 2B).

Para melhor recobrimento do defeito criado, dada sua ampliação após remoção do fragmento, foram fixadas 2 malhas, em cada lesão. Os animais pertencentes ao grupo controle, passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico, entretanto, sem a colocação da malha. Todas as feridas foram mantidas sem curativo e sem aplicação de antisséptico.

Figura 2 - Campo cirúrgico dos grupos controle e tratado



Legenda: Realização do procedimento cirúrgico em ambos os grupos. **A.** Grupo controle: Incisão quadrangular sem colocação das malhas. **B.** Grupo tratado: Incisão quadrangular com fixação das malhas. Centro cirúrgico experimental. DVT - UFV.

5.2.6 Período pós-operatório

A analgesia pós-operatória foi realizada com cloridrato de tramadol (3 mg/kg) pela via subcutânea, a cada 12 horas, durante os 2 primeiros dias após o procedimento cirúrgico.

5.3 Avaliação clínica e macroscópica das feridas

Os animais foram submetidos a exame clínico diariamente nos sete primeiros dias de pós-operatório e na sequência, semanalmente até término do experimento, quando foram avaliados: (1) presença ou não do material no grupo tratado; (2) reação inflamatória exsudativa da ferida cirúrgica, presente ou ausente; (3) sensibilidade dolorosa, avaliada pela reação do animal ao toque da ferida cirúrgica, atribuindo os escores 0 para ausência de qualquer manifestação do animal ao estímulo, 1 para manifestação de desconforto ao toque e 2 para vocalização ou tentativa de fuga.

5.4 Avaliação histopatológica e histomorfométrica

5.4.1 Eutanásia

Para a coleta das amostras os animais sofreram eutanásia, realizada nos dias 7, 30 e 60 após a cirurgia, de acordo com o grupo experimental. Para realização do procedimento os animais foram submetidos a anestesia dissociativa por via intramuscular com cetamina na dose de 10 mg/kg, metadona na dose de 1 mg/kg e midazolam na dose de 1 mg/kg. Passados 15 minutos da aplicação, foi realizada cateterização da veia marginal da orelha externa direita e administrado propofol na sobredose de 50 mg/kg por via intravenosa. Após atingido o plano anestésico profundo (estágio IV) foi administrado cloreto de potássio, levando à parada cardiorrespiratória dos animais.

Após a eutanásia, o dorso dos coelhos contendo a região previamente operada, foi novamente tricotomizado e preparado para a coleta das amostras. Tais amostras apresentavam dimensões de 4 cm x 4 cm, contendo toda área da ferida e tecidos adjacentes. As amostras foram removidas conforme realizado previamente com remoção do tecido de pele e tecido subcutâneo até exposição da musculatura. Para os grupos de 30 e 60 dias o biomaterial que se encontrava ressecado sobre essa região, preso apenas pela sutura, foi descartado juntamente com os fios de sutura, antes da coleta do material. Os materiais coletados foram fixados em solução de formol 10%.

5.4.2 Análise histopatológica

As amostras de cada momento e de cada grupo, após fixadas, foram processadas segundo técnicas histológicas de rotina, desidratadas em soluções crescentes de álcool, diafinizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação e corados em hematoxilina e eosina (HE). Tais amostras foram avaliadas em microscopia de rotina com microscópio óptico Olympus BX53, utilizando como parâmetros a presença de leucócitos, hemácias, fibroblastos e regeneração ou ulceração. Todas as lesões foram avaliadas em todos os períodos seguindo os mesmos critérios.

5.4.3 *Análise histomorfométrica*

Foram realizadas fotomicrografias dos cortes histológicos em HE com a câmera Leica MC170 HD (Leica Microsystems AG, Industry Divison – Suíça) e o programa de captura de imagens LAS (Versão 4.12.0, Leica Microsystems – Suíça) conectado a um microscópio de luz Leica DM1000.

Para realizar a análise morfométrica foram identificadas as lâminas com completa reepitelização da área lesada, e determinadas as espessuras das camadas da epiderme e queratina. O mesmo procedimento se aplicou para as áreas que não sofreram lesão, para determinação da espessura média da camada de queratina e epiderme de áreas sadias.

Uma vez determinada a área a ser avaliada em cada lâmina foi realizado fotomicrografia de 1 campo histológico em aumento de 10x para determinação das medidas. Com o software ImageJ, desenvolvido pelo Institute Of Health (Maryland, EUA), disponível gratuitamente online (<https://imagej.nih.gov/ij/>), foram realizadas 5 medições da espessura da camada de epiderme e 5 da camada de queratina, em cada campo. Essa técnica foi aplicada para determinação da espessura média da camada de queratina e epiderme de uma área sadia, ou seja, que não sofreu uma lesão prévia e compará-las com as áreas que sofreram lesão, de ambos os grupos.

Os dados obtidos foram exportados e salvos em planilha eletrônica (Excel 2013) para organização e análise estatística. A captura das imagens e análise morfométrica foram realizadas por um único avaliador.

