



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICO-CIRÚRGICAS

BEATRIZ ODEBRECHT COSTA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) COMO
XENOENXERTO EM ÚLCERAS CUTÂNEAS TRAUMÁTICAS EM EQUINOS**

FORTALEZA
2023

BEHATRIZ ODEBRECHT COSTA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) COMO
XENOENXERTO EM ÚLCERAS CUTÂNEAS TRAUMÁTICAS EM EQUINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do grau de Doutor. Área de concentração: Metabolismo, fisiologia e biologia celular no estresse.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacaru.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C87a Costa, Behatriz Odebrecht.

Avaliação da eficácia da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como xenoenxerto em úlceras cutâneas traumáticas em equinos / Behatriz Odebrecht Costa. – 2023.

113 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Coorientação: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fachine Jamacarú.

1. Tilápia. 2. Cavalos. 3. Ferimentos e Lesões. 4. Úlcera Cutânea. 5. Curativos Biológicos.
I. Título.

CDD 617

BEHATRIZ ODEBRECHT COSTA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) COMO XENOENXERTO EM ÚLCERAS CUTÂNEAS TRAUMÁTICAS EM EQUINOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico-cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do grau de Doutor. Área de concentração: Metabolismo, fisiologia e biologia celular no estresse.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Vagnaldo Fechine Jamacaru.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Márcio Gomes de Alencar Araripe
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus e à minha família

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua misericórdia infinita e bondade para comigo.

À minha família, minha base e meu apoio. Meu esposo, **Júlio César de Almeida Santos**, por toda a paciência e dedicação diária para que eu atingisse meu objetivo. Minha mãe, **Elaine Odebrecht**, e meu pai, **Francisco de Assis Costa** (*in memoriam*), que formaram os meus princípios e valores que tento seguir retamente. De forma especial, à minha mãe que soube educar a mim e a minha irmã para que nos tornássemos pessoas boas e comprometidas, nosso exemplo de garra e abdicção. Minha irmã, **Francislaine Odebrecht Costa**, que desde muito cedo ajudou a minha mãe a cuidar de mim e é minha companheira de caminhada nas dificuldades e alegrias da vida.

Ao **Dr. Odorico de Moraes** que aceitou me orientar, mesmo sem me conhecer e confiou em mim para desenvolver a pesquisa da Tilápia na espécie equina, permitindo que eu passasse por esse percurso árduo, que é o doutorado, em uma área que tanto amo. Além da sua secretária **Adelania**, pela atenção, carinho e simpatia com o qual sempre me recebeu.

Ao **Dr. Vagnaldo Fechine**, que me acolheu desde o primeiro dia, quando no final de 2016 fui conhecê-lo e manifestar o meu interesse em fazer o doutorado. Desde então, não hesitou em, com paciência e dedicação, me ajudar nesse trajeto.

Ao **Dr. Edmar Maciel**, que me orientou na parte prática do estudo e que sempre lembra de mim para assumir responsabilidades na área veterinária da pesquisa. Obrigada pela confiança e amizade!

Ao **Dr. Paulo Leitão** que, no fim do percurso, assumiu minha orientação e, mesmo sem me conhecer e conhecer a minha história, me acolheu. À **Dra. Ana Paula Negreiros** que sempre foi muito atenciosa comigo, sua contribuição foi fundamental nesse trabalho!

Aos meus colegas de pesquisa, por fazermos juntos essa caminhada e compartilharem da sua rotina e seus conhecimentos comigo. De forma especial, aos Doutores **Carlos Paier** e **Felipe Rocha** que, na função de coordenadores de laboratório, me ensinaram sobre os bastidores e o que acontecia na bancada, além de todo apoio que sempre me deram, confiança no meu trabalho e na minha competência. À amiga, **Sofhia Martins**, minha parceira diária nessa jornada e

companheira de café, junto com a **Dona Ivaneide**, obrigada por tornarem minhas tardes mais leves e por me estimularem a estudar e não desanimar.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-cirúrgicas, **Luciene e Marcelo**, que com tanta dedicação atendem os alunos, tiram dúvidas e facilitam nossa vida para que sejam atingidos os pré-requisitos necessários para a nossa conclusão.

À Cavalaria da Polícia Militar do Ceará, que desde que eu era aluna de graduação, sempre me recebeu e me acolheu com muito carinho e respeito. A receptividade e apoio que dão aos estudantes é fundamental para o nosso crescimento profissional. Aos enfermeiros veterinários que, com paciência e alegria, me ajudavam diariamente na execução do meu trabalho e, em nome deles, quero destacar o amigo **Souzinha** (*in memoriam*), que me acolheu como uma filha e tanto me ensinou no trato com o animal, o seu nome é constantemente lembrado na nossa rotina.

Quero agradecer, de forma especial ao **Dr. Miguel Marcos**, que me acolheu como estagiária quando terminei o primeiro semestre da faculdade, e não hesitou quando levei a proposta dos meus projetos de mestrado e doutorado. Obrigada por sempre me ensinar, acreditar em mim e, fazer isso até hoje. Suas palavras de apoio, me ajudam a me tornar mais segura e não canso de dizer o quanto foi e ainda é importante para o meu crescimento profissional.

Aos **cavalos**, amigo honesto, que faz com que eu queira ser melhor para eles. O amigo que, muitas vezes, aliviou o peso dos dias difíceis fazendo com que um momento de carinho e contato, se tornasse uma experiência de paz e renovação das forças.

“O espírito do homem pode criar infinitamente, somente sua preguiça põe limites à sua sabedoria e às suas invenções.”

Bossuet

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA PELE DE TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) COMO XENOENXERTO EM ÚLCERAS CUTÂNEAS TRAUMÁTICAS EM EQUINOS. Behatriz Odebrecht Costa. Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-cirúrgicas. Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, Faculdade de Medicina, UFC. Fortaleza, 2023.

O cavalo é um animal naturalmente propenso a feridas acidentais, sendo esta uma das razões mais comuns para que a espécie seja examinada por um veterinário. No Brasil, os substitutos biológicos são pouco usados devido ao alto custo, mesmo sendo mais vantajosos para os pacientes em relação aos tratamentos tradicionais. Esse contexto impulsionou a pesquisa para o desenvolvimento de novos dispositivos biomédicos para uso clínico e a pele da tilápia vem sendo estudada como biomaterial alternativo. Baseado na eficácia comprovada desse curativo biológico na cicatrização de queimaduras em humanos, levantou-se o questionamento dos benefícios do seu uso na cicatrização de diferentes tipos de ferimentos e em outras espécies. Sendo assim, o estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da utilização da pele de Tilápia do Nilo como xenoenxerto no manejo de úlceras traumáticas em equinos comparada com o curativo de sulfadiazina de prata. Para tanto, foram utilizados 13 cavalos sem raça definida, selecionados a partir do plantel de equinos do RPMONT/PMCE. Sendo um estudo clínico, os animais com feridas traumáticas, que se enquadravam nos critérios de inclusão do estudo, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de tratamento: Pele de Tilápia e Sulfadiazina de Prata. Para cada grupo de tratamento foram avaliados os seguintes pontos: variação da área da úlcera mensurada no final do tratamento em relação à medida pré-tratamento; tempo para completa cicatrização; proporção de animais nos quais houve cicatrização completa da úlcera durante o período de seguimento; número de trocas de curativo ao longo do estudo; análise histopatológica para avaliação do processo inflamatório e da deposição de colágeno. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos no que concerne aos parâmetros avaliados, exceto no número de curativos realizados em cada grupo. Portanto, é possível concluir que o tratamento com o curativo de pele de tilápia em equinos tem uma resposta de cicatrização semelhante à de um produto do mercado que é conhecido por ter um efeito favorável na cicatrização, porém com uma diminuição

considerável no número de curativos, o que implica em maior conforto e, conseqüente, melhora do bem-estar do animal.

Palavras-chave: Tilápia; Cavalos; Ferimentos e Lesões; Úlcera Cutânea; Curativos Biológicos.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFICACY OF TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SKIN AS A XENOGRAFT IN TRAUMATIC SKIN ULCERS IN EQUINES

Horses are naturally prone to accidental injuries, which is one of the most common reasons they are examined by a veterinarian. In Brazil, biological substitutes for trauma injuries are rarely used due to their high cost, even though they offer more advantages for patients compared to traditional treatments. This context has driven research towards the development of new biomedical devices for clinical use, and tilapia skin has been studied as an alternative biomaterial. Based on the proven effectiveness of this biological dressing in healing burns in humans, the question arose about the benefits of its use in healing different types of wounds and in other species. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of using Nile tilapia skin as a xenograft in the management of traumatic ulcers in horses, compared to silver sulfadiazine dressing. Thirteen mixed-breed horses were selected from the equine herd of RPMONT/PMCE for this clinical study. Animals with traumatic wounds that met the inclusion criteria were randomly assigned to two treatment groups: Tilapia Skin and Silver Sulfadiazine. The following parameters were evaluated for each treatment group: variation in ulcer area measured at the end of treatment compared to pre-treatment measurement, time to complete healing, proportion of animals with complete ulcer healing during the follow-up period, number of dressing changes throughout the study, and histopathological analysis to assess the inflammatory process and collagen deposition. There were no statistically significant differences between the two groups in terms of the evaluated parameters, except for the number of dressings performed in each group. Therefore, it can be concluded that treatment with tilapia skin dressing in horses has a similar healing response to a market product known to have a favorable effect on healing, but with a significant decrease in the number of dressings required. This implies greater comfort and consequent improvement in the animal's well-being.

Keywords: Tilapia; Horses; Wounds and Injuries; Skin Ulcer; Biological Dressings.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fases da cicatrização	23
Figura2- Ferida em região distal de um membro posterior equino	27
Figura3- Tecido de granulação exuberante em região distal de membro equino	29
Figura4- Tratamento da ferida e aplicação do curativo.....	50
Figura5- Aquisição da imagem da úlcera com régua milimetrada posicionada rente à borda da lesão.....	51
Figura6- Transcrição do perímetro da úlcera em folha de acetato para viabilizar o cálculo da área por planimetria computadorizada.....	52
Figura7- Primeiropasso para a mensuração de feridas cutâneas pelo programa imageJ: padronização da escala em centímetros.....	53
Figura8- Demarcação da área da úlcera e mensuração de feridas cutâneas pelo programa imageJ.....	53
Figura9- Imagens digitalizadas das lâminas de análises histopatológicas na objetiva de 40x, coradas com HE.....	57
Figura10- Quantificação de colágeno tipo I.....	58
Figura11- Quantificação de colágeno tipo III	59
Figura12- Quantificação de colágeno total	59
Figura13- Identificação das zonas de maior densidade do marcador CD-31.....	

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curvas de tempo até a completa cicatrização da úlcera	66
Gráfico2 - Evolução temporal do processo de cicatrização.....	67
Gráfico3 - Avaliação global do processo de cicatrização.....	69
Gráfico4 - Evolução temporal da área da úlcera.....	70
Gráfico5 - Evolução temporal do processo de cicatrização.....	74
Gráfico6 - Avaliação global do processo de cicatrização.....	75
Gráfico7 - Quantificação do grau de edema nos preparados histológicos.....	78
Gráfico8 - Quantificação de neutrófilos nos preparados histológicos.....	79
Gráfico9 - Quantificação de macrófagos nos preparados histológicos.....	80
Gráfico10 - Quantificação do tecido de granulação nos preparados histológicos.....	81
Gráfico11 - Quantificação de fibroblastos nos preparados histológicos.....	82
Gráfico12 - Quantificação de colágeno nos preparados histológicos.....	83
Gráfico13 - Quantificação do grau de epitelização das úlceras nos preparados histológicos.....	84
Gráfico14 - Quantificação do grau de neovascularização nos preparados histológicos.....	86

Gráfico15 - Quantificação do colágeno total nos preparados histológicos.....	
.....	87
Gráfico16 - Quantificação do colágeno tipo I nos preparados histológicos.....	
.....	88
Gráfico17 - Quantificação do colágeno tipo III nos preparados histológicos.....	89
Gráfico18 - Densidade microvascular mensurada nos preparados histológicos .	90
Gráfico19 - Evolução semanal do número de curativos realizados.....	91
Gráfico20 - Número total de curativos realizados.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas e clínicas dos animais dos grupos sulfadiazina de prata e pele de tilápia, verificadas na primeira avaliação	65
Tabela 2 -Evolução temporal do processo de cicatrização, avaliado pelo percentual de cicatrização total, nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia.....	67
Tabela 3 - Avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia por meio da determinação da área sob a curva (ASC)	69
Tabela 4 - Evolução temporal da área da úlcera	71
Tabela 5 - Variação absoluta da área da úlcera observada nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia	72
Tabela 6 - Taxa de cicatrização verificada nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia	73
Tabela 7 - Evolução temporal do processo de cicatrização, avaliado pelo escore total do instrumento PUSH, nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia	74
Tabela 8 - Avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia por meio da determinação da área sob a curva	

(ASC) das medições temporais do escore total do instrumento PUSH versus o tempo (dias)	76
Tabela 9 - Variação absoluta do escore total do instrumento PUSH observada nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia.....	77
Tabela 10 -Quantificação do grau de edema nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	79
Tabela 11 - Quantificação de neutrófilos nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	80
Tabela 12 - Quantificação de macrófagos nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	81
Tabela 13 - Quantificação do tecido de granulação nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	82
Tabela 14 - Quantificação de fibroblastos nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	83
Tabela 15 - Quantificação de colágeno nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	84
Tabela 16 - Quantificação do grau de epitelização das úlceras nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	85

Tabela 17 - Quantificação do grau de neovascularização das úlceras nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	86
Tabela 18 - Quantificação do colágeno total nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	87
Tabela 19 - Quantificação do colágeno tipo I nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	88
Tabela 20 - Quantificação do colágeno tipo III nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia no D0 e D28 do período de seguimento	89
Tabela 21 - Densidade microvascular mensurada nos preparados histológicos dos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia D0 e D28 do período de seguimento	90
Tabela 22 - Evolução semanal do número de curativos realizados nos animais tratados com sulfadiazina de prata e pele de tilápia.....	92
Tabela 23 - Número total de curativos realizados nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia ao longo do período de tratamento.....	93

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ANCOVA – Análise de covariância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC – Área sob a curva

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

CD31 - Cluster de diferenciação 31

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFU's - Unidades formadoras de colônias

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DNOCS - Departamento Nacional de Obras Contra a Seca

GRP – Gel autólogo rico em plaquetas

HE - Hematoxilina-eosina

IL-1 - Interleucina 1

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares

MEC - Matriz extracelular

NaCl- Cloreto de sódio

NPDM - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos

PCT - Percentual de cicatrização total

PECAM-1 - Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

PMCE - Polícia Militar do Ceará

PRP – Plasma rico em plaquetas

PUSH - Pressure Ulcer Scale for Healing

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPMONT - Regimento de Polícia Montada
SF – Soro fisiológico
SUS – Sistema único de saúde
TC – Taxa de cicatrização
TGE – Tecido de granulação exuberante
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa
UFC – Universidade Federal do Ceará
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 ÚLCERAS TRAUMÁTICAS EM EQUINOS	21
1.2 CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS	22
1.3A CICATRIZAÇÃO NO EQUINO	25
1.4ABORDAGEM TERAPÊUTICA DE FERIDA EM EQUINOS.....	29
1.5 PELE DE TILÁPIA DO NILO (<i>OREOCHROMIS NILOTICUS</i>)	33
1.6 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	38
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3 MÉTODO	42
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	42
3.2 ASPECTOS ÉTICOS	42
3.3 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO	42
3.4 ANIMAIS	43
3.4.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	43
3.4.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	43

3.4.3 CRITÉRIOS DE DESCONTINUAÇÃO	44
3.5 INTERVENÇÕES AVALIADAS	44
3.5.1 PRODUTO SOB INVESTIGAÇÃO: PELE DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	44
3.5.2 PRODUTO COMPARADOR: CURATIVO OCLUSIVO COM SULFADIAZINA DE PRATA	46
3.6 DELINEAMENTO DO ESTUDO	47
3.6.1 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS DE TRATAMENTO.....	47
3.6.2 MÉTODO DE RANDOMIZAÇÃO E DE GARANTIA DO SIGILO DA LISTA DE ALOCAÇÃO	47
3.6.3 ETAPAS DO ESTUDO.....	47
3.7 PROCEDIMENTOS QUE FORAM REALIZADOS NO ESTUDO	49
3.7.1 TRATAMENTO DAS ÚLCERAS	49
3.7.2 PROCEDIMENTOS PARA AQUISIÇÃO DAS IMAGENS DAS ÚLCERAS	50
3.7.3 PROCEDIMENTOS PARA QUANTIFICAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DAS ÚLCERAS	51
3.7.4 PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DA BIÓPSIA DA LESÃO	55
3.7.5 PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	55
3.7.6 PROCEDIMENTOS PARA A ANÁLISE HISTOQUÍMICA DO COLÁGENO.....	57
3.7.7 AVALIAÇÃO DO MARCADOR DE ANGIOGÊNESE CD-31 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	60
3.8 AVALIAÇÃO DE EFICÁCIA	61
3.8.1 MEDIDAS DE DESFECHOS PRIMÁRIOS	61
3.8.2 MEDIDAS DE DESFECHOS SECUNDÁRIOS	62
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62

4 RESULTADOS	65
5DISCUSSÃO	93
6CONCLUSÃO	102
REFERÊNCIAS	103
ANEXO I: ESCORE PRESSURE ULCER SCALE FOR HEALING (PUSH)	112
ANEXO II: CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO CEUA	114

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, o rebanho equino é superior a 5 milhões, sendo o maior produtor, o estado de Minas Gerais (IBGE, 2021). Diversos fatores minimizaram as atividades criatórias ao longo dos anos, a citar o processo de urbanização, o crescimento tecnológico agropecuário e a mecanização no campo, dentre outros. Todavia, o cavalo continua sendo indispensável para o desenvolvimento da maioria das propriedades agropecuárias com significativa importância na economia local, regional e nacional. Os equinos exerceram um relevante papel na formação econômica, social e política brasileira, permitindo compreender os aspectos fundamentais para a configuração do atual perfil do agronegócio do cavalo (SEAB, 2017).

Nos últimos anos, estudos demonstram que as diferentes condições ambientais em que os cavalos são submetidos podem impactar significativamente no bem-estar animal (LESIMPLE, 2020). O uso de equipamentos inadequados e esforço excessivo são alguns dos fatores associados aos ferimentos e lesões de pele. Animais de criação, lazer, desporto, trabalho ou de estimação estão entre os mais acometidos por esses traumas. Alesão física é considerada uma das principais causas que afetam a integridade física do indivíduo. É um grave problema enfrentado na clínica de equídeos, sendo a maior ocorrência em animais utilizados para o trabalho (VIEIRA, 2015; LESIMPLE, 2020).

1.1 Úlceras traumáticas em equinos

O cavalo é um animal naturalmente propenso a feridas acidentais. Isso se dá, muitas vezes, devido aos hábitos comuns à espécie de saltar obstáculos; disputas por território e comida, levando a brigas com episódios de mordidas e coices, mesmo em um ambiente controlado, em que o acesso ao alimento é fácil; transporte em caminhões; além da própria atividade de trabalho a que esse animal pode ser submetido, como provas esportivas, policiamento montado e equoterapia. Além disso, a espécie equina, na natureza, é caracterizada como uma presa, estando sempre alerta para necessidade de fuga de um predador, o que dá ao animal a característica de ser altamente sensível a estímulos ambientais, tornando-o

assustado, levando-o à respostas rápidas e aumentando a probabilidade de acidentes (BARROSO, 2017).

O tratamento de feridas crônicas representa um prejuízo ao bem-estar animal e problemas financeiros para a clínica de equinos. Um estudo do *National Animal Health Monitoring System* demonstrou que as feridas são uma das razões mais comuns para o cavalo ser examinado por um veterinário. Portanto, é de extrema importância estudar a fisiopatologia da cicatrização de feridas crônicas para ser capaz de desenvolver novas estratégias de gerenciamento de feridas e identificar novos alvos terapêuticos (BUNDGAARD *et al.*, 2018; USDA, 2015).

Em um levantamento feito na Nova Zelândia com veterinários clínicos de equinos, as feridas no membro distal, envolvendo apenas a pele e/ou tecidos mais profundos, foram relatadas por 85% dos entrevistados como as mais frequentemente encontradas. As feridas neste local também incorreram no período de tratamento mais longo, custo mais elevado e foram as mais propensas a desenvolver complicações (THEORET *et al.*, 2016). Podemos observar esse mesmo fato acontecendo nos atendimentos clínicos de equinos do Brasil.

Úlceras traumáticas em equinos, podem se tornar feridas crônicas, apresentando demora e complicação para cicatrizar, especialmente nas extremidades distais. Um número considerável de animais tem sua carreira atlética comprometida por apresentar claudicação persistente, membros inchados, tecido de granulação exuberante e cicatrizes extensas. Embora a cicatrização por primeira intenção seja o tratamento preferencial, nem sempre é possível, pois podem ocorrer casos de contaminação, perda excessiva ou comprometimento grave do tecido. Nesses casos, a cicatrização de feridas por segunda intenção é, muitas vezes, a única opção (HENDRICKSON & VIRGIN, 2005; WILMINK & VAN WEEREN, 2005).

1.2 Cicatrização de feridas

O veterinário de equino, ao se deparar com um equino ferido, deve compreender os mecanismos fisiológicos envolvidos na reparação, de modo a elaborar um plano de tratamento adequado (THEORET, 2005).

A cicatrização de feridas é um processo fisiológico complexo que requer a orquestração das contribuições da matriz extracelular, das células que produzem a matriz extracelular (tecido de granulação e epitélio) e das células responsáveis pela produção dos fatores bioativos que funcionam para recrutar outras células endógenas e ditar as proteínas que elas produzem. Em decorrência da complexidade do processo, é inerente que algumas terapias contribuam com mais de uma forma para o processo de cura (DAHLGREN, 2018).

Especificamente, em uma ferida, o processo regenerativo ou reparo tecidual consiste em várias fases ativadas por meio de vias bioquímicas intra e intercelulares (Figura 1). A ação coordena a restauração, integridade tecidual e também a homeostase. A hemostasia é a primeira etapa do processo de cicatrização, que consiste na liberação de mediadores pelas plaquetas para promover uma vasoconstrição na parede do vaso afetado pelo ferimento. Em seguida, uma cascata de coagulação é ativada e encerra a passagem de sangue para fora do vaso sanguíneo (RODRIGUES & CASTILHO-FERNANDES, 2012).

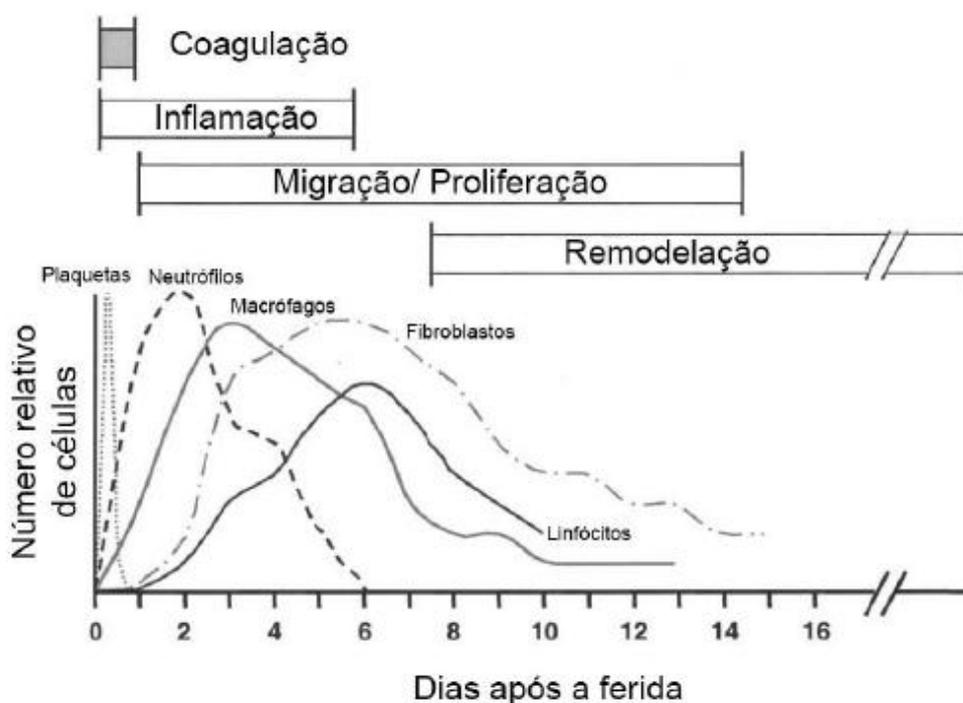


Figura 1. Fases da cicatrização (BARROSO, 2017).

A cascata de coagulação e as vias inflamatórias são os principais elementos celulares que envolvem a homeostasia. Fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais, neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos e células dendríticas estão envolvidas nessa ação. Além disso, ainda são liberadas substâncias vasoativas, como serotonina, histaminas, prostaglandinas e leucotrienos, além de proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases (BROUGHTON, 2006; MANDELBAUM, 2003). Toda a ativação do sistema imunológico ocorre de forma sequencial para iniciar a etapa do processo inflamatório (ROWAN, 2015).

O processo inflamatório é a base para iniciar a cicatrização, uma vez que remove os agentes patogênicos e estruturas danificadas pela injúria tecidual. As células de defesa (leucócitos e macrófagos) atuam no tecido lesionado e fagocitam patógenos que tentam acessar o organismo através do ferimento (ABREU NETO, 2013; OLIVEIRA & DIAS, 2012). Além disso, essas células liberam citocinas que amplificam a quimiotaxia de neutrófilos e estimulam demais macrófagos, queratinócitos, fibroblastos e expressão de fatores de crescimento necessários na angiogênese e síntese de colágeno (MEDEIROS, 2016). Após a finalização do processo de desbridamento pelo próprio organismo, é iniciada a fase de reparo tecidual.

Na fase de reparo ou reepitelização ocorre a proliferação e migração de queratinócitos em direção à parte central da lesão, iniciando a etapa de granulação (GENTHIN, 2012). Com a granulação ocorre a regeneração da camada basal, sendo possível restaurar as características fisiológicas do tecido epitelial. Dessa forma, o tecido é remodelado e todas as etapas anteriores são desativadas ou realocadas na ferida, deixando espaço para uma região rica em colágeno e outras proteínas de deposição de matriz extracelular (MEC) (RODRIGUES, 2019). No final da fase de granulação é possível observar a reorganização de fibras de colágeno na MEC. Especificamente, a MEC é rica em fibronectinas, fibroblastos, granulócitos, macrófagos, capilares e fibras colágenas tipo I e III (ENOCH E LEAPER, 2008; VERHAEGEN *et al.*, 2009).

