UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM MEDICAMENTOS
MESTRADO PROFISSIONAL EM FARMACOLOGIA CLÍNICA

EDMAR MACIEL LIMA JUNIOR

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA PELE DA TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), COMO CURATIVO BIOLÓGICO OCLUSIVO, NO TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

FORTALEZA
2017

EDMAR MACIEL LIMA JUNIOR

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA PELE DA TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), COMO CURATIVO BIOLÓGICO OCLUSIVO, NO TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de grau de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Co-orientadora: Dra. Andréa Vieira Pontes Rohleder

FORTALEZA

2017

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

L697a Lima Junior, Edmar Maciel.
Avaliação pré-clínica da pele da tilápia (oreochromis niloticus), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras / Edmar Maciel Lima Junior. – 2017.
78 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
Coorientação: Prof. Dr. Andrea Vieira Ponte Rohleder.

1. Queimaduras. 2. Tilápia do Nilo. 3. Oreochromis niloticus. 4. Materiais Biocompatíveis. 5. Cicatrização. I. Título.

CDD 615.1

EDMAR MACIEL LIMA JUNIOR

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA PELE DA TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), COMO CURATIVO BIOLÓGICO OCLUSIVO, NO TRATAMENTO DE QUEIMADURAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de grau de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia Clínica.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

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

_____
Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

_____
Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A todos os pacientes vítimas de queimaduras, que ao longo de minha trajetória profissional nestes 35 anos, tive oportunidade de cuidar como médico, conviver e aprender. Sinto-me com o coração confortado, em poder retribuir, pois comecei a minha vida profissional nesta área e devo todo o meu aprendizado e crescimento, como ser humano e médico, a este sofrido paciente queimado.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é uma das grandes virtudes do ser humano.

A Deus, pelo dom da vida e por ter concedido saúde ao longo destes anos e conseguir trilhar esta caminhada até os dias atuais.

À minha esposa Márcia e meus filhos Victor, Diego, Nathália e Thiago, pela compreensão nos momentos de ausência e pelos ensinamentos que me fizeram crescer.

A todos os 80 colaboradores da pesquisa, que ao longo de 25 etapas atuaram com dedicação e profissionalismo. Ao mestre e orientador Prof. Dr. Odorico Moraes, por acreditar nesta pesquisa e pelo convite, incentivo e orientação durante todo o mestrado, com muita dedicação e paciência; ao amigo Marcelo Borges, pela idéia da pele da tilápia e por confiar que a pesquisa fosse realizada no Ceará; a bióloga Livia Barreto e a toda equipe de Jaguaribara, pelo aprendizado na etapa da psicultura e o fornecimento das peles; aos técnicos Jociê e Junior pelo incessante trabalho nas etapas do projeto; as secretárias Renata, Patricia e Adelania, pelo profissionalismo e dedicação; a Dra. Ana Paula Negreiros e sua equipe, pelos importantes resultados histológicos obtidos nas etapas pré clínica e clínica; a Dra. Tereza Bandeira e sua equipe, pelo importante trabalho da microbiota da tilápia e microbiologia da peles; ao veterinário Wesley Ribeiro e sua equipe, pela etapa do uso das peles em ratos; a Dra. Mônica Mathor e toda equipe do IPEN, pela etapa de irradiação da pele da tilápia; a Dra. Elisabete Moraes e sua equipe, pela condução das Fases Clínicas I, II e III; a Dra. Andréa Pontes, pela importante participação nas etapas clínicas, nos prêmios obtidos, nas publicações realizadas e no dossiê para a ANVISA; as enfermeiras Cybele e Eliane, pela coordenação do Banco de Pele e a coordenação da equipe de acadêmicos no IJF; a equipe da dor, composta por Mariana Vale, Ana Kelly e Priscila Godinho, pelos estudos de analgesia; a farmacêutica Kelly Tavares, pelo estudo de custos; ao médico estatístico Vagnaldo Fechine, pela análise dos estatística dos resultados da pesquisa; a todos os acadêmicos que se envolveram nas etapas, Guilherme, Ezequiel, Diana Karla, Kamilly Ohana,

Junior, Camila, Flaviane, João Paulo, Bruno, Alex, ao acadêmico de psicologia Julio Cesar, responsável pela fotografia, curativos e digitação das fichas clínicas; aos colegas de outros estados e de outras espcialidades, que estão desenvolvendo estudos de pesquisa com a pele da tilápia.

"Penso noventa e nove vezes e nada descubro; deixo de pensar - mergulho em profundo silêncio e eis que a verdade se me revela"

Albert Einstein.

RESUMO

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA PELE DA TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*), COMO CURATIVO BIOLÓGICO OCLUSIVO, NO TRATAMENTO DE QUEIMADURAS. Edmar Maciel Lima Júnior. Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2017.

