



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**GUILHERME COSTA SOARES**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DO COLÁGENO EXTRAÍDO DA  
PELE DE TILÁPIA DO NILO EM ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DE MUCOSA JUGAL  
EM RATOS**

**FORTALEZA**

**2022**

GUILHERME COSTA SOARES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DO COLÁGENO EXTRAÍDO DA PELE  
DE TILÁPIA DO NILO EM ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DE MUCOSA JUGAL EM RATOS

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.  
Área temática: Estomatopatologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- S654a Soares, Guilherme Costa.  
Avaliação do potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo em úlceras traumáticas de mucosa jugal em ratos / Guilherme Costa Soares. – 2022.  
70 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.  
Coorientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Úlceras Orais. 2. Colágeno. 3. Cicatrização. 4. Tilápia do Nilo. I. Título.

CDD 617.6

---

GUILHERME COSTA SOARES

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DO COLÁGENO EXTRAÍDO DA PELE  
DE TILÁPIA DO NILO EM ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DE MUCOSA JUGAL EM RATOS

Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.  
Área temática: Estomatopatologia Oral.

Aprovada em 11 / 04 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior  
Centro Universitário Christus (Unichristus)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **DEUS**, nosso PAI que está sempre nos dando forças e foi peça fundamental para a realização desse estudo.

Aos meus pais **Domingos Ferreira Soares** e **Ana Paula Galdino Costa**, a quem eu devo tudo, pois sempre estiveram do meu lado me incentivando e me ajudando para que fosse possível o caminhar durante o mestrado.

À toda minha **família**, que é a minha força motriz, que acreditaram no meu potencial e nunca me deixaram sozinho.

Ao meu grande orientador, **Prof. Mário Rogério Lima Mota**, que eu sempre considerei como terceiro pai. Um exemplo de profissional e pessoa para mim, algum dia espero ser metade do que o prof. Mário representa para todos nós. Agradeço por todos os ensinamentos e por acreditar no meu potencial.

Aos professores que fizeram parte das bancas de qualificação, pré-defesa e defesa desta pesquisa, **Prof. Mário Rogério Lima Mota**, **Prof. Luiz André Cavalcante Brizen**, **Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, **Prof. Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior**, **Prof. Paulo Goberlânio de Barros Silva** e **Profa. Thâmara Manoela Marinho Bezerra**, grato por todos os ensinamentos e contribuições para o enriquecimento deste estudo.

Agradeço, fortemente, a todos os professores do laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia pelos ensinamentos e contribuição na minha formação acadêmica, **Prof. Paulo Goberlânio (Paulinho)**, **Prof. Fabrício Bitu**, **Profa. Karuza**, **Profa. Thâmara**, e, especialmente, a minha orientadora de toda a graduação, **Profa. Ana Paula Negreiros Nunes Alves**, que tem o mesmo nome de minha mãe. Tenho o prazer de ter duas “Ana Paula” na minha vida. Profa. Ana Paula foi minha orientadora do Programa de Educação Tutorial (PET) do curso de Odontologia, da monitoria na disciplina de Patologia Bucal, do meu trabalho de conclusão de curso, etc. Enfim, profa. Ana Paula esteve em todos os momentos de minha vida acadêmica, sempre me ensinando e me fazendo crescer pessoalmente e profissionalmente. Todos os professores estarão eternamente guardados nas minhas lembranças.

A toda a equipe do **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC**, representado pelos professores **Manoel Odorico de Moraes Filho**, **Edmar Maciel Lima**

**Júnior e Carlos Roberto Koscky Paier**, por todo o apoio, incentivo e fornecimento de subsídios essenciais para a realização desta pesquisa.

Aos meus queridos colegas de pós-graduação, **Cássia, Dayrine, Osias, Priscila, Farah, Pedro Henrique (PH), Ronildo, João Eudes, Milena, Joyce, Imaculada**, que estiveram do meu lado, me auxiliaram em vários momentos do mestrado e tornaram tudo mais fácil.

Agradecimento especial ao meu querido amigo **Alceu**, técnico do laboratório de Patologia Bucal, que me ajudou em várias etapas de minha pesquisa e teve um papel fundamental na sua realização.

Ao **Dr. Wesley Ribeiro**, veterinário do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da UFC, por todo o apoio e contribuição para a realização dos procedimentos experimentais. Vivemos um momento difícil de pandemia da COVID-19, e Dr. Wesley sempre esteve disposto a me ajudar e a contornar os problemas que surgiam.

Aos meus queridos amigos de iniciação científica e petianos, representados por **Manuela (Manu), Dênis, Marta, Igor, Gabriela (Gabi), Rairam**, que me auxiliaram em todas as etapas de experimentos e análises.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFC (PPGO-UFC)**, coordenadora **Profa. Cristiane Sá Roriz Fonteles**, vice-coordenador **Prof. Vicente de Paulo Aragão Saboia**, secretário **Rafael (Rafa)**, por terem me dado a oportunidade de realizar esta pesquisa e contribuírem fortemente no meu aprendizado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela contribuição e concessão de bolsas de estudo.

## RESUMO

As úlceras traumáticas são lesões dolorosas e comuns da mucosa oral, não possuindo protocolo terapêutico bem definido. A pele da tilápia do Nilo surge como uma possível alternativa de tratamento, já que mostra melhora na cicatrização de feridas cutâneas em estudos animais e humanos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo (CPTN) em modelo experimental de úlceras traumáticas orais em ratos. O estudo contou com 120 ratos machos da linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em três grupos, os quais foram tratados por via tópica, 2x ao dia, com: CPTN a 1% em orabase (CPTN-Ob), orabase sem o colágeno (Ob) e triancinolona acetona em orabase (Triancinolona-Ob). As úlceras traumáticas foram induzidas em mucosa jugal esquerda através de punch dermatológico com 8 mm de diâmetro. A administração tópica foi realizada até os dias de eutanásia (dias 1, 5, 10, 15 e 20, após ulceração), onde as úlceras foram clinicamente mensuradas para cálculo da área e percentual de contração (relação entre área inicial e final) e os animais pesados para cálculo da variação de massa corpórea. Lâminas histológicas foram confeccionadas para análise através de escores (presença ou ausência de epitélio e de reparo do tecido conjuntivo) e histomorfométrica (contagem de polimorfonucleares (PMN), mononucleares (MN), vasos sanguíneos (VS) e fibroblastos/miofibroblastos). Coloração de Picrosirius Red foi realizada para análise do colágeno e imunistoquímica para os marcadores CD31,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ . Para a análise estatística, foi utilizado o *software* GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0 e o índice de significância  $p < 0,05$  foi adotado em todas as avaliações. No 15º dia, os grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob mostraram menor área de úlcera e maior percentual de contração ( $p = 0,0061$ ), total re-epitelização ( $p < 0,001$ ), melhores escores histológicos de reparo ( $p = 0,012$ ) e menor número de PMN ( $p = 0,0029$ ) comparado ao grupo Ob. Ainda nesse dia, o grupo CPTN-Ob mostrou um maior número de VS ( $p = 0,017$ ), maior deposição de colágeno total, colágeno tipo I e tipo III ( $p < 0,05$ ) e maior expressão de CD31,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) comparado aos grupos Ob e Triancinolona-Ob. No 20º dia, o grupo CPTN-Ob obteve um maior ganho de peso em relação aos grupos Ob e Triancinolona-Ob ( $p < 0,0001$ ). Conclui-se que o CPTN em orabase otimiza a cicatrização de úlceras traumáticas por estimular re-epitelização, angiogênese e colagênese, com importante papel do TGF- $\beta$  nesse processo.

**Palavras-chave:** úlceras orais; colágeno; cicatrização; tilápia do Nilo.

## ABSTRACT

Traumatic ulcers are painful and common lesions of the oral mucosa, with no well-defined therapeutic protocol. Nile tilapia skin appears as a possible alternative treatment, as it shows improvement in the healing of skin wounds in animal and human studies. The objective of this study was to evaluate the healing potential of collagen extracted from Nile tilapia skin (NTSC) in an experimental model of traumatic oral ulcers in rats. The study included 120 male Wistar rats, which were randomly divided into three groups, which were treated topically, twice a day, with: 1% NTSC in orabase (NTSC-Ob), orabase without collagen (Ob) and triamcinolone acetonide in orabase (Triamcinolone-Ob). Traumatic ulcers were induced in the left jugal mucosa using a dermatological punch measuring 8 mm in diameter. Topical administration was performed until the days of euthanasia (days 1, 5, 10, 15 and 20, after ulceration), where the ulcers were clinically measured to calculate the area and percentage of contraction (relation between initial and final area) and the weighed animals to calculate body mass variation. Histological slides were prepared for analysis through scores (presence or absence of epithelium and connective tissue repair) and histomorphometric (polymorphonuclear (PMN), mononuclear (MN), blood vessels (BV) and fibroblasts/myofibroblasts analysis. Picosirius Red staining was performed for collagen analysis and immunohistochemistry for CD31,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$  markers. For the statistical analysis, the GraphPad Prism® 5.0 *software* was used and the significance index  $p < 0.05$  was adopted in all evaluations. On the 15th day, the NTSC-Ob and Triamcinolone-Ob groups showed a smaller ulcer area and a higher percentage of contraction ( $p = 0.0061$ ), total re-epithelialization ( $p < 0.001$ ), best histological repair scores ( $p = 0.012$ ) and a lower number of PMN ( $p = 0.0029$ ) compared to the Ob group. Also on that day, the NTSC-Ob group showed a greater number of BV ( $p = 0.017$ ), greater deposition of total collagen, collagen type I and type III ( $p < 0, 05$ ) and higher expression of CD31,  $\alpha$ -SMA and TGF- $\beta$  ( $p < 0.05$ ) compared to the Ob and Triamcinolone-Ob groups. On the 20th day, the NTSC-Ob group obtained a greater weight gain in relation to the Ob and Triamcinolone-Ob groups ( $p < 0.0001$ ). It is concluded that NTSC in orabase optimizes the healing of traumatic ulcers by stimulating re-epithelialization, angiogenesis and collagenesis, with an important role of TGF- $\beta$  in this process.

**Keywords:** oral ulcers; collagen; wound healing; Nile tilapia.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 (Introdução geral)</b> - Etapas da cicatrização de feridas .....	15
<b>Figura 2 (Introdução geral)</b> - Participação de células inflamatórias em uma ferida ao longo do processo de cicatrização .....	17
<b>Figura 1 (Capítulo 1)</b> - Dias de experimento, indução da úlcera e eutanásia com coleta das amostras dos grupos experimentais .....	37
<b>Figura 2 (Capítulo 1)</b> - Perfil clínico de cicatrização de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos, nos diferentes grupos .....	42
<b>Figura 3 (Capítulo 1)</b> - Avaliação da variação de massa corpórea dos ratos ao longo do protocolo experimental, nos diferentes grupos .....	43
<b>Figura 4 (Capítulo 1)</b> - Perfil microscópico de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos ao longo do protocolo experimental, nos diferentes grupos .....	44
<b>Figura 5 (Capítulo 1)</b> - Avaliação histomorfométrica de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos, nos diferentes grupos .....	48
<b>Figura 6 (Capítulo 1)</b> - Perfil do colágeno de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos no 10º e 15º dia experimental, nos diferentes grupos .....	50
<b>Figura 7 (Capítulo 1)</b> - Perfil imunoistoquímico para CD31, $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos, no 15º dia experimental, nos diferentes grupos ...	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Avaliação histopatológica de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos ao longo do protocolo experimental, nos diferentes grupos .....	45
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -AML	Alfa - Actina de Músculo Liso
ADP	Adenosina Difosfato
CAT	Catalase
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
CPTN-Ob	Colágeno da Pele de Tilápia em Orabase
CSA	Colágeno Solubilizado por Ácido
DAB	Diaminobenzidina
DFP	Departamento de Fisiologia e Farmacologia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>do inglês, Desoxyribonucleic Acid</i> )
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico ( <i>do inglês, Epidermal Growth Factor</i> )
EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos ( <i>do inglês, Fibroblast Growth Factor</i> )
GSH	Glutathiona Reduzida
GPx	Glutathiona Peroxidase
HE	Hematoxilina-Eosina
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina - 1 Beta
IL-4	Interleucina - 4
IL-6	Interleucina - 6
IL-8	Interleucina – 8
IL-10	Interleucina - 10
IL-13	Interleucina - 13
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos ( <i>do inglês, Keratinocyte Growth Factor</i> )
LNP	Luz Não-Polarizada
LP	Luz Polarizada
LPS	Lipopolissacarídeos
MMPs	Metaloproteinases de Matriz

MN	Mononucleares
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos ( <i>do inglês, Neutrophil Extracellular Traps</i> )
NF- $\kappa$ B	Fator de Transcrição Nuclear – Kappa B ( <i>do inglês, Nuclear Factor – Kappa B</i> )
NO	Óxido Nítrico ( <i>do inglês, Nitric Oxide</i> )
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
Ob	Orabase
PBS	Solução Tampão de Fosfato ( <i>do inglês, Phosphate-Buffered Saline</i> )
PMN	Polimorfonucleares
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas ( <i>do inglês, Platelet-Derived Growth Factor</i> )
SOD	Superóxido Dismutase
TMA	Tissue Micro-Array
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Transformante – Beta ( <i>do inglês, Transforming Growth Factor – Beta</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral – Alfa ( <i>do inglês, Tumor Necrosis Factor – Alpha</i> )
UFC	Universidade Federal do Ceará
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular ( <i>do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\kappa$	Kappa
®	Marca Registrada
%	Porcentagem
&	Conjunção aditiva “e”
±	Mais-menos
<	Menor que
°C	Graus Celsius
mg	Miligrama
kg	Quilograma
$\pi$	Pi
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
pH	Potencial hidrogeniônico
$\mu\text{m}$	Micrômetro
cm	Centímetro
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Cicatrização de feridas.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.1 Fase inflamatória .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.2 Fase proliferativa.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.3 Fase de remodelação.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Úlceras traumáticas orais .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Tratamento de úlceras traumáticas orais.....</b>	<b>22</b>
<b>1.4 A pele de tilápia do Nilo .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 O colágeno da pele de tilápia .....</b>	<b>24</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>3 HIPÓTESES .....</b>	<b>27</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>28</b>
<b>4.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>28</b>
<b>5 CAPÍTULO .....</b>	<b>29</b>
<b>5.1 Capítulo 1 .....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO B – DECLARAÇÃO DE CORREÇÃO ORTOGRÁFICA .....</b>	<b>70</b>

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Cicatrização de feridas

As feridas, tanto cutâneas como orais, consistem em uma solução de continuidade do epitélio, com exposição de tecido conjuntivo, decorrentes de uma agressão por agentes mecânicos, térmicos, químicos ou biológicos ao tecido vivo. O processo cicatricial é o esforço dos tecidos para restaurar a função e estruturas normais (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

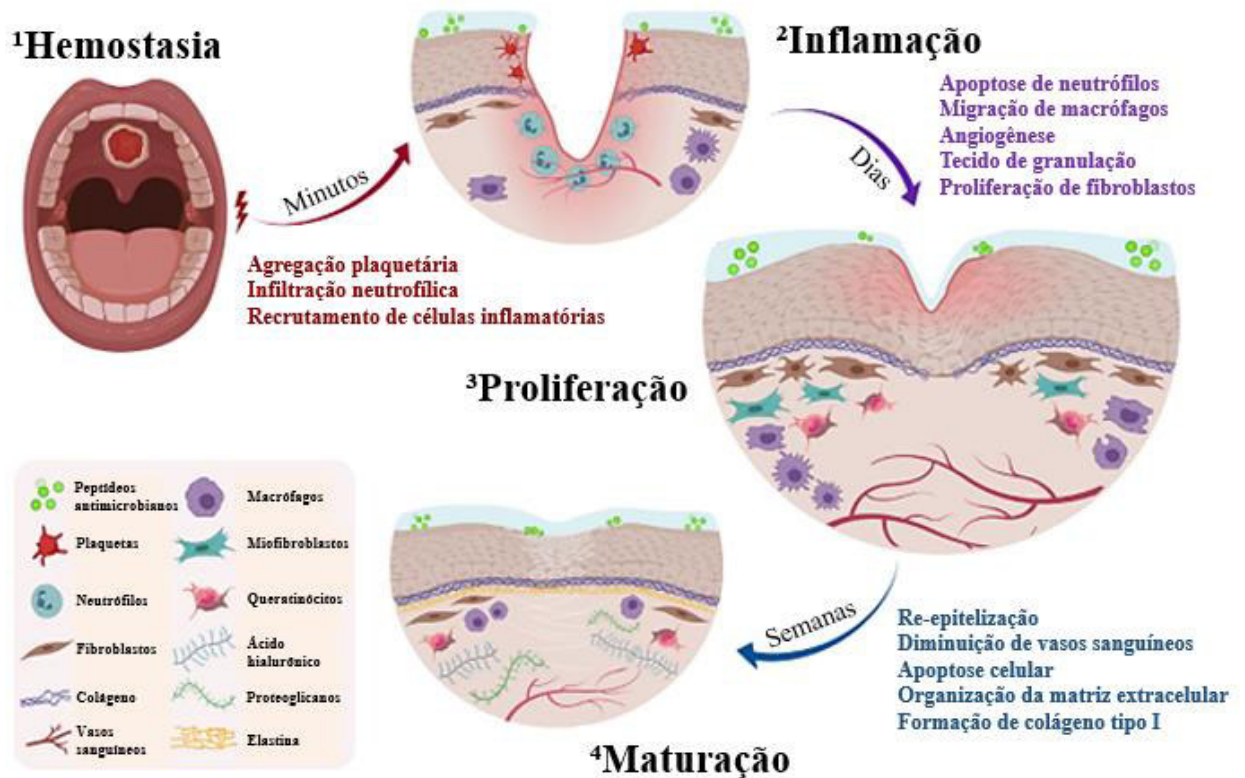
Após o surgimento de uma lesão, inicia-se o processo de reparação dessa ferida. O tecido lesionado pode passar por dois processos: regeneração ou cicatrização. A regeneração é a recuperação total da área injuriada, quando esta não compromete as células precursoras do epitélio e conjuntivo. Ocorre uma reorganização tecidual e substituição completa da população celular normal. Em humanos, a regeneração ocorre perfeitamente somente em fetos, sendo a cicatrização a principal forma de reparo tecidual (FERGUSON; O’KANE, 2004; EMING; MARTIN; TOMIC-CANIC, 2014).