Com a neoformação da MEC, inicia-se a fase de cicatrização (HINZ, 2007). Nessa etapa, a angiogênese ainda não está completa, apenas abundantemente

presente e avermelhada. É importante ressaltar a suma importância da angiogênese na remodelação tecidual. Nessa fase é possível evidenciar os leitos vasculares dos tecidos normais (PEACOCK *et al.*, 2012). Moléculas de adesão celular endotelial auxiliam na verificação das células inflamatórias durante a inflamação e facilitam a migração leucocitária. A citar, o PECAM-1, mais conhecido como CD31, como uma importante molécula de adesão presente na superfície de plaquetas, monócitos, macrófagos e neutrófilos. Caracteriza-se como um dos fatores de adesão entre células endoteliais durante a angiogênese (BERMAN *et al.*, 1996; PUSZTASZERI *et al.*, 2006; KOUHSOLTANI *et al.*, 2016).

Em estudos que avaliaram a expressão dos fatores angiogênicos em lesões celulares, através da contagem de vasos sanguíneos marcados por campo utilizando o CD31, foi possível identificar que a intensidade da angiogênese e a vascularização caracterizam o quadro clínico. Quando aumentados, esses marcadores aumentam a gravidade da lesão (PEACOCK *et al.*, 2012). A caracterização de marcadores angiogênicos e endoteliais (CD31) podem ser úteis para definir o comportamento biológico da lesão. As interações entre os tecidos permitem avaliar a integridade do processo cicatricial e a homeostase.

O tecido de granulação é estabelecido dentro de 3 a 5 dias, sendo formado a partir da proliferação capilar e de fibroblastos, o que o torna friável, porém resistente à infecção (WINKLER, 2015). Quando maturados, os fibroblastos tornam-se miofibroblastos e dão espaço para o remodelamento da ferida, podendo essa fase se prolongar por até um ano (XI-QIAO *et al.*, 2009). Durante esse período, a MEC é modificada pela maturação da ferida com a substituição do colágeno tipo III para tipo I e a contração dos miofibroblastos que atuam na contração da ferida quando aderidos aos feixes colagenosos (HINZ, 2007). Também, ocorre a diminuição do processo angiogênico e do fluxo sanguíneo da ferida, bem como a atividade metabólica, potencializando a formação cicatricial madura. A finalização do processo fisiológico do reparo de feridas em mamíferos ocorre com a formação de cicatrizes.

1.3 A cicatrização no equino

A cicatrização no cavalo há muito tempo chama a atenção de pesquisadores, devido à facilidade dessa espécie em se ferir, além de peculiaridades na sua cicatrização, no qual tratamentos de longo prazo e, algumas vezes, de custo elevado são necessários para tentar modular a cicatrização. Além disso, há prejuízo para o animal, que fica parado por longos períodos, ou, em alguns casos, impossibilitado de exercer suas funções permanentemente (BARROSO, 2017), portanto, quaisquer mecanismos que acelerem a cicatrização de feridas tem um impacto significativo (KNOTTENBELT, 1997).

Feridas crônicas são aquelas que demoram a cicatrizar e não conseguem passar pelos estágios normais de cicatrização de maneira ordenada e oportuna. Devido às circunstâncias comumente encontradas quando os cavalos são feridos, as feridas crônicas são um desafio para quem trabalha com clínica de equinos. Uma compreensão de por que os cavalos desenvolvem feridas que não cicatrizam e as opções para o manejo dessa condição ajudam a aliviar parte da frustração (MAHER & KUEBELBECK, 2018).

É comum que os equinos tenham feridas nos membros, especialmente em regiões mais distais (Figura 2), e sabe-se que as feridas localizadas nas regiões distais dos membros têm a cicatrização mais difícil comparadas com feridas no corpo. Esse dado foi relatado em um estudo que mostrou a transição epitelial-mesenquimal e a diferenciação de queratinócitos na cicatrização por segunda intenção de feridas experimentais no corpo e nos membros de equinos em que as feridas do corpo pareciam ter queratinócitos mais diferenciados na ponta do epitélio migratório, tais diferenças podem ser parte da explicação para a pior cicatrização descrita em feridas de membros equinos (JORGENSEN et al., 2019b).

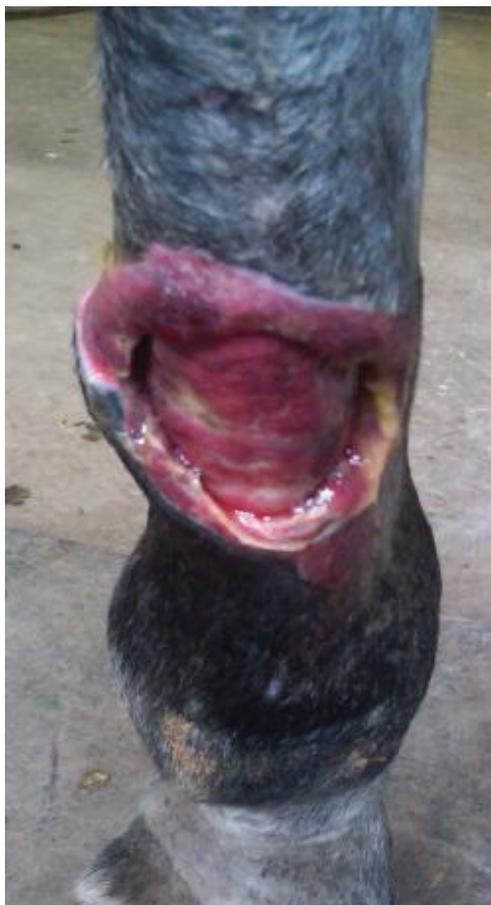


Figura 2: Ferida em região distal de um membro posterior equino (HACKET, 2011).

Uma peculiaridade importante das feridas distais dos membros equinos é o alargamento inicial do leito da ferida após a lesão, aumentando para quase o dobro do tamanho original nas primeiras duas semanas. Este alargamento que acontece nas feridas dos membros é mais pronunciado do que em feridas localizadas em outras regiões do corpo. As causas propostas são a alta tensão da pele nessa região, a ausência de músculos cutâneos e o alto grau de movimentação nesta região. Além disso, a resposta inflamatória primária das feridas dos membros equinos parece ser menos intensa do que nas feridas do corpo, atrasando a cicatrização (ANANTAMA *et al.*, 2022). A baixa produção inicial de $TNF\alpha$, IL-1, quimiotáticos, $TGF-\beta$, e ROS em cavalos pode explicar o início fraco da resposta inflamatória e a consequente persistência da inflamação (WILMINK & VAN WEEREN, 2005).

Outro fator que deve ser levado em conta na cicatrização de feridas é o suporte sanguíneo. A angiogênese é necessária para restaurar a rede de vasos sanguíneos e apoiar a restauração do tecido. No entanto, estudos encontraram uma menor saturação de oxigênio em feridas de membros comparadas com feridas em outras regiões do corpo, mostrando que existem diferenças regionais na oxigenação da ferida durante a cicatrização normal (CELESTE *et al.*, 2011). A oclusão da microvasculatura é prejudicial à resposta inflamatória e estimula a angiogênese excessiva e a fibroproliferação via citocinas e outros mediadores (THEORET *et al.*, 2013).

Outra importante peculiaridade na cicatrização de feridas em equinos é a formação de tecido de granulação exuberante (TGE), intercorrência muito comum nesta espécie. O TGE parece ser influenciado por mediadores inflamatórios. Na cicatrização dérmica equina ocorre uma fraca resposta inflamatória persistente, que é mais pronunciada nas extremidades do que no tronco, portanto, o TGE se desenvolve mais em feridas de membros do que em feridas localizadas em outras partes do corpo (THEORET *et al.*, 2013).

A formação de tecido de granulação através da fibroplasia é um componente essencial da cicatrização de feridas. O tecido de granulação é importante para preencher os defeitos da ferida, para cobrir o tendão exposto, o osso e outras estruturas vitais e para fornecer um substrato para a migração epitelial, sendo essencial para a contração da ferida. Idealmente, a proliferação do tecido de granulação cessa quando o defeito da ferida atinge a superfície. A migração epitelial e a contração começam como os principais mecanismos de cura. Infelizmente, em alguns cavalos, a proliferação do tecido de granulação continua inabalável, levando a um TGE (Figura 3) que é caracteristicamente elevado acima da superfície da ferida, irregular, cronicamente inflamado, contrai mal, devido à fibrose, e é uma barreira física para a epitelização da ferida (HACKET, 2011).



Figura 3: Tecido de granulação exuberante em região distal de membro equino. Observa-se o tecido elevado acima das bordas da pele (Theoret, 2004).

1.4 Abordagem terapêutica de ferida em equinos

Existem várias abordagens terapêuticas para o tratamento de feridas, especialmente em equinos, em que consistem basicamente de limpezas diárias das feridas, aplicação de pomada cicatrizante e curativo quando possível e necessário. Dependendo do local da ferida, não é possível cobrir com um curativo, favorecendo a contaminação, principalmente devido ao ambiente em que o animal vive, que geralmente tem areia e moscas, sendo necessárias várias limpezas durante o dia. Além disso, caso haja formação de tecido de granulação exuberante, é essencial

que seja feita a remoção cirúrgica desse tecido em excesso. Todo esse procedimento se torna oneroso e trabalhoso para os proprietários e tratadores, respectivamente, o que nos faz buscar alternativas para o tratamento de feridas nessa espécie (STASHAK & FARSTVEDT, 2004).

O manejo bem-sucedido de feridas em equinos depende do conhecimento dos estágios de cicatrização de feridas, dos fatores que podem alterar esses estágios, bem como os estágios de cicatrização podem ser manipulados e da adesão aos princípios de cicatrização de feridas. Os desafios que complicam o manejo de feridas incluem: a incapacidade de imobilizar e/ou confinar pacientes equinos e manter um ambiente limpo durante os estágios iniciais críticos da cicatrização. Devido a esses desafios, o veterinário de equinos depende muito de técnicas de bandagem e coaptação externa para tratar e gerenciar feridas com sucesso. O tipo de curativo usado é determinado pela região do corpo que está lesionada. As feridas dos membros distais são as mais propícias ao curativo, enquanto as feridas no ombro e na garupa podem ser difíceis de enfaixar de maneira tradicional. Feridas na cabeça e no pescoço são propícias ao curativo com modificações criativas (EGGLESTON, 2018).

Diante desse cenário, várias alternativas são pesquisadas para otimizar o tratamento de feridas em cavalos com o objetivo de encontrar soluções práticas e de custo acessível para os diversos perfis de tutores desses animais.

Como medida terapêutica indicada para feridas é recomendável a aplicação de soluções antissépticas na lesão, tais como o iodo-povidona, solução de clorexidine e água oxigenada ou peróxido de hidrogênio, onde estas soluções apresentam atividades antimicrobianas minimizando o risco de infecções. Outra forma alternativa de tratamento de lesões, que são abordados na literatura e vem sendo testados rotineiramente na clínica cirúrgica de grandes animais, são os medicamentos fitoterápicos. Como exemplo de fitoterápicos que já foram testados, temos: óleo de copaíba, barbatimão, aloe vera, própolis, óleo de semente de girassol, entre outros (OLIVEIRA JR. *et al.*, 2012; ARGENTINO *et al.*, 2017). E, recentemente, foi verificado, com um bom resultado na cicatrização, um composto com mel e óleos de alecrim e camomila (ANIS *et al.*, 2021). Além disso, observou-se

que o uso de maltodextrina pode reduzir o alargamento inicial da ferida e promover a formação de tecido de granulação (HOWARD *et al.*, 2019).

Tratamento de feridas utilizando células-tronco também demonstra ser um potencial recurso para essa finalidade terapêutica. Sendo, inclusive, comparado o tratamento autólogo versus alogênico com células-tronco do tipo epitelial em um modelo *in vivo* de feridas na pele de equinos (SPAAS *et al.*, 2015). Recentemente, o plasma rico em plaquetas (PRP) liofilizado e um meio condicionado com células tronco começou a ser investigado para uso terapêutico em equinos (FREITAS *et al.*, 2023). No entanto, apesar do proposto sucesso do tratamento, pode ser uma terapia inviável, em alguns casos, devido ao alto custo e dificuldade na obtenção do produto.

Uma terapia que se difundiu nos últimos anos foi a ozonioterapia. Para o tratamento de feridas, o ozônio pode ser utilizado em três formas: água ozonizada, óleo ozonizado ou na forma de gás, utilizando a via tópica, injetável ou retal (SOUZA *et al.*, 2021). Também configura uma alternativa de custo elevado e de difícil acesso por existirem poucos profissionais que realizam esse procedimento terapêutico.

Todas essas alternativas, mesmo que o produto seja de baixo custo, necessitam de curativos diários, exigindo o uso de mais mão de obra e material, o que torna o procedimento oneroso, além do estresse causado ao animal devido o mesmo ser manipulado todos os dias no local da lesão, sem contar as alternativas em que o produto já possui o custo de obtenção elevado.

Além das opções propostas para resolução clínica da ferida, é possível ser necessário, como parte do tratamento, um procedimento cirúrgico na lesão para que o sucesso seja alcançado. Como dito anteriormente, caso o TGE esteja presente, frequentemente é necessário um procedimento cirúrgico para sua retirada e uma longa internação. As despesas envolvidas podem ser um impedimento para os proprietários. Curativos oclusivos foram recentemente descritos como uma boa opção para tratamento de TGE em equinos (HACKET, 2011).

A medicina regenerativa, em seus termos mais gerais, refere-se à criação de biomateriais para substituir ou restaurar tecidos nativos que estão ausentes,

perdidos ou danificados devido a defeito congênito, envelhecimento, doença ou lesão. Esta definição cobre uma vasta gama de terapias. Exemplos mais simples de medicina regenerativa são usados na medicina humana e veterinária diariamente como PRP ou gel autólogo rico em plaquetas (GRP), soro condicionado autólogo e hidrogel de quitosana. O campo das terapias regenerativas está se expandindo em um ritmo tão rápido que é difícil acompanhar as novas descobertas científicas (LACOPETTI *et al.*, 2012; DAHLGREN, 2018; SPARKS *et al.*, 2021).

Dentro da medicina regenerativa podemos citar os curativos oclusivos, no qual existem diversos tipos de curativos e coberturas disponíveis no mercado. O curativo oclusivo é útil nas seguintes etapas de recuperação do tegumento: higienização, desbridamento, diminuição da população bacteriana, controle do exsudato, estímulo à granulação e proteção da reepitelização (SMANIOTTO *et al.*, 2012).

A seleção do curativo deve ser baseada em sua capacidade de fornecer ou manter o ambiente úmido, promover a migração epidérmica, promover a angiogênese e a síntese do tecido conjuntivo, permitir a troca gasosa entre o tecido lesado e o ambiente, para o leito da ferida e melhorar a migração epidérmica, fornecer proteção contra infecção bacteriana. Além disso, deve ser fácil de remover após a cicatrização, fornecer um ambiente favorável ao desbridamento para melhorar a migração de leucócitos e apoiar o acúmulo de enzima e deve ser estéril, não tóxico e não alérgico (DHIVYA *et al.*, 2015).

Os substitutos cutâneos são caracterizados como uma via de tratamento alternativo no processo de cicatrização de feridas. Especificamente, os enxertos cutâneos são segmentos de pele compostos de epiderme e por quantidades variáveis de derme, podendo variar de delgados a espessos dependendo da quantidade de derme (FERREIRA, 2021). Todavia, a literatura reporta menor durabilidade, maior predisposição a traumas e podem ter crescimento piloso ausente ou esparso em comparação com os enxertos de espessura totais (MACPHAIL, 2014).

Já as matrizes dérmicas ou substitutos biológicos apresentam-se como biomateriais permissivos a neovascularização e formação de uma neoderme em vez de apenas uma cicatriz em lesões cutâneas (FERREIRA, 2021; CORRÊA, 2018). Essas terapias associadas potencializam o processo cicatricial para a cura, uma vez que possibilitam enxertos cutâneos mais finos, de espessura parcial; minimizam os danos da área doadora em casos de autoenxerto e reduz a formação de cicatrizes. Um biomaterial desejável para o tratamento de feridas abertas, não só de animais, mas também de seres humanos é caracterizado pela diminuição da manipulação, dor e estresse diário e, conseqüentemente, proporcionando uma recuperação mais rápida (PIRESet al., 2015; CORRÊA, 2018; MOERBECK-FILHO et al., 2019).

Nesse sentido, a medicina regenerativa juntamente com a bioengenharia de tecidos tem avançado com o desenvolvimento e emprego de matrizes biológicas para regenerar tecidos ou órgãos danificados em situações clínicas como lesões, infecções ou traumas (KAUL & VENTIKOS, 2015). Diversos biomateriais têm sido desenvolvidos com esse objetivo e podem ser de natureza sintética, semissintética ou derivados de tecidos biológicos. Suas aplicações variam de curativos temporários e removíveis até matrizes proteicas biocompatíveis e permanentes, muitas vezes absorvidas pelo organismo do paciente (PERES, 2014). No Brasil, os substitutos biológicos são pouco usados devido ao alto custo, apesar de serem significativamente mais vantajosos para os pacientes em relação aos tratamentos tradicionais (FERREIRA et al., 2011). Esse contexto, impulsionou a pesquisa para o desenvolvimento de novos dispositivos biomédicos para uso clínico.

1.5 Pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencente à família dos ciclídeos, é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, como o Oriente Médio (Israel), no Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa) e no Continente Americano, Estados Unidos, México, Panamá e toda a América do Sul (CARVALHO, 2006). Tem rápido crescimento, grande rusticidade, fácil manejo, alto índice de rendimento e

possui carne de ótima qualidade, atingindo cerca de 800 a 1000 gramas, em 6 meses de cultivo. Foi introduzida no Brasil em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), nos açudes do Nordeste, difundindo-se, posteriormente, para todo o país (CASTAGNOLLI, 1996). No Ceará, a piscicultura da tilápia encontra-se difundida em diversos reservatórios, nas principais bacias hidrográficas do Estado, sendo o Açude Castanhão, localizado nos municípios de Jaguaribara, Alto Santo, Jaguaribe e Jaguaratama, o seu principal produtor.

A pele de peixe é um produto nobre e de alta qualidade, pois possui resistência peculiar (AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2011). Contudo, a comercialização e a industrialização dessa pele enfrentam problemas de competitividade com outras peles existentes no mercado, devido ao pequeno tamanho e a sua fragilidade para uso industrial. Quando se deu início ao estudo com a pele de Tilápia, menos de 1% desse material era aproveitado no artesanato. Portanto, a pele de tilápia é considerada economicamente de pouca rentabilidade e, conseqüentemente, tornou-se um subproduto de descarte na piscicultura. Por outro lado, como já foram citados anteriormente, diversos materiais de origem biológica vêm sendo testados e alguns já foram introduzidos na terapêutica, como curativos oclusivos no tratamento de queimaduras.

Desde 2015, a pele da tilápia vem sendo estudada como biomaterial alternativo para ser usado na medicina regenerativa. Os estudos histológicos e tensiométricos realizados pela equipe de pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM), demonstraram que as características microscópicas da pele da tilápia são semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e que possui elevada resistência e extensão à tração em quebra. A pele da tilápia é constituída, predominantemente, por derme, com ausência total de revestimento epitelial. A derme superficial mostra fibras colágenas compactadas e em paralelo, enquanto que na profunda, as mesmas são espessas e dispostas, ora em paralelo ora transversalmente (ALVES *et al.*, 2015). Como a pele da tilápia apresentou uma boa resistência à tração e à compressão, viu-se uma real possibilidade de que a mesma pudesse vir a ser utilizada como curativo oclusivo biológico no tratamento de queimaduras, o que levou à continuidade nos estudos.

Em 2016, estudos microbiológicos foram realizados para avaliação da microbiota dos peixes utilizados para extração das peles. Foi um estudo observacional, quantitativo e transversal. 20 espécimes de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pesando aproximadamente 1.000 gramas cada um, tinha sua microflora oral e da pele cultivada em placas que foram analisadas. Foram selecionadas todas as colônias com características morfológicas distintas, e reisoladas. 113 microorganismos foram isolados, sendo que os microorganismos gram-negativos foram os mais prevalentes. Gram-positivo *Globicatella*, *Streptococcus* e *Enterococcus* também foram encontrados. *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae* foram isolados em placas de todos os estudos. Gram-positivas *Enterococcus faecalis* foi prevacente em 70 a 60% das amostras de pele e por via oral, respectivamente. Ao considerar a ausência de sinais infecciosos nos peixes e uma carga inferior a 100.000 unidades formadoras de colônias (CFU's), conforme padronizado para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), concluiu-se que os valores de CFU's encontrados neste estudo eram de microfloras normais e não infecciosas (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2016).

Visto que a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é a espécie de peixe mais cultivada no Brasil, sua carne possui excelência de aceitação no mercado de alimentos (PEIXE BR, 2021) e sua pele continua sendo subproduto de descarte da indústria, o primeiro bioproduto da pesquisa foi a pele de tilápia em Glicerol. No processo de produção, a pele é submetida a duas etapas de clorexidina e tres etapas com Glicerol (50%, 75% e 100%) (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017). Testes de radioesterilização gama foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares (IPEN) e demonstram que as diferentes substâncias utilizadas no processo de esterilização da pele da tilápia do Nilo não modificaram a sua constituição histológica. As peles submetidas à irradiação apresentaram, de forma dose-dependente, maiores valores de deformação à tração e menor extensão à tração em quebra. Isto pode ser atribuído à disposição mais em paralelo das fibras colágenas, as quais, em amostras não irradiadas, apresentam-se, também, de forma transversal/vertical, provavelmente, aumentando a extensão. Esta disposição mais paralela dos feixes colagênicos foi verificada nas doses de 25kGy e 35 kGy (ALVES *et al.*, 2015; ALVES *et al.*, 2018).

Todos esses resultados motivou a equipe de pesquisadores do NPDM da Universidade Federal do Ceará (UFC) a realizar estudos *in vivo* com ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) para demonstrar o uso da pele de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras em ratos. A pele da tilápia foi aplicada em quatro grupos de 10 ratos, sendo dois grupos controles e dois com queimaduras de 2º grau superficial e profundo. Foi apresentando um resultado de não inferioridade do tratamento com a pele em relação ao tratamento convencional com o antimicrobiano sulfadiazina de prata do grupo controle, tendo boa aderência ao leito da ferida e não ocorreram alterações nos exames laboratoriais de função hepática, renal e hemograma (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Os resultados obtidos nas etapas da fase pré clínica (*in vitro* e *in vivo*), principalmente pela sua semelhança histológica e bons resultados obtidos em animais de laboratório, confirmaram que a pele da tilápia pode ser uma boa opção de tratamento local das queimaduras e feridas (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Os excelentes resultados culminaram no avanço dos estudos com a pele de tilápia, dando início ao estudo de fase I. No estudo de fase I, que aconteceu em 2016, foi realizado um estudo clínico para avaliar a segurança e o potencial de irritabilidade e sensibilização cutânea da pele de tilápia. Essa pesquisa foi terceirizada e feita pela empresa Allergisa. Apenas 4 participantes (6,9% do total) apresentaram sinais clínicos cutâneos, sendo que entre estes sujeitos, três já relatavam histórico prévio de alergias e o outro sujeito apresentou reação no local onde o esparadrapo estava aderido, não qualificando, desta forma, como uma reação relacionada à pele da tilápia. 93,1% dos participantes da pesquisa não apresentaram nenhum tipo de reação. Tais resultados demonstraram que a pele não causou irritação ou sensibilização significativa na pele dos sujeitos de pesquisa saudáveis, demonstrando segurança na sua utilização em seres humanos.

Após relevantes publicações de relatos de casos relacionados ao uso do produto em humanos, incluindo casos pediátricos, com excelentes resultados (COSTA *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2019; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2019; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2020a; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2020b), somando-se à alta disponibilidade de

matéria-prima e por ser uma tecnologia genuinamente nacional, abriu-se a possibilidade para uso nas mais diversas aplicações biomédicas. Uma inovação que poderá ser fabricada a custo reduzido, com impacto ecológico positivo e sustentável. Dessa forma, o produto terá vantagem competitiva em relação aos concorrentes importados e grande potencial de inserção no mercado nacional, gerando um impacto financeiro e social significativo no sistema de saúde público e privado do Brasil (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2021).

Este fato motivou o início do estudo de fase II, no qual se enquadravam pacientes com queimaduras de 2º grau superficial ambulatorial, queimaduras de 2º grau superficial internado, queimaduras de 2º grau profundo internado e queimadura de 3º grau, para avaliação da eficácia da pele da Tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras em adultos, em comparação com o tratamento convencional utilizando sulfadiazina de prata. Os resultados obtidos foram positivos, a pele da Tilápia apresentou boa aderência ao leito das feridas, reduzindo a dor e o sofrimento dos pacientes. Sua utilização reduziu o número de dias até a completa re-epitelização, assim como o número de troca de curativos e conseqüentemente o número de anestésias e analgesias utilizadas, auxiliando no processo de cicatrização, diminuindo a perda de líquidos, demonstrando benefícios para os pacientes (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2020b).

E, finalmente, em 2021 foram publicados os dados do estudo de fase III, avaliando o controle da dor e redução dos custos, no qual observou-se que ao acelerar a reepitelização, melhorar a dor relacionada à queimadura e diminuir os custos relacionados ao tratamento, podendo a pele de tilápia do Nilo beneficiar os sistemas de saúde pública com os poucos recursos dos países em desenvolvimento (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2021). Esses resultados confirmam a pele de tilápia como um novo biomaterial de grande potencial em medicina regenerativa. O curativo biológico em Glicerol oriundo da pele de tilápia foi utilizado como um promissor biomaterial de origem animal, de fácil obtenção, principalmente como curativo oclusivo para o tratamento de queimaduras (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017; 2019).

Recentemente, foi desenvolvido o segundo produto a partir da pele de tilápia *in natura*: a pele de tilapia liofilizada. Com isso, foi possível reduzir os custos de

produção, embalagem, conservação e transporte das peles de tilápia comparadas com as produzidas em glicerol. Com grande sucesso, foi aplicado como um novo dispositivo empregado no tratamento de lesões cutâneas em mais de 500 pacientes queimados, em mais de 53 vaginoplastias e cirurgias de redesignação sexual (DIAS *et al.*, 2019a; 2019b; 2019c; SLONGO *et al.*, 2019; LIMA-JUNIOR *et al.*, 2020c; RODRIGUES *et al.*, 2020). No Brasil, o tratamento convencional para queimaduras consiste de pomada antibiótica, que provoca intensa dor com as trocas diárias de curativos. Por outro lado, as vaginoplastias e as cirurgias de redesignação sexual geralmente são realizadas com autoenxertos, que geram sequelas, morbidades e grande sofrimento pós-operatório. Nesse contexto, o curativo biológico de pele de tilápia apresentou-se como um biomaterial alternativo, barato, biossustentável, efetivo e reduz a dor do paciente. Este curativo supera desafios do tratamento de queimados do Brasil, pois, propicia melhores resultados com potencial redução de custos, contribuindo para a qualidade de vida dos pacientes.