No Brasil, cerca de 1 milhão de casos de queimaduras ocorrem ao ano, dos quais 100 mil pacientes procurarão atendimento hospitalar e 2.500 irão a óbito em decorrência de suas lesões. Nosso país jamais teve uma pele animal legalmente registrada para uso nos pacientes queimados, embora em países de primeiro mundo, o tratamento com pele humana ou animal, fornecida por bancos de pele, é realizado de forma padronizada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da pele de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), usada como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. Este trabalho foi realizado em três capítulos, cujo primeiro manuscrito tratou sobre a caracterização da microflora da cavidade oral, pele e tecido subcutâneo dos peixes. Ao considerar a ausência de sinais infecciosos e uma carga inferior a 100.000 UFC, conclui-se que os valores de CFU encontrados neste estudo consistiam de microbiota normal, não infecciosa. No segundo manuscrito, a equipe de pesquisadores do NPDM apresentou resultados de um estudo para caracterizar a pele de tilápia do Nilo, a partir de suas características físicas (resistência a tração), histomorfológicas e da tipificação da composição do colágeno. As características microscópicas da pele da tilápia mostraram-se semelhantes à estrutura morfológica da pele humana, com elevada resistência e extensão à tração em quebra, o que suporta sua possível aplicação como biomaterial. A terceira publicação científica avaliou a utilização da pele de tilápia como curativo oclusivo nas queimaduras de segundo grau superficial e profunda em ratos, para avaliar pela primeira vez sua utilização *in vivo.* Os resultados demonstraram que a pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas induzidas por queimaduras nos ratos, interferindo positivamente no processo cicatricial. Além disso, a ausência valores significativamente alterados nos exames laboratoriais sinalizam a segurança da utilização da pele como curativo. Os resultados apresentados pela equipe de pesquisadores do NPDM possibilitam o prosseguimento das investigações para pesquisas em seres humanos, para confirmação de sua segurança e eficácia como curativo biológico. Os estudos pré-clínicos publicados demonstraram que a pele de tilápia possui as características e propriedades necessárias para ser utilizada com segurança e eficácia, confirmando seu potencial como curativo biológico oclusivo para o tratamento de queimaduras em seres humanos.

Palavras-chave: Queimaduras; Tilápia do Nilo; *Oreochromis niloticus*; Materiais Biocompatíveis; Cicatrização; Ferimentos e Lesões.

ABSTRACT

PRE-CLINICAL EVALUATION OF TILAPIA SKIN (*Oreochromis niloticus*), AS AN OCLUSIVE BIOLOGICAL DRESSING IN THE TREATMENT OF BURN WOUNDS. Edmar Maciel Lima Junior. Advisor: PhD. Manoel Odorico de Moraes Filho. Masters dissertation. Postgraduate Program in Pharmacology, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, 2017.

In Brazil, about 1 million cases of burns occur per year, of which 100 thousand patients will seek hospital care and 2.500 will die from their injuries. Our country has never had a legally registered animal skin for use in burned patients, although in first world countries, treatment with human or animal skin provided by skin banks is considered a gold standard. The objective of this study was to evaluate the effect of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin, used as a biological occlusive dressing, in the treatment of burn wounds, through three preclinical studies, developed and published in scientific journals by researchers of the Center of Drug Research and Development (NPDM) of the Federal University of Ceará. The first manuscript was about the characterization of the microflora of the fishes' oral cavity, skin and subcutaneous tissue. When considering the absence of infectious signs and a load below 100,000 CFU, it is concluded that the CFU values found in this study consisted of normal, non-infectious microflora. In the second manuscript, the NPDM researchers team presented results of a study to characterize the skin of Nile tilapia, based on their physical characteristics (tensile strength), histomorphological and typification of collagen composition. The microscopic characteristics of the tilapia skin were similar to the morphological structure of the human skin, with high resistance and extension to breaking traction, which supports its possible application as biomaterial. The third scientific publication evaluated the use of tilapia skin as an occlusive dressing for superficial and deep second-degree burns in rats to evaluate its *in vivo* use for the first time. The results showed that the tilapia skin showed good adherence in the wounds induced by burns in the rats, interfering positively in the cicatricial process. In addition, the absence of significantly altered values in laboratory tests signals the safety of skin use as a dressing. The results presented by the researchers enable the continuation of the research for human studies to confirm its safety and efficacy as a biological dressing. The published preclinical studies have demonstrated that tilapia skin has the necessary characteristics and properties to be used safely and effectively, confirming its potential as a biological occlusive dressing for the treatment of burn wounds in humans.