A cicatrização consiste na reparação da arquitetura tecidual por meio da deposição de colágeno e da proliferação de tipos celulares, principalmente fibroblastos, resultando em uma cicatriz, no caso de feridas cutâneas (GURTNER et al., 2008). Esse processo é complexo e envolve populações celulares residentes e que migram para o local lesionado, sinais químicos e componentes da matriz extracelular (SINGER; CLARK, 1999).

As formas de cicatrização de feridas podem ser classificadas em primeira, segunda ou terceira intenção. A cicatrização por primeira intenção ocorre quando as extremidades da ferida ficam próximas uma da outra e podem ser suturadas, ocorrendo de forma mais rápida. A por segunda intenção é mais lenta e se dá quando há uma perda extensa de tecido, com as margens distantes umas das outras, sendo necessário a formação de tecido de granulação, contração e re-epitelização da lesão. A por terceira intenção, também chamada de cicatrização atrasada por primeira intenção, envolve o uso de medicamentos antibióticos para combater infecções na área lesionada, que deve permanecer aberta enquanto o organismo não reverter o quadro infeccioso (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

O processo fisiológico que envolve a cicatrização de feridas é dividido, basicamente, em 4 fases que se sobrepõem no curso temporal: Hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (VELNAR; BAILEY; SMRKOLI, 2009; GONZALEZ et al., 2016; CHENG et al., 2018) (Figura 1).

**Figura 1** Etapas da cicatrização de feridas.



Fonte: adaptado de TOMA et al. (2021).

### 1.1.1 Fase inflamatória

O reparo tecidual inicia-se com a fase inflamatória. Ela é precedida pela hemostasia, que é estabelecida a partir da constrição de vasos danificados imediatamente após a abertura da úlcera, a fim de evitar o sangramento excessivo, ocasionando hipóxia e acidose tecidual (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009). Estas condições favorecem a liberação de óxido nítrico (NO), adenosina difosfato (ADP) e outros metabólitos vasoativos, que juntamente com a histamina liberada por mastócitos promovem a vasodilatação para permitir que plaquetas e outros elementos



celulares alcancem a área lesionada (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). O plasminogênio, glicoproteína precursora da plasmina, participa ativamente de controles fisiológicos ligados à hemostasia sanguínea, como fibrinólise e trombólise. Além disso, estudos evidenciam que o sistema de ativação do plasminogênio está envolvido na cicatrização de feridas, sendo também responsável pela migração de queratinócitos durante o processo cicatricial bem como do aumento da expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (JUNCKER-JENSEN, LUND, 2011; SHEN, et al., 2012; CHENG et al., 2018).

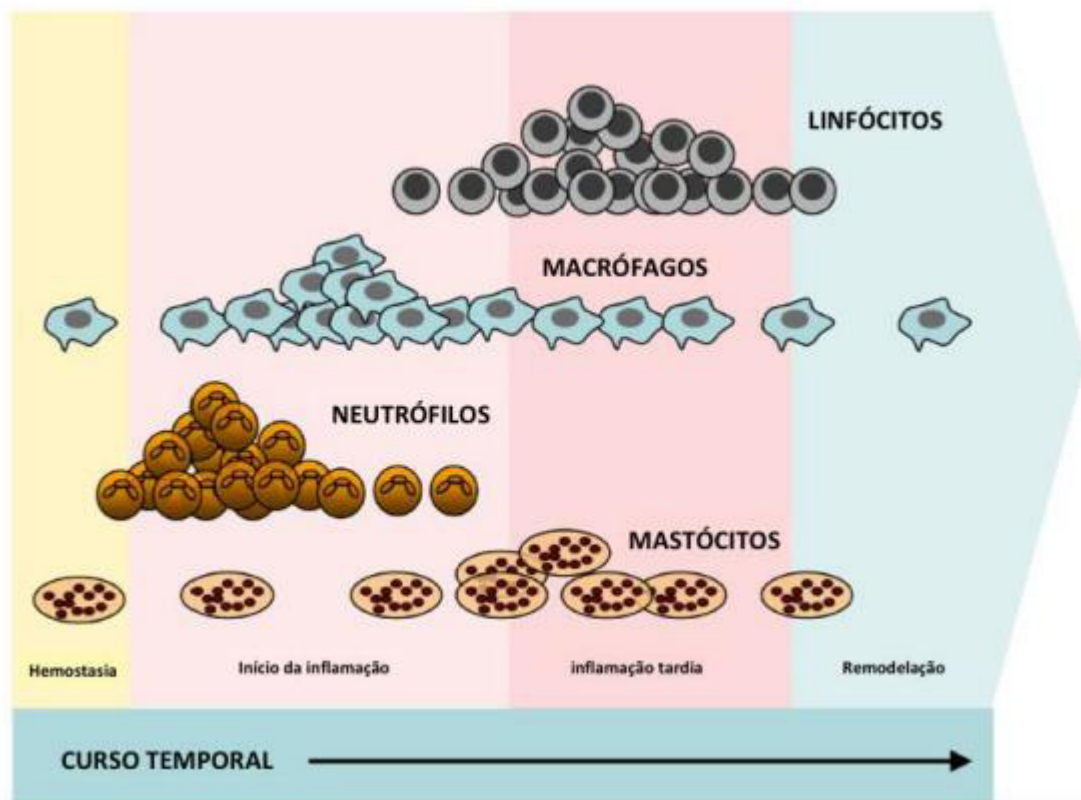
Concomitante a esse processo, ocorre a agregação plaquetária e a formação de um tampão de fibrina, decorrentes da ativação da cascata de coagulação sanguínea e do sistema complemento (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). A ativação das plaquetas pela trombina leva à liberação do conteúdo dos grânulos densos e alfa, que expressam receptores de adesão que facilitam a infiltração de leucócitos e liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, tais como: Interleucina 1 (IL-1), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), serotonina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento epidérmico (EGF) e VEGF (GOLEBIEWSKA; POOLE, 2015).

Na fase inflamatória aguda ocorre aumento da permeabilidade vascular, causando exsudação de plasma rico em proteínas para o tecido extravascular, ocasionando o edema (FREIRE; DYKE, 2013). A formação do edema é um processo que envolve a liberação de mediadores da dor, tais como NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , bradicinina e prostaglandinas, que estimulam os nociceptores, originando o processo doloroso. Tais feridas geralmente são associadas com dor intensa, sendo, portanto, um fator de desconforto para os portadores dessas lesões (SAKATA; ISSY, 2004).

No exsudato inflamatório há a presença de diversos leucócitos, com o perfil de infiltração se alterando conforme a evolução da cicatrização (Figura 2). Neutrófilos são as células predominantes no momento inicial da inflamação, surgindo cerca de 1 hora após a injúria, atraídos por fatores quimiotáticos liberados durante a hemostasia (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8). São células pequenas e de núcleo segmentado que agem eliminando patógenos e restos celulares consequentes da lesão por meio de: fagocitose; degranulação e liberação de uma variedade de substâncias tóxicas (mieloperoxidase, catepsina, lactoferrina); produção de “armadilhas” extracelulares (NETs) e de espécies reativas de oxigênio (EROs), potentes moléculas oxidantes de ação bactericida. Além disso, os neutrófilos também agem, por meio da liberação de quimiocinas, no recrutamento de

monócitos e ativação de macrófagos, na degradação e, posterior, reorganização da matriz extracelular por meio da liberação de metaloproteinasas de matriz (MMPs), além de secretar citocinas pró e anti-inflamatórias (por exemplo, IL-8 e IL-10, respectivamente) (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017; SELDERS et al., 2017). A população neutrofílica entra em declínio à medida que os patógenos e restos celulares vão sendo eliminados da ferida, geralmente em torno do 3º dia pós-injúria. A eliminação dos neutrófilos se dá por apoptose e subsequente fagocitose por macrófagos, que começam a se tornar predominantes no local lesionado (STRONCEK; BELL; REICHERT, 2008; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

**Figura 2** Participação de células inflamatórias em uma ferida ao longo do processo de cicatrização.



Fonte: Adaptado de KOH e DIPIETRO (2011).

Os monócitos representam somente 3% dos leucócitos circulantes e são recrutados, inicialmente, pela liberação de quimiocinas por neutrófilos. Ao chegarem na área da ferida, passam por um processo de diferenciação e ativação, convertendo-se em macrófagos, cujo pico de concentração se dá entre 48-72 horas após a injúria (KOH; DIPIETRO, 2011). A ativação dos macrófagos ocorre por dois mecanismos diferentes, originando dois fenótipos distintos: por meio da exposição a citocinas inflamatórias, interferons ou lipopolissacarídeos (LPS), dando origem ao macrófago M1; por meio da exposição às citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-13), gerando os macrófagos M2 (MAJTAN, 2014).

Os macrófagos do tipo M1 são classicamente ativados e recrutados para o leito da ferida a fim de que haja o debridamento e fagocitose dos restos celulares, enquanto os macrófagos do tipo M2 são responsáveis por reduzir os níveis de citocinas e fatores quimiotáticos pró-inflamatórios, além de liberar uma série de fatores de crescimento essenciais para a regulação da resposta inflamatória, angiogênese e formação de tecido de granulação. Essa transição de fenótipo dos macrófagos é importante para a redução de marcadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e fator de transcrição nuclear – kappa B (NF- $\kappa$ B), bem como pela maior produção de fatores de crescimento como TGF- $\beta$ , VEGF e Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF), essenciais para a fase proliferativa do processo cicatricial (MESZAROS; REICHNER; ALBINA, 2000; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011; RIDIANDRIES et al., 2018).

Ainda durante a fase aguda da inflamação, são produzidas, por macrófagos ativados e neutrófilos, as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs), potentes moléculas oxidantes que podem exercer papel duplo e antagônico: combatem patógenos que invadem o sítio da ferida durante a inflamação aguda, porém os seus acúmulos nos meios intra e extracelulares podem danificar membranas celulares, DNA e proteínas, podendo favorecer até mesmo o surgimento de tumores (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009). A fim de se manter a homeostase e balancear esses processos oxidativos, enzimas antioxidantes são produzidas, tais como glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (GUO; DIPIETRO, 2010; KUNKEMOELLER; KYRIAKIDES, 2017).

A fase inflamatória tardia é caracterizada pela infiltração de linfócitos T, estimulados pela liberação de IL-1 $\beta$ . Essas células desempenham um papel regulatório na inflamação e na fibrose, além de produzir o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) e estimular a proliferação

desses tipos celulares. Linfócitos T têm seu pico de concentração e atividade sobreposto às fases inflamatória tardia, proliferativa e início da remodelação tecidual (PORTOU et al., 2015). A fase inflamatória dura cerca de 4 dias, persistindo o tempo que for necessário, assegurando que o excesso de patógenos e restos celulares sejam removidos (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011; RIDIANDRIES et al., 2018).

### ***1.1.2 Fase proliferativa***

A fase proliferativa consiste na recuperação do tecido injuriado através da formação de tecido de granulação, angiogênese, deposição de colágeno, contração da ferida e re-epitelização, a partir, principalmente, da produção e liberação de fatores de crescimento pelos macrófagos (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011). O elemento central dessa fase é a formação do tecido de granulação, assim chamado pelo aspecto granular gerado pelos capilares neoformados no local da lesão, presença de células inflamatórias e endoteliais, fibroblastos e miofibroblastos arranjados em uma matriz frouxamente organizada que antecede o desenvolvimento do tecido cicatricial maduro (BEANES et al., 2003; CLARK et al., 2007).

Os fibroblastos são células do tecido conjuntivo que desempenham um papel essencial durante o processo de cicatrização. Essas células são atraídas por TGF- $\beta$ , FGF e PDGF liberados por células inflamatórias, principalmente macrófagos, e plaquetas. O FGF estimula a proliferação celular, enquanto o PDGF estimula a proliferação e ativação dos fibroblastos (CAMPOS; GROTH; BRANCO, 2008). Entre o 2º e 3º dia, a ferida se torna rica em fibroblastos, que começam a produzir fibronectina, proteoglicanos, ácido hialurônico e colágeno, componentes da matriz extracelular. Além disso, são responsáveis pela reorganização dessa matriz provisória e interação com queratinócitos (liberação de fatores de crescimento e citocinas) (THOMAS et al., 1995; ENOCH et al., 2008; GILL; PARKS, 2008; HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011).

O TGF- $\beta$  é considerado um mediador crítico do reparo tecidual, auxiliando na produção de novas fibras colágenas, processo conhecido como fibrose, por suprimir a produção de mediadores pró-inflamatórios que podem piorar a lesão tecidual, ao mesmo tempo que ativam miofibroblastos, células essenciais durante o processo de contração da úlcera (WANG et al., 2018; EMING; WYNN; MARTIN, 2017).

A contração da úlcera é um evento importante no processo cicatricial, onde ocorre uma tentativa de fechamento das bordas da ferida. Durante a formação do tecido de granulação,

fibroblastos são gradualmente diferenciados em miofibroblastos, estimulados, principalmente, por TGF- $\beta$  mediado via ativação Smad3, que regula a transcrição de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML), um importante marcador utilizado para detectar estas células. Esses filamentos de actina proporcionam aos miofibroblastos a capacidade de estender pseudópodes, prendendo-se ao colágeno da matriz extracelular, realizando fortes movimentos de retração celular (EMING; WYNN; MARTIN, 2017; MIA; BANK, 2016; WANG et al., 2018).

Durante a cicatrização, o aumento da atividade celular exige uma demanda maior de nutrientes. Assim, a formação de novos vasos (angiogênese) é de suma importância na recuperação do tecido e formação do tecido de granulação. Esse processo envolve alteração fenotípica de células endoteliais, migração e vários estímulos mitogênicos. Células endoteliais e macrófagos estimulam a produção e secreção de citocinas e fatores de crescimento (VEGF, PDGF, FGF e TGF- $\beta$ ). O VEGF é um agente mitogênico e que atua na proliferação e formação dos novos vasos sanguíneos (HARPER; YOUNG; MCNAUGHT, 2011; PORTOU et al., 2015). O CD31, conhecido como molécula de adesão de células endoteliais/plaquetas – 1 (PECAM-1), é uma glicoproteína transmembrânica que desempenha diferentes papéis na biologia vascular, incluindo a angiogênese, sendo um importante marcador para estudo desse processo (LI et al., 2005; KIM et al., 2010).

Dessa forma, macrófagos, fibroblastos e vasos sanguíneos são elementos essenciais que atuam de maneira interdependente durante essa fase. Os macrófagos estimulam a fibroplasia e angiogênese por serem fonte contínua da liberação de fatores de crescimento, enquanto fibroblastos atuam na construção da nova matriz extracelular, produzindo colágeno, glicosaminoglicanas e proteoglicanas, dando suporte para a chegada de novas células (WANG et al., 2018; EMING; WYNN; MARTIN, 2017).

O processo de re-epitelização é representado pela proliferação e migração de queratinócitos para a área lesionada. Fatores de crescimento como EGF, TGF- $\beta$  e KGF, liberados por fibroblastos e macrófagos, são importantes durante essa etapa (STOJADINOVIC et al., 2008; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

A migração de queratinócitos e contração da úlcera resultam na re-epitelização da ferida. O resultado da fase proliferativa é importante para a cicatrização, pois estabelece o suporte necessário para a remodelação do tecido conjuntivo (HARDING; PATEL, 2002; STRONCEK; BELL; REICHERT, 2009).