Clinicamente, os animais também são frequentemente acometidos por diferentes tipos de feridas abertas, e a determinação do manejo adequado para o tratamento é essencial para a cicatrização das lesões (ABDULLAHI *et al.*, 2014). O manejo diário de feridas abertas gera um grande desconforto, dor e estresse. As técnicas mais utilizadas são *spray* de prata, oxigenoterapia, ozonioterapia, hidrocoloides etc, sendo todos de alto custo. A busca por novas técnicas e terapias regenerativas é necessária para a cicatrização eficiente das lesões cutâneas e o bem-estar animal (CAMPOS *et al.*, 2007).

Dessa forma, a pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se apresenta como um biomaterial promissor para o tratamento na forma de curativo oclusivo ou para gerar uma matriz dérmica, principalmente para casos de queimaduras de 3º grau (muito profundas) e feridas extensas (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017; 2019). O seu uso em feridas é uma alternativa de tratamento tanto para seres humanos quanto para animais, diminuindo a manipulação, dor, estresse diário e proporcionando uma recuperação mais rápida (COSTA *et al.*, 2017). O uso dessa matriz dérmica, possibilita o acesso a novas terapias no tratamento na medicina veterinária. Além disso, expande os horizontes da pesquisa e torna-se uma

cobertura biológica mais acessível que as demais matrizes já existentes no mercado.

1.6 Relevância e justificativa

A pele da tilápia vem sendo estudada desde 2015, como uma possível fonte de biomaterial para enxertia, pois ela possui características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana; elevada resistência e extensão à tração em quebra, o que suporta sua possível aplicação como biomaterial; e a derme desta pele é composta por feixes organizados de fibras de colágeno denso, predominantemente do tipo I, o que traz considerável importância para o seu uso clínico (ALVES *et al.*, 2015).

Em 2016, novos estudos foram realizados para caracterizar a microbiota da pele da tilápia e os resultados encontrados indicaram a presença de microbiota normal, não infecciosa, não sendo ela, portanto, uma fonte de contaminação (LIMA JÚNIOR, 2016). Em 2017, foi divulgado o resultado do uso da pele de tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras em ratos em que a pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas induzidas, interferindo positivamente no processo cicatricial, no qual esses resultados possibilitaram o prosseguimento das investigações para pesquisas em seres humanos para confirmação da sua segurança e eficácia como curativo biológico (LIMA JÚNIOR, 2017). No mesmo ano, foi publicado um relato da avaliação da redução do uso de analgésicos por pacientes ambulatoriais de um centro de queimados de referência em Fortaleza-CE com a aplicação da pele de tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras de segundo grau superficial, em que concluiu-se que a utilização de pele de tilápia no tratamento desse tipo de queimadura gera menos dor para o paciente do que o tratamento com a pomada de sulfadiazina de prata, o que acarreta em um cuidado médico mais humanizado e diminui os custos gerados para o Sistema Único de Saúde (SUS) (COSTA, 2017).

Baseado na comprovação da eficácia do curativo biológico da pele da tilápia na cicatrização de queimaduras de segundo grau em humanos levantou-se o questionamento dos benefícios do uso da pele da tilápia na cicatrização de outros tipos de ferimentos, além de queimaduras, e em outras espécies. A espécie

escolhida foi a equina devido o enorme desafio, pois são animais que frequentemente se ferem acidentalmente e precisam ficar afastados das suas atividades por bastante tempo, até completa cicatrização dos ferimentos. Além disso, essa espécie tem uma característica na cicatrização de feridas que, muitas vezes, é um inconveniente para a sua recuperação que é a formação de tecido de granulação exuberante. Com esse estudo, pretendemos ter alternativas para uma rápida recuperação desses pacientes, diminuindo a formação do tecido exuberante, além de permitir que menos curativos sejam feitos, estressando menos esses animais, causando menos dor e diminuindo os custos do tratamento, além do risco de acidente para quem estiver tratando do animal.

Estudos clínicos já fazem parte da rotina da pesquisa em humanos, no entanto, na Medicina Veterinária, especialmente se tratando de feridas, os estudos experimentais ou pré-clínicos são mais comuns. Frequentemente é observado estudo de feridas em cavalos, em que as lesões são confeccionadas pelo pesquisador, na região dos membros ou garupa, padronizando o tamanho da lesão e o dia de início do tratamento. Portanto, esse é um estudo clínico pioneiro na medicina equina, em que as lesões não são confeccionadas, mas são utilizados os casos de feridas traumáticas que surgem na rotina.

Diante disso, considerando a lacuna acerca do comportamento desse curativo biológico em outros tipos de ferida e espécies, este estudo tem a finalidade de responder à seguinte pergunta: a aplicação de xenoenxerto de pele de tilápia em feridas acidentais em cavalos é eficaz para acelerar o processo de cicatrização e, por conseguinte, reduzir o tempo de inatividade do animal, bem como diminuir o número de trocas de curativo?

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da utilização da pele de TilápiadoNilo (*Oreochromis niloticus*) como xenoenxerto no manejo de úlceras traumáticas em equinos comparada com o curativo oclusivo com sulfadiazina de prata.

2.2 Objetivos específicos

Comparar as duas abordagens terapêuticas no que concerne aos seguintes parâmetros:

- Análise macroscópica do processo de cicatrização, por meio de planimetria da úlcera, para avaliação da reparação por contração e epitelização da ferida, mediante a determinação do percentual de cicatrização total em relação à medida da úlcera verificada no pré-tratamento;
- Análise clínica do processo de cicatrização da ferida por meio da aplicação do instrumento *Pressure Ulcer Scale for Healing* (PUSH);
- Tempo até a completa cicatrização;
- Número de trocas de curativo ao longo do estudo;
- Análise histopatológica para avaliação do processo inflamatório, da deposição de colágeno e da resposta angiogênica.

3 MÉTODO

3.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo de intervenção em equinos, prospectivo, aberto, randomizado e controlado, com o propósito de avaliar a eficácia da pele de Tilápiado Nilo (*Oreochromis niloticus*) como xenoenxerto no manejo/tratamento de úlceras traumáticas em equinos comparada com o curativo oclusivo com sulfadiazina de prata.

3.2 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), tendo sido APROVADO conforme o protocolo CEUA nº 1560010219 de 16/04/2019. O estudo foi realizado em conformidade com as normas de boas práticas referentes às pesquisas que envolvem o uso de animais, adotadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Banco de Pele Animal do NPDMdaUFC, onde foram preparadas, embaladas e armazenadas as frações de pele de tilápia, bem como no Regimento de Polícia Montada (RPMONT) da Polícia Militar do Ceará (PMCE), onde foram selecionados os animais que integraram a parte clínica do estudo.

O RPMONT é uma das unidades especializadas da Polícia Militar do Ceará e está localizado na cidade de Fortaleza-CE e possui um plantel de mais de 100 cavalos, porém, apesar da sua atividade fim ser o policiamento montado, dentro desse número se encontram animais aposentados ou que participam de projetos sociais como a equoterapia e equitação para crianças. A maior parte dos animais é criada na forma de sistema semi-intensivo em que passa parte do dia em baia e outra parte solto em piquete, respeitando os lotes específicos.

Entre os diversos departamentos distribuídos no quartel, existe o Departamento Médico Veterinário (DMV) composto por um oficial, um auxiliar, uma veterinária e quatro auxiliares veterinários que trabalham sob escala de modo que os

equinos tenham assistência emergencial 24h por dia. Para isso, o RPMONT possui um espaço denominado “enfermaria” onde os atendimentos e tratamentos clínicos são realizados. Em casos de necessidade cirúrgica, os animais são encaminhados para um Hospital.

3.4 Animais

Foram utilizados 13 cavalos (*Equus caballus*) sem raça definida, selecionados a partir do plantel de equinos do RPMONT. Os animais se encontravam alojados em baias individuais, com tamanho e piso conforme padrão da instituição, iluminação natural, alimentados com feno e ração própria para a espécie e com acesso a água potável. O manejo alimentar e de soltura dos animais não foi alterado pelo estudo, sendo mantida a rotina à qual os mesmos já estavam habituados.

3.4.1 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios foram satisfeitos para que o animal fosse incluído no estudo:

- Equinos de ambos os sexos;
- Faixa etária: de 5 a 30 anos;
- Massa corporal: entre 400 e 600 kg;
- Presença de úlcera traumática localizada nos membros anteriores ou posteriores, com área não inferior a 12 cm², área obtida através da multiplicação do maior e menor diâmetro da lesão. Em animais que apresentaram mais de uma úlcera, a de maior área foi escolhida;
- Ausência de outras doenças significativas, que a juízo do médico veterinário, pudessem interferir na resposta ao tratamento ou nos procedimentos estabelecidos no protocolo.

3.4.2 Critérios de exclusão

A ocorrência de alguns dos seguintes critérios excluiu o animal da pesquisa:

- Hipersensibilidade conhecida aos constituintes do produto sob investigação ou a compostos relacionados; história de reações adversas sérias;

- Animal com evidência atual de doenças significativas de origem: gastrointestinal, cardiovascular, hepática, renal, pulmonar, ou outra que impedisse a sua inclusão no estudo e/ou que, a juízo do pesquisador principal, expusesse o equino a risco adicional do que normalmente previsto;
- Ter efetuado qualquer tratamento prévio para a lesão em questão que, a juízo do pesquisador principal, possa interferir nos objetivos do estudo ou realizado tratamento dentro dos 3 meses prévios ao estudo com qualquer fármaco reconhecidamente com potencial tóxico bem definido para os grandes órgãos;
- Existência de qualquer condição que impedisse a inclusão do animal no estudo, segundo julgamento do investigador.

3.4.3 Critérios de descontinuação

Constituem critérios para descontinuação do animal no estudo:

- Qualquer condição clínica que, a critério do pesquisador, impedisse a continuidade do animal no protocolo;
- Ocorrência de evento adverso grave;
- Evento adverso que impossibilitasse a continuidade do uso do produto em estudo;
- Diagnóstico de doença no decorrer do ensaio que fizesse parte dos critérios de exclusão.
- Equinos cuja saúde ou bem-estar pudesse estar sendo colocados em risco pela manutenção no estudo;
- Desenvolvimento, no decorrer do tratamento, de alguma doença intercorrente requerendo medicamento que pudesse confundir ou interferir na avaliação do produto sob investigação;
- Piora da lesão durante o tratamento que, a juízo do pesquisador, implicasse a adoção imediata de outro procedimento terapêutico;
- Além disso, com o objetivo de garantir o bem-estar dos animais, o estudo poderia ser interrompido em parte ou como um todo caso, a juízo do pesquisador principal, fosse constatado que os riscos a que estão sendo submetidos fossem superiores aos antecipadamente previstos.

3.5 Intervenções avaliadas

3.5.1 Produto sob investigação: Pele de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Produto Teste:	<p>Pele de Tilápia-do-Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) glicerolada e esterilizada por radiação gama.</p> <p>Obs.: Patente registrada no INPI sob número BR 10 2015 021435 9.</p>
Fornecimento:	<p>A Pele de Tilápia-do-Nilo esterilizada foi fornecida em quantidade suficiente para suprir o tratamento dos sujeitos de pesquisa incluídos no estudo pelo Banco de Pele Animal, instalado no NPDM.</p>
Apresentação:	<p>Pele de tilápia recortada e embalada em pedaços de 10,0 cm x 5,0 cm.</p>
Preparo:	<p>As peles passaram por um processo de esterilização para garantir a segurança de seu uso em seres humanos e, conseqüentemente, em animais, conforme descrição a seguir:</p> <p>Após o abate do peixe, as peles foram removidas e submetidas a lavagem em água corrente, para a remoção de qualquer resquício de sangue e outras impurezas e foram colocadas em soro fisiológico (solução de NaCl a 0,9%) estéril, previamente resfriado a 4°C, para a limpeza final.</p> <p>Em seguida, foram retirados os excessos de músculo, que ainda permaneceram ligados à pele, e feito o recorte em pedaços de 10,0 cm x 5,0 cm, lavados com Soro Fisiológico (SF), obedecendo as seguintes etapas de esterilização:</p> <p>1ª Etapa - as peles foram colocadas em um recipiente estéril, contendo gluconato de clorexidina (solução com tensoativos) a 2%, onde permaneceram por 30 min.</p> <p>2ª Etapa - após a operação anterior, as peles foram lavadas com SF estéril e removidas para outro recipiente, contendo outra solução de gluconato de clorexidina a 2%, onde permaneceram por 30 minutos.</p> <p>3ª Etapa - as peles foram enxaguadas em soro fisiológico estéril e colocadas em um recipiente, contendo solução 50% de glicerol, 50% de soro fisiológico e embaladas para o transporte até o laboratório numa caixa isotérmica contendo gelo.</p> <p>As próximas etapas foram realizadas em ambiente estéril, com fluxo laminar horizontal ou vertical:</p> <p>4ª Etapa –antes de 24h, as peles foram removidas da solução anterior, lavadas com SF estéril e colocadas em um recipiente estéril e hermético, contendo 75% de glicerol, 25% de soro fisiológico (massageando as peles por 5 minutos nesta solução) e mantidas por 3 horas, num banho-maria, com agitador em velocidade constante de 15 rotações por minuto e temperatura de 37°C.</p> <p>5ª Etapa - as peles foram removidas, lavadas com SF estéril novamente e colocadas em outro recipiente estéril e hermético, contendo 100% de glicerol (massageando as peles por 5 minutos nesta solução) e mantidas em banho-maria, na temperatura de 37°C e 15 rotação por minuto, por mais 3 horas.</p> <p>6ª Etapa - ao final da última etapa do glicerol, as peles foram</p>

	<p>recondicionadas em duplos envelopes plásticos estéreis, com dupla selagem e armazenadas a 4°C.</p> <p>7ª Etapa – As peles foram enviadas para radioesterilização complementar, no Instituto de Pesquisa Energética Nuclear (IPEN-SP), em gama cobalto a 30 KGs.</p> <p>Foram realizados sete testes microbiológicos, para bactérias gram +, gram - e fungos, iniciando-se na pele <i>in natura</i> (antes da primeira etapa) e nas seis etapas subsequentes (Lima-Júnior et al., 2017).</p>
Via de administração	Via tópica.
Armazenamento:	Em geladeira, com temperatura entre 4-8°C.
Procedimentos para aplicação:	Para utilizar as peles previamente esterilizadas, antes da aplicação, as mesmas foram removidas do duplo envelope plástico, colocada em recipiente estéril com soro fisiológico, massageada e lavada por cinco minutos (para retirada do glicerol do derma da pele). Este procedimento foi repetido por três vezes, sendo renovado o soro fisiológico. Após este procedimento, as peles foram recortadas do tamanho que passasse 1cm da borda da ferida e aplicadas como curativo oclusivo.
Condições para operação/manipulação:	Em ambiente limpo, utilizando luvas de procedimento.
Acesso ao produto:	A Pele de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) esterilizada é armazenada em local de acesso restrito. Apenas pessoas autorizadas podem ter acesso a este produto.

3.5.2 Produto comparador: curativo oclusivo com sulfadiazina de prata

Produto comparador:	Sulfadiazina de prata.
Fornecimento:	O produto comparador foi adquirido através de doação do Instituto de Apoio ao Queimado (IAQ) em quantidade suficiente para suprir o tratamento dos animais incluídos no estudo.
Apresentação:	Creme dermatológico 10 mg/g (1%) Nativita farmacêutica®
Preparo:	Não se aplica.
Via de administração	Via tópica.
Armazenamento:	Foi armazenado em sua embalagem original, de acordo com as instruções do fabricante.
Procedimentos para aplicação:	O produto foi utilizado de acordo com as instruções de uso do fabricante.
Condições para operação/manipulação:	De acordo com as instruções de uso do fabricante.

Acesso ao produto:	O produto comparador foi armazenado em local de acesso restrito. Apenas pessoas autorizadas tiveram acesso a este produto.
---------------------------	--

3.6 Delineamento do estudo

3.6.1 Definição dos grupos de tratamento

Foram incluídos 13 animais no estudo, que foram distribuídos aleatoriamente nos dois grupos de tratamento, Pele de Tilápia e Sulfadiazina de Prata, conforme descrição a seguir:

- **Grupo Sulfadiazina de Prata:** constituído por seis animais, nos quais, após limpeza da ferida, o curativo foi realizado por meio da aplicação do creme de sulfadiazina de prata a 1%, coberto com uma camada de gaze fixada com atadura;
- **Grupo Pele de Tilápia:** formado por sete animais, nos quais, após limpeza da ferida, foi aplicada a pele de tilápia como curativo oclusivo primário; em seguida, foi realizado o curativo secundário com atadura.

3.6.2 Método de randomização e de garantia do sigilo da lista de alocação

Após a inclusão no estudo, procedeu-se à alocação aleatória dos animais nos dois grupos de tratamento. A alocação nos dois grupos foi realizada mediante a geração de uma lista de números aleatórios por um software (randomization.com) apropriado. Para cada sujeito, foi, então, designado um número ao qual estava associado um determinado tratamento. A lista foi gerada por um membro da equipe que não participou das medidas do efeito terapêutico. Para garantir o equilíbrio no número de animais em cada grupo, utilizou-se a técnica de randomização em bloco. Assim, foram definidos 4 blocos de 4 animais, de maneira que, para cada 4 equinos que ingressavam no estudo, 2 animais eram alocados no grupo Pele de Tilápia e 2 no grupo Controle.

3.6.3 Etapas do estudo

Visita 1 (avaliação inicial / inclusão – dia zero):

- Avaliação clínica do animal – Exame físico, sinais vitais;
- Avaliação dos Critérios de Elegibilidade (Critérios de Inclusão e Exclusão);
- Alocação no grupo Sulfadiazina de Prata ou Pele de Tilápia (conforme randomização);
- Biópsia da lesão;
- Obtenção da fotografia;
- Realização da planimetria da lesão;
- Aplicação da escala Pressure Ulcer Scale for Healing (PUSH);
- Preparo do curativo;
- Avaliação dos demais desfechos secundários.

Visitas de tratamento – visitas de 2 a 9 (a cada 7 dias até a cicatrização da ferida ou encerrado o prazo de permanência no estudo – dia 56, visita 9):

- Avaliação clínica do animal;
- Pesquisa de eventos adversos;
- Avaliação dos critérios de descontinuação;
- Obtenção da fotografia;
- Realização da planimetria da lesão;
- Aplicação da escala PUSH;
- Biópsia da lesão (Visitas 1, 5 e 9);
- Troca do curativo;
- Avaliação dos demais desfechos secundários.

Visita 10 (pós-tratamento) – 63 dias:

- Avaliação clínica do animal;
- Pesquisa de eventos adversos;
- Observação da lesão ou cicatriz;
- Realização da planimetria da lesão.

Portanto, as avaliações foram realizadas de 7 em 7 dias, iniciando no dia zero (D0 - pré-tratamento) até o dia 63 (D63), totalizando 10 momentos.

3.7 Procedimentos que foram realizados no estudo

3.7.1 Tratamento das úlceras

Nos dois grupos, antes do primeiro curativo, foi realizado o desbridamento das feridas, quando necessário, de acordo com a presença de tecido necrótico ou de granulação exuberante. Para tanto, inicialmente, os animais foram sedados com cloridrato de detomidina 1% (0,2-0,4ml/100Kg), administrado por via endovenosa, assim como foi feito o bloqueio local infiltrativo com cloridrato de lidocaína 2g/100ml (5-10ml/animal), para que não sentissem dor durante o procedimento. As feridas foram, então, devidamente limpas e desinfetadas com produtos específicos para limpeza, como clorexidina degermante 20% e soro fisiológico. Em seguida, procedeu-se ao desbridamento, quando necessário. Na sequência, foi realizado o curativo de acordo com o grupo ao que o animal pertence. Assim, no grupo da pele da tilápia, a mesma era moldada e posicionada com a parte de colágeno em contato com o leito da ferida e de modo que o curativo passasse em torno de 1 centímetro da borda da lesão, sendo coberto pelo curativo secundário de atadura, fixando a pele de tilápia no local correto. O creme de sulfadiazina de prata, por seu turno, foi aplicado no leito da ferida em fina camada, que foi recoberta por uma camada de gaze, sobreposta pelo curativo secundário de atadura. As feridas escolhidas foram nos membros, para que fosse possível um curativo secundário com atadura (Figura 4).

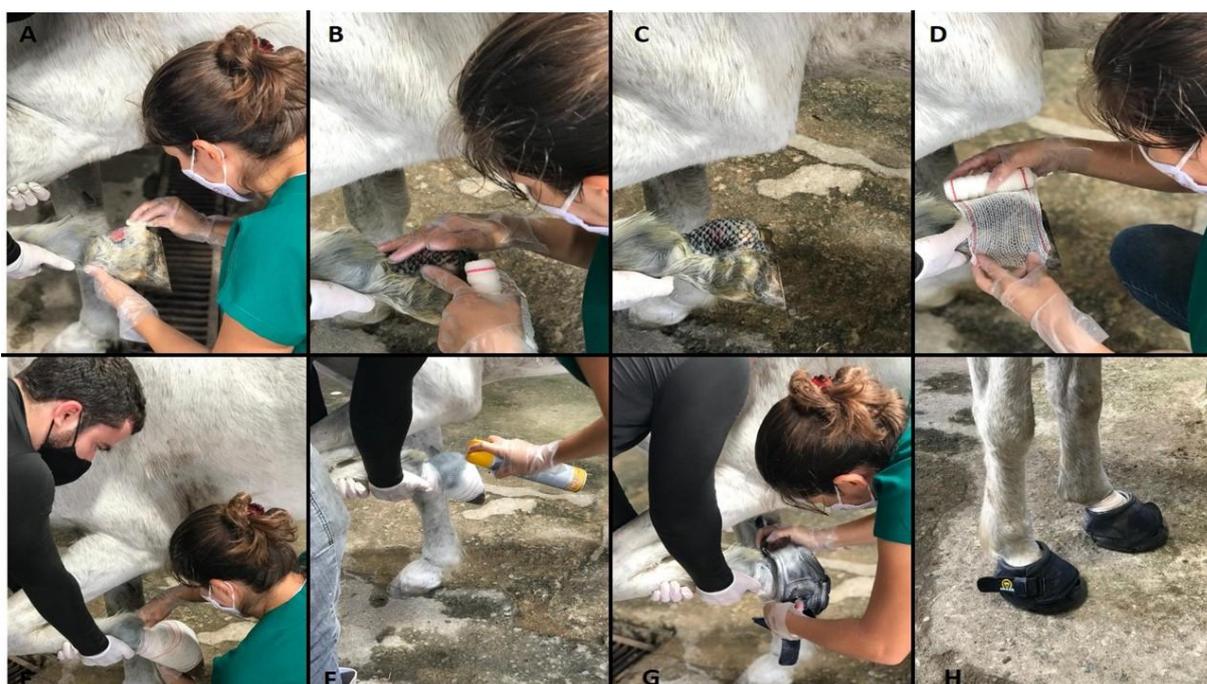


Figura 4: Tratamento da ferida e aplicação do curativo. A) Limpeza com clorexidina; B) Aplicação do curativo de pele de tilápia; C) Pele de tilápia aplicada; D) Aplicação do curativo secundário com atadura; E) Atadura posicionada; F) Aplicação de repelente; G) Reforço com uso de botas Cloche; H) Animal calçado com as botas (Arquivo pessoal).

No grupo Pele de Tilápia, o curativo secundário foi trocado, conforme a condição de limpeza do mesmo, a cada 3 a 7 dias, ocasiões em que o curativo primário era reavaliado para verificar a necessidade de troca em virtude de falta de aderência ao leito da ferida ou de perda de parte da cobertura do enxerto. No grupo controle, com o creme de sulfadiazina de prata, a troca completa do curativo era efetuada diariamente.

A contabilização do número de curativos foi realizada a cada semana, totalizando 9 semanas: dias 0 a 7, semana 1; dias 8 a 14, semana 2; dias 15 a 21, semana 3; dias 22 a 28, semana 4; dias 29 a 35, semana 5; dias 36 a 42, semana 6; dias 43 a 49, semana 7; dias 50 a 56, semana 8; dias 57 a 63, semana 9.

3.7.2 Procedimentos para aquisição das imagens das úlceras

A aquisição das imagens digitais coloridas das úlceras para fins de documentação foi realizada em cada visita de avaliação. Para tanto, utilizou-se uma câmera digital de celular, sob iluminação ambiente, batendo a foto sempre no mesmo local e mantendo-se o eixo da câmera perpendicular ao plano da úlcera.

Uma régua milimetrada foi posicionada rente à borda da lesão para fins de comparação com uma medida conhecida (Figura 5).



Figura 5: Aquisição da imagem da úlcera com régua milimetrada posicionada rente à borda da lesão (Arquivo pessoal).

3.7.3 Procedimentos para quantificação do processo de cicatrização das úlceras

A cicatrização total, que denota a reparação da lesão tanto por contração da ferida como por epitelização, foi quantificada por meio da mensuração da área total da úlcera usando planimetria computadorizada. Para tanto, uma folha de acetato transparente foi sobreposta à ferida, na qual foi traçado o contorno de suas margens (Figura 6). Em seguida, a folha transparente foi digitalizada em um scanner de mesa de alta resolução (HP DeskJet Ink Advantage1515), juntamente com uma régua milimetrada para possibilitar a conversão das medidas realizadas em unidades de comprimento e área conhecidas posicionada ao lado da região tracejada. As

imagens digitalizadas foram padronizadas no formato BMP com resolução de 300dpi e tamanho 640x480.



Figura 6: Transcrição do perímetro da úlcera em folha de acetato para viabilizar o cálculo da área por planimetria computadorizada (Arquivo pessoal).

A planimetria foi executada medindo os traços de fechamento do leito da ferida pelo software ImageJ 1.43 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), que é frequentemente utilizado pela comunidade científica para o processamento de imagens biomédicas (SCHNEIDER *et al.*, 2012), com base nas imagens digitalizadas dos desenhos das úlceras. Inicialmente foi feita a calibração, na qual cada imagem foi aberta no programa e, em seguida, foi realizada a mensuração da distância de 2cm na régua que foi digitalizada juntamente com o traçado, para a escolha da escala em centímetros, por meio da ferramenta *Straight line selection* e a opção *Set scale* na guia *Analyze* (Figura 7).



Figura 7: Primeiropasso para a mensuração de feridas cutâneas pelo programa Image J: padronização da escala em centímetros. Imagem digitalizada no formato BMP com resolução de 300dpi e tamanho 640x480 (Arquivo pessoal).