Keywords: Burns; Wounds and Injuries; Wound Healing; Biocompatible Materials; Nile Tilapia; *Oreochromis niloticus.*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
1.1. Tratamento de Queimaduras 12
1.1.1. Fisiopatologia da Queimadura 13
1.1.2. Curativos Oclusivos no Tratamento de Queimaduras 13
1.2. Pele de Tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) 20
2. OBJETIVOS 22
2.1. Objetivo Geral 22
2.2. Objetivos Específicos 22
3. REGISTRO DE PATENTES 23
3.1. Pedido de Patente no Brasil 23
3.2. Pedido de Patente Internacional 28
4. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS 32
4.1. Caracterização da Microbiota da Pele e Cavidade Oral Da Tilápia 32
4.2. Análise Histológica e de Propriedades Tensiométricas da Pele de Tilápia 47
4.3. Estudo Pré-Clínico *In Vivo.* 56
5. DISCUSSÃO 65
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 70
7. CONCLUSÃO 70

APRESENTAÇÃO

Na rede pública brasileira, o tratamento local de queimaduras é feito com a pomada sulfadiazina de prata, na grande maioria dos serviços de queimados. Na Europa, nos EEUU e alguns países da América do Sul este mesmo tratamento é realizado com pele humana (homóloga) ou animal (heteróloga). O Brasil jamais teve uma pele animal registrada na ANVISA e disponibilizada pelo SUS (Sistema Único de Saúde), para uso nos pacientes queimados. O Ministério da Saúde preconiza que o Brasil deveria ter 13 bancos de pele, entretanto existem três em funcionamento, em São Paulo, Rio Grande do Sul e Paraná, que não suprem 1% da necessidade de pele do país. Estamos atrasados 50 anos no tratamento local das queimaduras sem o uso de peles, num país onde 97% dos brasileiros que se queimam não têm plano de saúde.

Há seis anos (2011), o médico pernambucano, cirurgião plástico Marcelo Borges, ao ver uma matéria no Jornal do Commércio de Pernambuco, que revelou que a pele da Tilápia é sub-produto de descarte e apenas 1% é empregado no artesanato (confecção de bolsa e sapato), teve a idéia de utilizar esta pele no tratamento das queimaduras. No ano de 2014, Marcelo Borges compartilhou a idéia comigo, cirurgião plástico cearense Edmar Maciel, ocasião em que fui convidado para viabilizar e realizar este estudo no Ceará. O pesquisador Odorico Moraes, diretor presidente do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), na Universidade Federal do Ceará, entrou para o grupo com o desafio de pesquisar a pele da tilápia e desenvolver o produto.

O Instituto de Apoio ao Queimado (IAQ), ONG no Ceará que realiza gratuitamente a reabilitação física e psíquica de vítimas de queimaduras há 10 anos, fez um convênio de pesquisa com a Enel, em fevereiro de 2015, com término em junho de 2018, para financiar o projeto. Outros projetos de pesquisa já eram realizados com sucesso por estas duas instituições.

Nós, coordenadores da pesquisa, elaboramos um cronograma de estudos pré-clínicos e clínicos, em psiculturas, laboratório, animais e pacientes vítimas de queimaduras, para permitir a avaliação da segurança e da eficácia

da pele da Tilápia do Nilo, para desenvolvimento de um curativo biológico oclusivo, objetivando futuramente o registro da pele na ANVISA. Neste momento, a equipe que estuda a pele da Tilápia, nas mais diversas fases, é composta por 65 colaboradores. Todos os estudos são elaborados e executados com total embasamento científico, seguindo as recomendações éticas, boas práticas laboratoriais e clínicas necessárias para realização de estudos com animais e seres humanos, tendo aprovação prévia de seus respectivos comitês de ética.

Inicialmente, os pesquisadores foram conhecer a psicultura no açude Castanhão, em Jaguaribara, no Ceará, para entender sobre a criação da tilápia, que chegou ao Brasil em 1956. A Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), de onde são removidas as peles para este estudo, chegou pela primeira vez no Brasil em 1971, entrando pelo Ceará, difundindo-se para outros estados brasileiros e países vizinhos.

Os estudos pré-clínicos fazem parte do desenvolvimento de um fármaco ou, no caso, de um curativo biológico oclusivo para tratar queimaduras. Antes de experimentar o produto em seres humanos faz-se necessária a avaliação de sua segurança e eficácia em estudos *in vitro* e em animais, seguindo-se todas as normas éticas e de boas práticas laboratoriais. Desta forma, o produto somente poderá ser utilizados em seres humano após passar satisfatoriamente por esta etapa de estudos. Desta forma, por meio de estudos pré-clínicos, caracterizamos e avaliamos o uso da pele da tilápia, para que pudéssemos seguir com a investigação clínica.

Liderar e coordenar uma equipe multidisciplinar para o desenvolvimento desse produto foi, e ainda tem sido, o meu grande desafio. Tornar esse sonho realidade para os pesquisadores envolvidos e, especialmente, os pacientes que serão beneficiados é o nosso principal objetivo.