### ***1.1.3 Fase de remodelação***

A remodelação é a última fase da cicatrização de feridas e pode se estender por um longo período, chegando a ter duração de até 2 anos para completa reorganização da arquitetura celular e maturação tecidual. Nessa etapa, fibroblastos já formaram matriz extracelular suficiente e alguns diferenciam-se em miofibroblastos, que conectam fibronectina ao colágeno, auxiliando na contração da úlcera. Os vasos neoformados desaparecem gradualmente por meio de apoptose, emigração ou outros mecanismos (ARNOLD; WEST, 1991; SINGER; CLARK, 1999; SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

## **1.2 Úlceras traumáticas orais**

O epitélio da mucosa oral representa uma estrutura anatômica única e que tem a função de proteger os tecidos subjacentes de injúrias do meio externo, porém esta barreira protetora pode ser rompida por diversas causas. Úlceras traumáticas em cavidade oral são relativamente frequentes e resultam de injúrias, principalmente, mecânicas. São caracterizadas pela perda do tecido epitelial e exposição do tecido conjuntivo dentro da boca, podendo ser bastante dolorosas, gerando desconforto e, muitas vezes, dificultando a ingestão de líquidos e alimentos, interferindo diretamente na qualidade de vida do paciente. (LIMA, 2005; CAVALCANTE, 2011; ANDISHEH-TADBIR, 2020)

Clinicamente, as úlceras traumáticas costumam ser únicas e apresentam tamanhos e formas variáveis, sendo recobertas por uma pseudomembrana branco-acinzentada ou branco-amarelada, com um halo eritematoso persistente. Comumente, são localizadas em regiões que coincidem com algum agente traumático, como aparelho ortodôntico, bordas de dentes ou restaurações cortantes, ocorrendo com maior prevalência em mucosa jugal, borda lateral de língua, lábio, gengiva e palato duro. Normalmente, o tempo de duração varia de dias a semanas (LIMA, 2005; CAVALCANTE, 2011).

Quanto ao aspecto histopatológico, as ulcerações apresentam descontinuidade do epitélio e são recobertas por uma membrana fibrinogranulocítica com presença de neutrófilos. O tecido de granulação pode ser observado na base da úlcera, onde estão presentes linfócitos, histiócitos, neutrófilos e, ocasionalmente, plasmócitos. Esses aspectos inflamatórios variam de acordo com a fase de evolução da úlcera (CAVALCANTE et al, 2011).

Estudos demonstram a existência de uma classificação do perfil clínico de evolução das úlceras, podendo ser dividida em 4 estágios de progressão. O primeiro não apresenta nenhuma alteração clinicamente visível, porém é sintomático, caracterizado por dor, sensação pruriginosa e aspereza da mucosa nas primeiras 24 horas. O segundo estágio é a fase pré-ulcerativa, manifestada por eritema, mácula localizada com discreta elevação e de consistência dura, podendo ser solitária ou múltipla, e com sensação dolorosa variada. O terceiro estágio é ulcerativo, onde ocorre uma necrose da membrana superficial, mostrando-se esbranquiçada. Essa mudança ocorre num período de 1 a 3 dias, onde forma-se sobre o assoalho da úlcera um exsudato fibrinoso e branco-amarelado. Em seu último estágio, o quarto, inicia-se a fase de reparo, que ocorre espontaneamente (CAVALCANTE, 2011).

### **1.3 Tratamento de úlceras traumáticas orais**

Alguns tratamentos são propostos na literatura para que haja um alívio no desconforto causado pelo aparecimento de úlceras traumáticas em mucosa oral, buscando devolver ao paciente principalmente a função mastigatória. Em relação ao tratamento farmacológico, observa-se uma ampla utilização de terapias tópicas, como: Analgésicos, antissépticos e antibióticos locais, sendo a administração de corticosteroides o mais utilizado, que são aplicados na forma tópica de orabase, como uma formulação de carboximetilcelulose, polietileno e óleo mineral, que conferem maior adesão à mucosa e resistência à dissolução e deslocamento. Entretanto, não há um consenso no que diz respeito a eficácia desses medicamentos, já que muitos desses agentes não foram devidamente avaliados e são utilizados de forma empírica, não existindo um protocolo definido para o tratamento dessas lesões (LIMA, 2005; CAVALCANTE, 2011).

Portanto, aumenta a necessidade de novas abordagens para avaliação e tratamento das feridas, na qual os produtos naturais vêm ganhando destaque. Produtos de origem animal (Pele da tilápia) tem sido apontado como alternativas para o tratamento de feridas pelo seu potencial terapêutico. (ALVES et al., 2015).

### **1.4 A pele de tilápia do Nilo**

Nos últimos anos, o interesse na pesquisa em tecidos de origem animal como curativos biológicos tem se intensificado. Pele de porco, pele de rã, pericárdio bovino e camada submucosa

de intestino de porco são exemplos de tais tecidos que são utilizados como curativos em lesões por queimaduras. Todavia, esses materiais devem ser submetidos a rigorosos protocolos, para se avaliar os seus reais efeitos e mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, além de sua eficácia e biocompatibilidade. (ALVES et al., 2015)

Dentre os tecidos de origem animal que são detentores de potenciais biológicos, destaca-se a pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), um possível subproduto com aplicabilidade clínica. Pertence à família dos ciclídeos, originária da bacia do rio Nilo, no leste da África, encontrando-se amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. No Ceará, a piscicultura da tilápia é praticada em diversos reservatórios, nas principais bacias hidrográficas do Estado, sendo a cidade de Itarema, seu principal produtor. (ALVES et al., 2015; LIMA-JUNIOR et al., 2017; ALVES et al., 2018) A pele desse peixe é um produto de alta qualidade e que vem sendo utilizada como curativo biológico de queimaduras e feridas em pele, devido às suas positivas propriedades físicas (resistência à tração), boa aderência ao leito da ferida e melhora no processo de cicatrização. (FRANCO et al., 2013; ALVES et al., 2015; LIMA-JUNIOR et al., 2017; HU et al., 2017; ZHOU et al., 2017) Estudos em pele de animais mostraram que o padrão de cicatrização através da pele de tilápia foi satisfatório devido a sua capacidade de obstruir a ferida, minimizando exsudatos e formação de crostas. Além disso, foram encontradas reações inflamatórias de intensidade leve a moderada nas feridas recobertas pela pele de tilápia, com fenótipo mononuclear (histiolinfoplasmocitário), interferindo positivamente no processo de cicatrização, confirmando o benefício de sua utilização. (LIMA-JUNIOR et al., 2017)

Diversos estudos histológicos da pele demonstraram uma epiderme revestida por epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno. O colágeno é um dos principais componentes dos biomateriais, devido à sua característica de orientar as células, a cicatrização e de definir a maioria dos tecidos, além de ser biocompatível, favorecendo a sua aplicação. Isso se confirma pelo fato de a pele da tilápia apresentar uma boa quantidade de colágeno tipo I. (FRANCO et al., 2013; ALVES et al., 2015; LIMA-JUNIOR et al., 2017; SUN et al., 2017; BI et al., 2019; CHEN et al., 2019; SONG et al., 2019).



## 1.5 O colágeno da pele de tilápia

A família do colágeno é composta por mais de 20 tipos geneticamente diferentes. O colágeno do tipo I forma fibras espessas, mecanicamente estáveis e responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. O colágeno do tipo III forma fibrilas e, ao contrário do colágeno do tipo I, são menos resistentes (ALVES et al., 2015).

A maioria dos biomateriais, como pericárdio de porco, apresenta grande quantidade de colágeno do tipo I (47%), do mesmo modo que a pele de tilápia, como evidenciado no estudo de Alves et al. (2015), mostrando uma quantidade em torno de 57%. O colágeno do tipo I apresenta uma estrutura caracterizada por um tripeptídeo, no qual há, frequentemente, glicina, prolina e hidroxiprolina. Sugere-se que este tipo de colágeno possua grande quantidade de grupos reativos, como aminas, ácidos carboxílicos e hidroxilas alcoólicas, que possibilitam alterações químicas dos tecidos, principalmente através de reticulação e hidrólise seletiva, aumentando sua adaptação aos outros tecidos.

Nos últimos anos, a extração e aplicação do colágeno da pele de tilápia têm gerado extensos estudos. Zhang et al. (2016), demonstraram que a administração de colágeno do tipo I derivado da tilápia apresenta baixa toxicidade e excelente biocompatibilidade *in vivo* para sua ampla aplicação em fins biomédicos. Yamamoto et al. (2014), comprovaram que todas as avaliações de sensibilização, toxicidade celular, reações intracutâneas, toxicidade sistêmica aguda e aberrações cromossômicas foram negativas. El-Rashidy et al. (2015), prepararam hidrogéis do colágeno da pele de tilápia do Nilo a 0,3 e 0,5 % e provaram que ambos apresentaram boa biocompatibilidade. Zhou et al. (2015), descobriram que as nanofibras biomiméticas de colágeno da tilápia podem promover efeitos curativos por meio da indução da diferenciação de queratinócitos e síntese de colágeno de fibroblastos dérmicos. Além disso, estudos prévios demonstraram que o colágeno tipo I da pele da tilápia estimula FGF e KGF, duas citocinas importantes para o fechamento de feridas (ALVES et al., 2015; TANG; SAITO, 2015; LIMA-JUNIOR et al., 2017; CHEN et al., 2019; ELBIALY et al., 2020).

Vale ressaltar que os estudos existentes com esses materiais buscaram avaliar o seu potencial de cicatrização e seu mecanismo de ação em feridas e queimaduras de pele, não existindo, na literatura, pesquisas que analisem essa capacidade em úlceras traumáticas de mucosa oral, onde esse processo ocorre de forma distinta. Sabe-se que feridas orais cicatrizam de forma mais

acelerada em comparação a feridas de pele, onde estudos *in-vitro* e com modelos animais têm atribuído isso a uma variedade de mecanismos, incluindo resposta inflamatória diferencial, modulação distinta de células tronco e remodelação epitelial mais eficiente (IGLESIAS-BARTOLOME et al., 2018).

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, várias pesquisas evidenciam o amplo efeito biológico do colágeno da pele de tilápia, principalmente, no que se refere à atividade cicatrizante. Desse modo, é de fundamental importância o entendimento do seu mecanismo de ação, propriedades e uso terapêutico.

Se de um lado alguns trabalhos na literatura abordam o potencial de reparação tecidual da pele de tilápia em feridas de pele, de outro, essa capacidade é pouco explorada em úlceras orais de ordem traumática, não existindo estudos que analisem essa relação.

As úlceras orais são causadas por diversos fatores locais ou sistêmicos, podem ser, por vezes severas e debilitantes, e não possuem um tratamento padronizado. Diversos fármacos são utilizados na terapia destas feridas, porém não há um consenso na literatura com relação às suas eficácias, não existindo protocolo definido para tratamento. Nesse contexto, o colágeno da pele de tilápia surge como um possível produto de origem animal, de baixo custo, adequada estabilidade, fácil acesso e excelente biocompatibilidade.

A partir disso, justifica-se a necessidade de uma maior exploração e comprovação das propriedades biológicas do colágeno extraído da pele de tilápia, as quais podem contribuir como ferramenta no tratamento de lesões orais (como as úlceras traumáticas).

### **3 HIPÓTESES**

Hipótese alternativa – O colágeno da pele de tilápia em orabase altera o processo de cicatrização de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos.

Hipótese nula – O colágeno da pele de tilápia em orabase não altera o processo de cicatrização de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo em um modelo de úlceras traumáticas induzidas em mucosa jugal de ratos.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Analisar o perfil macroscópico in situ e histológico de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos tratados com o colágeno extraído da pele de tilápia;
- Avaliar a variação de peso durante o curso temporal das úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos tratados com o colágeno extraído da pele de tilápia;
- Quantificar o infiltrado inflamatório, a fibroplasia e vasos sanguíneos das úlceras traumáticas induzidas em mucosa jugal de ratos tratados com o colágeno extraído da pele de tilápia;
- Avaliar a deposição de colágeno na região das úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos tratados com o colágeno extraído da pele de tilápia;
- Avaliar os marcadores de reparo tecidual ( $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ ) e de vasos sanguíneos (CD31), através de imunistoquímica, em úlceras traumáticas induzidas em mucosa jugal de ratos tratados com o colágeno extraído da pele de tilápia.

## 5 CAPÍTULO

Esta dissertação está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de mestrado e doutorado (dissertações e teses) e permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato.

Por se tratar de pesquisa envolvendo animais, os protocolos utilizados, neste trabalho, foram submetidos à apreciação e foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, tendo sido aprovados e protocolados sob o nº 8063020519 (vide anexo).

Dessa forma, a presente dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com a revista científica escolhida.

### 5.1 Capítulo 1

“Avaliação do potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo em úlceras traumáticas de mucosa jugal em ratos” (Evaluation of the healing potential of collagen extracted from Nile tilapia skin in traumatic ulcers of the jugal mucosa in rats).

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico:

*Archives of Oral Biology*

ISSN: 0003-9969

**Title page**

**Título:** Avaliação do potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo em úlceras traumáticas de mucosa jugal em ratos.

**Autores:** Guilherme Costa Soares<sup>a</sup>, Ana Paula Negreiros Nunes Alves<sup>a</sup>, Paulo Goberlânio de Barros Silva<sup>b,c</sup>, Edmar Maciel Lima Júnior<sup>d</sup>, Manoel Odorico de Moraes Filho<sup>e</sup>, Carlos Roberto Koscky Paier<sup>e</sup>, Felipe Augusto Rocha Rodrigues<sup>e</sup>, Mário Rogério Lima Mota<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Clínica Odontológica, Laboratório de Patologia Bucal, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Odontologia, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto do Câncer do Ceará, Hospital Haroldo Juaçaba, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>d</sup> Centro de Tratamento de Queimados, Instituto Dr. José Frota, Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>e</sup> Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

\*Autor de correspondência: PhD. MSc. DDS. Mário Rogério Lima Mota

Departamento de Clínica Odontológica

Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

Universidade Federal do Ceará

Rua Monsenhor Furtado, 1273 - Rodolfo Teófilo – Cep 60416-030

Fortaleza - CE, Brasil.

Telefone: +55 85 3366 8232

E-mail: mariolmota@yahoo.com.br

**Título curto:** Colágeno de tilapia cicatriza úlcera oral.

**Palavras-chave:** Úlceras Orais, Colágeno, Cicatrização, Tilápia do Nilo.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Todos os autores concordaram com a submissão.

*Highlights*

- O colágeno da tilápia otimiza o reparo de úlceras orais em ratos.
- O colágeno da tilápia reduz o tamanho e melhora o perfil histológico de úlceras orais em ratos.
- O colágeno da tilápia estimula angiogênese e colagênese em úlceras orais de ratos.



## Resumo

**Objetivo:** Avaliar o potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo (CPTN) em modelo experimental de úlceras traumáticas orais em ratos.

**Metodologia:** 120 ratos Wistar machos foram divididos em três grupos experimentais (n=8/grupo). Realizou-se indução de úlceras traumáticas através de punch dermatológico em mucosa jugal esquerda, sendo os animais eutanasiados nos dias 1, 5, 10, 15 e 20, após ulceração. Os grupos foram tratados topicamente, 2x/dia, com: CPTN 1% em orabase (CPTN-Ob), orabase sem colágeno (Ob) e triancinolona acetona em orabase (Triancinolona-Ob). Mensurou-se área e contração das úlceras, variação de massa corpórea dos animais e foram confeccionadas lâminas para análise histológica e histomorfométrica. Coloração de Picrosirius Red foi realizada para análise do colágeno e imunistoquímica para os marcadores CD31,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ .

**Resultados:** No 15º dia, os grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob mostraram menor área de úlcera e maior percentual de contração (p=0,0061), total re-epitelização (p<0,001), melhores escores histológicos de reparo (p=0,012) e menor número de polimorfonucleares (p=0,0029) comparado ao grupo Ob. Ainda nesse dia, o grupo CPTN-Ob mostrou um maior número de vasos sanguíneos (p=0,017), maior deposição de colágeno total, colágeno tipo I e III (p<0,05) e maior expressão de CD31,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  (p<0,05) comparado aos grupos Ob e Triancinolona-Ob. No 20º dia, o grupo CPTN-Ob obteve um maior ganho de peso em relação aos grupos Ob e Triancinolona-Ob (p<0,0001).

**Conclusões:** O CPTN em orabase otimiza a cicatrização de úlceras traumáticas por estimular re-epitelização, angiogênese e colagênese, com importante papel do TGF- $\beta$  nesse processo.

**Palavras-chave:** Úlceras orais; Colágeno; Cicatrização; Tilápia.

## 1. Introdução

O epitélio da mucosa oral representa uma estrutura anatômica única e que tem a função de proteger os tecidos subjacentes de injúrias do meio externo, porém esta barreira protetora pode ser rompida por diversas causas. Úlceras traumáticas em cavidade oral são relativamente frequentes e resultam de injúrias, principalmente, mecânicas. São caracterizadas pela perda do tecido epitelial e exposição do tecido conjuntivo dentro da boca, podendo ser bastante dolorosas, gerando desconforto e, muitas vezes, dificultando a ingestão de líquidos e alimentos, interferindo diretamente na qualidade de vida do paciente (Lima, Grégio, Tanaka, Machado & França, 2005; Cavalcante et al., 2011; Andisheh-Tadbir, Yaghoubi, Tanideh & Mardani, 2020).