Em seguida, a área foi demarcada manualmente por meio da ferramenta *Freehand selections*, seguindo o contorno da borda do traçado, e foi feito o cálculo da área de acordo com a unidade de medida utilizada no processo de calibração (cm^2) na opção *Measure* da guia *Analyze*, na qual a área da referida região era equivalente à área da úlcera (Figura 8).



Figura 8: Demarcação da área da úlcera e mensuração de feridas cutâneas pelo programa Image

J. Imagem digitalizada no formato BMP com resolução de 300dpi e tamanho 640x480 (Arquivo pessoal).

Definiu-se como completa cicatrização a epitelização completa da úlcera na ausência de crosta. O processo de cicatrização foi determinado por meio do percentual de cicatrização total (PCT), que é o percentual da diferença entre a área da úlcera inicial (medida em D₀) e a área da úlcera mensurada num dado dia em relação à área da úlcera inicial, calculado conforme a seguinte expressão:

$$PCT = \frac{\text{Área}D_0 - \text{Área}D_i}{\text{Área}D_0} \cdot 100$$

Onde Áre₀ e Áre_i correspondem, respectivamente, à área da úlcera medida em D₀ e a área da úlcera mensurada em um dado dia de avaliação D_i.

A taxa de cicatrização (TC) verificada nos animais tratados com Sulfadiazina de prata e Pele de Tilápia é definida como a diferença entre a medida realizada no D₀ (pré-tratamento) e a última medida da área da úlcera (igual a zero no caso de cicatrização completa) dividida pelo número de dias decorridos entre D₀ e a última medida da ferida. A TC denota a velocidade com que a ferida é reparada, ou seja, constitui uma medida da velocidade de epitelização, sendo expressa em cm²/dia e calculada de acordo com a seguinte expressão:

$$TC = \frac{\text{Área}D_0 - \text{Área}D_i}{\Delta D}$$

Onde Áre₀ e Áre_i correspondem, respectivamente, à área da úlcera medida em D₀ e à área da úlcera mensurada em um dado dia de avaliação D_i, enquanto ΔD equivale ao número de dias transcorridos entre D₀ e D_i.

E a variação absoluta da área da úlcera observada nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia é definida como a diferença entre a medida obtida no dia zero (D₀ – pré-tratamento) e a última medida da área da úlcera (igual a zero no caso de cicatrização completa).

Para a evolução temporal do processo de cicatrização, foi aplicado o instrumento PUSH (anexo I) e feita a avaliação do escore total desse instrumento. O

escore total varia de 0 a 17 e foram realizados de 7 em 7 dias, iniciando no D0 até o D63, totalizando 10 momentos. Esse instrumento é usado para avaliar o processo de cicatrização de feridas e, por conseguinte, os resultados de intervenções em tal processo. O mesmo avalia a cicatrização mediante a análise de três parâmetros: área da úlcera, estimada pela multiplicação do maior comprimento pela maior largura da ferida, sendo expressa em cm^2 e, subsequentemente, classificada em escores variando de zero a 10, conforme a área calculada, metodologia esta substituída pelo cálculo da área da úlcera através do software ImageJ; quantidade de exsudato presente na ferida, avaliada após a remoção da cobertura e antes da aplicação de qualquer agente tópico, sendo classificada como ausente, pequena, moderada e grande, correspondendo aos escores de 0 (ausente) a 3 (grande); e aparência do leito da ferida, definida como o tipo de tecido dominante na região da úlcera, podendo ser especificado como tecido necrótico, esfacelo, tecido de granulação, tecido epitelial e ferida fechada ou completamente recoberta com epitélio, os quais correspondem aos escores 0 (ferida fechada), 1 (tecido epitelial), 2 (tecido de granulação), 3 (esfacelo) e 4 (tecido necrótico). Assim, o escore total do instrumento variou de 0 a 17, em que escores maiores indicam piores condições da úlcera e escores menores indicam melhora no processo de cicatrização (SANTOS *et al.*, 2005).

3.7.4 Procedimentos para a realização da biópsia da lesão

Nas visitas 1, 5 e 9, foi biopsiado um pequeno fragmento do tecido da úlcera, sendo o mesmo no centro da lesão, utilizando-se um punch dermatológico e uma lâmina de bisturi. A retirada do fragmento não foi realizada caso se constatasse a completa re-epitelização da úlcera no dia programado para o procedimento. Os fragmentos obtidos foram fixados em formol neutro tamponado a 10% e encaminhados para análise histopatológica.

3.7.5 Procedimentos para a análise histopatológica

Após a imersão em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas, os fragmentos foram lavados em água corrente e analisados macroscopicamente, sendo examinadas alterações na forma, coloração e consistência. Os fragmentos foram submetidos ao processador automático de tecidos (Lupe®), incluídos em

parafina fundida a 58°C e seccionados em micrótomo semiautomático Leica®, com cortes de 4 µm de espessura dispostos em lâminas de vidro (ALVES *et al.*, 2015). Posteriormente, os cortes foram desparafinizados na estufa a 60°C por 3h, seguido de dois banhos de xilol a cada 10 min e de reidratação em série decrescente de álcool a cada 3 min. Em seguida, as lâminas com os cortes histológicos foram submetidas às colorações de Hematoxilina-eosina (HE) e Picrosirius Red.

A coloração tem duas etapas: hematoxilina (1) um corante básico nuclear e eosina (2) um corante citoplasmático ácido (ácido xantêmico) (GURCAN *et al.*, 2009). As amostras foram reidratadas em série decrescente de álcool. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente, incubadas por 10 min em hematoxilina e lavadas em água corrente por 2 min para eliminar o excesso de hematoxilina. Posteriormente, receberam 5 banhos em eosina de 2 segundos cada, banhos em álcool grau crescente e por último em xilol. As lâminas foram montadas com bálsamo e recobertas com lamínulas para análise em microscópio de luz convencional para verificação das estruturas microscópicas, presença de células inflamatórias, vascularização, dentre outras.

A avaliação de marcadores dos processos de cicatrização foi feita seguindo a metodologia de Nussbaum *et al.* (2009) em que os mesmos foram classificados para cicatrização de feridas de acordo com sete parâmetros relacionados à resposta inflamatória aguda e reparo, que eram visualizadas no microscópio na objetiva de 40x: edema, neutrófilos, macrófagos, tecido de granulação, fibroblastos, deposição de colágeno e epitelização, em que cada característica foi avaliada semiquantitativamente (de 0, ausente a 3, proeminentes) com base em características histológicas bem definidas, além da neovascularização que foi adaptada da mesma metodologia sendo 0 ausente, 1 único foco, 2 menos de 50% do tecido e 3 acima de 50% do tecido.

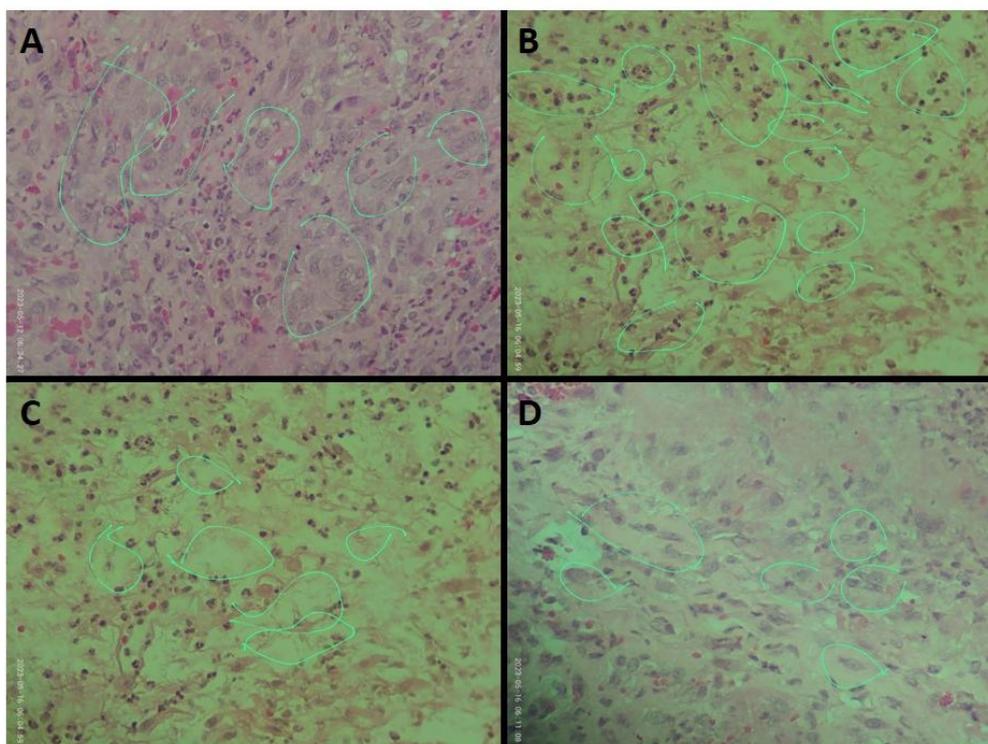


Figura 9: Imagens digitalizadas das lâminas de análises histopatológicas na objetiva de 40x, coradas com HE (Arquivo pessoal). A) Infiltrado de macrófagos associado a neutrófilos; B) Infiltrado de neutrófilos; C) Edema caracterizado por distensão das fibras colágenas; D) Fibroblastos associados à fibras colágenas

3.7.6 Procedimentos para a análise histoquímica do colágeno

A análise histoquímica das fibras colágenas foi realizada mediante a coloração com *Picrosirius Red*. A utilização desta técnica conforme descrita por Junqueira *et al.* (1978), seguiu o roteiro de colorações específicas do laboratório de Histopatologia do NPDM do Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Tal coloração possibilita uma análise qualitativa e quantitativa do colágeno, propiciando a identificação do colágeno tipo I e III. Para tanto, as lâminas foram confeccionadas através de cortes de 3 μm dos blocos parafinados selecionados. Foi realizada a desparafinização em estufa a 60°C por 3 horas, seguida de 3 banhos de 5 minutos em xilol, reidratação em solução de etanol decrescente (90%, 85% e 70%), com posterior lavagem com água, incubação em solução de *Picrosirius* (ScyTek®) por 30 minutos e realização de dois banhos de ácido clorídrico 5%. A

contra-coloração dos espécimes foi feita com hematoxilina de Harris por 45 segundos e, em seguida, realizada a montagem com Enthellan® (ALVES *et al.*, 2015).

A avaliação dos resultados foi realizada pela seleção de cinco campos das lâminas em um aumento de 400x. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Leica® modelo DM 2000), o que permite visualizar o colágeno tipo I (maduro) (Figura 9), com coloração vermelho-alaranjada, e o colágeno tipo III (imaturo) (Figura 10), com cor verde. As lâminas analisadas em luz convencional foram utilizadas para visualizar colágeno total (Figura 11). Os campos foram fotografados com uso de câmera DFC 295 acoplada ao microscópio.

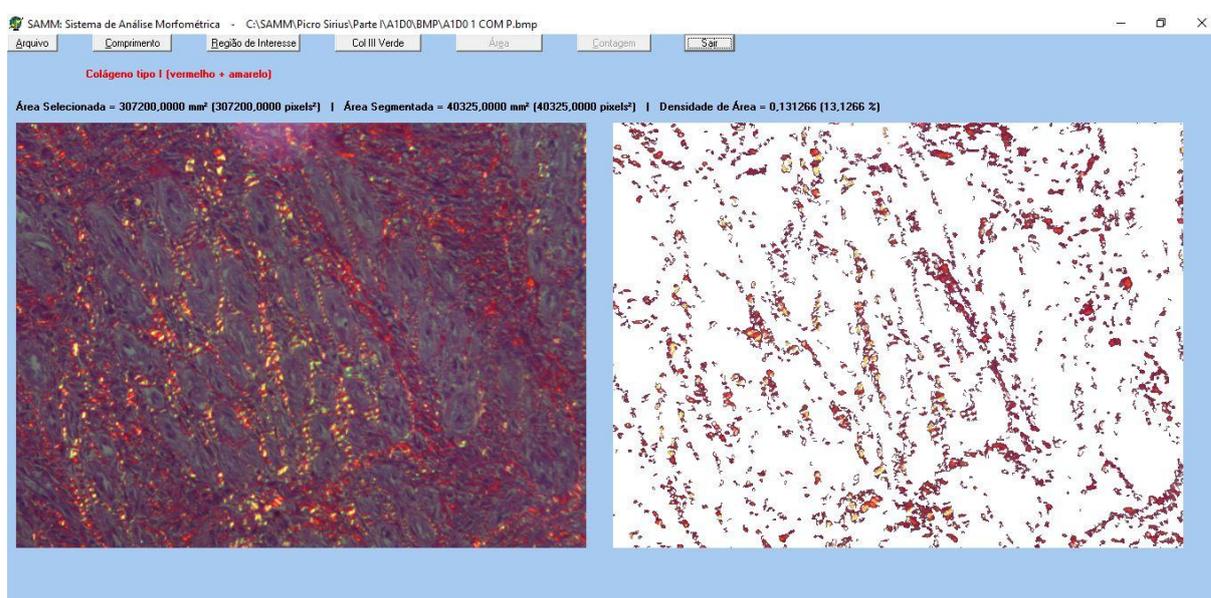


Figura 10: Quantificação de colágeno tipo I (Software SAMM-PSR versão 1.00). Imagem de lâmina corada com Picrosirius Red em um aumento de 400x, com luz polarizada (Arquivo pessoal).

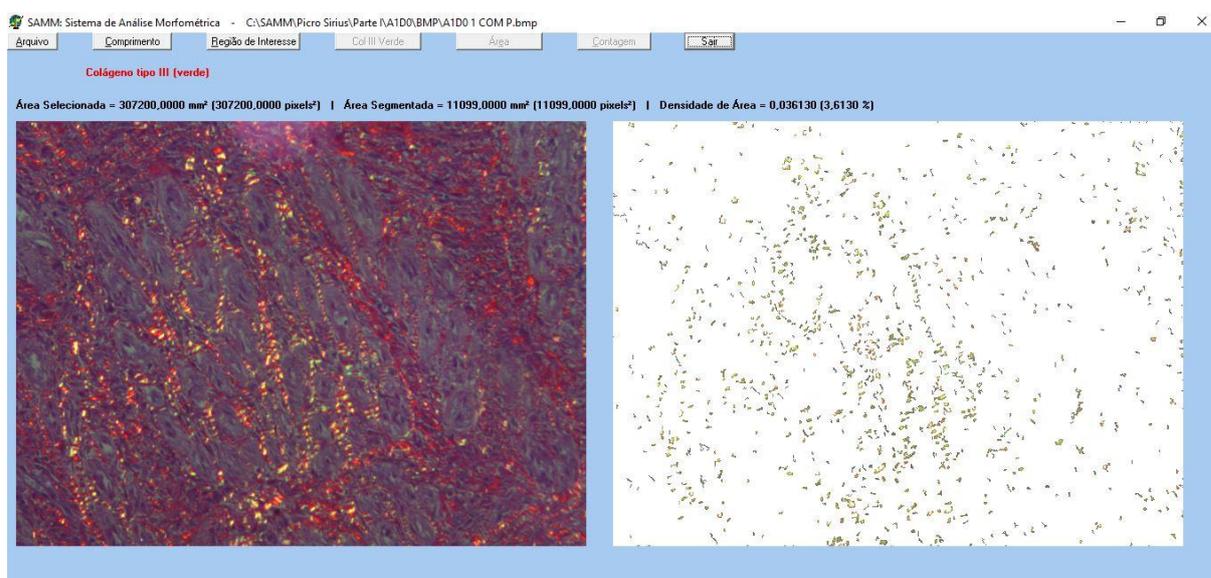


Figura 11: Quantificação de colágeno tipo III (Software SAMM-PSR versão 1.00). Imagem de lâmina corada com Picrosirius Red em um aumento de 400x, com luz polarizada (Arquivo pessoal).

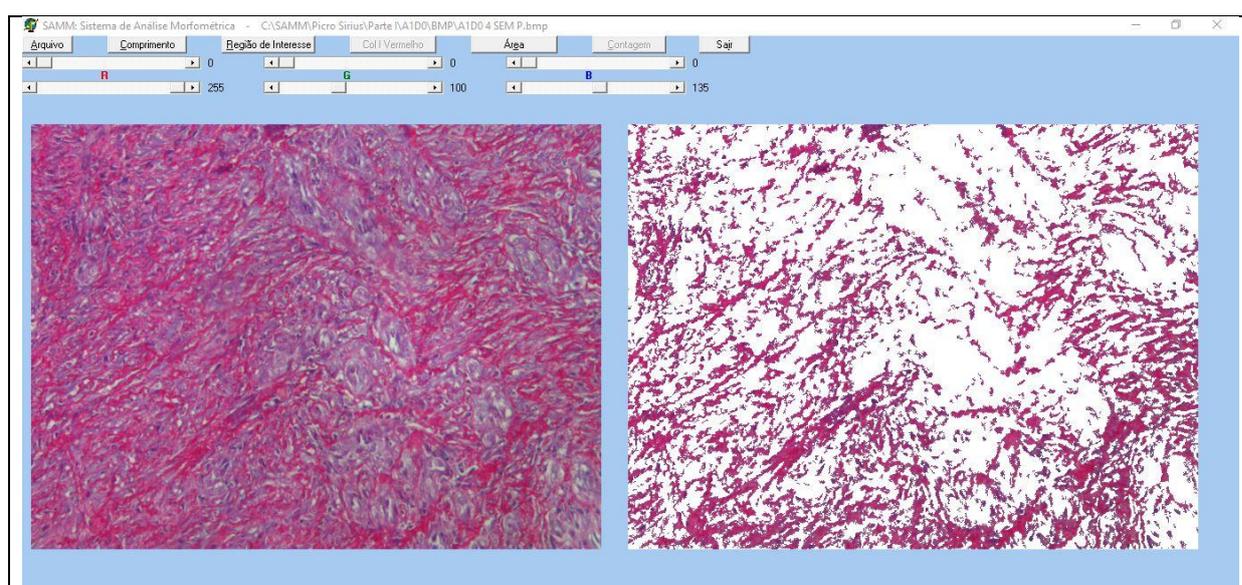


Figura 12: Quantificação de colágeno total (Software SAMM-PSR versão 1.00). Imagem de lâmina corada com Picrosirius Red em um aumento de 400x, com luz convencional (Arquivo pessoal).

As análises das fotomicrografias (640x480) foram realizadas pelo software Sistema de análise morfométrica (SAMM-PSR) versão 1.00, um software de análise de imagem desenvolvido e validado pela UFC, Brasil. As fotomicrografias foram tomadas em luz convencional e em luz polarizada em cada campo no maior aumento (400x). Dois campos foram usados para estabelecer o conteúdo de colágeno tipo III (não polimerizado) e colágeno tipo I (polimerizado) sob um

microscópio óptico de luz polarizada conectado a um computador. Este software calcula semi-automaticamente a área de proteínas coradas em relação à área total do campo, com base nas diferenças de cor. Sob polarização, o colágeno tipo III fica verde e o colágeno tipo I fica vermelho. A ferramenta “cores separadas” foi usada para dividir as imagens em canais de cores (vermelho, verde e azul) para analisar o arranjo das fibras de colágeno (FECHINE-JAMACARU, 2006; MESQUITA *et al.*, 2010).

3.7.7 Avaliação do marcador de angiogênese CD-31 por imunohistoquímica

A detecção de marcador envolvido no processo de angiogênese foi realizada por meio de reação imuno-histoquímica. Para a análise da resposta angiogênica, foi utilizado o anticorpo anti-CD31. Para tanto, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura em lâminas histológicas silanizadas previamente identificadas, seguindo a técnica de estreptavidina-biotinperoxidase. Como anticorpo primário, foi utilizado anti-CD31 (M0823, Dako®), na diluição de 1: 100 para avaliação da angiogênese. As lâminas histológicas silanizadas foram incubadas a 70°C por 3 horas, e após este período, desparafinizadas em xileno e gradiente alcoólico (TEÓFILO *et al.*, 2020).

A recuperação antigênica foi realizada em solução tampão de pH 9 (S2367, DAKO Target Retrieval), em câmara de pressão Pascal (3:30 minutos 125°C, 18-24 psi). Após o bloqueio da atividade da peroxidase endógena (solução aquosa de H₂O₂ 3%), o anticorpo primário foi incubado por 12 horas a 4°C em câmara úmida. Após a lavagem, o anticorpo secundário biotinilado foi adicionado (60 minutos), seguido do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (60 minutos) e revelado com cromogênio diaminobenzidina (K3468, Dako®). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos e montadas. Como controle negativo, o anticorpo primário foi omitido das reações, e como controle positivo, utilizamos granuloma piogênico para anticorpo anti-CD31 (TEÓFILO *et al.*, 2020).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Leica® DM 2000) com câmera digital (DFC 295) acoplada. Inicialmente, realizou-se uma varredura das lâminas com pequeno aumento (40 vezes), com a finalidade de identificar as zonas

de maior densidade do marcador. Foram selecionados e fotografados 3 desses campos, com magnificação de 200 vezes. Para realizar uma análise quantitativa dos marcadores nas suas respectivas imagens, um programa de computador foi desenvolvido (SAMM-CD31) para identificar a área marcada separando-a do restante do campo isolando, portanto, a área de interesse. Em seguida, a área de interesse é dividida usando o módulo de processamento de imagens (Figura 12). O sistema determina, de forma automática, o percentual referente à marcação pela reação imuno-histoquímica em relação à área total do campo analisado (FECHINE-JAMACARU, 2006).

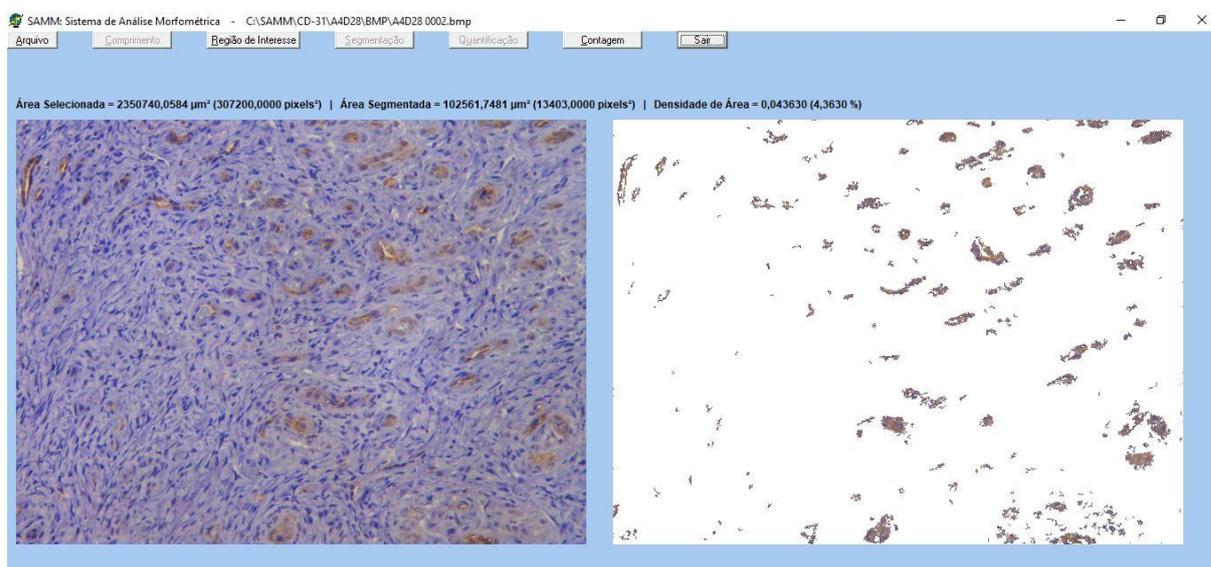


Figura 13: Identificação das zonas de maior densidade do marcador CD-31 (Software SAMM-CD31 versão 1.00). Imagem de lâmina marcada com anticorpo anti-CD-31 em um aumento de 200x (Arquivo pessoal).

3.8 Avaliação da eficácia

3.8.1 Medidas de desfechos primários

Os desfechos de avaliação da eficácia são o percentual de cicatrização total (PCT) e o número de curativos realizados. A primeira variável mede o percentual de variação da área da ferida em relação ao valor basal mensurado em D_0 . As medidas foram efetuadas a cada visita de seguimento ou até ocorrer a completa

cicatrização. A segunda variável representa a contabilização dos curativos a cada semana e durante todo o período de seguimento.

3.8.2 Medidas de desfechos secundários

Definiram-se os seguintes desfechos secundários: o número de dias para a completa cicatrização da úlcera, definida como a epitelização completa na ausência de crosta; o escore do instrumento PUSH como medido processo de cicatrização da ferida; parâmetros histopatológicos de avaliação da inflamação, da colagênese e da angiogênese.

3.9 Análise estatística

As variáveis quantitativas (contínuas e discretas) foram inicialmente analisadas pelo teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva, calcularam-se a média e o desvio padrão (dados paramétricos) ou a mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo (dados não paramétricos). Para avaliar de forma global o processo de cicatrização das feridas, mensurado por meio do percentual de cicatrização total (contração + epitelização) e do escore total do instrumento PUSH, ao longo do período de tratamento, calculou-se a área sob a curva (ASC) das medições temporais de cada variável *versus* o tempo (em dias), utilizando-se, para tanto, o método dos trapézios.

Um modelo de análise de variância para dois fatores de classificação com medidas repetidas foi usado para comparar o efeito dos dois tratamentos (fator 1: Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia) no processo de cicatrização das úlceras, medido pelo percentual de cicatrização total e escore total do instrumento PUSH, ao longo das visitas de seguimento (fator 2: D0 a D63), sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni (comparações entre os tratamentos em cada dia de avaliação) e Dunnett (comparações entre os tempos D7 a D63 e D0 dentro do mesmo grupo de tratamento). Tal abordagem também foi utilizada para comparar o efeito dos dois tratamentos no número semanal de curativos, considerando as contagens efetuadas ao longo das semanas 1 a 9, assim como na densidade microvascular e na quantidade de colágeno total, colágeno tipo I e colágeno tipo II, considerando as avaliações realizadas no dia zero (D0 – pré-tratamento) e no dia 28 (D28) do período de seguimento.