Assim, em breve, esperamos apresentar para o mercado mundial um produto inovador e genuinamente brasileiro, um curativo biológico oclusivo de pele do peixe Tilápia do Nilo, idealizado e desenvolvido em todas as fases por pesquisadores e instituições do Brasil, eficaz, seguro e de baixo custo, produzido a partir de um sub-produto que seria descartado.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tratamento de Queimaduras

A queimadura é uma lesão dos tecidos orgânicos, em decorrência de um trauma de origem térmica, que varia desde uma pequena bolha até formas graves, capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à extensão e à profundidade (GUIRRO, GUIRRO, 2004). São lesões que podem levar à desfiguração, à incapacidade e até à morte (LIMA JÚNIOR *et al*., 2008).

A grande maioria das queimaduras (95%) é considerada pequena, ou seja, superficial e não maior que 10% da superfície corporal, cujo atendimento é usualmente feito em ambulatórios (WARDEN, 1987; LIMA JÚNIOR *et al*., 2008). Os casos dramáticos, de extensas queimaduras, com alto risco de vida, embora sejam minoria estatística, ainda assim, representam a terceira causa de morte acidental em todas as faixas etárias e constituem, sem dúvida, uma das maiores catástrofes individuais que podem ocorrer a um ser humano. Por maiores que sejam os avanços tecnológicos, o tratamento de lesões extensas de espessura total é extremamente complexo, constituindo-se num grande desafio para a ciência.

No Brasil, o trauma contribui com 57% do total de mortalidade na faixa etária de 0 a 19 anos e corresponde a 38% dos principais agravos atendidos no sistema de saúde (DANILLA, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2015). Sabe-se que cerca de 1 milhão de casos de queimaduras ocorrem ao ano, dos quais 100 mil pacientes procurarão atendimento hospitalar e 2.500 irão a óbito em decorrência de suas lesões (GOMES *et al*., 2001). Estima-se uma taxa de mortalidade entre 0,86% a 34,4%, sendo que a maior parte ocorre por infecção e o período de internação é, em média, de 1 a 266 dias (PIRES, 2003). Segundo Linde (2002), o tempo necessário para a cura da queimadura é um dos principais determinantes para o desenvolvimento de complicações.

Várias são as maneiras de classificar as queimaduras, sendo todas muito importantes para o diagnóstico, para as condutas clínicas e cirúrgicas a serem adotadas e para o prognóstico do paciente. A classificação das

queimaduras, quanto à profundidade, pode ser: primeiro grau - geralmente causada pelo sol, atinge a epiderme, é pouco dolorosa, apresenta vermelhidão na pele e o quadro normaliza-se com 07 dias, com banhos diários com sabão antisséptico e o uso de hidratantes; segundo grau - destruição da epiderme e parte da derme, podendo ser divididas em superficiais e profundas: as superficiais, são bastante dolorosas e avermelhadas, formam bolhas e necessitam de 10 a 12 dias para sua completa cicatrização; as profundas, são esbranquiçadas, pouco dolorosas e levam até três semanas ou mais para a epitelização; terceiro grau - destruição total da pele, atingindo os anexos cutâneos e, em alguns casos, as camadas mais profundas como tecido celular subcutâneo, músculos, tendões, vasos e ossos (PICCOLO *et al*., 2008).

As queimaduras são consideradas feridas infectadas por estarem, frequentemente, contaminadas com sujidades do local de ocorrência da injúria, pela presença de colonização imediata por microorganismos e pela rápida proliferação em decorrência da grande quantidade de tecido desvitalizado (JOHSON, RICHARD, 2003), requerendo técnicas meticulosas de limpeza das feridas e desbridamento de tecidos não viáveis e demais condições, que propiciem um ambiente ideal para a reparação tecidual (FERREIRA *et al*., 2010).

Portanto, em muitos casos, há a necessidade de intervenções através de curativos, para que o processo de reparação tecidual prossiga sem complicações, que possam retardá-lo, assim como, manter a perfusão tecidual adequada e a integridade da pele em áreas não queimadas (LEE *et al*., 1989).

1.1.1. Fisiopatologia da Queimadura

Com o intuito de “corrigir” a ferida provocada pela queimadura, o organismo utiliza-se de um complexo mecanismo denominado cicatrização, que envolve quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de matriz proteica extracelular e remodelação, processo que pode se prolongar até dois anos após a agressão (BIONDO-SIMÕES, 1998) A cicatriz será sempre um substituto imperfeito do tecido original dos pontos de vista mecânico, nutricional e estético.