5.4.4 *Análise dos dados*

Para análise dos dados clínicos e macroscópicos da ferida, foi utilizado o Statistical Analysis System (SAS OnDemand). As frequências foram arranjadas em tabelas de contingência e avaliadas pelo teste exato de Fisher quando tabelas 2×2 , e pelo teste de Freeman-Halton quando tabelas $1 \times c$ (Freq Procedure). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

Já para análise dos dados histomorfométricos, utilizando do mesmo sistema as variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett para avaliação da normalidade dos erros e da homogeneidade de variâncias,

respectivamente. Os dados de epiderme foram submetidos à transformação logarítmica ($y' = \log(y)$). Os dados foram, então, submetidos a análise de variância (GLM Procedure) de acordo com o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (TD)_{ij} + e_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} , resposta observada; μ , constante; T_i , efeito do tratamento; D_j , efeito do dia; $(TD)_{ij}$, interação; e e_{ijk} , erro aleatório.

As médias (lsmeans) foram comparadas pelo teste de Tukey.

Os dados de frequências foram arranjados em tabelas de contingência e avaliados pelo teste exato de Fisher quando tabelas 2×2 , e pelo teste de Freeman-Halton quando tabelas $l \times c$ (Freq Procedure). O nível de significância adotado foi $\alpha = 0,05$.

6. RESULTADOS

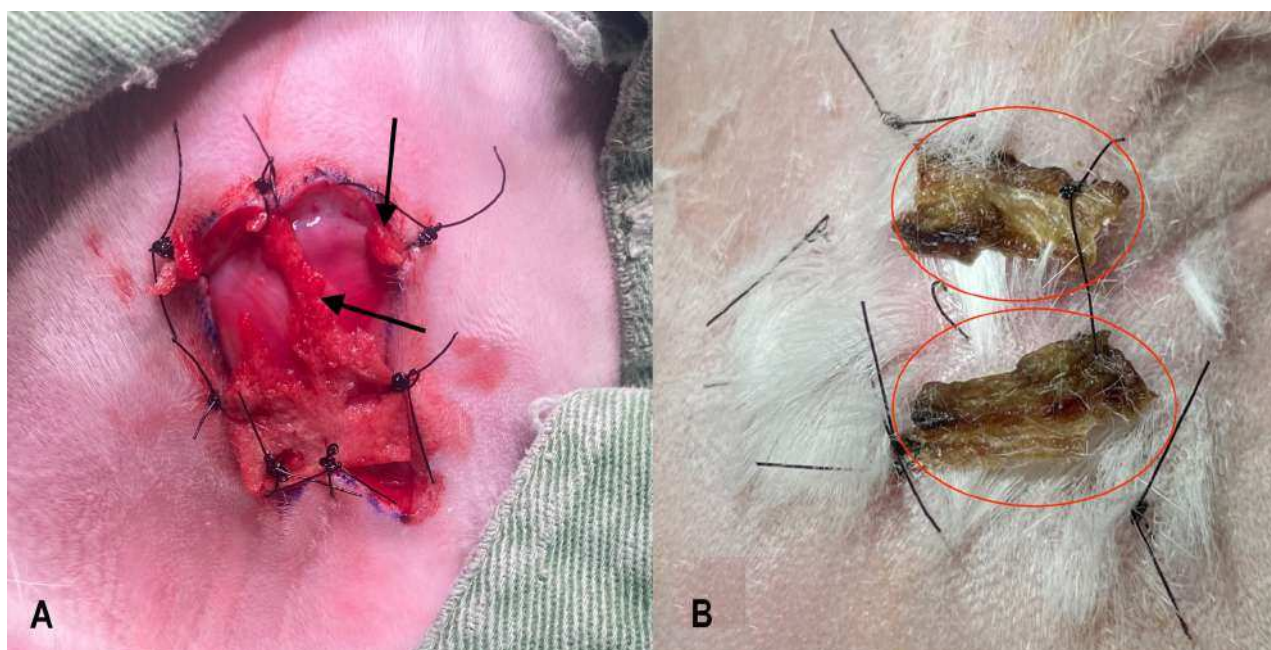
6.1 Análise clínica e macroscópica da ferida

Durante todo o período de avaliação pós-operatória nenhum dos animais apresentou manifestação de desconforto ao toque da ferida cirúrgica e também não foram observados a presença de tecido necrótico ou fluido indicando infecção das mesmas.

A sutura foi suficiente para manter a malha no local da ferida, mas não evitou a ruptura dela. Tal fato ocorreu possivelmente em decorrência da baixa força de tensão do biomaterial e sua alta capacidade de absorção de fluidos corpóreos, visualizada macroscopicamente. Tais características levaram a ruptura da malha no ponto de fixação com a pele (Figura 3A). Tal problema se agravou com a movimentação do coelho, visto que a movimentação promovia um estiramento do biomaterial, e uma vez não apresentando resistência para tal, levava a sua ruptura.