Comparações entre os dois grupos de tratamento em relação ao número total de curativos foram feitas mediante o uso do teste t para variáveis não emparelhadas. O mesmo teste foi utilizado para comparar os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta da área da úlcera e do escore total do instrumento PUSH, definidas como a diferença entre a medida obtida no dia zero (D0 – pré-tratamento) e a última medida da área da úlcera ou do instrumento PUSH (iguais a zero no caso de cicatrização completa), assim como em relação à taxa de cicatrização, definida como a diferença entre a medida realizada em D0 e a última medida da área da úlcera (igual a zero no caso de cicatrização completa) dividida pelo número de dias decorridos entre D0 e a última medida da ferida. Para realizar as mesmas comparações, considerando o ajuste para covariáveis que podem influenciar na variação absoluta da área da úlcera e do escore total do instrumento PUSH e na taxa de cicatrização, utilizou-se a análise de covariância (ANCOVA) complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, tomando-se os tratamentos (Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia) como efeito principal e como covariável a área da úlcera ou o escore total do instrumento PUSH mensurados no dia zero (D0).

Variáveis categóricas, por sua vez, foram expressas como frequência absoluta e relativa enquanto as variáveis ordinais foram expressas como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo. Comparações entre os dois tratamentos no que se refere às variáveis categóricas foram efetuadas pelo teste exato de Fisher. Por se tratarem de variáveis ordinais, os parâmetros histológicos, avaliados em espécimes submetidos à coloração por hematoxilina-eosina no dia zero (D0) e no dia 28 (D28), foram analisados por testes não paramétricos. Assim, o teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois grupos de tratamento em cada tempo, enquanto comparações entre D0 e D28 dentro do mesmo grupo foram feitas pelo teste de Wilcoxon.

Nas comparações entre os grupos, além da significância estatística, determinaram-se, ainda, as diferenças de médias ou de medianas e seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

Ademais, as curvas de tempo até o evento (completa cicatrização da úlcera) referentes aos dois grupos de tratamento foram construídas conforme o método de Kaplan-Meier, considerando como dados censurados os casos em que

não foi constatada a completa cicatrização da ferida até o final do estudo (dia 63). Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank.

Em todas as análises, empregaram-se testes bicaudais, estabelecendo-se o nível de significância em 0,05 (5%), considerando-se, por conseguinte, como estatisticamente significativa um valor P menor que 0,05. Os *softwares* GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) e IBM SPSS Statistics versão 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) foram utilizados para a realização dos procedimentos estatísticos. O primeiro *software* também foi usado para a elaboração dos gráficos.

4 RESULTADOS

Dos 13 animais incluídos no estudo, 2 foram retirados devido não ser possível a realização da avaliação histológica, pois a ferida fechou antes do segundo dia de biopsia ou a ferida estava contaminada com *Habronema sp*; totalizando então, um número de 11 animais que participaram da análise estatística, sendo 5 do grupo da sulfadiazina de prata e 6 do grupo da pele de tilápia, conforme demonstrado na Tabela 1. Portanto, todos os dados correspondem à análise de 5 cavalos do grupo Sulfadiazina de Prata e 6 animais do grupo Pele de Tilápia.

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas dos animais dos grupos Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia, verificadas na primeira avaliação (D0), antes do início dos tratamentos.

Característica	Sulfadiazina de Prata	Pele de Tilápia	Significância
Número de participantes	5	6	-
Idade (anos): média ± DP	9,80 ± 6,34	16,17 ± 8,68	P = 0,2068 ^a
Sexo			
Fêmea	2 (40,00%)	1 (16,67%)	P = 0,5455 ^b
Macho	3 (60,00%)	5 (83,33%)	
Peso (kg): média ± DP	500,00 ± 79,06	415,00 ± 52,44	P = 0,0611 ^a
Raça			
SRD	5 (100,00%)	5 (83,33%)	P = 0,9999 ^b
PSI	0 (0,00%)	1 (16,67%)	
Localização da úlcera			
Membro anterior	2 (40,00%)	4 (66,67%)	P = 0,5671 ^b
Membro posterior	3 (60,00%)	2 (33,33%)	
Área da úlcera (cm ²): média ± DP	28,56 ± 14,62	29,05 ± 7,70	P = 0,9451 ^a
Escore total do instrumento			
PUSH: média ± DP	13,60 ± 0,55	14,00 ± 1,10	P = 0,4790 ^a

DP: desvio padrão; PUSH: *Pressure Ulcer Scale for Healing*; SRD: sem raça definida; PSI: puro sangue inglês; ^ateste *t* para dados não emparelhados; ^bteste exato de Fisher.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos no que concerne às características demográficas e clínicas analisadas.

Na análise do tempo até a completa cicatrização da úlcera foi observado que no grupo Sulfadiazina de Prata, o tempo mediano até a completa cicatrização foi de 63 dias, enquanto no grupo Pele de Tilápia foi igual a 59,50 dias. No gráfico (Gráfico 1), em cada dia, os dados correspondem à probabilidade de completa cicatrização da lesão até esse dia e as comparações entre as curvas não evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre elas.

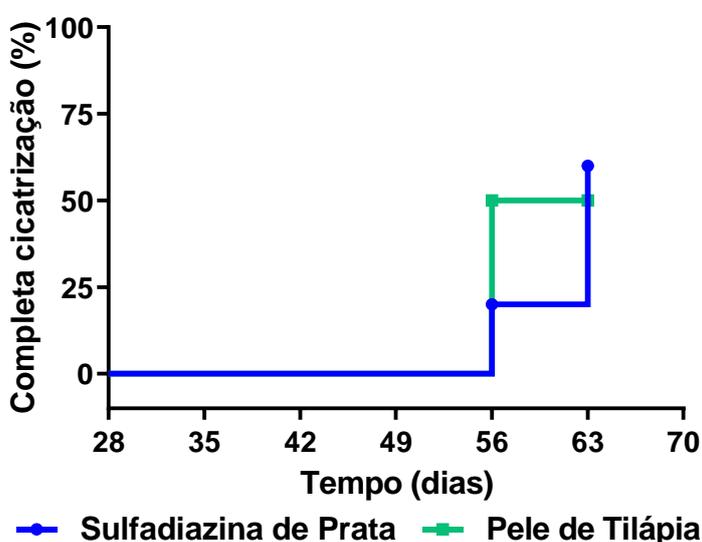


Gráfico 1 – Curvas de tempo até a completa cicatrização da úlcera referentes aos grupos Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia, construídas conforme o método de Kaplan-Meier. Comparações entre as curvas foram feitas pelo teste log-rank, que não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre elas ($P=0,9704$).

Ao analisar a evolução temporal do processo de cicatrização, avaliada pelo percentual de cicatrização total (PCT), nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia constatou-se que os efeitos dos dois tratamentos não diferem significativamente ao longo do tempo ($F=0,0117$; $P=0,9163$), ou seja, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia em nenhum dos momentos de avaliação. A análise de variância para dois fatores de classificação foi usada para avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo no processo de cicatrização das úlceras, medido pelo percentual de cicatrização total, sendo complementada pelo teste de comparações

múltiplas de Bonferroni, para verificar diferenças entre os tratamentos em cada momento de avaliação (Gráfico 2 e Tabela 2).

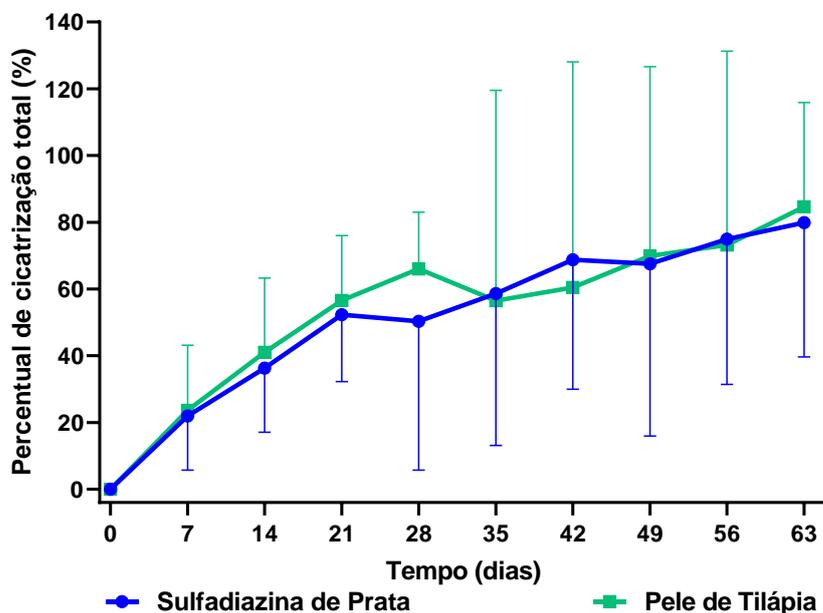


Gráfico 2 – Evolução temporal do processo de cicatrização, avaliado pelo PCT, nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia. Dados expressos como média e desvio padrão.

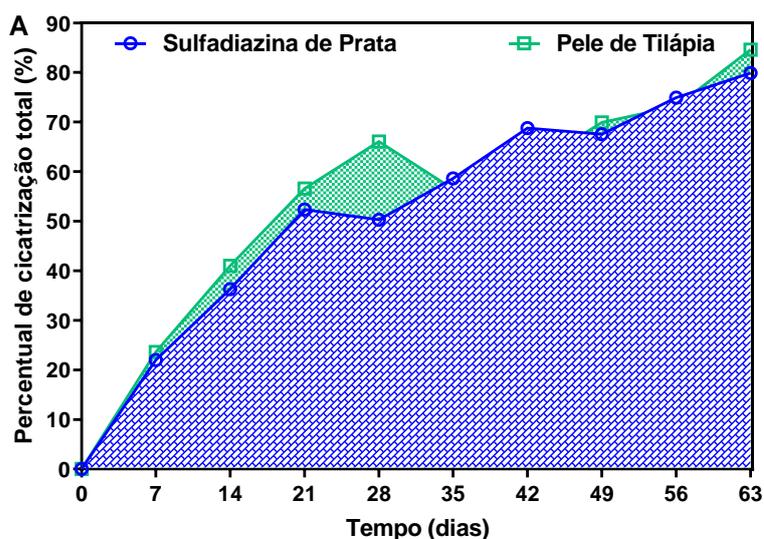
Tabela 2 – Evolução temporal do processo de cicatrização, avaliado pelo percentual de cicatrização total, nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância*
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00	–	–
7	21,99 ± 16,25	23,61 ± 19,58	-1,62	-70,19 a 66,96	P = 0,9999
14	36,28 ± 19,17	41,01 ± 22,24	-4,73	-73,31 a 63,84	P = 0,9999
21	52,33 ± 20,07	56,58 ± 19,39	-4,25	-72,83 a 64,33	P = 0,9999
28	50,30 ± 44,61	66,04 ± 16,96	-15,74	-84,31 a 52,84	P = 0,9999
35	58,62 ± 45,49	56,49 ± 63,01	2,13	-66,45 a 70,71	P = 0,9999
42	68,79 ± 38,85	60,48 ± 67,56	8,31	-60,27 a 76,88	P = 0,9999

49	67,52 ± 51,60	69,91 ± 56,69	-2,39	-70,97 a 66,18	P = 0,9999
56	74,90 ± 43,50	73,16 ± 58,14	1,74	-66,84 a 70,32	P = 0,9999
63	79,87 ± 40,26	84,58 ± 31,32	-4,71	-73,29 a 63,86	P = 0,9999

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias. *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Na avaliação global do processo de cicatrização nos dois grupos por meio da determinação da área sob a curva (ASC) das medições temporais do percentual de cicatrização total *versus* o tempo (dias). O teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar os dois grupos, não sendo constatada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (P=0,5963) (Gráfico 3 e Tabela 3).



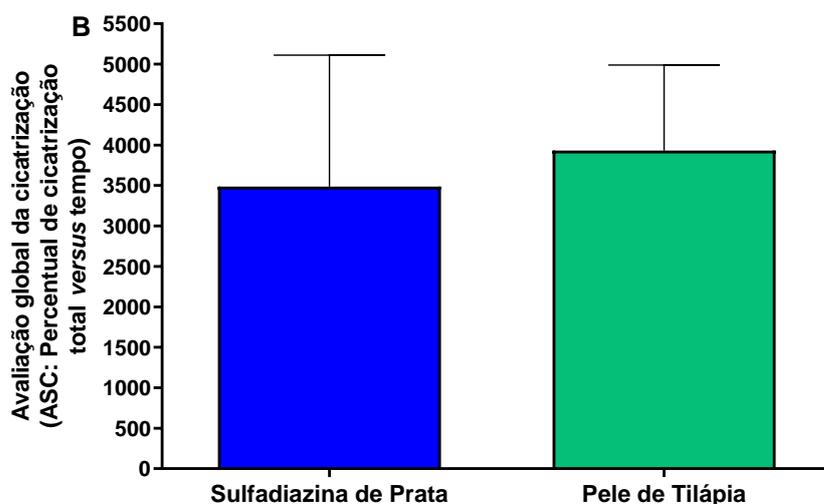


Gráfico 3 – Avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia por meio da determinação da ASC das medições temporais do percentual de cicatrização total *versus* o tempo (dias): A – representação gráfica da progressão temporal do percentual de cicatrização total, em que os pontos correspondem à média das medidas de um dado dia e a região hachurada denota a área sob a curva; B – média e desvio padrão das medidas da ASC.

Tabela 3 – Avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia por meio da determinação da ASC das medições temporais do percentual de cicatrização total *versus* o tempo (dias).

Parâmetro	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância (teste ^t)
Primeira metade (D0 – D28): ASC cicatrização total (%) <i>versus</i> o tempo (dias)	3486,65 ± 1625,59	3932,00 ± 1056,07	-445,35	-2280,10 a 1389,41	P = 0,5963
Segunda metade (D28 – D63): ASC cicatrização total (%) <i>versus</i> o tempo (dias)	973,47 ± 470,09	1079,52 ± 458,99	-106,05	-741,58 a 529,48	P = 0,7146

Período completo (D0 – D63): ASC cicatrização total (%) <i>versus</i> o tempo (dias)	2513,19 ± 1177,62	2852,48 ± 675,91	-339,29	-1617,08 a 938,49	P = 0,5629
--	----------------------	---------------------	---------	----------------------	------------

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias.

Quanto a evolução temporal da área da úlcera, a análise de variância para dois fatores de classificação foi usada para avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo no processo de cicatrização das úlceras, medido pela área da ferida, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni (comparações entre os tratamentos em cada dia de avaliação) e Dunnett (comparações entre os tempos D7 a D63 e D0 dentro do mesmo grupo de tratamento). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhum dos momentos de avaliação ($F=0,0248$; $P=0,8783$). Todavia, em ambos os grupos, as áreas das úlceras reduziram significativamente em relação ao valor inicial mensurado em D0: a partir da sexta semana do período de seguimento no grupo Sulfadiazina de Prata e da terceira semana no grupo Pele de Tilápia (Gráfico 4 e Tabela 4).

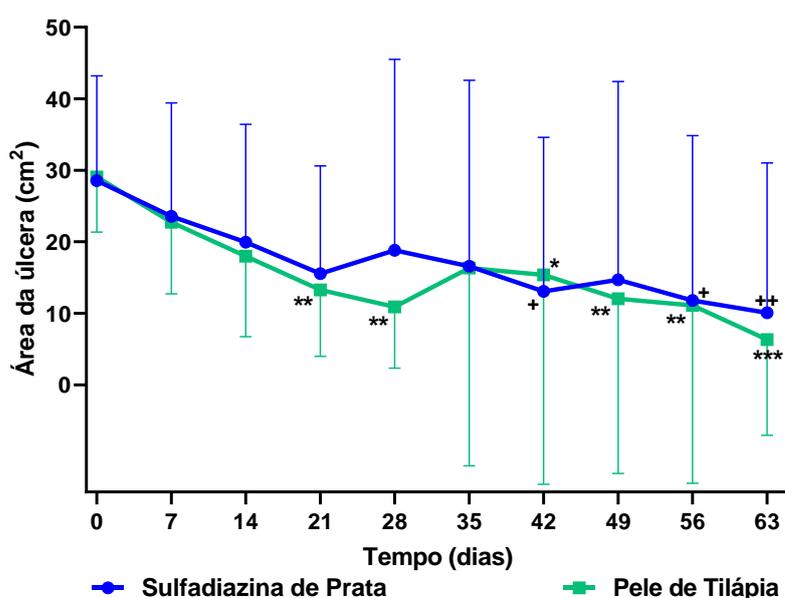


Gráfico 4 – Evolução temporal da área da úlcera, mensurada por meio de planimetria da ferida e expressa em cm^2 , nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia. Dados expressos como média e desvio. Os símbolos + ($P<0,05$) e ++ ($P<0,01$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao dia zero (D0) no grupo Sulfadiazina de Prata. * ($P<0,05$),

($P < 0,01$) e *($P < 0,001$) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação D0 no grupo Pele de Tilápia.

Tabela 4 – Evolução temporal da área da úlcera.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância *
0	28,56 ± 14,62	29,05 ± 7,70	-0,49	-35,12 a 34,16	P = 0,9999
7	23,55 ± 15,87	22,73 ± 10,00	0,82	-33,82 a 35,46	P = 0,9999
14	19,94 ± 16,47	17,98 ± 11,24	1,96	-32,68 a 36,60	P = 0,9999
21	15,55 ± 15,06	13,27 ± 9,30 ^b	2,28	-32,36 a 36,92	P = 0,9999
28	18,80 ± 26,72	10,89 ± 8,58 ^b	7,91	-26,73 a 42,55	P = 0,9999
35	16,55 ± 26,04	16,33 ± 27,66	0,22	-34,42 a 34,86	P = 0,9999
42	13,07 ± 21,52 ^a	15,38 ± 29,30 ^a	-2,31	-36,95 a 32,33	P = 0,9999
49	14,68 ± 27,73	12,04 ± 24,45 ^b	2,64	-32,00 a 37,28	P = 0,9999
56	11,79 ± 23,06 ^a	11,10 ± 24,87 ^b	0,69	-33,96 a 35,32	P = 0,9999
63	10,08 ± 20,93 ^b	6,32 ± 13,40 ^c	3,76	-30,88 a 38,40	P = 0,9999

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias. *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Asletras ^a($P < 0,05$), ^b($P < 0,01$) e ^c($P < 0,001$)denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao dia zero (D0) dentro do mesmo grupo (teste de comparações múltiplas de Dunnett).

Em relação à variação absoluta da área da úlcera, o teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os dois grupos de tratamento, sem considerar o ajuste para covariáveis. Para comparar os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta da área da úlcera, considerando o ajuste para a área da úlcera medida no pré-tratamento, utilizou-se a ANCOVA complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, tomando-se como covariável a área da úlcera mensurada no dia zero. Na análise sem ajuste, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de tratamento em

relação à variação absoluta da área da úlcera. Após o controle da influência da medida da área da úlcera verificada no dia zero, igualmente, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta da área da úlcera, embora tenha havido um ligeiro incremento em tal diferença (Tabela 5).

Tabela 5 – Variação absoluta da área da úlcera observada nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia.

Variação absoluta da área da úlcera: médias não ajustadas				
Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância ¹
18,48 ± 9,83	22,73 ± 7,19	-4,25	-15,84 a 7,35	P = 0,4291
Variação absoluta da área da úlcera: médias ajustadas tomando-se a área da úlcera mensurada no dia zero como covariável				
Sulfadiazina de Prata Média (IC 95%)	Pele de Tilápia Média (IC 95%)	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância ²
18,38 (10,34 a 26,43)	22,81 (15,46 a 30,15)	-4,43	-15,32 a 6,47	P = 0,3765

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; ¹Teste *t* para variáveis não emparelhadas; ²Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Em relação à taxa de cicatrização (TC), o teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os dois grupos de tratamento, sem considerar o ajuste para covariáveis. Para comparar os dois grupos de tratamento em relação à TC, considerando o ajuste para a área da úlcera medida no pré-tratamento, utilizou-se a ANCOVA complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, tomando-se como covariável a área da úlcera mensurada no dia zero. Na análise sem ajuste para a área da úlcera mensurada no pré-tratamento, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de tratamento em relação à taxa de cicatrização. Após o controle da influência da medida da área da úlcera verificada no D0, igualmente, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de tratamento em relação à taxa

de cicatrização, embora tenha havido um ligeiro incremento em tal diferença (Tabela 6).

Tabela 6 – Taxa de cicatrização verificada nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia.

Taxa de cicatrização: médias não ajustadas				
Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância ¹
0,30 ± 0,16	0,38 ± 0,12	-0,08	-0,28 a 0,11	P = 0,3710
Taxa de cicatrização: médias ajustadas tomando-se a área da úlcera mensurada no dia zero como covariável				
Sulfadiazina de Prata Média (IC 95%)	Pele de Tilápia Média (IC 95%)	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância ²
0,30 (0,17 a 0,44)	0,39 (0,26 a 0,51)	-0,09	-0,27 a 0,10	P = 0,3115

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; ¹Teste t para variáveis não emparelhadas; ²Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

O efeito dos tratamentos e do tempo no processo de cicatrização das úlceras, medido pelo escore total do instrumento PUSH, foi avaliado utilizando a análise de variância para dois fatores de classificação, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni (comparações entre os tratamentos em cada dia de avaliação) e Dunnett (comparações entre os tempos D7 a D63 e D0 dentro do mesmo grupo de tratamento). Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhum dos momentos de avaliação ($F=0,0044$; $P=0,9488$). Todavia, em ambos os grupos, os valores do escore total do instrumento PUSH reduziram significativamente em relação ao valor inicial mensurado em D0: a partir da sexta semana do período de seguimento no grupo Sulfadiazina de Prata e da quinta semana no grupo Pele de Tilápia (Gráfico 5 e Tabela 7).

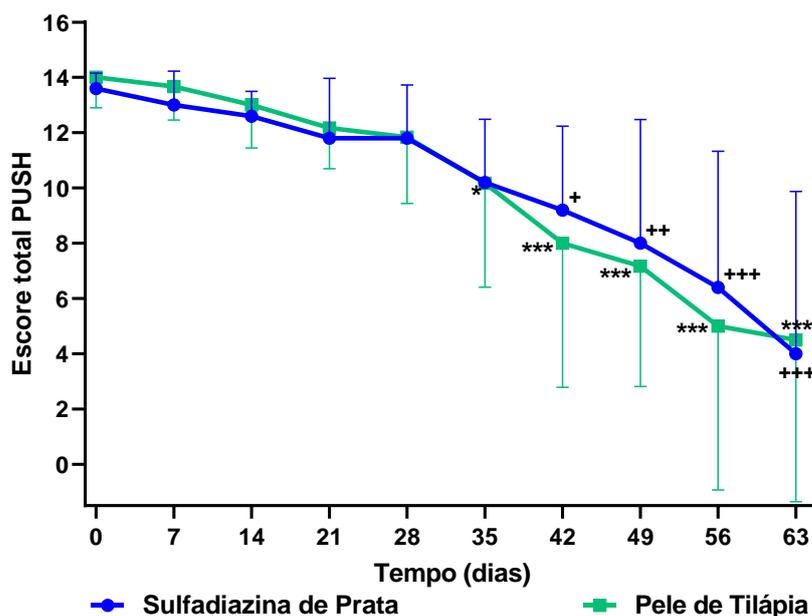


Gráfico 5 – Evolução temporal do processo de cicatrização, avaliado pelo escore total do instrumento PUSH, nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia. Dados expressos como média e desvio padrão. Os símbolos +(P<0,05), ++(P<0,01) e +++(P<0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao D0 no grupo Sulfadiazina de Prata, enquanto os símbolos *(P<0,05) e ***(P<0,001) indicam diferenças estatisticamente significantes em relação D0 no grupo Pele de Tilápia.

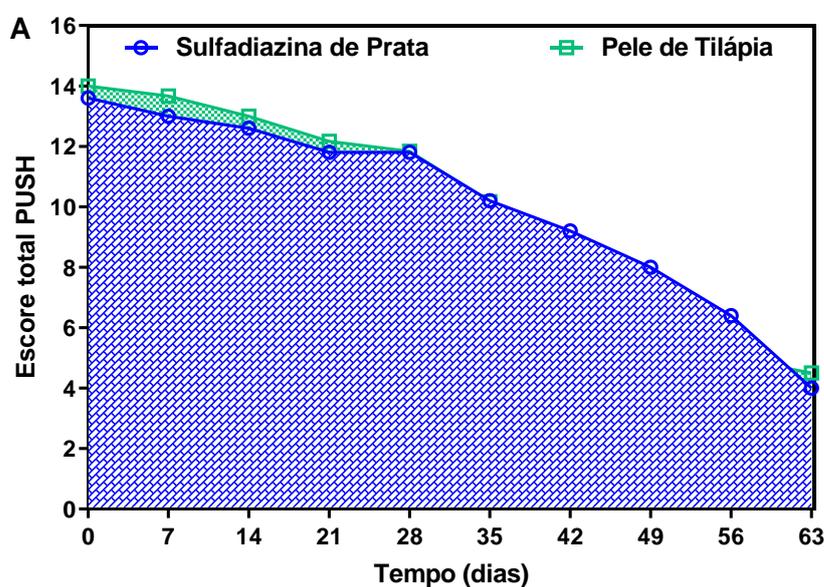
Tabela 7 – Evolução temporal do processo de cicatrização, avaliado pelo escore total do instrumento PUSH, nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância *
0	13,60 ± 0,55	14,00 ± 1,10	-0,40	-6,58 a 5,78	P = 0,9999
7	13,00 ± 1,22	13,67 ± 1,21	-0,67	-6,84 a 5,51	P = 0,9999
14	12,60 ± 0,89	13,00 ± 1,55	-0,40	-6,58 a 5,78	P = 0,9999
21	11,80 ± 2,17	12,17 ± 1,47	-0,37	-6,54 a 5,81	P = 0,9999
28	11,80 ± 1,92	11,83 ± 2,40	-0,03	-6,21 a 6,14	P = 0,9999
35	10,20 ± 2,28	10,17 ± 3,76 ^a	0,03	-6,14 a 6,21	P = 0,9999

42	9,20 ± 3,03 ^a	8,00 ± 5,22 ^c	1,20	-4,98 a 7,38	P = 0,9999
49	8,00 ± 4,47 ^b	7,17 ± 4,36 ^c	0,83	-5,34 a 7,01	P = 0,9999
56	6,40 ± 4,93 ^c	5,00 ± 5,93 ^c	1,40	-4,78 a 7,58	P = 0,9999
63	4,00 ± 5,87 ^c	4,50 ± 5,86 ^c	-0,50	-6,68 a 5,68	P = 0,9999

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias. *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As letras ^a(P<0,05), ^b(P<0,01) e ^c(P<0,001) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao dia zero (D0) dentro do mesmo grupo (teste de comparações múltiplas de Dunnett).

Quanto à avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia por meio da determinação da área sob a curva (ASC) das medições temporais do escore total do instrumento PUSH versus o tempo (dias). O teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar os dois grupos, não sendo constatada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos (P=0,9195) (Gráfico 6 e Tabela 8).