As feridas decorrentes de queimaduras caracterizam-se como uma solução de continuidade produzida em um tecido, dando lugar a um espaço anormal, à interrupção do fluxo sanguíneo, à perturbação da sensibilidade, ao acúmulo de elementos celulares mortos e a um grau maior ou menor de contaminação, com ou sem infecção (BOLGIANI *et al*., 2013). Uma vez estabelecido o dano tecidual, o organismo desencadeia uma complexa sequência de eventos, na tentativa de restaurar morfo-fisiologicamente o mesmo. Inicia-se um processo inflamatório agudo induzido pela própria lesão, seguido da regeneração das células parenquimatosas, migração e proliferação de tecido conectivo, síntese protéica, colagenização, aquisição de força tensil e remodelação do tecido conjuntivo. Partindo desses eventos, Orgill, Demling (1988) dividem o processo fisiológico de reparação tecidual em cinco fases: inflamatória, de proliferação celular, de formação de tecido conjuntivo, de contração da ferida e de remodelação, completando a divisão preconizada por Carrel (1910).

A inflamação pode ser dividida em três fases: a inflamação aguda, a resposta imune e a inflamação crônica. A inflamação aguda é referida como resposta inicial à lesão tecidual, sendo mediada pela liberação de autacóides como histamina, bradicinina, prostaglandinas e, normalmente, precede o desenvolvimento da resposta imune. A resposta imune surge quando as células imunologicamente competentes são ativadas em resposta a organismos estranhos ou a substâncias antigênicas, liberadas no decorrer da resposta inflamatória aguda ou crônica. Este resultado pode ser benéfico para o hospedeiro, quando permite que os microrganismos invasores sejam fagocitados ou neutralizados. Ou pode ser deletério, se resultar em inflamação crônica, sem resolução do processo subjacente. A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores, que não são proeminentes na resposta aguda (BOLGIANI, SERRA, 2013).

Sendo assim, o trauma desencadeia um processo hemorrágico que, inicialmente, induz vasoconstricção local. A liberação de numerosos mediadores vasoativos e quimiotáticos resulta na ativação da cascata da coagulação e do complemento. Segue-se uma vasodilatação mediada pelas prostaglandinas, pela bradicinina e pela histamina, que aumentam a

permeabilidade vascular através das células endoteliais, permitindo o afluxo de fluidos e de macromoléculas para o interstício. Neutrófilos, guiados por estímulos quimiotáticos, atravessam a parede dos vasos por diapedese e migram para o interior da lesão, fagocitando microrganismos e tecidos desvitalizados (KUMAR *et al*., 2013). Linfócitos chegam, em seguida, liberando linfocinas, que medeiam a atividade dos fibroblastos e dos anticorpos, que atuam no controle de infecções (FISHEL *et al*., 1987). Após cinco horas da injúria, atraídos pelos produtos da degradação da fibrina, dos macrófagos teciduais e dos monócitos circulantes (que se diferenciam em macrófagos) dominam o processo inflamatório, matando bactérias, liberando mediadores vasoativos e ativando “fatores de crescimento”, que ativam o processo de cicatrização (DIEGELMANN *et al*., 1987).

A fase de proliferação celular envolve a angiogênese, a proliferação fibroblástica e a epitelização. A cicatrização só ocorre quando o fluxo sanguíneo é restaurado. A queda da tensão de O_2 e o acúmulo de ácido láctico na lesão induzem a liberação de fatores angiogênicos, que passam a atrair células endoteliais (BANDA *et al*., 1982). Estas formam brotos de células, que produzem plasminogênio e colagenases que, por sua vez, permitem a invasão de tecidos pobremente vascularizados. Esses brotos formam malhas teciduais, que se fundem umas com as outras, construindo um novo leito capilar, que se une aos adjacentes, revascularizando o tecido ferido. Esta densa trama de novos vasos, junto aos fibroblastos e a matriz colágena, recebe a denominação de tecido de granulação. Fibras de colágeno remanescentes e as malhas de fibrina formadas durante a coagulação permitem a migração de fibroblastos para o interior da lesão que, contando com o suprimento de O_2 possibilitado pela neovascularização, iniciam sua proliferação (KNIGHTON *et al*., 1981).

As células epidérmicas normais não são móveis, entretanto alterações fenotípicas induzidas por diversos fatores (TGF-β, IGF-1, TNF-α, entre outros) permitem sua movimentação por lameloploidia (CROMACK *et al*., 1990). Dependendo do tamanho do ferimento, das células basais remanescentes, do suprimento sanguíneo e das condições gerais do organismo, o tempo de epitelização da lesão pode demorar de poucos dias até meses.

A hipóxia tecidual e o aumento local de lactato estimulam a produção de colágeno pelos fibroblastos levando à formação de tecido conjuntivo. Macrófagos e plaquetas também participam do processo através da liberação de quimiocinas (BURR *et al*, 1938). A concentração do colágeno na área de cicatrização atinge níveis próximos do normal entre o sétimo e o décimo dia. Já a matriz intersticial, produzida pelos fibroblastos e outras células mesenquimais, promove uma distribuição homogênea e uma perfeita tensão das fibras colágenas.