Houve situações em que a malha não manteve contato direto com a ferida durante todo o período de cicatrização. Dessa forma, passados 30 ou 60 dias de tratamento, o material permaneceu ressecado sobre a área de lesão já recuperada, mantido fixado somente pelo fio de sutura (Figura 3B), não sendo possível mensurar o quanto foi absorvido.

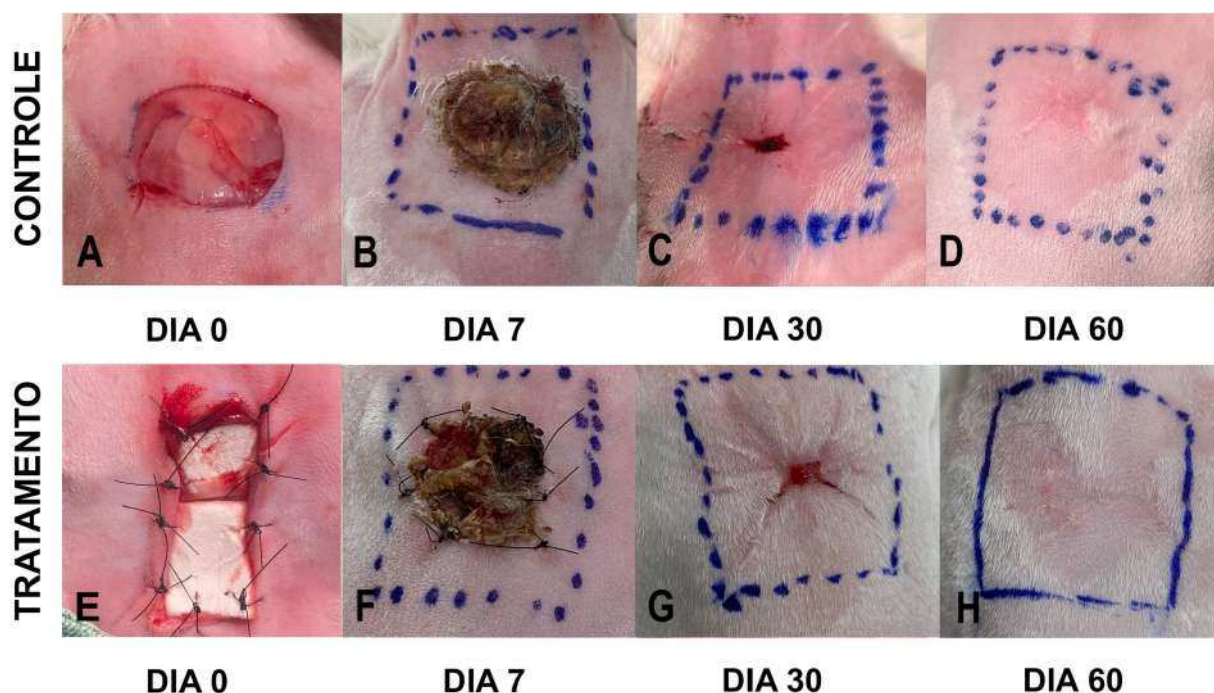
Figura 3 - Biomaterial implantado



Legenda: Avaliação das características macroscópicas das feridas no grupo tratado nos dias 0 e 60. **A.** Evidência de ruptura da malha (seta preta) no transoperatório em consequência da absorção dos fluidos presentes na ferida cirúrgica, pela própria malha. **B.** Evidência da permanência da malha já ressecada (círculo) aos 60 dias, mesmo após cicatrização da ferida.

Para avaliar a eficiência da malha no processo de reparação da ferida, o grupo controle e o grupo tratado foram comparados, conforme a figura 4. No dia 7 observou-se uma crosta enegrecida em ambos os grupos, porém com ausência de sinais de edema ou inflamação ao redor da lesão. No dia 30 observou-se uma significativa contração da ferida com uma boa recuperação ao redor da lesão para ambos os grupos. Nesse período, 3 animais pertencentes ao grupo controle e 4 do grupo tratado apresentaram completa recuperação da lesão macroscopicamente. Já no dia 60, 100% dos animais de ambos os grupos apresentaram completa recuperação da ferida pela avaliação macroscópica.

Figura 4 - Evolução da lesão



Legenda: Avaliação das características macroscópicas das feridas no grupo controle e no grupo tratado nos dias 0, 7, 30 e 60. **A.** Ferida após incisão de pele e subcutâneo realizado no dorso do coelho no grupo controle. **B.** Presença de formação crostosa no local da incisão. **C.** Retração da ferida. **D.** Delimitação da área cicatricial. **E.** Incisão de pele e subcutâneo com fixação do biomaterial na região do dorso no grupo tratado. **F.** Presença de formação crostosa. **G.** Presença de retração da ferida cutânea. **H.** Delimitação da área cicatricial. Centro cirúrgico experimental. DVT - UFV.