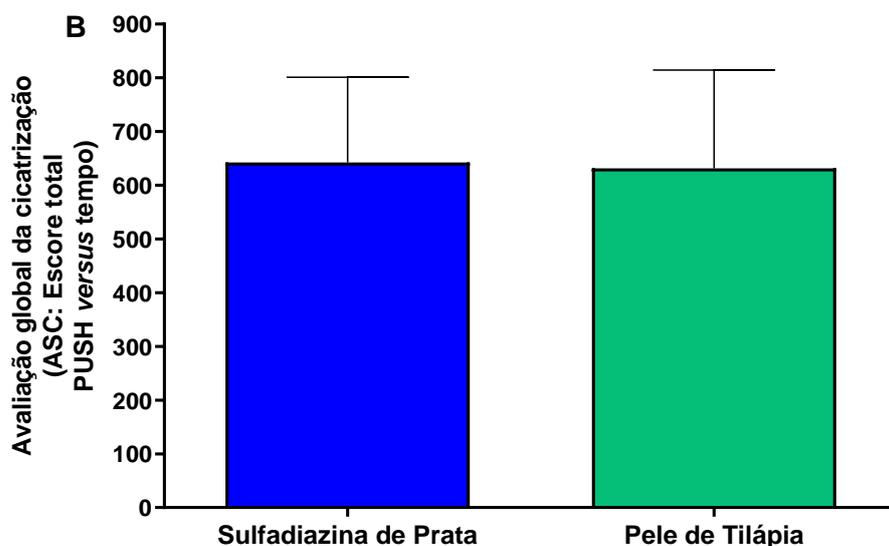


Gráfico 6 – Avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia por meio da determinação da ASC das medições temporais do escore total do instrumento PUSH *versus* o tempo (dias): A – representação gráfica da progressão temporal do percentual de cicatrização total, em que os pontos correspondem à média das medidas de um dado dia e a região hachurada denota a área sob a curva; B – média e desvio padrão das medidas da ASC.

Tabela 8 – Avaliação global do processo de cicatrização nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia por meio da determinação da ASC das medições temporais do escore total do instrumento PUSH *versus* o tempo (dias).

Parâmetro	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância (testet)
Primeira metade (D0 – D28): ASC escore total PUSH <i>versus</i> o tempo (dias)	350,70 ± 35,21	362,25 ± 34,13	-11,55	-58,97 a 35,87	P = 0,5950
Segunda metade (D28 – D63): ASC escore total PUSH <i>versus</i> o tempo (dias)	291,90 ± 126,06	269,50 ± 157,37	22,40	-175,26 a 220,06	P = 0,8034

Período completo (D0 – D63): ASC escore total PUSH <i>versus</i> o tempo (dias)	642,60 ± 158,33	631,75 ± 182,83	10,85	-225,26 a 246,96	P = 0,9195
---	--------------------	--------------------	-------	---------------------	------------

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias.

Podemos também observar na Tabela 9 a variação absoluta do escore total do instrumento PUSH observada nos dois tratamentos, definida como a diferença entre o escore total obtido no D0 e a última avaliação do escore total (igual a zero no caso de cicatrização completa). O teste *t* para variáveis não emparelhadas foi usado para comparar os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta do escore total do instrumento PUSH, sem considerar o ajuste para covariáveis. Para comparar os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta do escore total do instrumento PUSH, considerando o ajuste para o escore total do instrumento PUSH verificado no pré-tratamento, utilizou-se a ANCOVA complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, tomando-se como covariável a área da úlcera mensurada no dia zero. Na análise sem ajuste para o escore total PUSH mensurado no pré-tratamento, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta do escore total do instrumento PUSH. Após o controle da influência do escore total PUSH verificado no dia zero, igualmente, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de tratamento em relação à variação absoluta do escore total do instrumento PUSH, embora tenha havido um ligeiro incremento em tal diferença.

Tabela 9 – Variação absoluta do escore total do instrumento PUSH observada nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia.

Variação absoluta do escore total do instrumento PUSH: médias não ajustadas				
Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância ¹
9,60 ± 5,86	9,50 ± 5,99	0,10	-8,03 a 8,23	P = 0,9784
Variação absoluta do escore total do instrumento PUSH: médias ajustadas tomando-se o escore total				

do instrumento PUSH verificado no dia zero como covariável				
Sulfadiazina de Prata Média (IC 95%)	Pele de Tilápia Média (IC 95%)	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância ²
9,82 (3,30 a 16,34)	9,32 (3,38 a 15,25)	0,50	-8,45 a 9,45	P = 0,9006

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; ¹Teste χ^2 para variáveis não emparelhadas; ²Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Na análise histopatológica, foram avaliados os seguintes parâmetros: edema, neutrófilos, macrófagos, tecido de granulação, fibroblastos, colágeno, epitelização e neovascularização. Esses parâmetros foram quantificados em espécimes submetidos à coloração por hematoxilina-eosina (HE) conforme os seguintes critérios: ausente (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3). Para todos, o teste de Mann-Whitney foi usado para comparar os dois grupos de tratamento em cada tempo, enquanto comparações entre D0 e D28 no mesmo grupo foram feitas pelo teste de Wilcoxon.

Para o grau de edema, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, seja em D0 (P=0,3939) ou em D28 (P=0,5455). Tampouco foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata (P=0,5000) ou Pele de Tilápia (P=0,9999) (Gráfico 7 e Tabela 10).

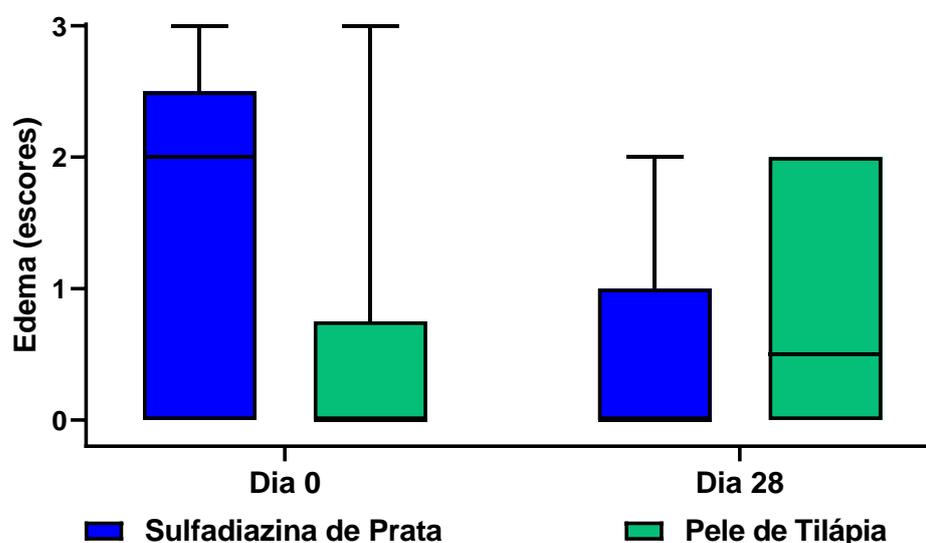


Gráfico 7 – Quantificação do grau de edema nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e no D28 do período de seguimento. Dados expressos

como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 10 – Quantificação do grau de edema nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápiano D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	2,00 (0,00 a 2,50)	0,00 (0,00 a 0,75)	2,00	-1,00 a 3,00	P = 0,3939
28	0,00 (0,00 a 1,00)	0,50 (0,00 a 2,00)	-0,50	-2,00 a 1,00	P = 0,5455
Mediana das diferenças	0,00	0,00			
IC 95% da mediana das diferenças	0,00 a 3,00	-2,00 a 2,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	P = 0,5000	P = 0,9999			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para os neutrófilos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, seja em D0 (P=0,6364) ou em D28 (P=0,7056). Tampouco foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata (P=0,9999) ou Pele de Tilápia (P=0,5000) (Gráfico 8 e Tabela11).

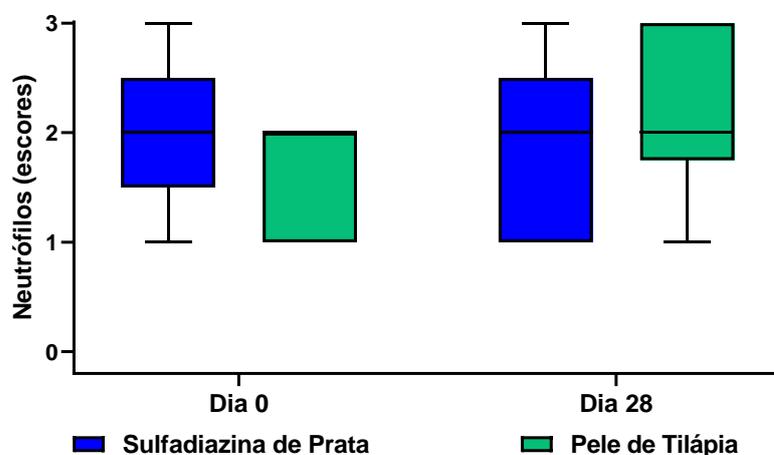


Gráfico 8 – Quantificação de neutrófilos nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos

como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 11 – Quantificação de neutrófilos nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	2,00 (1,50 a 2,50)	2,00 (1,00 a 2,00)	0,00	-1,00 a 1,00	P = 0,6364
28	2,00 (1,00 a 2,50)	2,00 (1,75 a 3,00)	0,00	-2,00 a 1,00	P = 0,7056
Mediana das diferenças	0,00	-0,50			
IC 95% da mediana das diferenças	-1,00 a 1,00	-2,00 a 1,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	P = 0,9999	P = 0,5000			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para os macrófagos, constatou-se que, em D0, a quantidade de macrófagos verificada no grupo Pele de Tilápia foi significativamente maior (*P=0,0216) que a observada no grupo Sulfadiazina de Prata. Todavia, em D28, não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (P=0,6753). Igualmente, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata (P=0,2500) ou Pele de Tilápia (P=0,9999) (Gráfico 9 e Tabela 12).

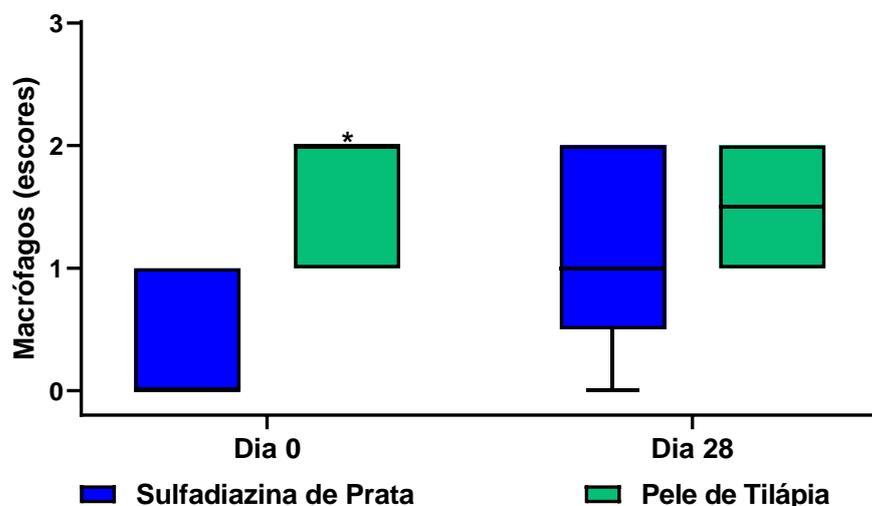


Gráfico 9 – Quantificação de macrófagos nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 12 – Quantificação de macrófagos nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	0,00 (0,00 a 1,00)	2,00 (1,00 a 2,00)	-2,00	-2,00 a 0,00	P = 0,0216
28	1,00 (0,50 a 2,00)	1,50 (1,00 a 2,00)	-0,50	-1,00 a 1,00	P = 0,6753
Mediana das diferenças	-1,00	0,00			
IC 95% da mediana das diferenças	-2,00 a 0,00	-1,00 a 1,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	P = 0,2500	P = 0,9999			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para o tecido de granulação, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, seja em D0 (P=0,7316) ou em D28 (P=0,8701). Tampouco foram verificadas diferenças estatisticamente

significantes entre os dois tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata ($P=0,3750$) ou Pele de Tilápia ($P=0,7500$) (Gráfico 10 e Tabela 13).

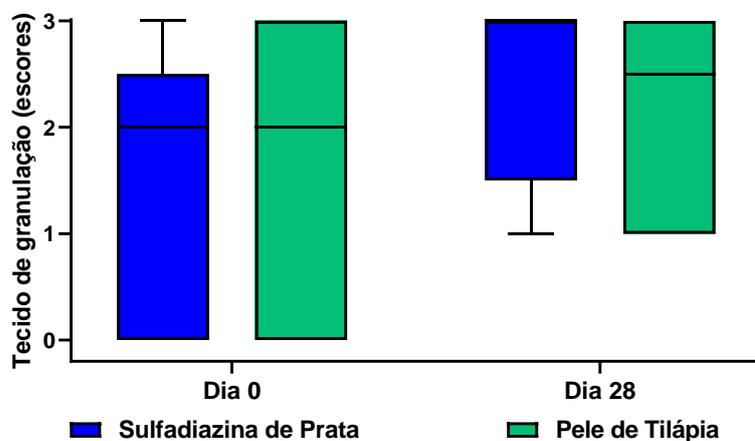


Gráfico 10 – Quantificação do tecido de granulação nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 13 – Quantificação do tecido de granulação nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	2,00 (0,00 a 2,50)	2,00 (0,00 a 3,00)	0,00	-3,00 a 2,00	$P = 0,7316$
28	3,00 (1,50 a 3,00)	2,50 (1,00 a 3,00)	0,50	-1,00 a 2,00	$P = 0,8701$
Mediana das diferenças	-1,00	0,00			
IC 95% da mediana das diferenças	-3,00 a 1,00	-3,00 a 2,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	$P = 0,3750$	$P = 0,7500$			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para os fibroblastos, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, seja em D0 ($P=0,2965$) ou em D28 ($P=0,6234$). Tampouco foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois

tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata ($P=0,2500$) ou Pele de Tilápia ($P=0,9999$) (Gráfico 11 e Tabela 14).

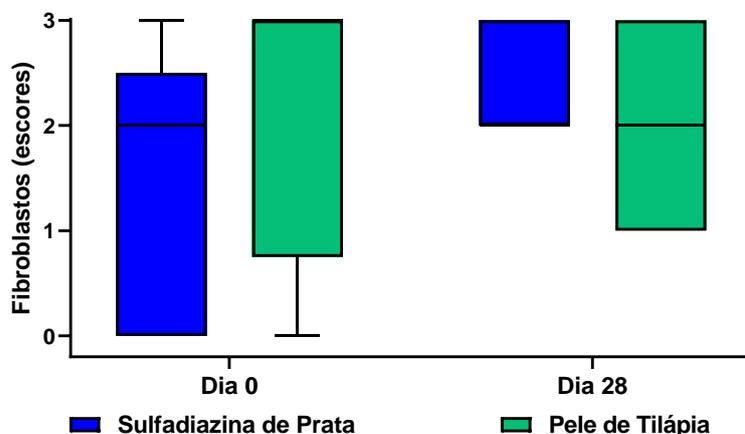


Gráfico 11 – Quantificação de fibroblastos nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 14 – Quantificação de fibroblastos nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	2,00 (0,00 a 2,50)	3,00 (0,75 a 3,00)	-1,00	-3,00 a 2,00	P = 0,2965
28	2,00 (2,00 a 3,00)	2,00 (1,00 a 3,00)	0,00	-1,00 a 2,00	P = 0,6234
Mediana das diferenças	-1,00	0,00			
IC 95% da mediana das diferenças	-2,00 a 0,00	-1,00 a 1,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	P = 0,2500	P = 0,9999			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para o colágeno, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, seja em D0 ($P=0,5628$) ou em D28 ($P=0,3160$). Tampouco foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois

tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata ($P=0,5000$) ou Pele de Tilápia ($P=0,5000$) (Gráfico 12 e Tabela 15).

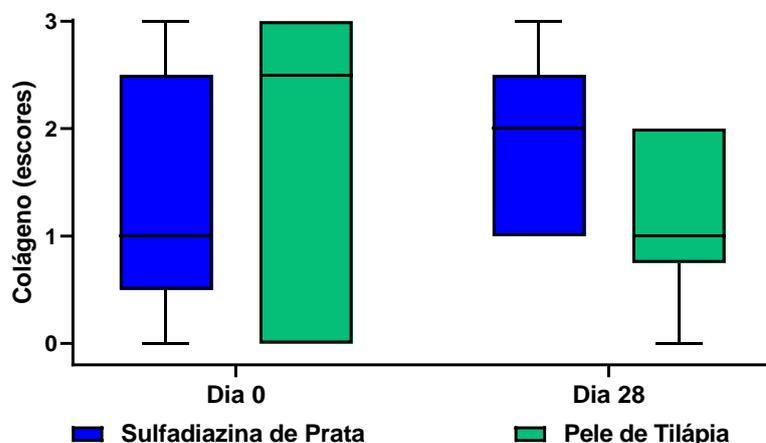


Gráfico 12 – Quantificação de colágeno nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 15 – Quantificação de colágeno nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	1,00 (0,50 a 2,50)	2,50 (0,00 a 3,00)	-1,50	-2,00 a 2,00	$P = 0,5628$
28	2,00 (1,00 a 2,50)	1,00 (0,75 a 2,00)	1,00	-1,00 a 2,00	$P = 0,3160$
Mediana das diferenças	0,00	0,50			
IC 95% da mediana das diferenças	-1,00 a 0,00	-1,00 a 3,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	$P = 0,5000$	$P = 0,5000$			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para o grau de epitelização, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos, seja em D0 ($P=0,4545$) ou em D28 ($P=0,1818$). Tampouco foram verificadas diferenças estatisticamente

significantes entre os dois tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata ($P=0,9999$) ou Pele de Tilápia ($P=0,2500$) (Gráfico 13 e Tabela 16).

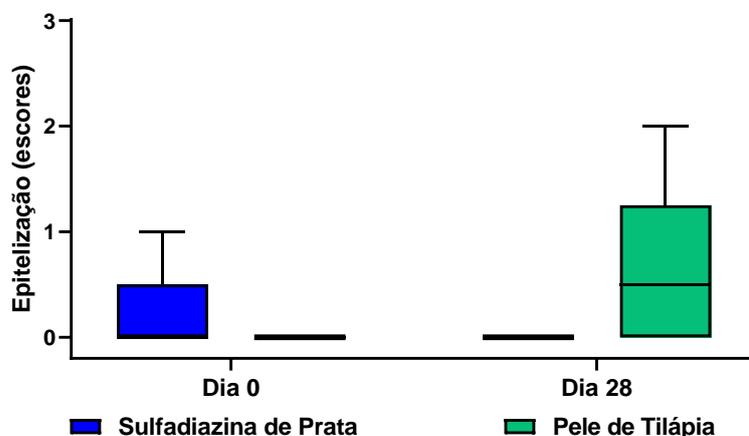


Gráfico 13 – Quantificação do grau de epiteliação das úlceras nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 16 – Quantificação do grau de epiteliação das úlceras nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	0,00 (0,00 a 0,50)	0,00 (0,00 a 0,00)	0,00	0,00 a 1,00	$P = 0,4545$
28	0,00 (0,00 a 0,00)	0,50 (0,00 a 1,25)	-0,50	-2,00 a 0,00	$P = 0,1818$
Mediana das diferenças	0,00	-0,50			
IC 95% da mediana das diferenças	0,00 a 1,00	-2,00 a 0,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	$P = 0,9999$	$P = 0,2500$			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para o grau de neovascularização, constatou-se que, em D28, o grau de neovascularização verificado no grupo Pele de Tilápia foi significativamente menor ($*P=0,0325$) que a observado no grupo Sulfadiazina de Prata. Todavia, em D0, não

foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P=0,3939$). Igualmente, não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos, seja no grupo Sulfadiazina de Prata ($P=0,1250$) ou Pele de Tilápia ($P=0,9999$) (Gráfico 14 e Tabela 17).

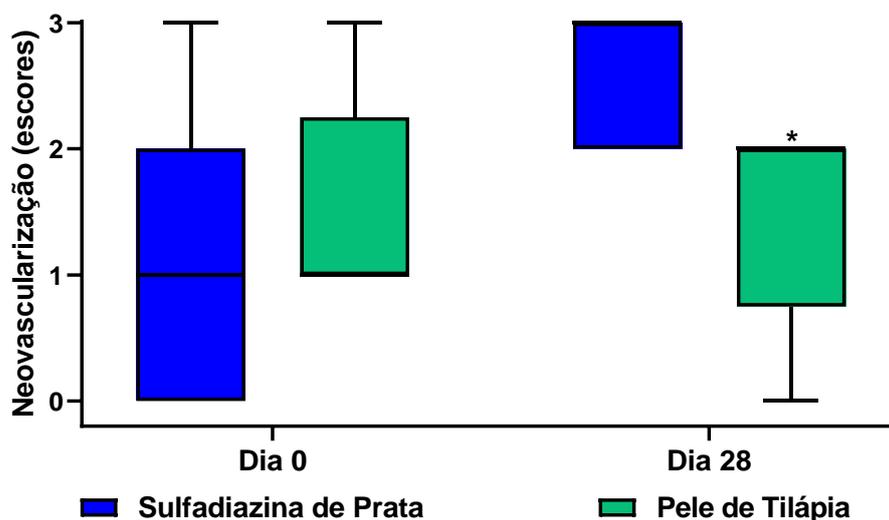


Gráfico 14 – Quantificação do grau de neovascularização nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como mediana, intervalo interquartil e valores mínimo e máximo das medições efetuadas nos preparados histológicos.

Tabela 17 – Quantificação do grau de neovascularização nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Mediana (IIQ)	Pele de Tilápia Mediana (IIQ)	Diferença de medianas	IC 95% da diferença	Significância (teste de Mann-Whitney)
0	1,00 (0,00 a 2,00)	1,00 (1,00 a 2,25)	0,00	-2,00 a 2,00	$P = 0,3939$
28	3,00 (2,00 a 3,00)	2,00 (0,75 a 2,00)	1,00	0,00 a 2,00	$P = 0,0325$
Mediana das diferenças	-2,00	-0,50			
IC 95% da mediana das diferenças	-3,00 a 0,00	-1,00 a 3,00			
Significância (teste de Wilcoxon)	$P = 0,1250$	$P = 0,9999$			

IIQ: intervalo interquartil; IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

Para avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo na quantidade de colágeno total, foi usada a análise de variância para dois fatores de classificação, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar diferenças entre os grupos em cada tempo, bem como entre os dias zero e 28 dentro de cada grupo.

Para o colágeno total, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhum dos momentos de avaliação ($F=0,00002$; $P=0,9963$). Tampouco, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos em nenhum dos grupos de tratamento ($F=1,7249$; $P=0,2216$) (Gráfico 15 e Tabela 18).

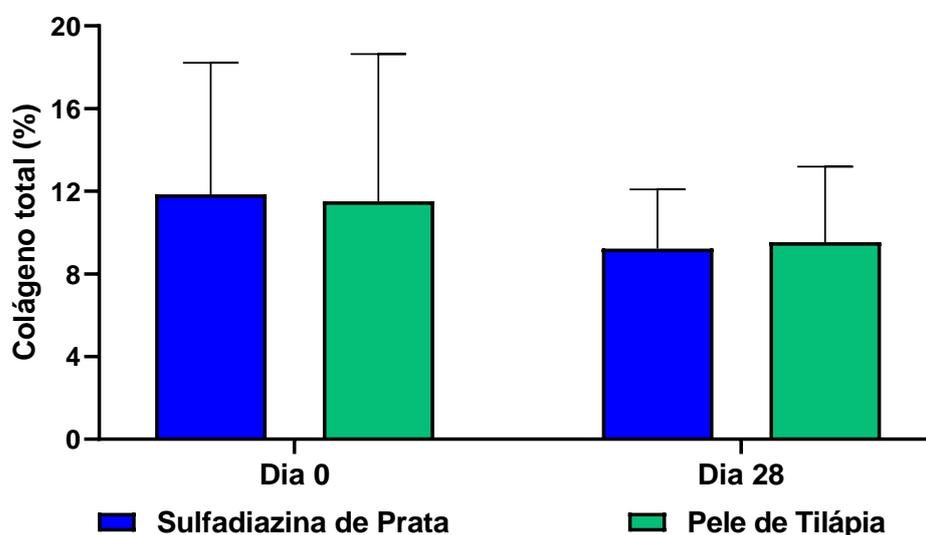


Gráfico 15 – Quantificação do colágeno total nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no dia D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como média e desvio padrão.

Tabela 18 – Quantificação do colágeno total nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância*
0	11,84 ± 6,38	11,51 ± 7,13	0,33	-7,60 a 8,26	P = 0,9999
28	9,22 ± 2,86	9,53 ± 3,66	-0,31	-8,24 a 7,62	P = 0,9999

Diferença de médias	2,62	1,98
IC 95% da diferença	-4,32 a 9,56	-4,36 a 8,32
Significância*	P = 0,6747	P = 0,8476

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para o colágeno tipo I não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhum dos momentos de avaliação ($F=0,2728$; $P=0,6141$). Tampouco, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos em nenhum dos grupos de tratamento ($F=2,5371$; $P=0,1457$) (Gráfico 16 e Tabela 19).

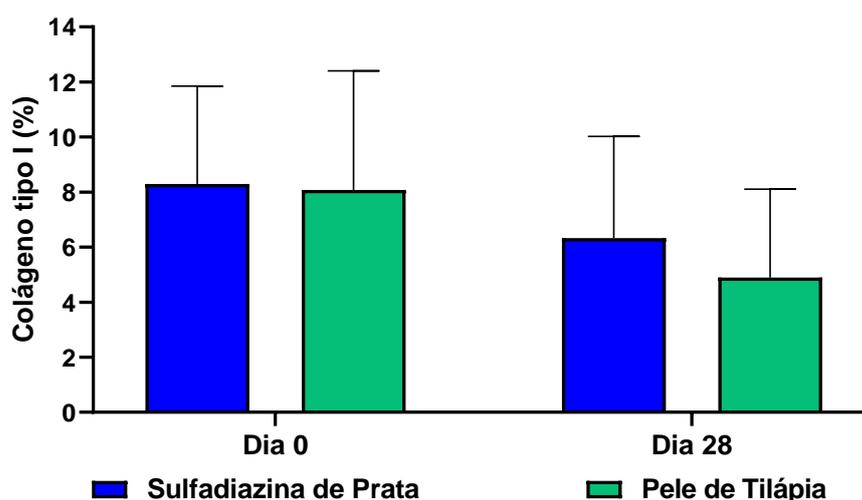


Gráfico 16 – Quantificação do colágeno tipo I nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como média e desvio padrão.