Clinicamente, as úlceras traumáticas costumam ser únicas e apresentam tamanhos e formas variáveis, sendo recobertas por uma pseudomembrana branco-acinzentada ou branco-amarelada, com um halo eritematoso persistente. Comumente, são localizadas em regiões que coincidem com algum agente traumático, como aparelho ortodôntico, bordas de dentes ou restaurações cortantes, ocorrendo com maior prevalência em mucosa jugal, borda lateral de língua, lábio, gengiva e palato duro. Normalmente, o tempo de duração varia de dias a semanas (Lima, Grégio, Tanaka, Machado & França, 2005; Cavalcante et al., 2011).

Quanto ao aspecto histopatológico, as ulcerações apresentam descontinuidade do epitélio e são recobertas por uma membrana fibrinogranulocítica com presença de neutrófilos. O tecido de granulação pode ser observado na base da úlcera, onde estão presentes linfócitos, histiócitos, neutrófilos e, ocasionalmente, plasmócitos. Esses aspectos inflamatórios variam de acordo com a fase de evolução da úlcera (Cavalcante et al., 2011).

A cicatrização de úlceras, de maneira geral, é dividida em 4 fases sobrepostas: Hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, que envolvem diferentes tipos celulares (neutrófilos, macrófagos, linfócitos, mastócitos e fibroblastos) e componentes da matriz extracelular (fibronectina, proteoglicanos e colágeno) (Gonzalez et al., 2016; Cheng et al., 2018). Esse processo é iniciado pelo extravasamento de constituintes do sangue, agregação plaquetária e migração de células inflamatórias, principalmente neutrófilos (24-48h), para o local da ferida. Após 5 dias, macrófagos ativados produzem fatores de crescimento e citocinas inflamatórias [Interleucina 1-beta (IL-1 $\beta$ ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento transformante-beta (TGF- $\beta$ )] que desempenham um papel modulador, como estimulação do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), síntese, quebra

de proteínas da matriz extracelular e quimiotaxia de fibroblastos (Koh & Dipietro, 2011; Ridiandries, Tan & Bursill, 2018). A transição da fase inflamatória para proliferativa é caracterizada pela migração e proliferação de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, seguido por angiogênese, levando à re-epitelização e formação de tecido de granulação. Durante essa etapa, fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, estimulados, principalmente, por TGF- $\beta$  mediado via ativação Smad3, que regula a transcrição de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -AML), um importante marcador utilizado para detectar estas células. Assim, possuem características contráteis e auxiliam no fechamento de feridas. Na fase de remodelação, há uma tentativa de recuperação dos tecidos normais pela redução da celularidade e vascularização, além da deposição de colágeno (Muthukumar, Anbarasu, Prakash & Sastry, 2014; Portou et al., 2015; Mia & Bank, 2016; Eming, Wynn & Martin, 2017; Wang et al., 2018).

Alguns tratamentos são propostos na literatura para que haja um alívio no desconforto causado pelo aparecimento dessas lesões. Em relação ao tratamento farmacológico, observa-se uma ampla utilização de terapias tópicas, como: Analgésicos, antissépticos e antibióticos locais, sendo a administração de corticosteroides o mais utilizado, porém não há um consenso no que diz respeito a eficácia desses medicamentos, já que muitos desses agentes não foram devidamente avaliados e são utilizados de forma empírica, não existindo um protocolo definido para o tratamento dessas lesões (Lima, Grégio, Tanaka, Machado & França, 2005; Cavalcante et al., 2011). Portanto, aumenta a necessidade de novas abordagens para avaliação e tratamento das feridas, na qual os produtos naturais vêm ganhando destaque. Produtos de origem animal tem sido apontado como alternativas para o tratamento de feridas pelo seu potencial terapêutico (Alves et al., 2015).

Dentre os tecidos de origem animal que são detentores de potenciais biológicos, destaca-se a pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencente à família dos ciclídeos, originária da bacia do rio Nilo, no leste da África, encontrando-se amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais. A pele desse peixe é um produto de alta qualidade e que vem sendo utilizada como curativo biológico de queimaduras e feridas em pele, devido às suas positivas propriedades físicas (resistência à tração), boa aderência ao leito da ferida e melhora no processo de cicatrização (Franco et al., 2013; Alves et al., 2015; Lima-Júnior et al., 2017; Hu, Yang, Zhou, Li & Hong, 2017; Zhou, Sui, Mo & Sun, 2017).

Diversos estudos histológicos da pele demonstraram uma epiderme revestida por epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno. O colágeno é um dos

principais componentes dos biomateriais, devido à sua característica de orientar as células, a cicatrização e de definir a maioria dos tecidos, além de ser biocompatível, favorecendo a sua aplicação. Isso se confirma pelo fato de a pele da tilápia apresentar uma boa quantidade de colágeno tipo I (Franco et al., 2013; Alves et al., 2015; Lima-Júnior et al., 2017; Sun, Hou, Li & Zhang, 2017; Bi et al., 2019; Chen et al., 2019; Song, Liu, Sun, Li & Hou, 2019). Estudos prévios demonstraram que o colágeno tipo I da pele da tilápia estimula Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF) e Fatores de Crescimento de Queratinócitos (KGF), duas citocinas importantes para o fechamento de feridas (Alves et al., 2015; Tang & Saito, 2015; Zhou et al., 2016; Lima-Júnior et al., 2017; Chen et al., 2019).

Vale ressaltar que os estudos existentes com esses materiais buscaram avaliar o seu potencial de cicatrização e seu mecanismo de ação em feridas e queimaduras de pele, não existindo, na literatura, pesquisas que analisem essa capacidade em úlceras traumáticas de mucosa oral, onde esse processo ocorre de forma distinta. Sabe-se que feridas orais cicatrizam de forma mais acelerada em comparação a feridas de pele, onde estudos *in-vitro* e com modelos animais têm atribuído isso a uma variedade de mecanismos, incluindo resposta inflamatória diferencial, modulação distinta de células tronco e remodelação epitelial mais eficiente (Iglesias-Bartolome et al., 2018).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo (CPTN) em um modelo experimental de úlceras traumáticas orais induzidas em ratos.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1 Animais e princípios éticos*

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob protocolo de número 8063020519, para, com base nos princípios da National Center for the Replacement & Reduction of Animals in Research minimizar o uso e sofrimento dos animais durante experimentação. 120 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) adultos machos da linhagem Wistar (2-3 meses), pesando entre 180 e 200 gramas, adquiridos do Biotério da UFC, foram mantidos em gaiolas 16 x 25 x 37 cm no Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da UFC e abrigados a 24°C em ciclo luz-escuro de 12 horas, com acesso irrestrito a água e a alimento. O cálculo amostral baseou-se no estudo de

Lima-Júnior et al. (2017), que observou que ratos submetidos a modelo de queimadura em dorso cujas feridas foram lavadas com sulfadiazina de prata observou-se que os animais tratados com a pele da tilápia apresentaram menor quantidade de leucócitos totais circulantes ( $9,10 \pm 1,17$ ) quando comparado aos animais com feridas abertas ( $10,64 \pm 1,11$ ). Baseado nesses dados, estimou-se necessário avaliar 8 animais por grupo de estudo, a fim de obter uma amostra que represente com 80% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho.

## *2.2 Obtenção do colágeno extraído da pele de tilápia e manipulação em orabase*

O CPTN foi obtido do NPDM-UFC, o qual foi preparado na forma liofilizada. A pele foi lavada em soro fisiológico e cortada em pequenos pedaços (aprox. 1,0 x 1,0 cm). Os pedaços foram incubados em solução alcalina para a retirada de proteínas não colagenosas e em mistura de butanol/água para retirada de substâncias apolares, como lipídeos e metabólitos diversos. As peles foram incubadas e reincubadas em solução de ácido acético para extração de colágeno solubilizado por ácido (CSA), posteriormente, o CSA foi precipitado em tampão Tris-HCl pH 7,5 com alta concentração de cloreto de sódio (precipitação veículo ou salting-out). Finalmente, o colágeno precipitado foi ressolubilizado em solução de ácido acético e dialisado contra soluções com concentrações decrescentes desse mesmo ácido, até que a diálise fosse realizada em água. O colágeno dialisado, transparente e gelatinoso, foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  e liofilizado para obtenção de uma lâmina fibrosa de cor branca. Todo processo foi realizado sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e agitação contínua (Nalinanon, Benjakul & Kishimura, 2010)

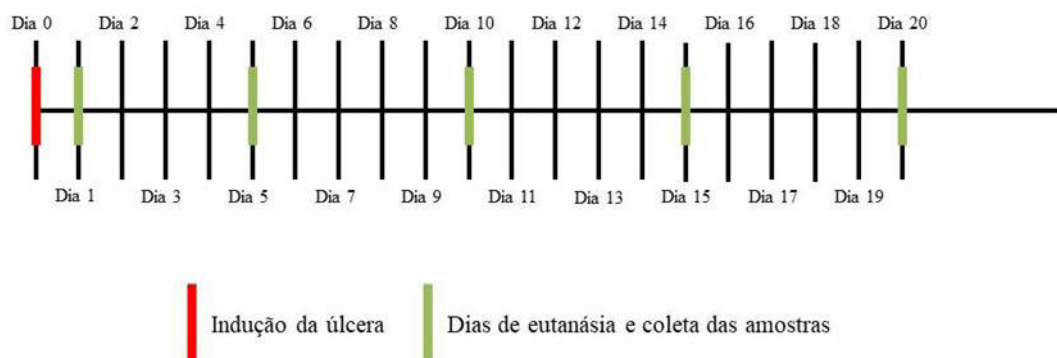
Para a formulação em apresentação de orabase, o colágeno liofilizado foi incorporado a uma base composta de gelatina, pectina e carboximetilcelulose de sódio e então, adicionados a uma plastibase (composta de polietileno e óleo mineral), sendo utilizado na concentração de 1%, concentração máxima para manter a formulação estabilizada, baseado em experiências prévias de formulação de hidrogel de carboximetilcelulose enriquecidos com colágeno de tilápia e estudos com formulações utilizando colágeno extraído de outros peixes (Muthukumar, Prabu, Ghosh & Sastry, 2014). Para isso, foram pesados os componentes da formulação (colágeno liofilizado, gelatina, pectina e carboximetilcelulose de sódio) e logo após a pesagem, foram moídos em um almofariz. Em seguida, foram incorporados à plastibase (Unigel) e embalados e etiquetados (Appel & Moura, 2006).

### 2.3 Grupos experimentais e protocolo de indução das úlceras traumáticas

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: Um grupo controle negativo tratado com orabase sem o colágeno (Grupo Ob), um grupo controle positivo tratado com Triancinolona acetona (Oncilom-A<sup>®</sup>) em orabase (Grupo Triancinolona-Ob) e um grupo teste tratado com CPTN a 1% em orabase (Grupo CPTN-Ob).

Os animais foram anestesiados através de uma solução com xilazina 10 mg/kg e quetamina 80 mg/kg (intraperitoneal), seguido de assepsia da mucosa (clorexidina 0,12%) e confecção de úlcera, em mucosa jugal esquerda por abrasão da região com punch dermatológico circular com 8mm de diâmetro e 2mm de profundidade (Rhosse<sup>®</sup>), realizado de forma randomizada entre os animais. O tecido remanescente foi excisado utilizando lâmina n° 15 em cabo de bisturi de Bard Parker convencional e os animais permaneceram em observação até recobrem os reflexos (Mesquita et al., 2020).

A indução da úlcera ocorreu no dia 0 e as eutanásias nos dias 1, 5, 10, 15 e 20. (Brizeno et al., 2013) A administração tópica foi realizada diariamente, durante todo o curso temporal do protocolo, em quantidade de 1mg de cada formulação nos três grupos, a cada 12 horas/dia, iniciando uma hora após a indução da úlcera até a eutanásia (Fig. 1). Para a administração, foi utilizado uma espátula de inserção n°1. Os animais foram eutanasiados (Xilazina 30 mg/kg + quetamina 240 mg/kg intraperitoneal) em número de 8/grupo/dia experimental, obtendo-se amostras para fixação em formol 10% tamponado.



**Fig. 1.** Dias de experimento, indução da úlcera e eutanásia com coleta das amostras dos grupos experimentais

#### *2.4 Análise clínica: Área das úlceras, percentual de contração e variação de massa corpórea*

Nos dias da eutanásia, as úlceras foram removidas e medidas com paquímetro digital (Digimess®) com 0,01mm de precisão no maior e no menor diâmetro ( $D$  = maior diâmetro e  $d$  = menor diâmetro) para o cálculo da área ( $A = \pi \times d \times D / 4$ ) de úlcera. A área de contração da úlcera foi calculada utilizando a equação  $100 \times (W_i - W_o) / W_o$  ( $W_o$  = área inicial;  $W_i$  = área final) e expresso como porcentagem de contração. Além disso, os animais foram pesados no dia de indução da úlcera e no dia de eutanásia para cálculo da variação percentual de massa corpórea [ $100 \times (\text{Massa final} - \text{Massa inicial}) / \text{Massa inicial}$ ]. (Brizeno et al., 2016)

#### *2.5 Análise histológica*

Após fixação, os fragmentos colhidos da mucosa jugal, nos dias da eutanásia, foram imersos em formol 10% tamponado, analisados macroscopicamente e submetidos a processamento histológico para coloração com hematoxilina-eosina (HE). A análise foi realizada através de um microscópio óptico (DM2000, Leica®) acoplado a câmera (DFC295, Leica®) por meio de escores histopatológicos, divididos em “Alterações do tecido epitelial” (0 = Ausência de úlcera; 1 = Presença de úlcera) e “Alterações no tecido conjuntivo” (0 = Tecido conjuntivo remodelado; 1 = Fibrose/Presença de discretas células inflamatórias mononucleares dispersas; 2 = Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório mononuclear leve; 3 = Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório mononuclear moderado ou intenso; 4 = Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório misto (agudo e crônico); 5 = Processo agudo (Vasos ectásicos, edema, presença de infiltrado inflamatório, predominantemente, neutrofílico) (adaptado de Cavalcante et al., 2011)

#### *2.6 Análise histomorfométrica: Avaliação do infiltrado inflamatório, densidade vascular e contagem de fibroblastos/miofibroblastos*

Após análise semiquantitativa, cinco campos de cada lâmina corada por HE foram previamente selecionados em áreas próximas às regiões ulceradas, e fotografados utilizando o mesmo sistema em um aumento de 400x. Neutrófilos polimorfonucleares (leucócitos de núcleo segmentado e morfologia multilobulada), células mononucleares (leucócitos de núcleo não lobulados), vasos sanguíneos (sendo excluídos brotos endoteliais) e fibroblastos/miofibroblastos (células com características morfológicas fusiformes) foram contados no sentido epitélio - tecido

conjuntivo. A contagem desses parâmetros foi realizada através da ferramenta “Cell Counter” do software ImageJ®, sendo a soma dos campos considerada unidade amostral para análise estatística (Brizeno et al., 2013).

### *2.7 Análise histoquímica: Coloração de Picrosirius Red e avaliação do colágeno*

Lâminas foram confeccionadas através de cortes de 3 µm dos blocos para coloração por Picrosirius Red para quantificação do colágeno. Após desparafinização e reidratação, as lâminas foram incubadas em solução de Picrosirius Red (ScyTek®) por 30 minutos, banhadas em ácido clorídrico 5%, e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos. Foram selecionados igualmente cinco campos em um aumento de 200x no tecido conjuntivo, fotografados em luz convencional e polarizada e realizado a quantificação do colágeno total e das regiões com birrefringência amarelo-avermelhadas (fibras espessas tipo I) utilizando o comando Color Thresold do software Image J® (RSB), no qual foram ajustadas as escalas de cores para o vermelho (mínimo: 0, máximo: 255), verde (mínimo: 0, máximo: 255) e azul (mínimo: 0, máximo: 32). Para a quantificação da área com birrefringência verde-esbranquiçada (fibras delgadas do tipo III), foi realizado a subtração da área de colágeno total com a área correspondente à birrefringência amarelo-avermelhada (Oliveira et al. 2016).

### *2.8 Arranjo em matriz de imunoistoquímica de amostras teciduais – TMA (tissue microarray) e análise imunoistoquímica*

Após as avaliações macroscópicas e microscópicas foram escolhidos os dias para avaliação dos marcadores inflamatórios possivelmente envolvidos no efeito do colágeno extraído da pele de tilápia. Os blocos dos animais de todos os grupos do 15º dia tiveram área representativa utilizada para a confecção de blocos de TMA através do dispositivo “tissue microarrayer” (Quick-Ray UNITMA®). Após confecção dos blocos, foram realizados cortes de 3µm sobre lâminas silanizadas para reação através da técnica da estreptoavidina-biotinilada.