6.2 Análise histopatológica

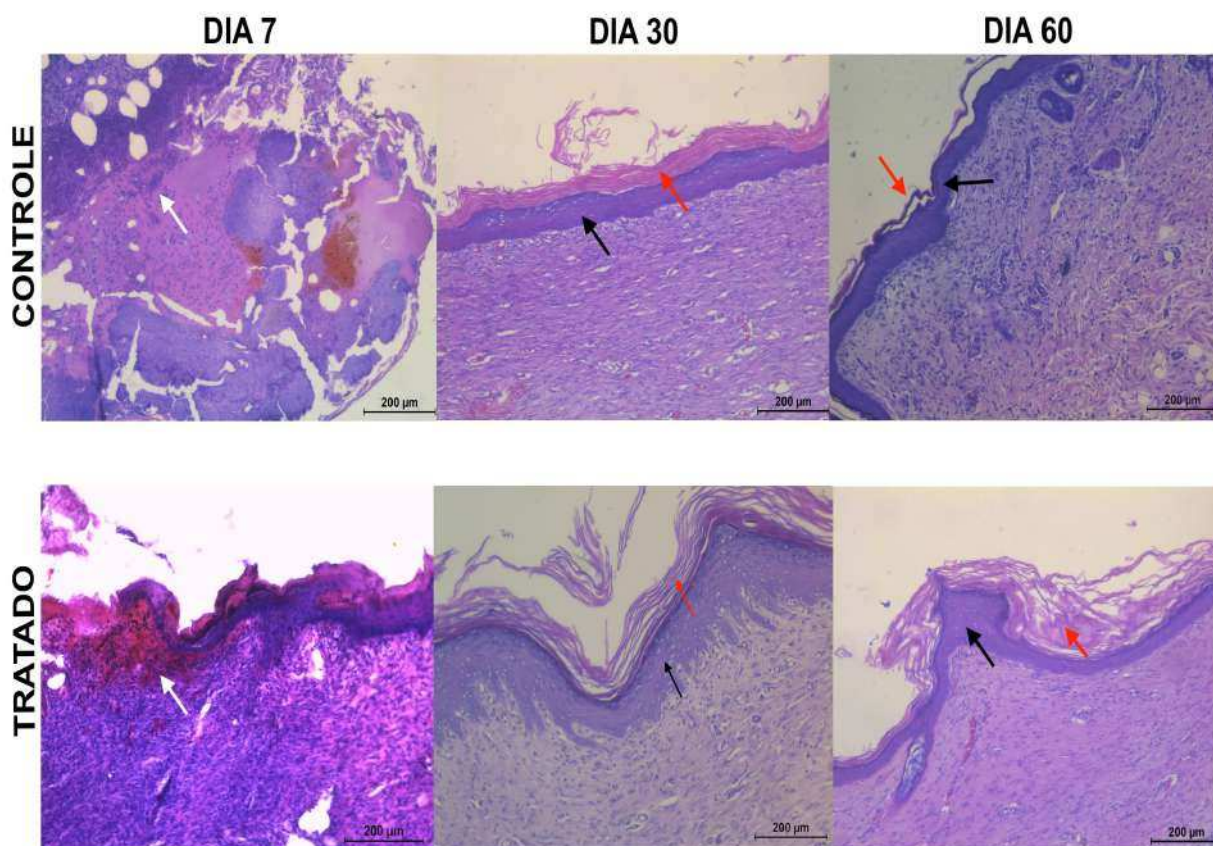
Para avaliar a qualidade do tecido reparado as amostras obtidas e coradas em hematoxilina e eosina foram avaliadas nos dias 7, 30 e 60. Como apresentado na figura 5, no dia 7 em ambos os grupos se observou predomínio de material necrótico ou serocelular, consistido por células inflamatórias e fibrina, com ausência de organização tecidual, camada de queratina ou sinais de regeneração epitelial. Todos os animais pertencentes a esse “time point” apresentaram ulceração tecidual, ou seja, uma área de descontinuidade da epiderme.

Na análise referente ao dia 30, 13 (7 do grupo tratado e 6 do controle) dos 20 animais, equivalente a 65%, apresentaram uma plena recuperação da ferida, evidenciada pela ausência de descontinuidade da epiderme. Enquanto nos demais animais foi observado áreas de ulceração, porém já apresentando uma certa organização tecidual, com predomínio de tecido cicatricial e células inflamatórias.

No que diz respeito ao dia 60, 100% dos animais de ambos os grupos apresentaram completa recuperação epitelial. Foi observado presença de fibroplasia, áreas de neovascularização, com tecido conjuntivo frouxo e infiltrado inflamatório mononuclear. Porém com ausência de folículo piloso na área recuperada.

Em nenhum dos três momentos de avaliação não foram observados nenhum sinal sugestivo de rejeição ou persistência do biomaterial testado.

Figura 5 - Observações microscópicas para ambos os grupos nos três momentos (7, 30 e 60 dias).



Legenda: Cortes histológico de fragmento de pele e subcutâneo. Presença de células inflamatórias e material serocelular (seta branca). Epiderme (seta preta). Queratina (seta vermelha). H/E 100x. Fonte: Arquivo institucional, 2023.