Tabela 19 – Quantificação do colágeno tipo I nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no dia D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância*
0	8,29 ± 3,56	8,07 ± 4,33	0,22	-5,30 a 5,74	P = 0,9999
28	6,33 ± 3,69	4,90 ± 3,20	1,43	-4,09 a 6,95	P = 0,9999

Diferença de médias	1,96	3,17
IC 95% da diferença	-4,43 a 8,35	-2,66 a 9,01
Significância*	P = 0,8633	P = 0,3562

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para o colágeno tipo III não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhum dos momentos de avaliação ($F=0,4530$; $P=0,5178$). Tampouco, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos em nenhum dos grupos de tratamento ($F=0,1556$; $P=0,7024$) (Gráfico 17 e Tabela 20).

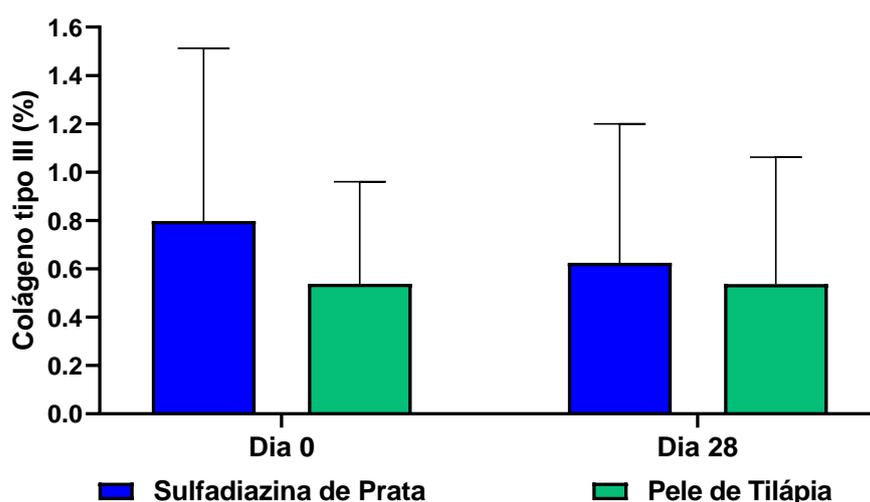


Gráfico 17 – Quantificação do colágeno tipo III nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como média e desvio padrão.

Tabela 20 – Quantificação do colágeno tipo III nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância*
0	0,80 ± 0,72	0,54 ± 0,42	0,26	-0,57 a 1,09	P = 0,9081
28	0,63 ± 0,57	0,54 ± 0,53	0,09	-0,74 a 0,92	P = 0,9999

Diferença de médias	0,17	0,00
IC 95% da diferença	-0,70 a 1,04	-0,79 a 0,80
Significância*	P = 0,9999	P > 0,9999

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A análise de variância para dois fatores de classificação foi usada para avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo na densidade microvascular, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar diferenças entre os grupos em cada tempo, bem como entre os dias zero e 28 dentro de cada grupo. Não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos em nenhum dos momentos de avaliação ($F=0,0131$; $P=0,9114$). Tampouco, foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tempos em nenhum dos grupos de tratamento ($F=0,0078$; $P=0,9316$) (Gráfico 18 e Tabela 21).

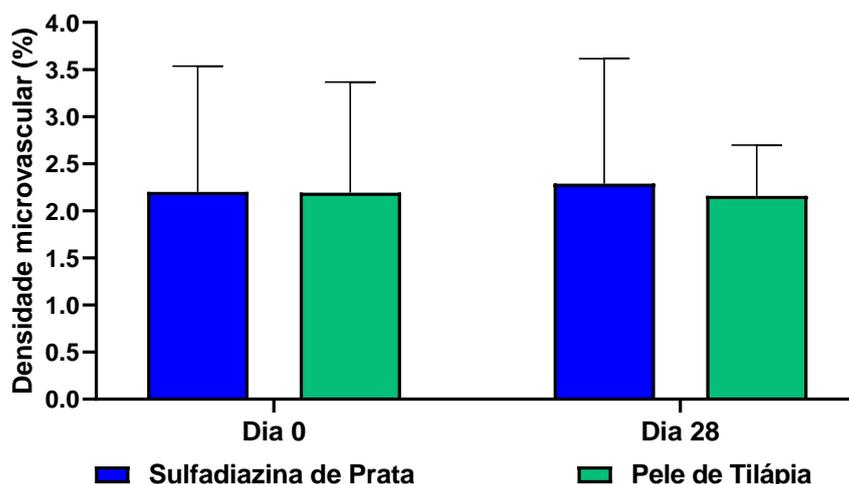


Gráfico 18 – Densidade microvascular mensurada nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento. Dados expressos como média e desvio padrão.

Tabela 21 – Densidade microvascular mensurada nos preparados histológicos dos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia no D0 e D28 do período de seguimento.

Dia	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95% da diferença	Significância*
0	2,20 ± 1,34	2,19 ± 1,17	0,01	-1,65 a 1,66	P = 0,9081
28	2,29 ± 1,33	2,16 ± 0,54	0,13	-1,52 a 1,79	P = 0,9999
Diferença de médias	-0,09	0,03			
IC 95% da diferença	-1,26 a 1,08	-1,03 a 1,10			
Significância*	P = 0,9999	P = 0,9999			

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias; *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para avaliar o efeito dos tratamentos e do tempo no número semanal de curativos, foi utilizada a análise de variância para dois fatores de classificação, sendo complementada pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni, para verificar diferenças entre os tratamentos em cada semana. Constatou-se que o número de curativos realizados nos animais tratados com Pele de Tilápia foi significativamente menor que o número de curativos realizados nos cavalos tratados com Sulfadiazina de Prata em todas as semanas do período de seguimento, exceto na última, isto é, do dia 57 ao dia 63 (Gráfico 19 e Tabela 22).

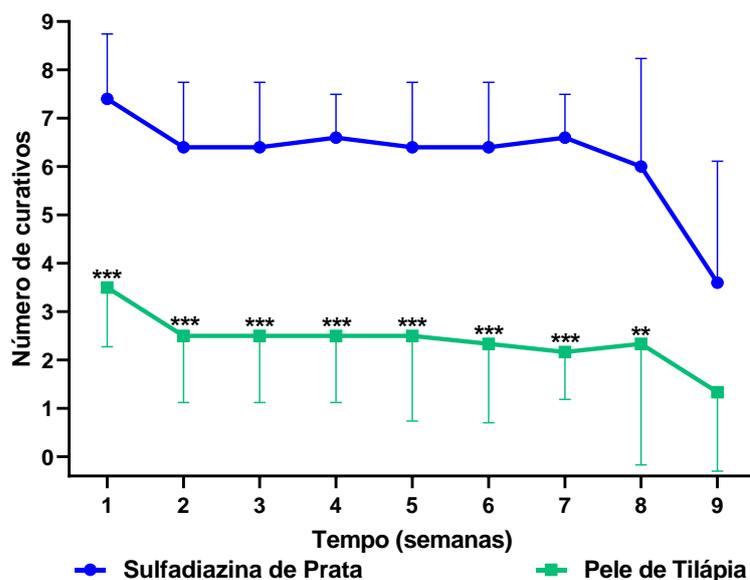


Gráfico 19 – Evolução semanal do número de curativos realizados nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia. Dados expressos como média e desvio padrão. Os símbolos **($P < 0,01$) e ***($P < 0,001$) denotam diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo Sulfadiazina de Prata na mesma semana.

Tabela 22 – Evolução semanal do número de curativos realizados nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia.

Semana	Sulfadiazina de Prata Média \pm DP	Pele de Tilápia Média \pm DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância*
1	7,40 \pm 1,34	3,50 \pm 1,22	3,90	1,18 a 6,62	P = 0,0009
2	6,40 \pm 1,34	2,50 \pm 1,38	3,90	1,18 a 6,62	P = 0,0009
3	6,40 \pm 1,34	2,50 \pm 1,38	3,90	1,18 a 6,62	P = 0,0009
4	6,60 \pm 0,89	2,50 \pm 1,38	4,10	1,38 a 6,82	P = 0,0004
5	6,40 \pm 1,34	2,50 \pm 1,76	3,90	1,18 a 6,62	P = 0,0009
6	6,40 \pm 1,34	2,33 \pm 1,63	4,07	1,34 a 6,79	P = 0,0005
7	6,60 \pm 0,89	2,17 \pm 0,98	4,43	1,71 a 7,16	P = 0,0001

8	6,00 ± 2,24	2,33 ± 2,50	3,67	0,94 a 6,39	P = 0,0022
9	3,60 ± 2,51	1,33 ± 1,63	2,27	-0,46 a 4,99	P = 0,1811

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias. *Teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Para o número total de curativos realizados nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia ao longo do período de tratamento o teste *t* para dados não emparelhados foi usado para comparar os dois grupos de tratamento. Constatou-se que o número total de curativos realizados nos animais tratados com Pele de Tilápia foi significativamente menor (**P=0,0009) que o número total de curativos realizados nos cavalos tratados com Sulfadiazina de Prata (Gráfico 20 e Tabela 23).

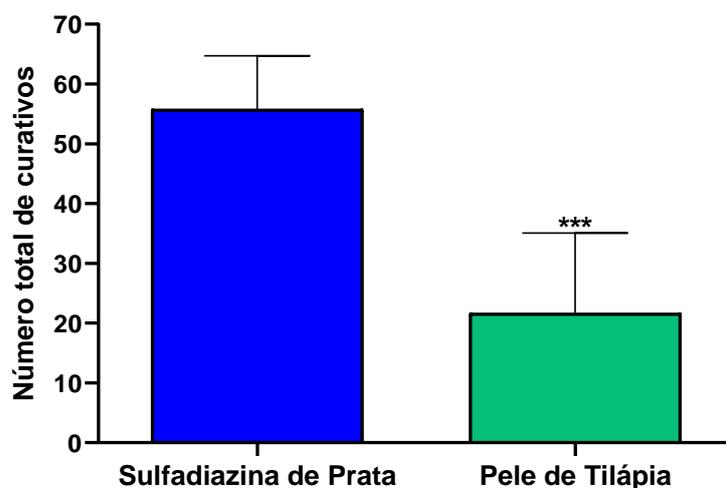


Gráfico 20 – Número total de curativos realizados nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia ao longo do período de tratamento. Os dados correspondem à média e desvio padrão.

Tabela 23 – Número total de curativos realizados nos animais tratados com Sulfadiazina de Prata e Pele de Tilápia ao longo do período de tratamento.

Parâmetro	Sulfadiazina de Prata Média ± DP	Pele de Tilápia Média ± DP	Diferença de médias	IC 95%	Significância (teste ^t)
Número total de curativos	55,80 ± 8,90	21,67 ± 13,40	34,13	18,22 a 50,04	P = 0,0009

DP: desvio padrão; IC 95%: intervalo de confiança de 95% da diferença de médias.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que um dado relevante para uma pesquisa, especialmente na área da saúde, é o número de pacientes (N) que participaram do estudo. No entanto, é importante ressaltar o quesito ética, além de conhecer a diferença entre um estudo clínico e um estudo experimental.

É comum observar que pesquisas feitas com equídeos, em geral, possui um N bastante reduzido, pois em um estudo experimental é ético que seja utilizado o mínimo possível de animais, já que feridas serão confeccionadas, respeitando um limite máximo de tamanho; e, em um estudo clínico, devido ao tempo de observação necessário para que se consiga um N grande. Além disso, nos dois formatos de estudo, experimental ou clínico, é frequente a dificuldade para conseguir animais para essa finalidade (SARDARI *et al.*, 2009; IBRAHIM *et al.*, 2020).

Em nosso estudo clínico, o número final de animais ficou em 11, após a retirada de 2, sendo dividido para os dois grupos. O lapso temporal entre a entrada desses animais no estudo, que acontecia na medida que ia surgindo uma ferida traumática, até finalização do experimento concluindo o tempo de observação de cada um, durou 1 ano e 7 meses.

Em um estudo experimental recente, que avaliou PRP liofilizado e meio condicionado com células tronco para uso terapêutico em feridas confeccionadas na garupa de equinos, o número total de animais foi 8, sendo 4 machos e 4 fêmeas (FREITAS *et al.*, 2023). Nesse modelo de feridas experimentais, conseguimos um padrão melhor de número de feridas e tamanho das mesmas, além da possibilidade de ter, no mesmo animal, o tratamento teste e o tratamento controle. No entanto, não é simulada uma condição próxima à realidade daquela espécie (SPARKS *et al.*, 2021).

Já em um modelo de estudo clínico, as feridas são acidentais e os casos clínicos vão surgindo no decorrer do tempo e, quando é observada uma ferida em um animal, este passa por uma avaliação para ver se o animal e a ferida se enquadram nos critérios de inclusão ou não. Dessa forma, encontramos feridas de tamanho variável e, muitas vezes, não conseguimos atingir o número desejável de animais, pois pode não surgir um número de feridas suficientes, que se enquadre no

estudo, dentro do espaço de tempo determinado. No entanto, nesse modelo, o estudo simula uma condição mais semelhante à realidade da clínica (ANIS et al., 2021).

Embora a pele de rã tenha sido usada como tratamento de queimaduras no Brasil (PICCOLO et al., 2002), nunca foi registrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e não está mais em uso. A pele de tilápia parece ser um tecido promissor para ser utilizado como curativo oclusivo para feridas em equinos (COSTA et al., 2020).

Quando um novo produto é testado, para que o mesmo seja propício, ele deve ter uma resposta semelhante ou melhor do que um produto já existente no mercado, com eficácia conhecida para o devido fim, sendo essencial que exista alguma vantagem em relação ao produto já prescrito. Em nosso estudo, tivemos eficácia semelhante ao tratamento utilizado no grupo controle em relação aos seguintes pontos: percentual de cicatrização total; evolução temporal da área da úlcera; taxa de cicatrização; evolução temporal do processo de cicatrização (PUSH); quantificação do grau de edema, neutrófilos, macrófagos, tecido de granulação, fibroblastos, colágeno, epitelização, neovascularização; colágeno total; colágeno tipo I; colágeno tipo III e densidade microvascular. No entanto, em relação ao número de curativos, tivemos uma diferença considerável, corroborando os resultados obtidos na pesquisa em humanos.

Nossos resultados foram semelhantes ao de um estudo que avaliou a eficácia da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico oclusivo no manejo e tratamento de queimaduras de segundo grau em humanos adultos comparado com o tratamento com curativo de hidrofibra à base de prata Aquacel Ag® foi verificado que a pele de tilápia do Nilo apresentou tempo médio de tratamento (cicatrização completa da ferida) semelhante ao do material comparativo, sugerindo que a pele de tilápia do Nilo é tão eficaz quanto um curativo biológico oclusivo. Porém, 60% dos pacientes tratados com pele de tilápia do Nilo não necessitaram de troca de curativos em nenhum momento do tratamento enquanto que os pacientes tratados com a hidrofibra, 53,3% dos pacientes necessitaram de mais de uma troca de curativo (MIRANDA & BRANDT, 2019).

Em uma criança de 3 anos com 18% do corpo queimado, utilizou-se a pele da tilápia em parte das lesões e sulfadiazina de prata em outra. Enquanto que em todas as lesões tratadas com a sulfadiazina de prata os curativos precisavam ser trocados diariamente, nas feridas tratadas com a pele da tilápia, em apenas uma, o curativo precisou ser substituído dentro do período de 10 dias de tratamento até a completa cicatrização (COSTA *et al.*, 2019). Em um homem de 23 anos que deu entrada no Hospital com queimaduras devido a uma lesão térmica causada por contato com chamas de explosão de pólvora em diversas regiões do corpo, foram selecionadas algumas lesões para tratar com a pele de tilápia. Durante os períodos de 12 e 17 dias necessários para a reepitelização completa das feridas, não houve necessidade de troca de curativo de pele de tilápia (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2019).

Em uma paciente de 18 anos, sem comorbidades, mas com queimaduras, a pele de tilápia foi aplicada nas lesões levando a uma reepitelização completa com 16 dias de tratamento. As lesões, em sua maioria, eram queimaduras de segundo grau profundo e, uma menor parte, queimaduras de segundo grau superficial. No quarto dia de tratamento, o curativo foi aberto pela primeira vez e foi observada boa aderência da pele de tilápia em parte da superfície queimada, porém em algumas regiões a pele não aderiu, tendo sido removida juntamente com as gazes ou permanecendo no leito da queimadura, mas com consistência amolecida e excesso de secreção subjacente. Nestas regiões, a pele de tilápia foi retirada e, após limpeza, houve reposição do biomaterial, seguida de nova cobertura firme com gaze e atadura. A mesma sequência de procedimentos foi realizada no sétimo dia de tratamento, porém com melhor aderência da pele de tilápia e menor presença de secreção foram observadas. Um período de 16 dias foi necessário para a reepitelização da queimadura desta paciente e a ausência de efeitos colaterais sugeriram a efetividade da pele de tilápia como um xenoinxerto flexível e aderente. A diminuição do número de troca de curativos foi um fator importante na redução da dor nesta paciente, além de diminuir o trabalho da equipe e os custos hospitalares (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2020a).

O curativo com consistência amolecida e excesso de secreção subjacente nas primeiras trocas, relatado anteriormente, foi observado no nosso estudo em equinos e no de SILVA (2022) que também avaliou a pele de tilápia como curativo biológico

oclusivo em feridas de equinos. Aparentemente, feridas profundas, mesmo que não seja por queimadura, ao receber o curativo com a pele de tilápia, produz uma quantidade excessiva de exsudato, impedindo a aderência do mesmo, necessitando de uma frequência inicial de trocas de curativos maior. Sendo assim, trocar os curativos com mais frequência nas duas primeiras semanas pode estimular a resposta inflamatória e ajudar no controle do mau cheiro devido à secreção, auxiliando na prevenção de moscas e problemas de miíase em equinos (SILVA, 2022). No entanto, no decorrer das trocas, essa secreção vai diminuindo e permitindo a aderência da pele de tilápia ao leito da ferida. É importante ressaltar que a pele da tilápia possui microbiota não patogênica (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2016), portanto o exsudato não é causado pela contaminação do curativo.

Em um estudo controlado randomizado de fase II com humanos, verificou-se que, nos participantes tratados com pele de tilápia, a reepitelização completa ocorreu em um número significativamente menor de dias e a necessidade de troca de curativos foi significativamente reduzida em comparação com voluntários tratados com Sulfadiazina de Prata (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2020b).

No estudo controlado randomizado de fase III foi observado que o curativo à base de pele de peixe de tilápia do Nilo diminui os custos relacionados ao tratamento de queimaduras superficiais de espessura parcial em humanos, comparado com o uso do curativo com sulfadiazina de prata. Os pacientes tratados com pele de peixe necessitaram de menos dias para reepitelização e menos curativos. Com isso, o uso da pele de peixe reduziu a média final do custo do tratamento por paciente em 42,1%. Portanto, observou-se que ao acelerar a reepitelização e diminuir os custos relacionados ao tratamento, a pele do peixe tilápia do Nilo pode beneficiar os sistemas de saúde pública com poucos recursos dos países em desenvolvimento (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2021).

Diferença considerável no número de curativos também foi encontrada na pesquisa feita com uma população de 30 crianças com idades entre 2 e 12 anos com queimaduras superficiais admitidas em menos de 72 horas após a lesão térmica. Esses curativos eram trocados apenas se a pele da tilápia não aderisse adequadamente ao leito da ferida. No grupo controle, foi aplicada fina camada de creme de sulfadiazina de prata 1%, coberta com gaze e curativo. Nesses pacientes,

os curativos eram trocados diariamente. Enquanto que no grupo com pele de tilápia a troca acontecia apenas em caso de necessidade. O número médio de dias para completar a reepitelização, a taxa de reepitelização, bem como a avaliação da melhoria da queimadura apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. No entanto, em relação ao número de curativos realizados, o número total de curativos foi significativamente reduzido no grupo Pele de Tilápia quando comparado ao grupo Sulfadiazina de Prata (LIMA JÚNIOR *et al.*, 2020d).

Depois que bons resultados foram obtidos com o uso da pele de tilápia glicerolizada em crianças e adultos queimados outra versão da pele foi desenvolvida e resultados semelhantes foram alcançados, inclusive na diminuição do número de trocas de curativos: pele de tilápia liofilizada. A versão liofilizada da pele de tilápia é eficaz no tratamento de queimaduras, com a vantagem de não precisar ser armazenada sob refrigeração, em comparação com a glicerolada, permitindo o armazenamento prolongado de tecido estéril e diminuindo os custos relacionados à distribuição e transporte (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2020c).

Outro produto a ser desenvolvido é o *Scaffold* utilizando a pele de Tilápia. *Scaffolds* de matriz extracelular descelularizada foram desenvolvidos há mais de 30 anos e têm sido utilizados para uma ampla gama de aplicações de reparo de tecidos em medicina humana e veterinária e é um exemplo de terapia de medicina regenerativa para cicatrização de feridas. Após a remoção do componente celular imunogênico, esses produtos contêm estruturas e moléculas funcionais importantes na reparação de tecidos, incluindo colágeno, glicosaminoglicanos, fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas (SWINEHART & BADYLAK 2016).

Além disso, os biomateriais à base de colágeno continuam a ser um dos materiais naturais mais investigados para a regeneração de tecidos. Estudos têm apontado a tilápia como fonte satisfatória de colágeno pela qualidade e custo benefício, com boas respostas *in vitro* e *in vivo*. Para regenerações de tecidos moles e duros, a pele de tilápia do Nilo está sendo considerada uma boa fonte de colágeno, o que motiva à extração desse colágeno para a criação de um novo produto (Lima-Verde *et al.*, 2020).

Como citado anteriormente, humanos queimados tratados com pele de tilápia diminuíram as necessidades analgésicas e a escala visual analógica (LIMA-JÚNIOR

et al., 2021). No presente estudo, esse aspecto não foi avaliado, mas o fato de um menor manuseio das feridas para troca do curativo ao longo do tempo, favorece o bem-estar animal. Esses fatores motivaram o desenvolvimento desta pesquisa em cavalos nos levou a tentar replicar o estudo clínico nessa espécie para a realidade da medicina equina, pois era importante investigar se o mesmo resultado favorável ocorre em feridas traumáticas de equinos e os nossos resultados demonstraram isso. Portanto, este é o primeiro estudo clínico a avaliar a eficácia da pele de tilápia na cicatrização de feridas traumáticas em equinos, com tempo de observação que simula a rotina clínica da medicina equina.

Na medicina veterinária temos uma escassez de trabalhos científicos que faça comparação de número de curativos em diferentes tratamentos e, conseqüentemente, que leve em consideração o impacto da diferença de custo de tratamentos que exigem menor número de trocas de curativo na rotina clínica veterinária. Nosso estudo vem chamar a atenção para esse ponto importante dentro da medicina veterinária que reflete diretamente no custo do tratamento, no bem-estar do animal e na segurança da equipe.

Nossa pesquisa foi semelhante ao estudo feito por Khafaga et al (2018) que investigaram o efeito cicatrizante de nanopartículas de prata (AgNPs) em feridas tratadas por segunda intenção em burros comparada com a sulfadiazina de prata e foi observado superioridade das AgNPs na cicatrização de feridas devido a formação precoce de tecido de granulação, maior epitelização e angiogênese, menor tempo de cicatrização e redução da largura da cicatriz. Os tratamentos foram aplicados duas vezes por semana durante as primeiras 2 semanas, depois uma vez por semana até a cura completa.

Embora a sulfadiazina de prata tenha sido estabelecida como o tratamento antimicrobiano tópico padrão para queimaduras em humanos (LIMA JÚNIOR et al., 2020b), e tenha uma taxa de cicatrização semelhante à feridas experimentais em membros equinos tratados com pomada de iodopovidona (Berry & Sullins, 2003), o curativo necessita ser trocado diariamente e o presente estudo demonstrou uma redução considerável no número de curativos nas feridas tratadas com pele de tilápia. Este resultado está relacionado ao maior intervalo entre as trocas de curativos, comparado com o de sulfadiazina de prata.

É comum dizer que todas as terapias para feridas que não cicatrizam em equinos são usadas em várias combinações o que nos leva a pensar na associação da pele de tilápia com outros protocolos como terapia com ozônio, terapia a laser, entre outras (DAHLGREN, 2018). Não há escassez de curativos para feridas disponíveis que fornecem um ambiente de cicatrização úmido e favorecem a cicatrização. Essa diversidade de opções de curativo na clínica de equinos se torna um desafio para o veterinário que deve escolher de acordo com o que tem ao alcance, dentro da realidade de cada paciente e tutor (Stashak e Farstvedt, 2004).

Os biomateriais baseados em ácido hialurônico (HA) reticulados fornecem uma excelente ferramenta para a cicatrização de feridas. Feridas de equinos tratadas com uma preparação de filme de HA reticulado cicatrizaram mais rapidamente e com um epitélio de maior qualidade e menos frágil do que as feridas tratadas apenas com bandagens, sendo proposto como uma opção de tratamento para ajudar a estimular a formação de tecido de granulação saudável na cicatrização precoce de feridas com grandes defeitos (DAHLGREN *et al.*, 2016). Um biomaterial à base de ácido hialurônico reticulado (HA-) usado para tratar feridas em ratos, cães e cavalos obteve tempos reduzidos de fechamento da ferida e melhor qualidade do tecido cicatrizado diminuindo o risco de infecção e a dor associada a feridas abertas (YANG *et al.*, 2011).

O uso de PRP em feridas de cavalos tem se tornado uma pesquisa frequente já que se refere a uma série de produtos sanguíneos que geralmente são feitos do mesmo cavalo que tem a ferida a ser tratada (autóloga), diminuindo custo de produção (CARTER *et al.*, 2003; LÓPEZ & CARMONA, 2014). Monteiro *et al.* (2009) fez um modelo de cicatrização com troca semanal de curativo utilizando o PRP, no entanto, a aplicação tópica de PRP autólogo não acelerou ou melhorou a qualidade do reparo de pequenas feridas em membros de cavalos.

Por um tempo, foi investigada a ação da membrana amniótica na cicatrização de feridas por ser uma matriz rica em colágeno e incluir propriedades antiinflamatórias, bacteriostáticas, reepitelizantes e de prevenção de cicatrizes. A aplicação de âmnio em feridas experimentais nos metacarpos e metatarsos de cavalos resultou em aumento da porcentagem de epitelização e diminuição do número de dias para cicatrização completa em comparação com feridas de controle

tratadas com um curativo não aderente. Além disso, as feridas tratadas com âmnio também tinham tecido de granulação menos exuberante em comparação com os controles (BIGBIE *et al.*, 1991).