Após desparafinização e reidratação, foi realizada recuperação antigênica, de acordo com as recomendações do fabricante, em banho maria por 45 minutos e, após resfriamento e lavagens em Solução Tampão de Fosfato (PBS) foram submetidas a bloqueio da peroxidase endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%). Foi realizada incubação com os anticorpos primários anti-CD31 (1:2000; ab182981; Abcam®), anti-Alfa actina de músculo liso (α-AML) (1:400; ab32575; Abcam®) e anti-



Fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (1:300; ab92486; Abcam®) overnight, e após incubação com anticorpo secundário livre de biotina (polímero HRP, Dako®) durante 30 minutos foi realizada revelação com diaminobenzidina (DAB, Abcam®) por 5 minutos e contra-coloração com hematoxilina de Harris por 10 segundos. Para controle positivo, utilizaram-se as recomendações da bula de cada anticorpo. Incubação com diluente dos anticorpos (supressão do anticorpo primário) foi utilizado como controle negativo.

Foram selecionados cinco campos nas áreas próximas às úlceras, em um aumento de 200x, para análise do CD31, e aumento de 400x, para análise de  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$ , fotografados e analisados pelo software ImageJ®. A avaliação microscópica foi quantitativa, com os resultados expressos na forma de porcentagem de células positivas. A positividade da imunomarcacão foram avaliadas nas regiões de membrana e/ou citoplasma, para CD-31, e citoplasma, para  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  (Adaptado de Brizeno et al., 2016).

### *2.9 Análise estatística*

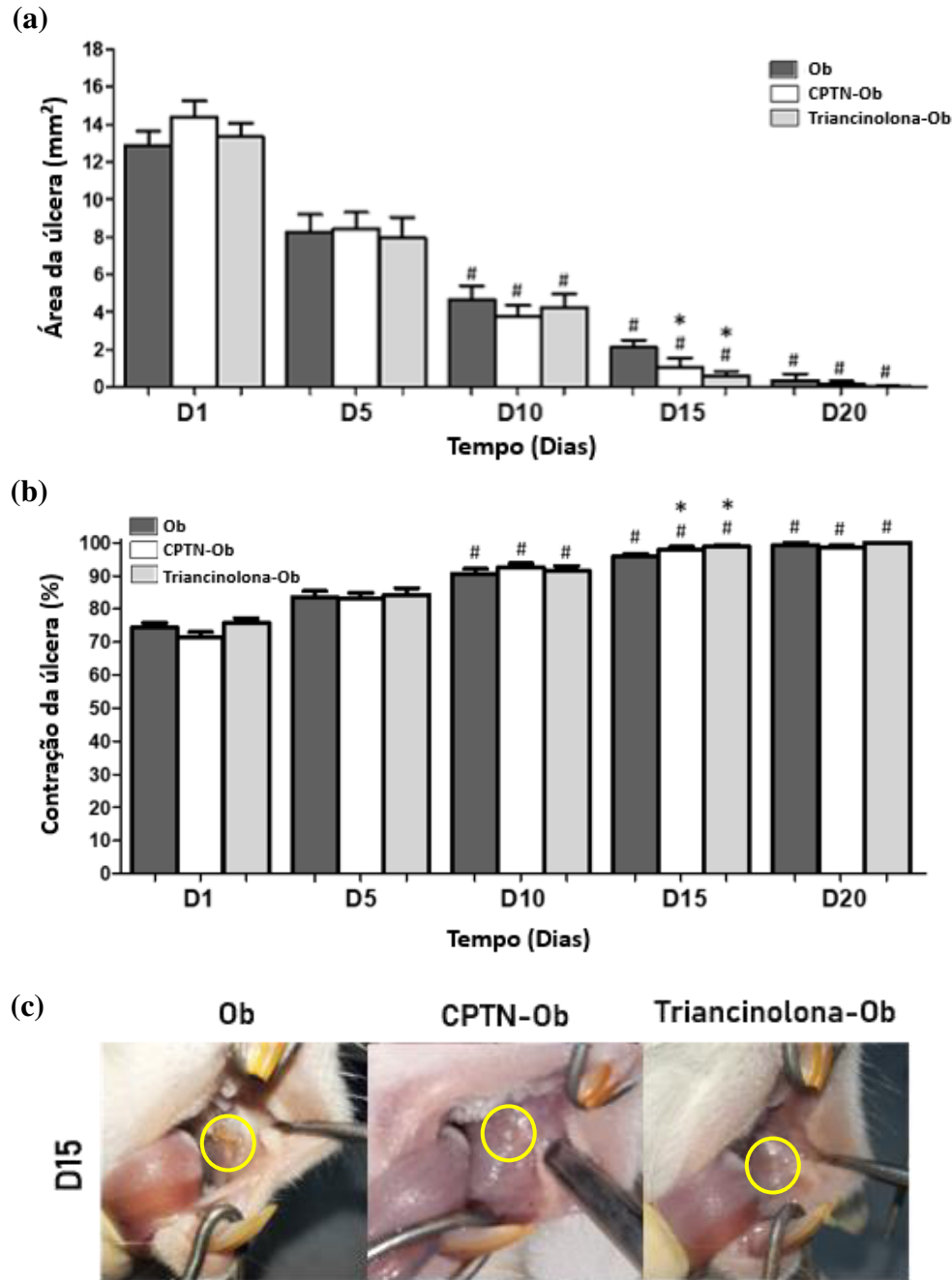
Os dados quantitativos foram expressos em forma de média  $\pm$  EPM, analisados pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados utilizando o teste ANOVA-1-way e ANOVA-2-way /Bonfferoni (dados paramétricos). Os escores histológicos foram expressos como mediana (máxima e mínima) e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis/ Dunn ( $p < 0,05$ , GraphPad Prism 5.0).

### 3. Resultados

#### *3.1 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob sobre área e percentual de contração da úlcera oral e variação de massa corpórea em ratos*

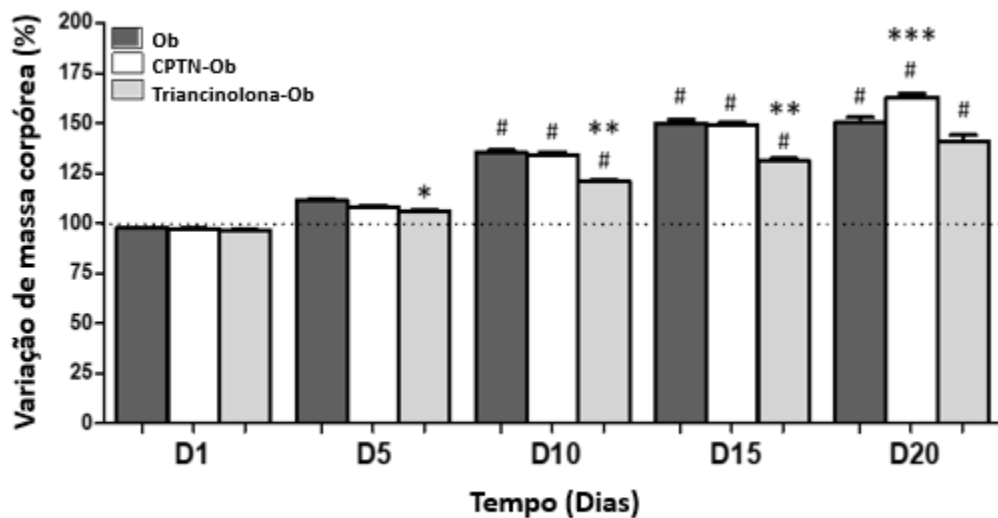
Todos os grupos experimentais mostraram redução significativa da média da área de úlcera e aumento no percentual de contração ao longo do protocolo experimental ( $p < 0,0001$ ). Na análise intragrupo, os três grupos apresentaram redução significativa da área de úlcera e maior percentual de contração, em relação ao 1º dia, a partir do 10º dia experimental ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 2).

No 15º dia experimental, os grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob evidenciaram menor área de úlcera ( $1,1 \pm 0,5$  e  $0,6 \pm 0,3$ , respectivamente) comparado ao grupo Ob ( $2,1 \pm 0,4$ ) ( $p = 0,0061$ ) e maior percentual de contração ( $97,8 \pm 0,9$  e  $98,8 \pm 0,5$ , respectivamente) comparado a este mesmo grupo ( $95,8 \pm 0,7$ ) ( $p = 0,0061$ ) (Fig. 2).



**Fig. 2.** Perfil clínico de cicatrização de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos, nos diferentes grupos. (a) Área das úlceras (mm<sup>2</sup>); (b) Percentual de contração das úlceras (%); (c) Aspecto clínico das úlceras traumáticas orais (demarcada através de círculo amarelo) nos três grupos, no 15<sup>o</sup> dia experimental. \* $p < 0,05$  versus grupo Ob no mesmo dia; <sup>#</sup> $p < 0,0001$  versus dia 1. Dados expressos em forma de média e erro-padrão; Teste Kruskal-Wallis/Dunn.

Com relação a variação de massa corpórea, todos os grupos mostraram ganho de peso ao longo do curso temporal, iniciando o ganho significativo a partir do 10º dia ( $p < 0,0001$ ). No 10º e 15º dia experimental, o grupo Triancinolona-Ob obteve um menor ganho de massa corpórea ( $120,7 \pm 1,07$  e  $131,0 \pm 1,33$ , respectivamente) em relação aos grupos CPTN-Ob ( $134,0 \pm 1,6$  e  $149,1 \pm 1,4$ , respectivamente) e Ob ( $135,5 \pm 1,1$  e  $149,8 \pm 2,0$ , respectivamente) ( $p < 0,0001$ ). No 20º dia, o grupo CPTN-Ob obteve um maior ganho de peso ( $163,1 \pm 1,8$ ) em comparação aos grupos Ob ( $150,1 \pm 2,7$ ) e Triancinolona-Ob ( $141,0 \pm 3,1$ ) ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 3).



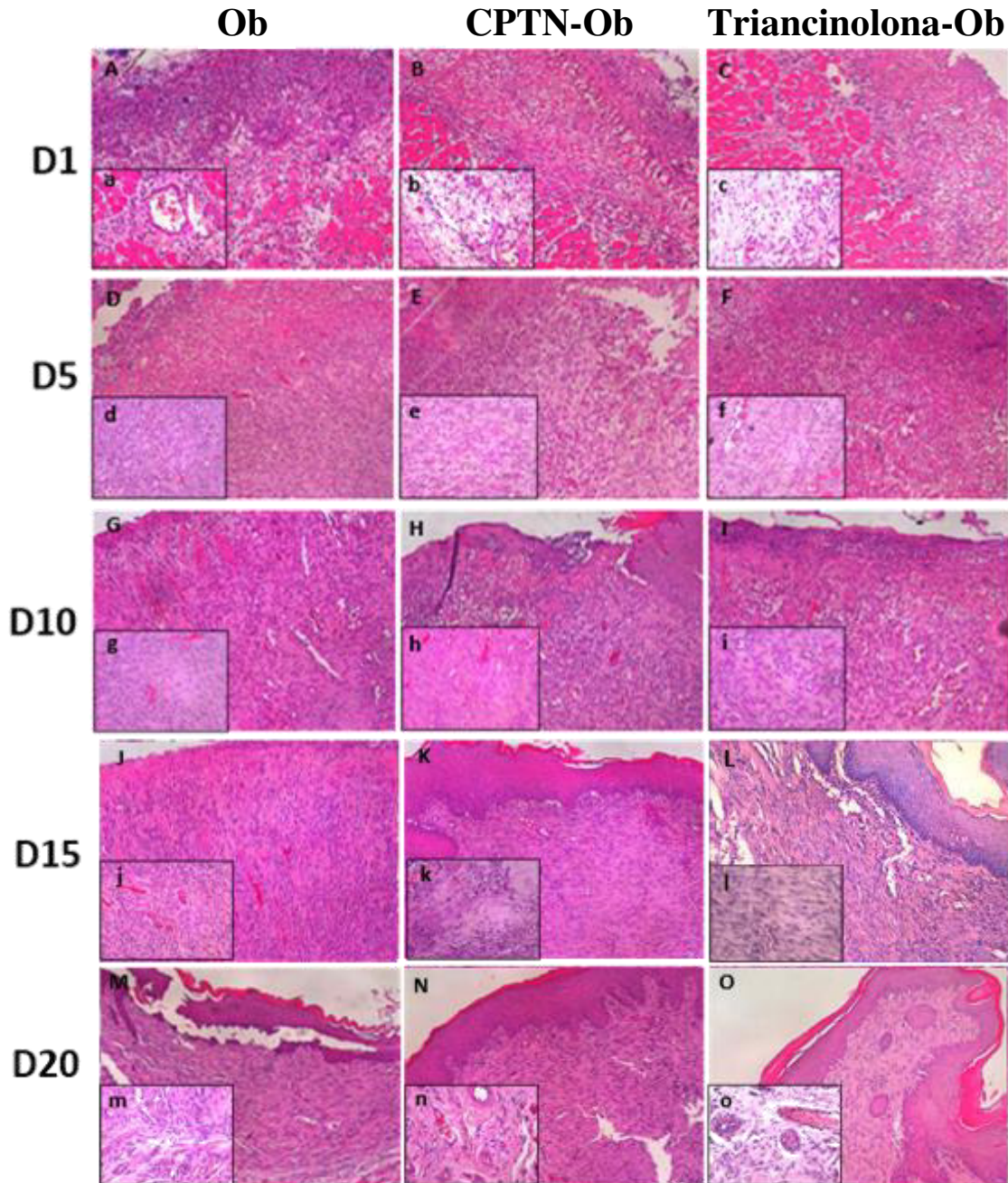
**Fig. 3.** Avaliação da variação de massa corpórea dos ratos ao longo do protocolo experimental, nos diferentes grupos. \* $p < 0,05$  versus grupo Ob no mesmo dia; \*\* $p < 0,0001$  versus grupos CPTN-Ob e Ob no mesmo dia; \*\*\* $p < 0,0001$  versus grupos Ob e Triancinolona-Ob no mesmo dia; # $p < 0,0001$  versus dia 1. Dados expressos em forma de média e erro-padrão; Teste Kruskal-Wallis/Dunn.

### 3.2 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob sobre alterações histopatológicas em úlceras traumáticas orais de ratos.

Todos os grupos mostraram total re-epitelização ao final do 20º dia, em relação ao dia 1 ( $p < 0,001$ ). No 15º dia experimental, os grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob apresentaram total re-epitelização em relação ao grupo Ob, que mostravam, ainda, ulceração ( $p < 0,001$ ) (Fig. 4, Tabela 1).

Todos os grupos evidenciaram redução nos escores de reparo do tecido conjuntivo ao longo do protocolo experimental, ocorrendo, significativamente, a partir do 10º dia ( $p < 0,001$ ). No primeiro dia de eutanásia, todos os grupos apresentaram escore 5 (Sinais de inflamação aguda,

ectasia vascular, infiltrado inflamatório, predominantemente, neutrofílico, edema, focos necróticos) sem diferença significativa ( $p=1,000$ ). No 5º dia e no 10º dia, a mediana dos escores histopatológicos variou de 2 (Presença de tecido de granulação e um infiltrado inflamatório, predominantemente, crônico leve) a 4 (Presença de tecido de granulação e infiltrado inflamatório



**Fig. 4.** Perfil microscópico de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos ao longo do protocolo experimental, nos diferentes grupos. (A, D, G, J, M) Grupo Ob, (B, E, H, K, N) Grupo CPTN-Ob e (C, F, I, L, O) Grupo Triancinolona-Ob. (HE; Letras maiúsculas=100x; Letras minúsculas=400x).

misto), sem diferença estatística ( $p=0,436$  e  $p=0,403$ , respectivamente). No 15º dia, o grupo CPTN-Ob mostrou menor escore histopatológico, com a presença de fibrose e discretas células inflamatórias mononucleares dispersas (1, 1-2) em comparação ao grupo Triancinolona-Ob, que mostrou a presença de tecido de granulação e infiltrado inflamatório crônico leve (2, 1-2) e foi significativamente menor em comparação ao grupo Ob, representado pela presença de um infiltrado inflamatório crônico mais intenso (3, 2-3) ( $p=0,012$ ). No 20º dia, a mediana dos escores variaram entre ausência e presença de tecido de granulação, com um infiltrado inflamatório, predominantemente, crônico leve, onde os grupos CPTN-Ob (1,5, 1-2) e Triancinolona-Ob (1, 1-2) apresentaram escores menores em relação ao grupo Ob (2, 1-2), porém sem diferença estatística ( $p=0,395$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Avaliação histopatológica de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos ao longo do protocolo experimental, nos diferentes grupos.