6.3 Análise histomorfométrica

Nas análises histomorfométricas realizadas a partir das lâminas histológicas, não houve observações registradas de Epiderme e de Queratina no D7 para nenhum dos grupos.

Os valores de Epiderme e Queratina de acordo com os tratamentos, nos dias 30 e 60, estão apresentados na Tabela 1. Lê-se “Normais” como sendo áreas sadias, ou seja, que não sofreram lesão prévia.

Em ambos os dias de avaliação (30 e 60), os valores de Epiderme foram mais elevados no grupo R/TR (Regenerado/Tratado), seguido do grupo R/CT (Regenerado/Controle), ambos com valores mais altos que os grupos normais ($p <$

0,05). Já os valores de Queratina foram mais elevados no grupo R/TR em relação aos grupos normais em ambos os dias de avaliação ($p < 0,05$), mas não houve diferença ($p > 0,05$) entre o grupo R/CT e os grupos normais.

Considerando os dias de avaliação, os valores de Epiderme foram mais baixos no dia 60 em relação ao dia 30 ($p < 0,05$) nos grupos regenerados, e não diferiram ($p > 0,05$) nos grupos normais. Para os valores de Queratina, não houve diferença entre os dias em nenhum dos grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1. Valores da espessura (μm) de Epiderme e Queratina nos defeitos e no tecido íntegro, nos grupos Controle e Tratado, nos dias 30 e 60 (média \pm erro-padrão).

Dia	Epiderme (μm)			
	R/CT	R/TR	N/CT	N/TR
Dia 30	55,66 \pm 6,00 ^{bA}	118,00 \pm 21,29 ^{aA}	24,03 \pm 2,02 ^{cA}	25,75 \pm 2,45 ^{cA}
Dia 60	40,76 \pm 5,59 ^{bB}	64,19 \pm 5,49 ^{aB}	22,50 \pm 1,63 ^{cA}	25,81 \pm 1,90 ^{cA}
Média geral: 24,47 \pm 0,98				
Dia	Queratina (μm)			
	R/CT	R/TR	N/CT	N/TR
Dia 30	43,16 \pm 7,60 ^{abA}	62,33 \pm 5,27 ^{aA}	26,81 \pm 2,43 ^{bA}	29,33 \pm 1,85 ^{bA}
Dia 60	42,58 \pm 6,56 ^{abA}	63,22 \pm 6,64 ^{aA}	26,59 \pm 2,67 ^{bA}	32,81 \pm 4,15 ^{bA}
Média geral: 29,10 \pm 1,61				

Legenda: R/CT, tecido regenerado/controle; R/TR, tecido regenerado/grupo tratado; N/CT, tecido normal/controle; N/TR, tecido normal/grupo tratado. Letras minúsculas na linha (entre tratamentos dentro do dia) e maiúsculas na coluna (entre dias dentro do tratamento) indicam diferença pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

O tratamento de feridas cutâneas ainda é um desafio tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana e causa grande impacto na qualidade de vida dos seres humanos e animais domésticos (VICENTE et al., 2019). Esse fato justifica as pesquisas de novas formas de tratamento, que permitam uma recuperação precoce do paciente, trazendo menor impacto financeiro e retorno em menor tempo para as atividades cotidianas.

Cicatrização de ferida é definido como um dos mais complexos processos biológicos, sendo composto basicamente pelas suas 4 principais etapas: inflamação, desbridamento, proliferação e maturação. Um desses mecanismos é a reepitelização, que é principalmente dependente da proliferação e migração de queratinócitos, também conhecido como hiperqueratose. Da mesma forma a proliferação pode garantir que mais células vão para o local da ferida e ocorra a reparação (PAZYAR, et al. 2018). No presente estudo tal fato foi comprovado inicialmente pelo aumento da espessura da camada de epiderme, para ambos os grupos aos 30 dias, seguido de uma redução dessa espessura aos 60 dias. E com relação a camada de queratina o processo de hiperqueratose ocorreu e se manteve para ambos os grupos e períodos, não diferindo do tecido normal. Entretanto, apesar da diferença estatística do tratado em relação ao controle e ao tecido normal, ambos os grupos apresentaram um processo de organização tecidual.

Segundo Genovese (2012), os queratinócitos e outras células estromais são importantes fontes de fatores angiogênicos durante a cicatrização de feridas além da formação das cicatrizes, justificando o aumento da camada de queratina durante o processo de reparação tecidual, conforme observado nesse presente trabalho.

Segundo Gamba e seus colaboradores (2016) a pele cicatrizada ganha resistência e a cicatriz diminui a espessura, bem como o tamanho até voltar ao aspecto inicial da lesão, concordando com os resultados observados no presente estudo, no qual ocorre diminuição da camada epidermal com o passar dos dias.