No final da primeira semana pós-injúria, e durante a semana seguinte, ocorre a contração da ferida, quando miofibroblastos promovem a aproximação das bordas da lesão, diminuindo-a.

Em torno da terceira semana após o trauma, inicia-se um processo de maturação da cicatriz, com remodelação da ferida. A colagenase participa do processo metabolizando o excesso de colágeno acumulado. A demanda metabólica é diminuída pela regressão da intensa trama capilar. Parte da matriz é desprezada pela perda de água da ferida. Dependendo do local e das estruturas lesadas, este processo pode persistir por meses ou até por anos (KUMAR *et al*., 2013).

Inúmeros fatores, sistêmicos e locais, podem interferir no processo de reparação tecidual. Um bom fluxo sanguíneo é exigência para uma cicatrização efetiva. Apesar do gradiente de hipóxia ser essencial para alguns eventos da cicatrização, as fases inflamatória e de síntese do colágeno são dependentes de uma perfusão adequada. Infecções causam atraso na regeneração tecidual (LUNDGREN, ZEDERFELDT, 1969). A invasão de bactérias leva à destruição tecidual e à manutenção da resposta inflamatória. A desnutrição pode retardar a realização das etapas de reparo, pela não disponibilidade de substratos para o mesmo. Além destes, condições como a corticoterapia, que estabelece um estado sistêmico de inibição da inflamação e das respostas imunológicas, e o diabetes, pelo retardo da função dos neutrófilos e o aumento no risco de infecções, comprometem a cicatrização (KUMAR *et al*., 2013).

1.1.2. Curativos Oclusivos no Tratamento de Queimaduras

Inúmeros estudos têm sido realizados procurando encontrar curativos que reduzam os efeitos da contaminação nas lesões, favoreçam o processo cicatricial e ofereçam melhores resultados estéticos. Esses curativos podem ser oclusivos ou abertos. Os abertos são caracterizados pela colocação de uma cobertura primária ou apenas pela aplicação do agente tópico, que são substâncias utilizadas na superfície da pele, com ação antimicrobiana ou não (WARD, SAFLLE, 1995). As coberturas, materiais ou produtos utilizados para tratar ou ocluir a ferida, impregnados ou não com agentes tópicos, podem ser primárias, quando colocadas diretamente sobre a lesão, ou secundárias, quando têm como função cobrir as coberturas primárias (GOMES, BORGES, 2001).

Os curativos oclusivos se caracterizam pela aplicação de uma cobertura primária, seguida por outra secundária. Esse tipo de curativo tem como vantagem permitir a mobilização do paciente. O método aberto é mais utilizado em pacientes críticos, com mobilidade limitada e em locais de difícil oclusão, como a face, a orelha e a genitália. Apresenta como vantagem, dependendo do tipo de cobertura, a possibilidade de visualização da área queimada, facilidade na mobilização de articulações, baixo custo e simplicidade na aplicação. Em relação às desvantagens, apresenta grande risco de levar o paciente à hipotermia, sobretudo em grandes queimados, requerendo maior temperatura externa, necessidade de diversas aplicações diárias e dificuldade de manipulação do paciente (RAGONHA, 2005). O curativo oclusivo tem como vantagem diminuir a perda de calor e de fluidos por evaporação pela superfície da ferida, além de auxiliar no desbridamento e na absorção do exsudato presente, sobretudo na fase inflamatória da cicatrização. Entretanto, pode proporcionar redução da mobilidade de articulações e limitar o acesso à ferida, somente durante o período de troca de curativos (KAVANAGH, 2004).

Nos curativos oclusivos podem ser utilizados substitutos temporários de pele, que são materiais eficazes no tratamento de queimaduras superficiais recentes e também na cobertura da pele, enquanto aguarda-se o enxerto definitivo. Podem ser trocados a intervalos regulares ou mantidos até a cicatrização ou enxerto, caso a aderência seja boa ou não haja infecção

(GOMES *et al*., 1995). Considera-se que há três linhas de substitutos temporários de pele (PEIXOTO, SANTOS, 1988):

- Substitutos homólogos: pele humana, conseguida através dos bancos de pele;
- Substitutos heterólogos: pele de animais, como pele de porco, pele de rã, pele de cão;
- Substitutos sintéticos: elaborados à base de substâncias sintéticas, tais como silicone, poliuretano e hydrom.

Podem ainda ser classificados em substitutos biológicos, que constituem os aloenxertos (homoenxertos), xenoenxertos (heteroenxertos) e a membrana amniótica; substitutos sintéticos, que são constituídos por membranas de polímero de silicone, membranas de cloreto de polivinil, metilmetacrilato, membrana de polipropileno com poliuretano, membrana de silicone com nylon ligado a peptídios de colágeno dérmico e membrana impermeável com camada profunda de partículas de hidroativos, agregados em polímero inerte; substitutos biossintéticos, que incluem a película microfibrilar de celulose pura e a membrana de silicone, com matriz dérmica de colágeno e glicosaminaglicanos (WARD, SAFLLE, 1995; SERRANO, 2013).