	Tempo (dias)					p-Valor
	D1	D5	D10	D15	D20	
<b>Escores de reparo do tecido conjuntivo</b>						
CPTN-Ob	5(5-5)	3(3-4)	2(2-4) <sup>#</sup>	1(1-2) <sup>*#</sup>	1.5(1-2) <sup>#</sup>	<0.001
Triancinolona-Ob	5(5-5)	3.5(3-4)	3(2-4) <sup>#</sup>	2(1-2) <sup>#</sup>	1(1-2) <sup>#</sup>	<0.001
Ob	5(5-5)	4(3-4)	2(2-3) <sup>#</sup>	3(2-3) <sup>#</sup>	2(1-2) <sup>#</sup>	<0.001
<b>p-Valor</b>	1.000	0.436	0.403	<b>0.012</b>	0.395	
<b>Re-epitelização</b>						
CPTN-Ob	0%	0%	0%	100% <sup>†</sup>	100%	<0.001
Triancinolona-Ob	0%	0%	0%	100% <sup>†</sup>	100%	<0.001
Ob	0%	0%	0%	0%	100%	<0.001
<b>p-Valor</b>	1.000	1.000	1.000	<0.001	1.000	

1 – Fibrose/Presença de discretas células inflamatórias mononucleares dispersas

2 - Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório mononuclear leve

3 – Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório mononuclear moderado ou intenso

4 – Fibrose/Presença de tecido de granulação + Infiltrado inflamatório misto (agudo e crônico)

5 – Processo agudo (Vasos ectásicos, edema, presença de infiltrado inflamatório, predominantemente, neutrofílico)

\* $p<0,05$  versus grupo Ob; <sup>#</sup> $p<0,001$  versus dia 1; teste Kruskal-Wallis/Dunn [mediana (mínimo-máximo)];

<sup>†</sup> $p<0,001$  versus grupo Ob; teste qui-quadrado de Pearson (n, %).

### *3.3 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob no número de polimorfonucleares neutrófilos em úlceras traumáticas orais de ratos*

Todos os grupos experimentais mostraram redução significativa do número de polimorfonucleares neutrófilos ao longo do estudo, iniciando-se a partir do 15º dia, em relação ao 1º dia ( $p < 0,001$ ).

No 15º dia experimental, os animais dos grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob evidenciaram menor número de neutrófilos ( $5,2 \pm 3,9$  e  $8,7 \pm 4,2$ , respectivamente) em relação ao grupo Ob ( $146,9 \pm 26,6$ ) ( $p = 0,0029$ ) (Fig. 5A).

### *3.4 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob no número de mononucleares em úlceras traumáticas orais de ratos*

No grupo Ob, houve redução significativa da contagem de mononucleares a partir do 10º dia, em relação ao 1º dia ( $p = 0,0002$ ). No grupo CPTN-Ob, essa redução ocorreu apenas no 20º dia ( $p = 0,0127$ ). Já no grupo Triancinolona-Ob, a redução significativa de mononucleares aconteceu nos dias 5 e 20 ( $p = 0,0067$ ).

No 5º dia, o número de mononucleares do grupo Triancinolona-Ob foi significativamente menor ( $151,0 \pm 13,7$ ) em comparação aos grupos Ob ( $238,1 \pm 15,5$ ) e CPTN-Ob ( $221,4 \pm 15,2$ ) ( $p = 0,0045$ ) (Fig. 5B).

### *3.5 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob na contagem de vasos sanguíneos em úlceras traumáticas orais de ratos*

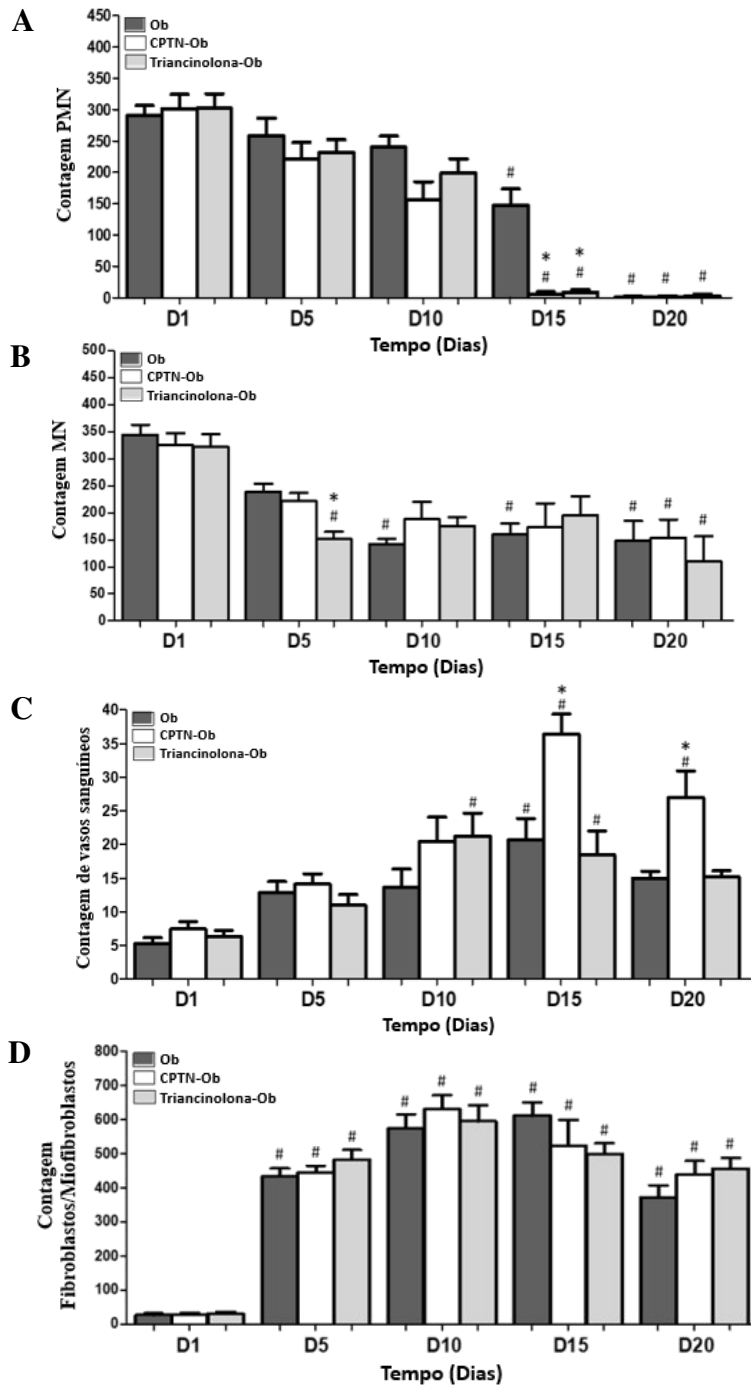
O grupo Ob apresentou aumento significativo de vasos sanguíneos a partir do 15º dia pós-ulceração ( $p = 0,0028$ ). No grupo Triancinolona-Ob, esse aumento ocorreu a partir do 10º dia, permanecendo até o 15º dia ( $p = 0,0006$ ). O grupo CPTN-Ob mostrou aumento a partir do 15º dia, permanecendo até o 20º dia pós-ulceração ( $p < 0,0001$ ).

No 15º e 20º dias experimentais, o grupo CPTN-Ob evidenciou um maior número de vasos sanguíneos ( $36,4 \pm 3,0$  e  $27,0 \pm 3,9$ , respectivamente) em relação aos grupos Ob ( $20,7 \pm 3,1$  e  $15,0 \pm 1,0$ , respectivamente) e Triancinolona-Ob ( $18,5 \pm 3,5$  e  $15,2 \pm 0,8$ , respectivamente) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5C).

### *3.6 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob na contagem de fibroblastos/miofibroblastos em úlceras traumáticas orais de ratos*

Nenhum grupo apresentou número expressivo de fibroblastos/miofibroblastos no 1º dia pós-ulceração. O número dessas células aumentou significativamente, em todos os grupos, a partir do 5º dia, permanecendo, assim, até o final do protocolo experimental ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatística entre os grupos ao longo dos dias experimentais (Fig. 5D).





**Fig. 5.** Avaliação histomorfométrica de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos, nos diferentes grupos.

**A.** Contagem de polimorfonucleares. \* $p < 0,05$  versus grupo Ob no mesmo dia; # $p < 0,001$  versus dia 1.

**B.** Contagem de mononucleares. \* $p < 0,05$  versus grupos Ob e CPTN-Ob no mesmo dia; # $p < 0,05$  versus dia 1

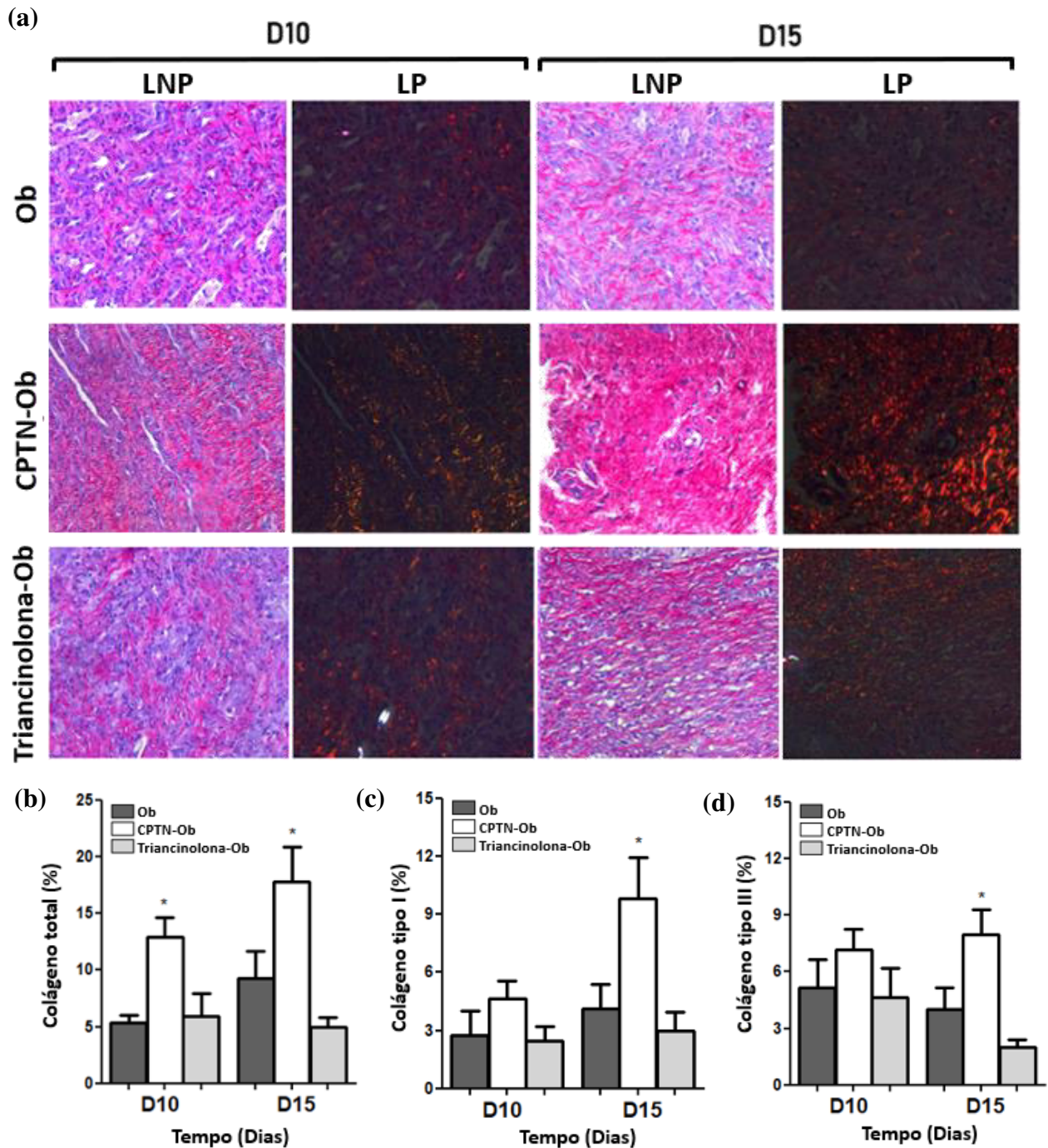
**C.** Contagem de vasos sanguíneos. \* $p < 0,05$  versus grupos Ob e Triancinolona-Ob no mesmo dia; # $p < 0,05$  versus dia 1

**D.** Contagem de fibroblastos/miofibroblastos. # $p < 0,001$  versus dia 1.

Dados expressos em forma de média e erro-padrão; Teste Kruskal-Wallis/Dunn. PMN: Polimorfonucleares; MN: Mononucleares.

### *3.7 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob na deposição de colágeno em úlceras traumáticas orais de ratos*

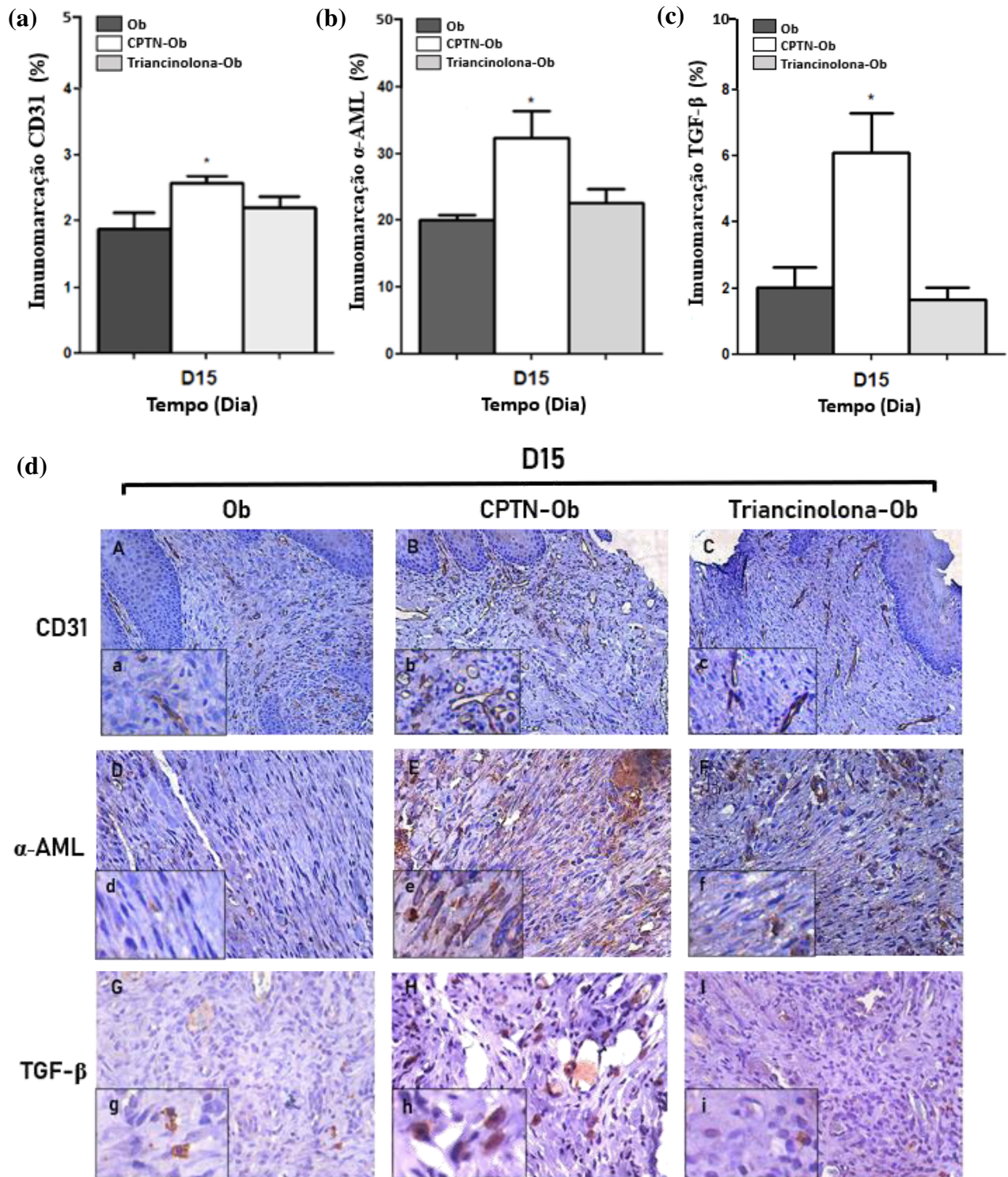
No 10° e 15° dia experimental, o grupo CPTN-Ob apresentou maior deposição de colágeno total ( $12,95 \pm 1,68$  e  $17,85 \pm 3,04$ , respectivamente) em comparação aos grupos Ob ( $5,3 \pm 0,7$  e  $9,2 \pm 2,5$ , respectivamente) e Triancinolona-Ob ( $5,9 \pm 2,0$  e  $5,0 \pm 0,8$ , respectivamente) ( $p < 0,05$ ). Quando analisado os diferentes tipos de colágeno, tanto colágeno tipo I quanto tipo III foram significativamente maiores no grupo CPTN-Ob ( $9,85 \pm 2,08$  e  $8,00 \pm 1,27$ , respectivamente) em relação aos grupos Ob ( $4,1 \pm 1,2$ ;  $4,0 \pm 1,2$ , respectivamente) e Triancinolona-Ob ( $3,0 \pm 0,9$ ;  $2,0 \pm 0,4$ , respectivamente), somente no 15° dia ( $p < 0,05$ ) (Fig. 6).