Um dos principais desfechos observados nessa pesquisa foi a biocompatibilidade apresentada pelo compósito derivado do colágeno de peixe, que segundo Carvalho (2004) é entendida como capacidade que o material tem de cumprir sua função sem provocar efeitos tóxicos ou injúrias ao local empregado. Corroborando as informações defendidas por Dhivya (2015) na escolha do compósito, acredita-se

que esse material permitiu a migração epidérmica na área lesada, promovendo angiogênese e síntese de tecido conjuntivo, exerceu proteção contra infecção de forma indireta, não apresentou características tóxicas, o que reforça suas características biocompatíveis, como observadas também por Huang (2017) e Zhang (2020).

Não foi observado sinal de rejeição frente ao tratamento utilizado. Fato que poderia ter ocorrido visto que o biomaterial trata-se de um material xenogênico, ou seja, material de origem biológica obtido a partir de animais de espécies diferentes, tendo então a capacidade de induzir a rejeição e restringir a sua utilização (SCHORLEMMER et al., 1998). Faz-se necessário, portanto, estudos com avaliações em um menor espaço de tempo a fim de identificar o momento exato em que se inicia o processo de absorção do material testado. Em um estudo semelhante, com a utilização do colágeno de peixe associado a extrato de plantas apresentou uma boa atividade antibacteriana e biocompatibilidade (YUFEI, et al., 2020).

Até o presente momento não possuem relatos quantitativos sobre o tempo de absorção do colágeno derivado do peixe envolvidas no processo de cicatrização de feridas. Sugerem, portanto, a realização de pesquisas futuras visando avaliar diferentes biomateriais derivados do colágeno de peixe e inclusive compará-la com outras espécies com relação a absorção tecidual em diferentes padrões de tempo.

Até o momento, foram localizadas na literatura poucas evidências a respeito do uso do colágeno de peixe de forma isolada, no processo de regeneração de feridas, ao qual o presente se propôs a evidenciar as características de sua utilização. Nesse contexto, grande parte dos estudos baseiam-se na utilização da pele de peixe em si como tratamento de lesões cutâneas, principalmente em pacientes vítimas de queimadura, aproveitando-se das características positivas oferecidas pela pele. Semelhante aos resultados obtidos por Lima (2019) e Hu (2017) com a utilização da pele de tilápia, o colágeno de peixe empregado no presente estudo permitiu a reepitelização completa da ferida, sem ocorrência de efeitos colaterais. De todo modo, a comparação dos resultados pode contribuir para a avaliação da regeneração tecidual, visto que o colágeno é um dos componentes presentes na pele de peixe e ele por si só foi capaz de produzir resultados semelhantes aos obtidos com a pele.

Biomateriais que apresentam como base o colágeno frequentemente apresentam baixa força de tensão e estabilidade, ficando propensos a danos

mecânicos. Tais características já foram observadas por Sun e seus colaboradores em 2018 e corroboram as características demonstradas pelo biomaterial derivado do colágeno de pele utilizado no presente estudo, no que diz respeito a suas falhas mecânicas de ruptura demonstrada de imediato após sua aplicação nas áreas de lesão. Dessa forma, a incorporação de componentes a matriz do colágeno e utilização de métodos físicos e químicos, são medidas que podem aumentar a rigidez e estabilidade enzimática do biomaterial (ZHANG et al., 2018). Faz-se necessários, portanto, novos estudos que possam incorporar tais características ao biomaterial testado, desde que não comprometa suas propriedades físico-químicas e de biocompatibilidade.

Quanto ao armazenamento do biomaterial ainda não existem relatos sobre a sua ideal conservação, visto que é um produto ainda em teste. Entretanto, aproximadamente 30 dias após o primeiro grupo passar pela cirurgia foi observado que o biomaterial adquiriu discreta umidade, tornando-se mais difícil a sua remoção da embalagem. Acredita-se que essa característica possa ter influenciado na qualidade do biomaterial e conseqüentemente tal embalagem não foi adequada para esse fim. Faz-se necessário, portanto, novos estudos pré-clínicos quanto à sua conservação e tempo para utilização uma vez determinada a sua validação.

8. CONCLUSÃO

O biomaterial não acelerou o processo de reparação tecidual, não causou infecção e não sofreu rejeição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMSELLEM, P. Complications of reconstructive surgery in companion animals. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 41, p. 995-1006, 2011.

BEHEREGARAY, W. K.; GIANOTTI, G. C.; GARCEZ, T. N. A.; FERNANDES, A. O.; CONTESINI, E. A. Tratamento de ferida por eletroacupuntura em uma gata. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 37, n. 3, p. 285-289, 2009.

BUSANELLO, J.; LARA, M. V.; DEUS, L. L.; BOHLKE, T. S.; MELLO-CARPES, P. B. Fisiologia e prática de enfermagem no cuidado de portadores de feridas. *Revista Ciência em Extensão*, v. 10, p. 254-261, 2014.

BOLGIANI, A.; LIMA E.M.; SERRA M.C.V.F. Queimaduras: condutas clínicas e cirúrgicas. **Atheneu**. São Paulo, 2013.