Alguns substitutos temporários de pele disponíveis, como por exemplo, Opsite® e Tegaderm®, são constituídos por filmes de poliuretano, por membrana de cloreto de polivinil, pelos filmes de cloreto de polivinil, que conferem ao material maior elasticidade e permeabilidade ao vapor de água, sendo que estes filmes aderem à pele e não à ferida. Há ainda outros produtos, como por exemplo o Epigard®, constituído pela membrana de polipropileno com poliuretano, um material de dupla constituição, que contém um filme de polipropileno microporoso na superfície, laminado a uma camada profunda de espuma de poliuretano; o Biobrane®, que é constituído pela membrana de silicone com nylon ligado a peptídeo do colágeno dérmico, material semipermeável, tem boa aderência e flexibilidade e alivia a dor em 90% dos pacientes; o Duoderm®, que é constituído por partículas hidroativas agregadas em polímero inerte e funciona como um curativo hidroativo, constituído por duas camadas, uma externa impermeável à água e uma interna formada por

partículas hidroativas agregadas a um polímero inerte. Esse tipo de cobertura adere à pele normal e as partículas protegem o leito cruento. O exsudato liberado pelo ferimento interage com as partículas hidroativas, formando um gel úmido, que facilita a migração de células epiteliais, estimulando a cicatrização (GOMES *et al*, 1995; LIMA JÚNIOR *et al*., 2008).

Os substitutos de pele têm sido considerados úteis no tratamento de queimaduras superficiais, pois reduzem a frequência de troca do curativo (HANSBROUGH, 1991). Entretanto, esses materiais têm alto custo e não são eficazes para o tratamento de queimaduras profundas. Em um estudo realizado com pacientes ambulatoriais, com queimaduras de segundo grau, constatou-se que o Duoderm® apresentou melhores resultados que a Sulfadiazina de Prata a 1%, pois os pacientes apresentaram menor limitação de atividade, re-pigmentação mais rápida, referiram melhora da dor, melhor cicatrização da ferida e menor necessidade de troca de curativo, com menor custo (WYATT, MCGOWAN, 1990).

Devido aos custos elevados dos curativos oclusivos sintéticos ou bio-sintéticos, tem-se buscado nos materiais biológicos, alternativas para o tratamento local de feridas provocadas por queimaduras (CHANDA *et al*., 1994).

Por outro lado, diversos materiais de origem biológica vêm sendo empregados como curativo oclusivo, por possuírem propriedades antibacteriana e analgésica, acelerarem a formação de tecido de granulação e a epitelização, propiciarem barreira à invasão bacteriana, assim como promoverem retenção do exsudato, características admitidas como benéficas para a cicatrização (PREVEL *et al*., 1995; SAI *et al*., 1995).

Tecidos biológicos de origem animal, como membrana amniótica humana e equina (CHANDA *et al*., 1994; BYGBIE *et al*., 1991; GANATRA, DURRANI, 1996; RAMSEY *et al*., 1995; SUBRAHMANYAM, 1995; TAYYAR, 1993; ZACHARIOU, 1997), pele de cadáver humano (ESCUDERO *et al*, 1997; RICHTERS *et al*., 1997; VAN BAARE *et al*., 1998), pele de cão (WAI, 1994), pele de cobaia (SILVA, MACIEL JUNIOR, 1988), pele de porco (RAMSEY, 1995), placenta humana (SUBRAHMANYAM, 1995), pericárdio bovino (JIA *et al*., 1995; CHEM *et al*. 1992; DAHAM, *et al*. 1990), equino (BELLENZANI *et al*.,

1998), membrana de queratinócitos humanos autólogos cultivados, (SOEDA *et al*., 1993) pele de anfíbio (RODRIGUES, MEDEIROS, 1998; PICCOLO *et al*., 2008) e camada submucosa de intestino delgado de porco (PREVEL *et al*., 1995) também já foram estudados.

Há muitos produtos no mercado destinados ao tratamento de feridas em suas diferentes fases. Entretanto, a utilização de qualquer produto no tratamento de queimaduras ou outros tipos de feridas deve seguir rigoroso protocolo, buscando identificar a real contribuição para o processo de cicatrização (PICCOLO *et al*., 2008).

1.2. 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 Jaguaretama, 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. Atualmente, menos de 1% desse material é aproveitado no artesanato. Portanto, a pele de tilápia é considerada economicamente de pouca rentabilidade e, consequentemente, 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 (FRANCO *et al*., 2013). Desta forma, existe uma real possibilidade de que a pele de tilápia possa vir a ser utilizada como curativo oclusivo biológico no tratamento de queimaduras.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliação Pré-clínica da pele da tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras.