**Fig. 6.** Perfil do colágeno de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos no 10<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia experimental, nos diferentes grupos. (a) Fotomicrografias de lâminas coradas por Picrosirius Red, em luz polarizada e não polarizada. Percentual de colágeno total (b), colágeno do tipo I (c) e tipo III (d). (Aumento: 200x; LNP=Luz não-polarizada; LP=Luz polarizada) \* $p < 0,05$  versus grupo Ob e Triancinolona-Ob no mesmo dia. Dados expressos em forma de média e erro-padrão; Teste Kruskal-Wallis/Dunn.

*3.8 Efeitos do tratamento tópico com CPTN-Ob na imunomarcação de CD31,  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  em úlceras traumáticas orais de ratos*

No 15<sup>o</sup> dia, a expressão para CD31 e  $\alpha$ -AML mostrou-se significativamente maior no grupo CPTN-Ob ( $2,6 \pm 0,1$  e  $32,4 \pm 4,0$ , respectivamente) quando comparado ao grupo Ob ( $1,9 \pm 0,2$  e  $20,1 \pm 0,6$ , respectivamente), apresentando marcação citoplasmática ( $p < 0,05$ ). Com rela o ao TGF- $\beta$ , nesse mesmo dia, observou-se maior percentual de imunomarcação citoplasmática no grupo CPTN-Ob ( $6,1 \pm 1,2$ ) em rela o aos grupos Ob ( $2,0 \pm 0,6$ ) e Triancinolona-Ob ( $1,6 \pm 0,4$ ) (Fig. 7).



**Fig. 7.** Perfil imunohistoquímico para CD31 (a),  $\alpha$ -AML (b) e TGF- $\beta$  (c) de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos, no 15º dia experimental, nos diferentes grupos. (d) Fotomicrografias de lâminas imunohistoquímicas para CD31 (A, B, C: 200x; a, b, c: 400x),  $\alpha$ -AML (D, E, F: 400x; d, e, f: 1000x) e TGF- $\beta$  (G, H, I: 400x; g, h, i: 1000x), no 15º dia. \* $p < 0,05$  versus grupo Ob no mesmo dia. Dados expressos em forma de média e erro-padrão. Teste Kruskal-Wallis/Dunn.

#### 4. Discussão

Este estudo é o primeiro a buscar compreender os efeitos do CPTN na cicatrização de feridas orais. Foi demonstrado que o CPTN em orabase otimizou a cicatrização de um modelo experimental de úlceras traumáticas orais de ratos reduzindo significativamente a área das úlceras, aumentando o percentual de contração, via estímulo de re-epitelização, angiogênese e colagênese, principalmente, no 15º dia pós-ulceração, e mantendo o ganho de peso normal dos animais.

Em nosso estudo, verificamos uma redução da área e o aumento do percentual de contração das úlceras dos animais tratados topicamente com CPTN (no 15º dia). A pele de tilápia possui resultados clínicos importantes em estudos de queimaduras induzidas em dorso de ratos. No estudo de Lima-Júnior et al., 2017, observou-se um melhor delineamento dos bordos das feridas após 21 dias de tratamento. Já no estudo de Elbially et al., 2020 houve uma redução do tamanho das lesões cutâneas nos dias 9, 12 e 15 pós indução experimental das feridas. Sabe-se que a contração da ferida é uma importante ferramenta para verificar o seu progresso de cicatrização. Segundo a literatura, ocorre durante a fase proliferativa no transcurso cicatricial fisiológico, sendo considerado um importante processo que ocorre por meio da ação dos miofibroblastos diferenciados, estimulados pela liberação de TGF- $\beta$ , que possuem atividade contrátil (Portou et al., 2015; Mia & Bank, 2016; Eming, Wynn & Martin, 2017; Wang et al., 2018). Mostramos que houve uma maior expressão de  $\alpha$ -AML e TGF- $\beta$  nos animais tratados topicamente com CPTN em orabase, igualmente no 15º dia. Sendo assim, o CPTN parece otimizar a contração das úlceras através de uma maior liberação de TGF- $\beta$ , o qual estimula a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, os quais expressam  $\alpha$ -AML, beneficiando esse processo. Essa teoria corrobora com outros estudos que mostram o potencial da pele de tilápia em estimular TGF- $\beta$  e a expressão de  $\alpha$ -AML, em feridas cutâneas experimentais (Elbially et al., 2020; Li et al., 2021).

Analisando-se a variação de massa corpórea, foi observado uma perda de peso dos animais dos três grupos nos primeiros dias após ulceração, fato este explicado pelo processo de indução da úlcera, que é bastante dolorosa e impacta na alimentação (Lima, Grégio, Tanaka, Machado & França, 2005; Cavalcante et al., 2011). À medida que a cicatrização avançava, o processo de alimentação era reestabelecido e, conseqüentemente, havia ganho de peso, o que explica o aumento de massa corpórea a partir do quinto dia. Após 10 dias, esse aumento foi significativo, ocorrendo devido a menor área das úlceras presentes. No 5º, 10º e 15º dia

experimental, o grupo tratado com triancinolona acetona em orabase mostrou menor ganho de peso em comparação aos outros grupos, semelhantemente encontrado no estudo de Oliveira et al., 2016. Os corticosteroides tópicos possuem um potencial de absorção e circulação sistêmica, onde, dependendo da quantidade e frequência de uso, podem interferir no metabolismo de diversas moléculas, incluindo os carboidratos, onde há uma tendência à hiperglicemia, e as proteínas, onde há uma inibição da síntese proteica, que resulta em desnutrição e catabolismo. (Oliveira et al., 2016; Phan & Smith, 2021). No 20º dia, os animais tratados com CPTN em orabase obtiveram um maior ganho de peso em relação aos outros grupos. Assim, o CPTN parece apresentar propriedades favoráveis que aliviam o incômodo ocasionado pelas úlceras traumáticas, favorecendo a alimentação dos animais. Alguns estudos demonstram a capacidade da pele de tilápia em reduzir a dor de pacientes com queimaduras de pele, em ensaios clínicos de fase II e III (Lima-Júnior et al., 2020; 2021). No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda permanecem incertos, sendo necessário novos estudos que avaliem essa relação.

O processo de cicatrização depende de uma efetiva resposta inflamatória que, mais tardiamente, será responsável pela angiogênese, fibroplasia e colagênese, fatores primordiais nesse processo (Silva et al., 2018; Mesquita et al., 2020; Toma, Fuller, Willett & Goudy, 2021)

Após o momento em que a úlcera surge, as primeiras células inflamatórias que chegam ao local da lesão são os neutrófilos, responsáveis pelo controle de infecções (Singh, Young & Mcnaught, 2017; Selders et al., 2017). Em nosso estudo, foi observado aumento do número dessas células no primeiro dia em todos os grupos, com redução gradual ao longo do protocolo. No entanto, no 15º dia experimental, os grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob evidenciaram uma maior redução do número de polimorfonucleares neutrófilos em comparação ao grupo Ob. Os neutrófilos desempenham um papel importante durante a fase aguda da inflamação, pois irão iniciar a fagocitose de patógenos e o debridamento do tecido lesionado por meio de enzimas como a mieloperoxidase (MPO), além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) (Campos, Groth & Branco, 2008; Heng, 2011). Contudo, a persistência dessas células afeta o processo cicatricial, por produzirem dano tecidual e estresse oxidativo pela liberação das enzimas citadas anteriormente. Quanto mais rápido essas células executarem sua ação e sofrerem apoptose, dando início à transição para a fase inflamatória crônica (proliferativa), mais benéfico será o reparo tecidual (Martin et al., 2003; Lima-Júnior et al., 2017). Lima-Júnior e colaboradores (2017) já evidenciaram em seu estudo envolvendo indução de queimadura em dorso de pele de ratos que o

padrão de cicatrização observado nos grupos tratados com a pele de tilápia foi superior devido à sua capacidade de minimizar exsudatos, reduzindo o processo inflamatório agudo.

Seguindo o processo cicatricial, os neutrófilos vão sendo substituídos no decorrer do tempo por macrófagos (48 a 96 horas) e linfócitos (5 a 7 dias) (Koh & Dipietro, 2011; Portou et al., 2015). Os macrófagos são células cruciais no processo cicatricial, responsáveis pela transição para a fase seguinte da cicatrização, pois estimulam a proliferação de queratinócitos, fibroblastos e o processo de angiogênese, dando início à fase proliferativa (Guo & Dipietro, 2010). No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas da contagem de mononucleares, entre os grupos, ao longo do protocolo. Entretanto, nos cinco primeiros dias, houve uma redução do número de MN no grupo tratado com triancinolona acetonida em orabase. Os corticosteroides apresentam uma potente ação anti-inflamatória e imunossupressora, podendo interferir na contagem dessas células. Estudos mostram que feridas com depleção de macrófagos exibem deficiência no fechamento de feridas, diminuição na formação de tecido de granulação e angiogênese, além de redução na síntese de colágeno e dos níveis de fatores de crescimento (VEGF, TGF- $\beta$ ) (Koh & Dipietro, 2011; Oliveira et al., 2016).

Quanto aos aspectos histológicos, observamos melhores parâmetros nos grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob, com a presença de um tecido conjuntivo com inflamação crônica leve, ao contrário do grupo Ob, na qual houve piores escores histológicos. O mesmo achado foi encontrado no estudo de Lima-Júnior e colaboradores (2017), já citado anteriormente, na qual encontraram reações inflamatórias de intensidade leve a moderada nas feridas cutâneas recobertas pelas peles de tilápia, com fenótipo mononuclear (histiolinfoplasmocitário), diferentemente da intensa resposta aguda observada nos grupos controle, interferindo positivamente no processo de cicatrização.

Além disso, os grupos CPTN-Ob e Triancinolona-Ob mostraram total re-epitelização, no 15º dia, enquanto no grupo Ob houve persistência da úlcera. O processo de re-epitelização é representado pela proliferação e migração de queratinócitos para a área lesionada. Fatores de crescimento como TGF- $\beta$  e KGF, liberados por fibroblastos e macrófagos, são importantes durante essa etapa (Stojadinovic et al., 2008; Stroncek, Bell & Reichert, 2009). Tang & Saito (2015) avaliaram os efeitos *in vitro* do colágeno do tipo I purificado da pele de tilápia em populações celulares e observaram o estímulo à liberação de fatores de crescimento, como o Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF), o que favorece a re-epitelização.



Simultaneamente a eventos celulares, os eventos vasculares, como coagulação, extravasamento celular e angiogênese, também são importantes nesse processo (Kvietys & Granger, 2012; Glim et al., 2013). Observamos em nosso estudo, após 15 dias pós ulceração, um significativo aumento do número de vasos sanguíneos no grupo CPTN-Ob, em comparação tanto com o grupo Ob como com Triancinolona-Ob. Esse aumento confirmou-se com uma maior expressão de CD31, glicoproteína transmembrânica expressa, principalmente, em células endoteliais, nesse mesmo período. O CPTN, como já mencionado, possui capacidade de estimular diversos fatores de crescimento. Elbially et al., (2020) realizaram um estudo experimental *in vivo*, na qual induziram uma ferida cutânea no dorso de ratos e avaliaram os possíveis mecanismos envolvidos no reparo tecidual da aplicação tópica do CPTN, e verificaram o papel do colágeno na superprodução de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), essencial para a formação de novos vasos, que fornecerão oxigênio e suprimentos nutricionais para a área lesionada, auxiliando na cicatrização.

Além de KGF e VEGF, diversos outros fatores de crescimento atuam durante o reparo tecidual. O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) são essenciais para a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, auxiliando, além da contração de feridas, na deposição de colágeno e re-epitelização. (Barrientos et al., 2008; Zubair & Ahmad, 2019; Said et al., 2020). Em nosso estudo, verificamos um aumento da deposição de fibras colágenas totais, do tipo I e do tipo III, nos grupos tratados com CPTN em orabase, no 15º dia de curso temporal das úlceras, estando esse resultado associado à maior expressão de TGF- $\beta$  nesse mesmo dia. Logo, essa molécula parece ter um papel chave no mecanismo de cicatrização de úlceras traumáticas induzidas em ratos pela aplicação tópica do CPTN em orabase.

A principal limitação do estudo está no fato de que os ratos são fisiologicamente diferentes dos humanos. Apesar da semelhança entre as espécies, eles não reproduzem perfeitamente a patogênese de úlceras traumáticas orais que ocorrem em humanos (Zomer & Trentin, 2018). Além disso, por tratar-se de um estudo pioneiro que avalia os efeitos do CPTN em orabase na cicatrização dessas lesões, não há estudos na literatura que avaliem essa relação e que pudessem corroborar com os nossos achados, apenas pesquisas envolvendo feridas cutâneas. Portanto, mais investigações são necessárias para a elucidação dos mecanismos envolvidos nesse processo.

## 5. Conclusões

O tratamento tópico com o colágeno da pele de tilápia manipulado em orabase otimizou a cicatrização de úlceras traumáticas induzidas em mucosa jugal de ratos, reduzindo área e aumentando o percentual de contração, estimulando a re-epitelização, a angiogênese e a colagênese, com aumento da expressão de TGF- $\beta$ , e favorecendo o ganho de peso normal dos animais, sendo, portanto, uma terapia promissora para essas lesões. Entretanto, mais estudos são necessários para se compreender os possíveis mecanismos de ação do colágeno sobre feridas orais.

## Referências

- Alves, A. P. N. N., Verde, M. E. Q. L., Ferreira Júnior, A. E. C., Silva, P. G. D. B., Feitosa, V. P., Lima Júnior, E. M., ... & Moraes Filho, M. O. D. (2015). Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. *Revista Brasileira de Queimaduras*, 14(3), 203-210.
- Andisheh-Tadbir, A., Yaghoubi, A., Tanideh, N. & Mardani, M. (2021). The effect of indocyanine green-mediated photodynamic therapy in healing of experimentally induced oral mucosal traumatic ulcer in rat. *Lasers in Medical Science*, 36(3), 611-618.
- Appel, G. & Moura, M. (2006). *Pharmaceutical compounding in odontology*. 1<sup>a</sup> ed. São Paulo: RCN editora.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 16(5), 585-601.
- Bi, C., Li, X., Xin, Q., Han, W., Shi, C., Guo, R., ... & Zhong, J. (2019). Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(2), 234-240.
- Brizeno, L.A.C. Avaliação da cicatrização em modelo de úlcera em mucosa oral de ratos portadores de diabetes mellitus induzida por aloxano. (2013) *Universidade Estadual do Ceará*, Fortaleza.
- Brizeno, L. A. C., Assreuy, A. M. S., Alves, A. P. N., Sousa, F. B., Silva, P. G. D. B., Sousa, S. C. O., ... & Mota, M. R. L. (2016). Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and FGF-2. *Life Sciences*. 36-47.
- Campos, A. C., Groth, A. K., & Branco, A. B. (2008). Assessment and nutritional aspects of wound healing. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(3), 281-288.
- Cavalcante, G. M., Paula, R. J. S. D., Souza, L. P. D., Sousa, F. B., Mota, M. R. L., & Alves, A. P. N. N. (2011). Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 26, 227-234.
- Chen, J., Gao, K., Liu, S., Wang, S., Elango, J., Bao, B., ... & Wu, W. (2019). Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process in vivo. *Marine drugs*, 17(1), 33.
- Cheng, T. L., Chen, P. K., Huang, W. K., Kuo, C. H., Cho, C. F., Wang, K. C., ... & Lai, C. H. (2018). Plasminogen/thrombomodulin signaling enhances VEGF expression to promote cutaneous wound healing. *Journal of Molecular Medicine*, 96(12), 1333-1344.

- de Barros Silva, P. G., de Codes, E. B. B., Freitas, M. O., de Lima Martins, J. O., Alves, A. P. N. N., & Sousa, F. B. (2018). Experimental model of oral ulcer in mice: Comparing wound healing in three immunologically distinct animal lines. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 22(3), 444.
- Elbially, Z. I., Atiba, A., Abdelnaby, A., Al-Hawary, I. I., Elsheshtawy, A., El-Serehy, H. A., ... & Assar, D. H. (2020). Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and  $\alpha$ -SMA genes expression. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1-11.
- Eming, S. A., Wynn, T. A., & Martin, P. (2017). Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*, 356(6342), 1026-1030.
- Franco, M. L. R. S., Franco, N. P., Gasparino, E., Dorado, D. M., Prado, M., & Vesco, A. P. D. (2013). Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. *Archivos de zootecnia*, 62(237), 21-32.
- Glim, J. E., van Egmond, M., Niessen, F. B., Everts, V., & Beelen, R. H. (2013). Detrimental dermal wound healing: what can we learn from the oral mucosa? *Wound Repair and Regeneration*, 21(5), 648-660.
- Gonzalez, A. C. D. O., Costa, T. F., Andrade, Z. D. A., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing-A literature review. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91, 614-620.
- Guo, S. A., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), 219-229.
- Heng, M. C. (2011). Wound healing in adult skin: aiming for perfect regeneration. *International journal of dermatology*, 50(9), 1058-1066.
- Hu, Z., Yang, P., Zhou, C., Li, S., & Hong, P. (2017). Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. *Marine drugs*, 15(4), 102.
- Iglesias-Bartolome, R., Uchiyama, A., Molinolo, A. A., Abusleme, L., Brooks, S. R., Callejas-Valera, J. L., ... & Morasso, M. I. (2018). Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. *Science translational medicine*, 10(451).
- Koh, T. J., & DiPietro, L. A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine*, 13.