BUOTE, N.; J. Updates in Wound Management and Dressings. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 52, p. 289-315, 2022.

CARVALHO, P. S. P.; BASSIN, A. P. F.; PEREIRA, L. A. V. Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais, **Implant News**, v. 1, 2004.

CEN, L.; LIU, W. E. I.; CUI, L. E. I.; ZHANG, W.; CAO, Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatr Res**, v. 63, p. 492-496, 2008.

CHANG, C. I. et al. Determining the cleavage site for the mature antimicrobial peptide of Nile tilapia β -defensin using 2D electrophoresis, western blot, and mass spectrometry analysis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 62, p. 41-46, 2017.

CHITTURI, R. T.; BALASUBRAMANIAM, A. M.; PARAMESWAR, R. A. The role of myofibroblasts in wound healing, contraction and its clinical implications in cleft palate repair. **J Int Oral Health**, v. 7, P.75-80, 2015.

GONÇALVES, G. R.; OLIVEIRA, M. A. S.; MOREIRA, R. F.; BRITO, D. Benefícios da Ingestão de Colágeno para o Organismo Humano. *Revista Eletrônica de Biologia* v.8, n.2, p. 190-207, 2015.

COSTA, J. Q.; OLIVEIRA, C. S. M.; ALVES, M.; MOURA, M. F. N.; DA NÓBREGA, M.; Estrela, S.; DURAND, V. R.; ARAÚJO, A. L.; DE SANTANA, V. L. Tratamento de feridas cutâneas ocasionada por queimadura em um canino – Relato de caso. **Revista de Agroecologia no Semiárido**, v. 4, n. 2, p. 51-54, 2020.

DERKUS, B.; EMREGUL, K. C.; EMREGUL, E. Evaluation of protein immobilization capacity on various carbon nano tube embedded hydrogel biomaterials. **Materials Science & Engineering. C, Materials for biological applications**, v.56, 132-140, 2015.

DHIVYA, S.; PADMA, V.V.; SANTHINI E. Wound dressings - a review. **Biomedice**, v.5, 2015.

DISSEMOND, J.; AUGUSTIN, M.; DIETLEIN, M. Efficacy of MMP-inhibiting wound dressings in the treatment of chronic wounds: a systematic review. **J Wound Care**, v. 18, p. 102-118, 2020.

FALEIROS-SANTOS, M. H. et al. Evolução dos Biomateriais na Ortopedia e Cardiologia. **Revista Processos Químicos**, v. 13, n. 26, p. 35-42, 2019.

FERREIRA, M. C. et al. Review Complex Wounds. **Clinics**, 2006.

FRANCO, M. L. R. S.; FRANCO, N. P.; GASPARINO, E.; DORADO, D. M.; PRADO, M.; VESCO, A. P. D. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. **Arch Zootec**, v. 62, p. 21-32, 2013.

GENOVESE, A.; DETORAKI, A.; GRANATA, F.; GALDIERO, M. R.; SPADARO, G.; MARONE, G. Angiogenesis, lymphangiogenesis and atopic dermatites. **Chem Immunol Allergy**, v. 96, p. 50-60, 2012.

GAMBA, M. A.; PETRI, V.; COSTA, M. T. F. Feridas: prevenção, causas e tratamento. **Rio de Janeiro: Santos**, p. 352, 2016.

GOSAIN, A.; DIPIETRO, L. A. Aging and Wound Healing World Journal of Surgery, 2004.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p.1352-1358, 2010.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of dental research**, v. 89, n. 3, p. 219–29, 2010.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de Medicina*, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2005.

HEIMANN, R. B. Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramic coatings. **Surface and Coatings Technology**, v. 233, p. 27–38, 2013.

HUANG, C. Y.; KUO, J. M.; WU, S. J., TSAI, H. T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by a novel extrusion-hydro-extraction process. **Food Chemistry**, v. 190, p. 997-1006, 2016. ISSN 0308-8146.

HUANG, T.; TU, Z. C.; WANG, H.; SHANGGUAN, X.; ZHANG, L.; ZHANG, N. H., BANSAL. Pectin and enzyme complex modified fish scales gelatin: Rheological behavior, gel properties and nanostructures. **Carbohydrate polymers**, v.156, n.535, p. 294-302, 2017.

Hu, Z., Yang, P., Zhou, C., Li, S., & Hong, P. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. **Marine Drugs**, 15(4), 2017.

JIN, S. et al. Fish Collagen and Hydroxyapatite Reinforced Poly(lactide- co-glycolide) Fibrous Membrane for Guided Bone Regeneration. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 5, p. 2058–2067, 2019.

KANJI, S.; DAS, H. Advances of stem cell therapeutics in cutaneous wound healing and regeneration. **Mediators Inflamm**, 2017.

KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, 2003.

KUA E. H.; GOH, C. Q.; TING, Y.; CHUA A.; SONG, C. Comparing the use of glycerol preserved and cryopreserved allogenic skin for the treatment of severe burns: differences in clinical outcomes and in vitro tissue viability. **Cell Tissue Bank**, v. 3, p. 269-279, 2012.