Em um estudo semelhante usando âmnio como curativo biológico após enxerto de pele em feridas experimentais de membros distais, feridas tratadas com âmnio apresentou diminuição da formação de TGE e diminuição do tempo mediano de cicatrização em comparação com o curativo não aderente sozinho. A troca de curativos era realizada a cada 3 dias, sendo uma vantagem em relação aos curativos convencionais de troca diária (GOODRICH *et al.*, 2000). No entanto, o uso de membrana amniótica para tratamento de feridas não é aplicado na rotina clínica equina, provavelmente pela dificuldade de adquirir, preparar e armazenar o material.

Em um relato de caso com dois equinos machos adultos que apresentavam feridas crônicas, a troca de curativo era feita a cada 7 dias e a pele de tilápia utilizada como curativo oclusivo pareceu ter um efeito positivo na cicatrização das feridas e o aspecto clínico melhorou nos 35 dias avaliados. Uma grande redução no tamanho da ferida, juntamente com a epitelização da superfície foi notada após 28 dias de tratamento. A utilização de curativo de pele de tilápia pareceu diminuir o tempo de cicatrização, diminuir a formação de TGE e permitir uma redução do número de trocas de curativos de a cada dois dias para uma vez por semana. Isso implica em menos estresse e dor para o animal devido à menor manipulação e menor custo de tratamento, pois há menor quantidade de material de curativo sendo utilizado. Além disso, permite evitar a utilização de antibióticos, o que diminui o impacto ambiental e não gera resistência (SILVA *et al.*, 2019).

Esses achados corroboram o que foi notado no nosso estudo que, apesar de a formação de TGE não ter sido investigada, foi um dado observado nos animais tratados com o curativo de pele de tilápia. Uma das razões para a formação de tecido de granulação exuberante em vez de cicatrização é a incapacidade das células de defesa dos equinos em eliminar patógenos (WILMINK & VAN WEEREN, 2005). Mais estudos são necessários para investigar a interferência da pele de tilápia nesse processo.

Outro relato de uso da pele de tilápia em equinos, teve resultado semelhante, mesmo sendo em um caso comprovado de ferida por habronemose cutânea. O

curativo era trocado a cada 7 dias e demonstrou ser uma alternativa viável, com uma diminuição na manipulação do animal, comparada ao tratamento convencional onde as trocas são preconizadas, na maioria das vezes, diariamente. O tempo de cicatrização também foi satisfatório levando em consideração que a habronemose cutânea é uma doença de difícil cicatrização (DA SILVA *et al.*, 2019).

Em resumo, o presente estudo confirmou a eficácia da pele de tilápia na cicatrização de feridas traumáticas em equinos, com redução do número de curativos. Sendo assim, o curativo com pele de tilápia representa um passo à frente na cicatrização de feridas em equinos. Como curativo, tem o potencial de abordar alguns dos desafios associados à cicatrização por segunda intenção, como tratamento diário da ferida, cicatrização retardada e formação de tecido de granulação exuberante.

Além disso, é uma escolha válida para aplicação em feridas cutâneas distais dos membros de equinos, pois as recomendações delineadas para o tratamento de feridas equinas com curativo de pele de tilápia seriam baseadas em sua eficácia na cicatrização de feridas e seu efeito prolongado, permitindo menos trocas de curativo, favorecendo o bem-estar animal.

O baixo custo e a ampla disponibilidade de peles de tilápia tornam esse curativo um divisor de águas no tratamento de queimaduras, seja em animais ou em humanos. A observação parece aplicável a cavalos, embora mais estudos sejam necessários para entender os mecanismos moleculares envolvidos no processo de cicatrização quando a pele de tilápia é usada como curativo oclusivo, bem como a sua interferência na formação de TGE.

Portanto, ainda há uma extensa pesquisa a ser feita que deve visar o seguinte: entender o mecanismo de ação do curativo da pele de tilápia que evita a formação do tecido de granulação exuberante, verificar a resposta da matriz descelularizada, oriunda da pele de tilápia, na cicatrização de úlceras traumáticas em equinos, bem como de outros derivados da pele de tilápia para esta mesma finalidade e comparar os custos do tratamento com pele de tilápia em relação aos tratamentos utilizados com frequência na rotina clínica.

6 CONCLUSÃO

É possível concluir que o tratamento com o curativo de pele de tilápia em equinos tem uma resposta de cicatrização semelhante à de um produto do mercado que é conhecido por ter um efeito favorável na cicatrização, porém com uma diminuição considerável no número de curativos, o que implica em maior conforto e, conseqüente, melhora do bem-estar do animal.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, A. et al. Animal models in burn research. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 3241–3255, 2014. DOI <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1612-5>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-014-1612-5>.
- ABREU NETO, O.M. Laminite Equina e Ferrageamento Corretivo. **Monografia** (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Tuiuti do Paraná, 2013, 44p.
- ALVES APNN, LIMA JUNIOR EML, PICCOLO NS, MIRANDA MJB, VERDE MEQL, FERREIRA JUNIOR AEC, SILVA PGB, FEITOSA VP, BANDEIRA TJPG, MATHOR MB, MORAES FILHO MO. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile Tilapia skin submitted to different sterilization methods. *Cell Tissue Bank*. 2018.
- ALVES, APNN; LIMA VERDE, MEQ; FERREIRA JUNIOR, AEC; SILVA, PGB.; FEITOSA, VP; LIMA JUNIOR, EM; MIRANDA, MJB; MORAES FILHO, MO. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Rev Bras Queimaduras**. 2015;14(3):203-10
- ANANTAMA et al. The granulation (t)issue: A narrative and scoping review of basic and clinical research of the equine distal limb exuberant wound healing disorder. **The Veterinary Journal**, 280 (2022) 105790, 2022.
- ANIS et al. A Novel Organic Composite Accelerates Wound Healing: Experimental and Clinical Study in Equine. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 99, 2021.
- ARGENTINO et al. Manejo e tratamento de feridas em equinos com produtos Fitoterápicos: revisão de literatura. **XIII Semana Acadêmica de Medicina Veterinária e IX Jornada Acadêmica de Medicina Veterinária**, Umuarama-PR, 2017.
- AZEVEDO-SANTOS, V. M.; RIGOLIN-SÁ, O.; PELICICE, F. M. Growing, losing or introducing? Cage aquaculture as a vector for the introduction of non-native fish in Furnas Reservoir, Minas Gerais, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 9: 915-919, 2011.
- BARROSO, C. G. Lesões acidentais em equídeos e expressões de cicloxigenase 2 (COX-2) e toll like receptor 2 (TLR-2) em feridas experimentais tratadas com óleo de coco (*cocos nucífera* L.) em equinos. **Dissertação**. Universidade Estadual do Ceará, 2017.
- BERMAN, Miriam E.; XIE, Yong; MULLER, William A. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 156, n. 4, p. 1515-1524, 1996.
- BERRY & SULLINS. Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the distal aspect of the limbs in horses. **AJVR**, Vol 64, No. 1, January, 2003.

- BIGBIE RB, SCHUMACHER J, SWAIM SF, et al. Effects of amnion and live yeast cell derivative on second-intention healing in horses. **Am J Vet Res** 1991;52(8):1376–82.
- BROUGHTON, G., II; Janis, J.E.; Attinger, C.E. The basic science of wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.** 2006, 117 (Suppl. 7), 12S–34S.
- BUNDGAARD, L; SØRENSEN, M. Aa; NILSSON, T.; SALLING, E.; JACOBSEN, S. Evaluation of Systemic and Local Inflammatory Parameters and Manifestations of Pain in an Equine Experimental Wound Model. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 68, p. 81-87, 2018.
- CAMPOS, A. C. L. et al. Cicatrização de feridas. ABCD, **arq. bras. cir. dig.** São Paulo , v. 20, n. 1, p. 51-58, Mar. 2007 . DOI <https://doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-67202007000100010&lng=en&nrm=iso.
- CARTER CA, JOLLY DG, WORDEN CE, et al. Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. **Exp Mol Pathol** 2003; 74(3):244–55.
- CARVALHO, E.D. Avaliação dos impactos da piscicultura em tanques-rede nas represas dos grandes tributários do alto Paraná (Tietê e Paranapanema): o pescado, a ictiofauna agregada e as condições limnológicas. **Relatório Científico** (FAPESP). Botucatu, SP. 2006. 46p.
- CASTAGNOLLI, N. Aquicultura para o ano 2000. Brasília: **CNPq**, 1996. 95p.
- CELESTE et al. Regional differences in wound oxygenation during normal healing in an equine model of cutaneous fibroproliferative disorder. **Wound Rep Reg.**, v. 19, p. 89–97, 2011.
- CORRÊA, F. B. Estudo prospectivo, randomizado e controlado comparando a contração tardia do enxerto de pele parcial entre três matrizes dérmicas no tratamento das sequelas de queimaduras. Orientador: Pedro Soler Coltro. 2018. 127 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Clínica Cirúrgica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018. DOI 10.11606/D.17.2019.tde-28112018-094549. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17137/tde-28112018-094549/en.php#referencias>
- COSTA BO, et al. Treatment of a Traumatic Equine Wound Using Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin as a Xenograft. **Acta Sci Vet.** 3 de Junho de 2020. Disponível em: <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/99678>
- COSTA, B.A. et al. Avaliação da redução do uso de analgésicos por pacientes ambulatoriais de um centro de queimados de referência em fortaleza com a aplicação da pele de tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de

queimaduras de segundo grau superficial. XXXVI **Encontro de Iniciação Científica**. Encontros Universitários da UFC, 2017. 29.

COSTA, B.A. et al. Use of Tilapia skin as a xenograft for pediatric burn treatment: a case report. **Journal of burn care & research**, v. 40, n. 5, p. 714-717, 2019.

DA SILVA *et al.* Pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) como curativo biológico em equino com habronemose cutânea. **CONIC SEMESP**. 19º Congresso Nacional de Iniciação Científica, 2019.

DAHLGREN LA et al. Evaluation of a hyaluronic acid-based biomaterial to enhance wound healing in the equine distal limb. **J Equine Vet Sci** 2016;44:90–9.

DAHLGREN, L. A. Regenerative Medicine Therapies for Equine Wound Management. **Veterinary Clinics Equine**, v. 34, p. 605–620, 2018.

DHIVYA et al. Wound dressings – a review. **BioMedicine**, v. 5, nº. 4, p. 24-28, 2015.

DIAS MTPM *et al.* Neovaginoplasty for radiation-induced vaginal stenosis using Nile Tilapia Fish Skin as a biological graft. Case report. **Journal of Surgical Case Reports**, v. 11, p. 1–3, 2019b

DIAS MTPM *et al.* Neovaginoplasty using Nile Tilapia Fish Skin as a new biological graft in patients with Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome. **The Journal of Minimally Invasive Gynecology**, 2019c.

DIAS MTPM *et al.* Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertility and Sterility**, 2019a.

EGGLESTON, R. B. Equine Wound Management Bandages, Casts, and External Support. **Vet Clin Equine**, v. 34, p. 557–574, 2018.

ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery (Oxford)**, 26, 31–37, 2008.

FECHINE-JAMACARU, F. V. Quantificação de angiogênese corneana in vivo através de processamento de imagens digitais. 2006. 292 f. **Tese** (Doutorado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FERREIRA, M. C. et al. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011. DOI <https://doi.org/10.1590/S1983-51752011000400028>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcp/a/jTyrHmYJ4Qcf5H7rKZFWfgQ/?lang=pt#>. Acesso em: 3 jun. 2021.

FREITAS et al. Freeze-dried Platelet-rich Plasma and Stem Cell-conditioned Medium for Therapeutic Use in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 121, 2023.

GETHIN, G. Understanding the inflammatory process in wound healing. **Br. J. Community Nurs.** 2012, 17 (Suppl. 3), S17–S22.

GOODRICH LR, MOLL HD, CRISMAN MV, et al. Comparison of equine amnion and anonadherent wound dressing material for bandaging pinch-grafted wounds in ponies. **Am J Vet Res**;61(3):326–9, 2000.

GURCAN *et al.* Histopathological Image Analysis: A Review. **IEEE Rev Biomed Eng**, v. 2, p. 147–171, 2009.

HACKET, R. P. How to Prevent and Treat Exuberant Granulation Tissue. **Wound & orthopedic management**, AAEP proceedings, Vol. 57, 2011.

HENDRICKSON, D.; VIRGIN, J. Factors that Affect Equine Wound Repair. **Veterinary Clinics Equine**, v. 21, p. 33–44, 2005.

HINZ, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. **J. Investig. Dermatol**, 127, 526–537, 2007.

HOWARD et al. A Preliminary Study on Second-Intention Healing of Full-Thickness Wounds on Equine Distal Forelimbs Treated With Maltodextrin. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 74, p. 90-94, 2019.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/busca.html?searchword=rebanho+equino>. Acesso em 08 de março de 2023.

IBRAHIM A, SOLIMAN M, KOTB S, ALI MM. Evaluation of fish skin as a biological dressing for metacarpal wounds in donkeys. **BMC Veterinary Research**, 16:472, 2020.

JØRGENSEN, E.; PIRONE, A.; JACOBSEN, M.; MIRAGLIOTTA, V. Epithelial-to-mesenchymal transition and keratinocyte differentiation in equine experimental body and limb wounds healing by second intention. **Vet Dermatol**, v. 30, p. 417–e126, 2019.

KAUL, H.; VENTIKOS, Y. On the genealogy of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Engenharia de tecidos - Parte B: Revisões**, 21 (2), 203–217. 2015.

KHAFAGA et al. Enhancement of Equid Distal Limb Wounds Healing by Topical Application of Silver Nanoparticles. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 61, p. 76-87, 2018.

KNOTTENBELT, D. C. Equine wound management: are there significant differences in healing at different sites on the body? **Veterinary Dermatology**, v. 8, p. 273-290, 1997.

KOUHSOLTANI, Maryam; KHIAMI, Monir Moradzadeh; TAHAMTAN, Shabnam. Evaluation of mast cell counts and microvessel density in reactive lesions of the oral cavity. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 10, n. 4, p. 241, 2016.

LACOPETTI et al. Application of Platelet-Rich Gel to Enhance Wound Healing in the Horse: A Case Report. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 123-128, 2012.

LESIMPLE, C. Indicators of horse welfare: State-of-the-art. **Animals**, v. 10, n. 2, 2020.

LIMA JUNIOR, EM ; BANDEIRA, TJPG ; MIRANDA, MJB; FERREIRA, GE; PARENTE, EA; PICCOLO, NS & MORAES FILHO, MO. Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. Caracterização da microbiota da pele e cavidade oral de *Oreochromis niloticus* doi: 10.12662/2317-3076jhbs.v4i3.767.p193-197.2016. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 193-197, 2016.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. Innovative Burn Treatment Using Tilapia Skin As A Xenograft: A Phase II Randomized Controlled Trial. **Journal of Burn Care & Research**, Volume 41, Issue 3, Pages 585–592, May/June 2020b.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **Journal of Surgical Case Reports**, 2019;6, 1–4.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. Lyophilised tilapia skin as a xenograft for superficial partial thickness burns: a novel preparation and storage technique. **Journal of Wound Care**, volume 29, número 10, Pages 598–602, Outubro 2020c.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. 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**, Volume 147, Number 5, May 2021.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. Pediatric Burn Treatment Using Tilapia Skin as a Xenograft for Superficial Partial-Thickness Wounds: A Pilot Study. **Journal of Burn Care & Research**, v. 41, n. 2, March/April, 2020d.

LIMA-JÚNIOR, E.M. et al. Tratamento de queimaduras de segundo grau profundo em abdômen, coxas e genitália: uso da pele de tilápia como um xenoenxerto. **Rev. Bras. Cir. Plást.**; v.35(2):243-248, 2020a.

LIMA-JUNIOR, E.M. et al. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista brasileira de queimaduras**, Limeira, v. 16, n. 1, p.10-7, 2017.

LIMA-VERDE et al. Nile Tilapia Fish Skin, Scales, and Spine as Naturally Derived Biomaterials for Tissue Regeneration. **Current Oral Health Reports**, 2020.

LÓPEZ C, CARMONA JU. Platelet-rich plasma as an adjunctive therapy for the management of a severe chronic distal limb wound in a foal. **J Equine Vet Sci**, 34(9):1128–33, 2014.

MACPHAIL, C. M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: **FOSSUM, T. W. Cirurgia de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 16, ISBN 978-85-352-6991-8.

MAHER, M.; KUEBELBECK, L. Nonhealing Wounds of the Equine Limb. **Veterinary Clinics Equine**, v. 34, p. 539–555, 2018.

MANDELBAUM, Samuel Henrique; SANTIS, É. P. D; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 393-410, ago/2003.

MEDEIROS, Aldo Cunha; DANTAS-FILHO, Antônio Medeiros. Cicatrização das feridas cirúrgicas. **Journal of surgical and clinical research**, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MESQUITA et al. Effect of imiquimod on partial-thickness burns. **Burns**, v. 36, p. 97-108, 2010.

MIRANDA MJB; BRANDT CT. Nile tilapia skin xenograft versus silver-based hydrofiber dressing in the treatment of second-degree burns in adults. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 34(1), p. 79-85, 2019.

MONTEIRO SO, LEPAGE OM, THEORET CL. Effects of platelet-rich plasma on the repair of wounds on the distal aspect of the forelimb in horses. **Am J Vet Res**, 70(2):277–82, 2009.

NUSSBAUM *et al.* Effects of Low Intensity Laser Irradiation During Healing of Skin Lesions in the Rat. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, p. 372–381, 2009.

OLIVEIRA JR. et al. Effects of Topical Application of Sunflower-Seed Oil on Experimentally Induced Wounds in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 139-145, 2012.

OLIVEIRA, I. V. P. D. M; DIAS, R. V. D. C. CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS: FASES E FATORES DE INFLUÊNCIA. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v. 6, n. 4, p. 267-271, abril/2012.

PEACOCK, Zachary S.; JORDAN, Richard CK; SCHMIDT, Brian L. Giant cell lesions of the jaws: does the level of vascularity and angiogenesis correlate with behavior?. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 70, n. 8, p. 1860-1866, 2012.

PEIXE BR, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PISCICULTURA. **Anuário peixe BR da piscicultura 2021**. São Paulo, p. 71, 2021.

PERES, V.S. Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de ferida cirúrgica em ratos. **Dissertação**, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2014.

PICCOLO N, PICCOLO MS, PICCOLO MTS. Uso de pele de rã como curativo biológico como substituto temporário da pele em queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, 2:18-24, 2002.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K; MORAES, A.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.

PUSZTASZERI, Marc P.; SEELENTAG, Walter; BOSMAN, Fred T. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 54, n. 4, p. 385-395, 2006.

RODRIGUES AH *et al.* Male-to-Female Gender-Affirming Surgery Using Nile Tilapia Fish Skin as a Biocompatible Graft. **The Journal of Minimally Invasive Gynecology**, 2020.

RODRIGUES, Evandra Straza; CASTILHO-FERNANDES, Andrielle; FONTES, Aparecida Maria. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RODRIGUES, M. et al. Wound Healing: A cellular perspective. **Physiol Rev**, Stanford, v. 99, n. 2019, p. 665-706, 2019.

ROWAN, M. P. et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Critical Care**, Houston, v. 19, n. 1, p. 1-12, jan./2015.

SANTOS VLGG, AZEVEDO MAJ, SILVA TS, CARVALHO VMJ, CARVALHO VF. Adaptação transcultural do Pressure Ulcer Scale for Healing (PUSH), para a língua portuguesa. **Rev Latino-am Enfermagem**, 13(3):305- 13, 2005.

SARDARI K, KAZEMI H, EMAMI MR, MOVASAGHI AR, GOLI AA. Role of collagen cross-linking on equine wound contraction and healing. **Comp Clin Pathol**, 18:239–247, 2009.

SCHNEIDER CA; RASBAND WS; ELICEIRI KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. **Nat Methods**, July, v. 9(7), p. 671–675, 2012.

SEAB, Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Equideocultura**, 2017.

SILVA SC *et al.* Using tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) as an occlusive biological curative in equine wounds: short communication. **Braz J Vet Res Anim Sci.**, v. 56(4), 2019.

SILVA, SC. Clinical and histopathological evaluation of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) as an occlusive biological curative in equine wounds. 2022. 71f. **Dissertação** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

SLONGO H *et al.* Tilapia Skin for Neovaginoplasty after Sex Reassignment Surgery. Video article. **The Journal of minimally invasive gynecology**, v. 00, p 1-1, 2019.

SMANIOTTO et al. Sistematização de curativos para o tratamento clínico das feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27 (4), p. 623-6, 2012.

SOUZA et al. The main uses of ozone therapy in diseases of large animals: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 51–56, 2021.

SPAAS et al. Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an in vivo equine skin wound model. **Cytherapy**, v. 17, p. 1434-1446, 2015.

SPARKS et al. Biomechanics of Wound Healing in an Equine Limb Model: Effect of Location and Treatment with a Peptide-Modified Collagen– Chitosan Hydrogel. **ACS Biomaterials Science Engineering**, v. 7, p. 265–278, 2021.

STASHAK TS, FARSTVEDT E, OTHIC A. Update on wound dressings: Indications and best use. **Clin Tech Equine Pract.** 3 (1): 148-163, 2003.

SWINEHART IT, BADYLAK SF. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. **Dev Dyn**, 245(3):351–60, 2016.

TEÓFILO *et al.* Mast Cells and Blood Vessels Profile in Oral Carcinogenesis: An Immunohistochemistry Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 21(4), p. 1097-1102, 2020.

THEORET et al. Equine Exuberant Granulation Tissue and Human Keloids: A Comparative Histopathologic Study. **Veterinary Surgery**, v. 42, p. 783–789, 2013.

THEORET, C. L. The Pathophysiology of Wound Repair. **Veterinary Clinics Equine**, v. 21, p. 1–13, 2005.

THEORET, C. L.; BOLWELL, C. F.; RILEY, C. B. A cross-sectional survey on wounds in horses in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 64(2), p. 90–94, 2016.

USDA, United States Department of Agriculture. **Equine 2015**. Baseline Reference of Equine Health and Management in the United States, 2015.

VERHAEGEN, P.D.H.M. et al. Diferenças na arquitetura do colágeno entre quelóide, cicatriz hipertrófica, cicatriz normotrófica e pele normal: Uma análise histopatológica objetiva. **Reparação de Feridas Regen.**, v. 17, p. 649–656, 2009.

VIEIRA, M. C. Percepções de práticas de manejo em estabelecimentos equestres quanto à influência dessas práticas para o bem-estar de equinos. 2015, 100 p. **Dissertação**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Agroecossistemas, 2015.

WILMINK, J. M.; VAN WEEREN, P. R. Second-Intention Repair in the Horse and Pony and Management of Exuberant Granulation Tissue. **Veterinary Clinics Equine**, v. 21, p. 15–32, 2005.

WINKLER, K.P. Factors that Interfere with Wound Healing.In: **The Merck Veterinary Manual**, 2015.

XI-QIAO, W. et al. A hiperatividade dos fibroblastos e a regressão funcional das células endoteliais contribuem para a oclusão dos microvasos na cicatrização hipertrófica. **Microvasc.**, v. 77, p. 204–211, 2009.

YANG G, PRESTWICH GD, MANN BK. Thiolated carboxymethyl-hyaluronic-acidbased biomaterials enhance wound healing in rats, dogs, and horses. **ISRN Vet Sci**;2011.

ANEXO I: ESCORE *PRESSURE ULCER SCALE FOR HEALING (PUSH)*

Comprimento X Largura	0 0 cm ²	1 < 0.3 cm ²	2 0.3-0.6 cm ²	3 0.7-1.0 cm ²	4 1.1-2.0 cm ²	5 2.1-3.0 cm ²	6 3.1- 4.0 cm ²	7 4.1-8.0 cm	8 8.1-12.0 cm ²	9 12.1-24.0 cm ²	10 >24.0 cm ²
Quantidade Exsudato	0 Ausente	1 Pequena	2 Moderada	3 Grande							
Tipo de Tecido	0 Ferida Fechada	1 Tecido Epitelial	2 Tecido de Granulação	3 Esfacelo	4 Tecido Necrótico						

Etapa 1: para avaliar a primeira característica - *comprimento x largura* - primeiramente mede-se a ferida em seu maior comprimento, no sentido céfalo-caudal. A seguir, uma segunda medida é feita também para a maior largura, do lado direito para o esquerdo. Multiplicam-se estas duas medidas para obter a área, em centímetros quadrados e, então, seleciona-se, no instrumento, a categoria à qual essa medida corresponde, registrando-se o subescore obtido, que pode variar de 0 a 10. Atenção: utilize sempre uma régua métrica graduada e sempre o mesmo método, todas as vezes em que a lesão for medida.

Etapa 2: avalia-se a *quantidade de exsudato* presente (segunda característica), após a remoção da cobertura e antes da aplicação de qualquer agente tópico, classificando-a como ausente (0), pequena (1), moderada (2) ou grande (3) quantidade. Seleciona-se a categoria correspondente no instrumento e registra-se o subescore obtido.

Etapa 3: identifica-se o *tipo de tecido* presente no leito da ferida. Deve-se apontar o escore “4” quando houver qualquer quantidade de tecido necrótico presente; o escore “3” quando houver presença de qualquer quantidade de esfacelo e ausência de tecido necrótico; o escore “2” quando a ferida estiver limpa e contiver tecido de granulação; o escore “1” quando a ferida for superficial e estiver re-epitelizando; e o escore “zero”, quando a ferida estiver fechada (Quadro 1). Seguem as características dos diferentes tipos de tecido: -

(escore 4) - tecido necrótico (escara): tecido de coloração preta, marrom ou castanha que adere firmemente ao leito ou às bordas da ferida e pode apresentar-se mais endurecido ou mais amolecido, comparativamente à pele periférica.

(escore 3) - esfacelo: tecido de coloração amarela ou branca que adere ao leito da ferida e apresenta-se como cordões ou crostas grossas, podendo ainda ser mucinoso.

(escore 2) - tecido de granulação: tecido de coloração rósea ou vermelha, de aparência brilhante, úmida e granulosa.

(escore 1) - tecido epitelial: para as feridas superficiais, aparece como um novo tecido róseo ou brilhante (pele) que se desenvolve a partir das bordas ou como “ilhas” na superfície da lesão.

(escore 0) - ferida fechada ou recoberta: a ferida está completamente coberta com epitélio (nova pele).

Etapa 4: Somam-se os subescores alcançados nas três características contidas no instrumento para obter o escore total do PUSH e registrá-los na *Tabela de Cicatrização da Úlcera de Pressão*.

Etapa 5: Registra-se o escore total no *Gráfico de Cicatrização da Úlcera de Pressão*, conforme a data. Durante o período de avaliação da ferida, as mudanças nos escores indicam as mudanças nas condições da ferida. Escores que diminuem indicam que há melhora no processo de cicatrização. Escores maiores apontam para a deterioração das condições de cicatrização da ferida.