- Kvietys, P. R., & Granger, D. N. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(3), 556-592.
- Li, D., Sun, W. Q., Wang, T., Gao, Y., Wu, J., Xie, Z., ... & Mo, X. (2021). Evaluation of a novel tilapia-skin acellular dermis matrix rationally processed for enhanced wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 127, 112202.
- Lima, A. A. S. D., Grégio, A. M. T., Tanaka, O., Machado, M. Â. N., & França, B. H. S. (2005). Tratamento das ulcerações traumáticas bucais causadas por aparelhos ortodônticos. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 10, 30-36.
- Lima-Junior, E. M., Picollo, N. S., Miranda, M. J. B. D., Ribeiro, W. L. C., Alves, A. P. N. N., Ferreira, G. E., ... & Moraes Filho, M. O. D. (2017). Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. 16(1), 10-17.
- Lima Júnior, E. M., De Moraes Filho, M. O., Costa, B. A., Rohleder, A. V. P., Sales Rocha, M. B., Fechine, F. V., ... & de Moraes, M. E. A. (2020). Innovative burn treatment using Tilapia skin as a Xenograft: a phase ii randomized controlled trial. *Journal of Burn Care & Research*, 41(3), 585-592.
- Lima Júnior, E. M., de Moraes Filho, M. O., Costa, B. A., Fechine, F. V., Vale, M. L., Diógenes, A. K. D. L., ... & de Moraes, M. E. A. (2021). Nile tilapia fish skin-based wound dressing improves pain and treatment-related costs of superficial partial-thickness burns: a phase III randomized controlled trial. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 147(5), 1189-1198.
- Martin, P., D'Souza, D., Martin, J., Grose, R., Cooper, L., Maki, R., & McKercher, S. R. (2003). Wound healing in the PU. 1 null mouse-tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Current biology*, 13(13), 1122-1128.
- Mesquita, K. C., Dantas, T. S., de Barros Silva, P. G., de Queiroz Rodrigues, M. I., Alves, A. P. N. N., Mota, M. R. L., & Sousa, F. B. (2020). Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: Role of interleukin (IL)-1 $\beta$ , -6 and -10 and CD8/CD30 cells: Influence of abatacept treatment on oral wound healing: Experimental model on rats. *Life sciences*, 243, 117243.
- Mia, M. M., & Bank, R. A. (2016). The pro-fibrotic properties of transforming growth factor on human fibroblasts are counteracted by caffeic acid by inhibiting myofibroblast formation and collagen synthesis. *Cell and Tissue Research*, 363(3), 775-789.

- Muthukumar, T., Anbarasu, K., Prakash, D., & Sastry, T. P. (2014). Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract-in vivo wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 178-188.
- Muthukumar, T., Prabu, P., Ghosh, K., & Sastry, T. P. (2014). Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 113, 207-212.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2010). Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(9), 1492-1500.
- Oliveira, B. V., Barros Silva, P. G., Nojosa, J. D. S., Brizenno, L. A. C., Ferreira, J. M., Sousa, F. B., ... & Alves, A. P. N. N. (2016). TNF-alpha expression, evaluation of collagen, and TUNEL of *Matricaria recutita* L. extract and triamcinolone on oral ulcer in diabetic rats. *Journal of Applied Oral Science*, 24, 278-290.
- Phan, K., & Smith, S. D. (2021). Topical corticosteroids and risk of diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Journal of Dermatological Treatment*, 32(3), 345-349.
- Portou, M. J., Baker, D., Abraham, D., & Tsui, J. (2015). The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: a review. *Vascular pharmacology*, 71, 31-36.
- Ridiandries, A., Tan, J., & Bursill, C. A. (2018). The role of chemokines in wound healing. *International journal of molecular sciences*, 19(10), 3217.
- Said, A., Naeem, N., Siraj, S., Khan, T., Javed, A., Rasheed, H. M., ... & Wahid, F. (2020). Mechanisms underlying the wound healing and tissue regeneration properties of *Chenopodium album*. *3 Biotech*, 10(10), 1-10.
- Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative biomaterials*, 4(1), 55-68.
- Singh, S., Young, A., & McNaught, C. E. (2017). The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 35(9), 473-477.

- Song, W. K., Liu, D., Sun, L. L., Li, B. F., & Hou, H. (2019). Physicochemical and biocompatibility properties of type I collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications. *Marine drugs*, 17(3), 137.
- Stojadinovic, A., Carlson, J. W., Schultz, G. S., Davis, T. A., & Elster, E. A. (2008). Topical advances in wound care. *Gynecologic oncology*, 111(2), S70-S80.
- Stroncek, J. D., Bell, N., & Reichert, W. M. (2009). Instructional PowerPoint presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 90(4), 1230-1238.
- Sun, L., Hou, H., Li, B., & Zhang, Y. (2017). Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International journal of biological macromolecules*, 99, 8-14.
- Tang, J., & Saito, T. (2015). Biocompatibility of novel type I collagen purified from tilapia fish scale: an in vitro comparative study. *BioMed research international*.
- Toma, A. I., Fuller, J. M., Willett, N. J., & Goudy, S. L. (2021). Oral Wound Healing Models and Emerging Regenerative Therapies. *Translational Research*.
- Wang, P. H., Huang, B. S., Horng, H. C., Yeh, C. C. & Chen, Y. J. (2018) Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94-101.
- Zhou, T., Wang, N., Xue, Y., Ding, T., Liu, X., Mo, X., & Sun, J. (2016). Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 415-422.
- Zhou, T., Sui, B., Mo, X., & Sun, J. (2017). Multifunctional and biomimetic fish collagen/bioactive glass nanofibers: Fabrication, antibacterial activity and inducing skin regeneration in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*, 12, 3495.
- Zomer, H. D., & Trentin, A. G. (2018). Skin wound healing in humans and mice: challenges in translational research. *Journal of dermatological science*, 90(1), 3-12.
- Zubair, M., & Ahmad, J. (2019). Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: a detailed review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(2), 207-217.

## 6 CONCLUSÃO GERAL

O tratamento tópico com o colágeno da pele de tilápia manipulado em orabase otimizou a cicatrização de úlceras traumáticas orais induzidas em mucosa jugal de ratos, através de:

- 1 - Redução da área e aumento do percentual de contração das úlceras, no 15º dia;
- 2 - Estímulo à re-epitelização, angiogênese e colagênese, etapas fundamentais no reparo tecidual, aliado a uma maior expressão de TGF- $\beta$ , igualmente no 15º dia;
- 3 - Manutenção do ganho de peso normal dos animais, ao longo do curso temporal.

Portanto, trata-se de uma terapia promissora para essas lesões. Entretanto, mais estudos são necessários para se compreender os possíveis mecanismos de ação do colágeno sobre feridas orais.



## REFERÊNCIAS

- ALVES, A. P. N. N. et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 3, p. 203-210, 2015.
- ALVES, A. P. N. N. et al. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. **Cell and tissue banking**, v. 19, n. 3, p. 373-382, 2018.
- ANDISHEH-TADBIR, A. et al. The effect of indocyanine green-mediated photodynamic therapy in healing of experimentally induced oral mucosal traumatic ulcer in rat. **Lasers in Medical Science**, v. 36, n. 3, p. 611-618, 2021.
- ARNOLD, F.; WEST, D. C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 52, n. 3, p. 407-422, 1991.
- BEANES, S. R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- $\beta$ . **Expert reviews in molecular medicine**, v.5, p.1-11, 2003.
- BI, C. et al. Effect of extraction methods on the preparation of electrospun/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. **Journal of bioscience and bioengineering**, 2019.
- CAMPOS, A. C.; GROTH, A. K.; BRANCO, A. B. Assessment and nutritional aspects of wound healing. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**. v.11, n. 3, p. 281-288, 2008.
- CAVALCANTE, G.M. et al. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 26, n. 3, p. 233, 2011.
- CHEN, J. et al. Fish Collagen Surgical Compress Repairing Characteristics on Wound Healing Process In Vivo. **Marine drugs**, v. 17, n. 1, p. 33, 2019.
- CHENG, T. et al. Plasminogen/thrombomodulin signaling enhances VEGF expression. to promote cutaneous wound healing. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 12, p.1333-1344, 2018.
- CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.
- ELBIALY, Z. I. et al. Collagen extract obtained from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) skin accelerates wound healing in rat model via up regulating VEGF, bFGF, and  $\alpha$ -SMA genes expression. **BMC Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2020.
- EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Science translational medicine**. v. 6, n. 265, p. 265sr6, 3 dez. 2014.

EMING, S. A., WYNN, T. A., MARTIN, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. **Science**, v. 356, n. 6342, 1026–1030, 2017.

ENOCH, S. et al. The oral mucosa: A model of wound healing with reduced scarring. **Oral Surgery**. v. 1, n. 1, p. 11–21, 2008.

EL-RASHIDY, A. A. et al. Chemical and biological evaluation of Egyptian Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish scale collagen. **International journal of biological macromolecules**, v. 79, p. 618-626, 2015.

FERGUSON, M. W.; O’KANE, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.359, p.839-850, 2004.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free radical biology & medicine**. v. 42, n. 2, p. 153–64, 15 jan. 2007.

FRANCO, M. L. R. S. et al. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. **Archivos de zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 21-32, 2013.

FREIRE, M. O.; DYKE, T. E. V. Natural resolution of inflammation. **Periodontal 2000**. v. 63, n. 1, p. 149–164, 2013.

GILL, S. E.; PARKS, W. C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 2008.

GOLEBIEWSKA, E. M.; POOLE, A. W. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. **Blood reviews**. v. 29, n. 3, p. 153–62, maio 2015.

GONZALEZ, A. C. O. et al. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 91, n. 5, p. 614–620, 2016.

GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factor affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GURTNER, G. C. et al. **Wound repair and regeneration**. **Nature**. v. 453, n. 7193, p. 314–321, 2008.

HARDING, K. G.; PATEL, M. G. K. Science, medicine and the future: Healing chronic wounds. **British Medical Journal**, v. 324, p. 160-163, 2002.

HARPER, D.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing and wound assessment. **Surgery (Oxford)**. v. 29, n. 10, p. 475–479, 2011.

- HU, Z. et al. Marine collagen peptides from the skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Characterization and wound healing evaluation. **Marine drugs**, v. 15, n. 4, p. 102, 2017.
- IGLESIAS-BARTOLOME, R. et al. Transcriptional signature primes human oral mucosa for rapid wound healing. **Science translational medicine**, v. 10, n. 451, 2018.
- JUNCKER-JENSEN, A., LUND, L.R. Phenotypic overlap between MMP-13 and the plasminogen activation system during wound healing in mice. **PLoS One**, v. 6, n.2, 2011.
- KHANSARI, N.; SHAKIBA, Y.; MAHMOUDI, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**. v. 3, n. 1, p. 73–80, 2009.
- KIM, H. et al. CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of nonendothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease. **Circulation research**. v. 107, n. 5, p. 602-614, 2010.
- KUNKEMOELLER, B.; KYRIAKIDES, T. R. Redox signaling in diabetic wound healing regulates extracellular matrix deposition. **Antioxidants & Redox Signaling**. v. 27, n. 12, p. 823–838, 20 out. 2017.
- LI, Z. J. et al. Kinetic expression of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) during embryonic stem cell differentiation. **Journal of cellular biochemistry**. v. 95, n. 3, p. 559-570, 2005.
- LIMA, A. A. S. et al. Tratamento das ulcerações traumáticas bucais causadas por aparelhos ortodônticos. **Rev. Dent. Press Ortod. Ortop. Facial (Impr.)**, v. 10, n. 5, p. 30-36, 2005.
- LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v. 16, n. 1, p. 10-7, 2017.
- MAJTAN, J. H. An immunomodulator in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**. v. 22, n. 2, p. 187–192, 2014.
- MESZAROS, A. J.; REICHNER, J. S.; ALBINA, J. E. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**. v. 165, n. 1, p. 435–41, 1 jul. 2000.
- MIA, M. M.; BANK, R. A. The pro-fibrotic properties of transforming growth factor on human fibroblasts are counteracted by caffeic acid by inhibiting myofibroblast formation and collagen synthesis. **Cell Tissue Research**, v.363, 775–789, 2016.
- PORTOU, M. J. et al. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. **Vascular Pharmacology**, 2015.

RIDIANDRIES, A. et al. The Role of Chemokines in Wound Healing. **International Journal of Molecular Science**. v. 19, 2018.

SAKATA, R. K.; ISSY, A. M. Guia de medicina ambulatorial e hospitalar: dor. 1. ed. Barueri, SP: Manole, 2004.

SELDERS, G. S. et al. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. **Regenerative biomaterials**. v. 4, n. 1, p. 55–68, fev. 2017.

SHEN, Y. et al. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. **Blood**, n.119, p.5879–5887, 2012.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (Oxford)**. v. 35, n. 9, p. 473–477, 2017.

SONG, W. K. et al. Physicochemical and Biocompatibility Properties of Type I Collagen from the Skin of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) for Biomedical Applications. **Marine drugs**, v. 17, n. 3, p. 137, 2019.

STOJADINOVIC, A. et al. Topical advances in wound care. **Gynecologic Oncology**, v. 111, n. 2, p. 70-80, 2008.

STRONCEK, J. D; BELL, N; REICHERT, W. M. Instructional power point presentations for cutaneous wound healing and tissue response to sutures. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 90, n. 4, p.1230-1238, 2009.

SUN, L. et al. Characterization of acid-and pepsin-soluble collagen extracted from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International journal of biological macromolecules**, v. 99, p. 8-14, 2017.

TANG, J.; SAITO, T. Biocompatibility of novel type I collagen purified from tilapia fish scale: an in vitro comparative study. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização. **Biblioteca Escolar em Revista**, v. 41, n. 3, p. 259-264, 2008.

THOMAS D. W. et al. Cutaneous wound healing: a current perspective. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 1995.

TOMA, A.I. et al. Oral Wound Healing Models and Emerging Regenerative Therapies. **Translational Research**, 2021.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: a Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528-1542, 2009.

WANG, P. et al. Wound healing. **Journal of the Chinese Medical Association**, v.81, n.2, 94-101, 2018.

YAMAMOTO, K. et al. Biological safety of fish (tilapia) collagen. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ZHANG, J. et al. Structural characterization, in-vivo acute systemic toxicity assessment and in-vitro intestinal absorption properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin acid and pepsin solubilized type I collagen. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2017-2025, 2016.

ZHOU, T. et al. Development of biomimetic tilapia collagen nanofibers for skin regeneration through inducing keratinocytes differentiation and collagen synthesis of dermal fibroblasts. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 5, p. 3253-3262, 2015.

ZHOU, T. et al. Multifunctional and biomimetic fish collagen/bioactive glass nanofibers: fabrication, antibacterial activity and inducing skin regeneration in vitro and in vivo. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 3495, 2017.

## ANEXO A - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial cicatrizante do colágeno extraído da pele de tilápia do Nilo em úlcera traumática de mucosa jugal em ratos.", protocolada sob o CEUA nº 8063020519 (ID 000987), sob a responsabilidade de **Mário Rogério Lima Mota e equipe; Guilherme Costa Soares** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 16/05/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the healing potential of collagen extracted from the Nile tilapia skin in traumatic ulcer of cheek mucosa in rats.", utilizing 240 Heterogenics rats (240 males), protocol number CEUA 8063020519 (ID 000987), under the responsibility of **Mário Rogério Lima Mota and team; Guilherme Costa Soares** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 05/16/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de 08/2019 a 08/2020

Área: Departamento de Clínica Odontológica

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [2 a 3 meses](#)

N: [240](#)

Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [200 a 300 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Ceará Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)

Fortaleza, 13 de novembro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Camila Ferreira Roncari  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

## ANEXO B – DECLARAÇÃO DE CORREÇÃO ORTOGRÁFICA

### DECLARAÇÃO

Eu, professor Marcos Paulo Brito de Sousa, graduado em Letras/Inglês, na Universidade Federal do Piauí (UFPI), RG 2.209.138, CPF 025.940.713-58, declaro, para os devidos fins, que analisei e realizei revisão ortográfica da Dissertação de Mestrado intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CICATRIZANTE DO COLÁGENO EXTRAÍDO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO EM ÚLCERAS TRAUMÁTICAS DE MUCOSA JUGAL EM RATO", realizado pelo aluno GUILHERME COSTA SOARES.

---

Marcos Paulo Brito de Sousa

Teresina, 28 de março de 2022.