KUMAR, G. S.; GOVINDAN, R.; GIRIJA, E. K. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 31, p. 5052–5060, 2014.

LEAL, L. M. et al. Utilização de enxerto cutâneo no tratamento de ferida traumática grave associada à luxação metatarsofalangeana aberta: relato de caso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 25, n. 2, 2018.

LIMA, J. et al. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical**, 2019.

MONDAL, B. et al. Fish scale derived hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Materials Characterization**, v. 121, p. 112–124, 2016.

OLIVEIRA, V. M.; ASSIS, C. R. D.; HERCULANO, P. N.; CAVALCANTI, M. T. H.; BEZERRA, R. S. & PORTO, A. L. F. Collagenase from smooth weakfish: extraction, partial purification characterization and collagen. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 1, p. 52-64, 2017.

ONG, J. L.; APPLEFORD, M. R.; MANI, G. Introduction to biomaterials: basic theory with engineering applications. **Cambridge University Press**, 2014.

PERCIE DU SERT, N. et al. The Arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLOS Biology**, v. 18, n. 7, p. 23000410, 2020.

PINTO MEDEIROS DIAS, M. T. et al. Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertility and Sterility**, v. 112, n. 1, p. 174–176, 2019.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C.; MORAES, A. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, p. 174-176, 2019.

PRAZYAR, N.; YAGHOOBI, R.; RAFIEE, E.; MEHRABIAN, A.; FEILY, A. Skin wound healing and phytomedicine: A review. **Skin Pharmacol. Phys**, v. 27, p. 303-310, 2018.

SCHORLEMMER, H.V.; KURRLE, R.S. Malanonitrilamides reduce IgM e IgG xenoantibodies and prolong skin xenografts survival in a mouse-to-rat model. **Transplant Proc**, v. 30, p. 976-979, 1998.

SILVA, T.; COELHO, M. C.; SIQUEIRA F., R.; TRAJANO, S.; TUDURY, E. Tratamento de feridas em cães e gatos. **Enciclopedia Biosfera**, v. 18, n. 37, 2021.

SNYDER, R. J.; LANTIS, J.; KIRSNER, R. S., et al. Macrophages: a review of their role in wound healing and their therapeutic use. **Wound Rep Reg**, v.24, p. 613-629, 2017.

STANLEY, B. J.; CORNELL, K. Wound healing. In: Johnston SA, Tobias KM, editors. *Vet-erinary surgery: small animal*. 2nd edition. **St. Louis: Elsevier Health Sciences**; p. 132–48, 2018.

SUN, L.; LI, B.; YAO, D.; SONG, W.; HOU, H. Effects of Cross-Linking on Mechanical, Biological Propertis and Biodegradation Behavior of Nile Tilapia Skin Collagen Sponge as Biomedical Material. **J. Mech. Behav. Biomed. Mater**, v. 80, p. 51-58, 2018.

TANG, J.; SAITO, T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. **Biomed Res Int**, 2015.

TELLER, P.; WHITE, T. K. The physiology of wound healing: injury through maturation. **Surg Clin North Am**, v. 89, p. 599-610, 2009.

TILLMANN, M.T. FELIX, S.R.; MUNDSTOK, C.P. et al. Tratamento e manejo de feridas cutâneas em cães e gatos: revisão de literatura. **Nosso Clínico**, n.103, p.12-19, 2015.

VICENTE, C. et al. Cuidado à pessoa com ferida oncológica: educação permanente em enfermagem mediada por tecnologias educacionais. **Revista Gaúcha de Enfermagem**, v. 40, 2019.

WANG, J. et al. Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 341–350, 2017.

WENDT, S.B.T. Comparação da eficácia da calêndula e do óleo de girassol na cicatrização por segunda intenção de feridas em pequenos animais. **Universidade Federal do Paraná**, Dissertação (Mestrado), 2005.

WINKLER, K. P. Factors that interfere with wound healing, the Merck veterinary manual. **Whitehouse Station, NJ: Merck Sharp & Dohme Corp**, 2012.

YUFEI, S.; HONGJIAN, Z.; XIN, Z.; ZHAN, C.; DAN, Z.; JUN, M. **A comparative study of two porous sponge scaffolds prepared by collagen derived from porcine skin and fish scales as burn wound dressing in rabbit model**. *Regen Biomater*, v. 7, p. 63-70, 2020.

ZHANG, D.; WU, X., CHEN, J.; LIN, K. The Development of Collagen Based Composite Scaffolds for Bone Regeneration. **Bioactive Materials**, v. 13, p. 129-138, 2018.

ZHANG, T.; TU, Z.; ZOU, Z.; SHANGGUAN, X.; WANG, H.; BANSAL, N. Glycosylated fish gelatin emulsion: Rheological, tribological properties and its application as model coffee creamers. **Food Hydrocolloids**, v.102, 2020.