2.2. Objetivos Específicos

- Mensurar a resistência da pele da tilápia à tração, comparando com a pele humana;
- Demonstrar a composição microscópica da pele da tilápia, comparando com a pele humana;
- Caracterizar a microbiota da pele e da cavidade oral da tilápia;
- Avaliar os efeitos do uso da pele da tilápia, como curativo biológico oclusivo, nas queimaduras de segundo grau em ratos;
- Registro de patentes nacional e internacional para assegurar a propriedade das técnicas de produção do curativo oclusivo de pele de tilápia.

3. REGISTRO DE PATENTES

3.1. Pedido de Patente no Brasil

Protocolo de pedido de depósito no INPI: BR 10 2015 021435 9.

INPI
03/09/2015 020150014713 11:59 NPR.
BR 10 2015 021435 9

Espaço reservado para o protocolo | Espaço reservado para a etiqueta | Espaço reservado para o código QR

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-FQ006	

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: COMPANHIA ENERGÉTICA DO CEARÁ - COELCE

1.2 Qualificação: EMPRESA PRIVADA

1.3 CNPJ/CPF: 07.047.251/0001-70

1.4 Endereço Completo: RUA PADRE VALDEVINO, 150, CENTRO, FORTALEZA, CE

1.5 CEP: 60135-000

1.6 Telefone: 21 2709 0513 1.7 Fax: 21 3553-3990

1.8 E-mail: jgu564190@gmail.com

☒ continua em folha anexa

2. **Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

PROCESSO DE BENEFICIAMENTO DA PELE DA TILÁPIA E SEU USO NA COBERTURA DE LESÕES CUTÂNEAS

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº Data do Depósito:

5. **Prioridade:** ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ005	

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: EDMAR MACIEL LIMA JÚNIOR

6.2 Qualificação: MÉDICO

6.3 CPF: 109.777.083-49

6.4 Endereço Completo: RUA VISCONDE DE MAUÁ, 1656 AP.801, FORTALEZA, CE

6.5 CEP: 60.125 160

6.6 Telefone: 21 2703-0613 6.7 FAX: 21 3553-3990

6.8 E-mail: jgm64196@gmail.com

☒ continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial. ☐
Artigo 12 da LPI – período de graça
Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

☐ Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome: JOUBERT GONÇALVES DE CASTRO

9.2 CNPJ/CPF: 244.897.687-68 9.3 APIOAB: 663

9.4 Endereço Completo: PRAIA DE ICARAI, 237/1301 BL.B, NITEROI, RJ

9.5 CEP: 24230-003

9.6 Telefone: 21 2703-0613 9.7 FAX: 21 3553-3990

9.8 E-mail: jgc64196@gmail.com

☐ continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.
Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver. ☐

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
Título do Documento: **Depósito de Pedido de Patente**		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

		Documentos Anexados	folhas
☒	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
☒	11.2	Procuração.	4
☐	11.3	Documentos de Prioridade.	
☐	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
☒	11.5	Relatório descritivo.	4
☒	11.6	Reivindicações.	2
☐	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº. _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	
☒	11.8	Resumo.	1
☐	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
☐	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
☐	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
☐	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
☐	11.13	Outros (especificar)	

12. Total de folhas anexadas: 12 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

RIO DE JANEIRO, 3 DE SETEMBRO DE 2015
Local e Data

Assinatura e Carimbo
JOUBERT GONÇALVES DE CASTRO
AP1056.3 INPI

CONTINUAÇÃO DO QUADRO 1

DEPOSITANTES :

1- COMPANHIA ENERGÉTICA DO CEARÁ - COELCE, distribuidora de energia elétrica, com sede capital na Rua Padre Valdevino, 150, Centro, Fortaleza, CE, CNPJ/MF: 07.047.251/0001.70, CEP : 60135-005;

2- Edmar Maciel Lima Júnior, brasileiro, casado, médico, portador do RG: 2007932269-1, inscrito no CPF/MF:109.777.083-49, residente na Rua Visconde de Mauá, 1650 apto 801, Fortaleza, CE, CEP: 60.125-160;

3- Manoel Odorico de Moraes Filho, brasileiro, médico, portador do RG:357360, inscrito no CPF/MF:048.545.433-53, residente na Rua República do Líbano, 881/500, Fortaleza, CE, CEP: 60.160-140;

4- Marcelo José Borges de Miranda, brasileiro, divorciado, médico, portador do RG: 580968, inscrito no CPF/MF:220.127.374-04, residente na Avenida Boa Viagem, 3296 apto 102, Recife, PE, CEP: 51.020-001.

CONTINUAÇÃO DO QUADRO 5

INVENTORES:

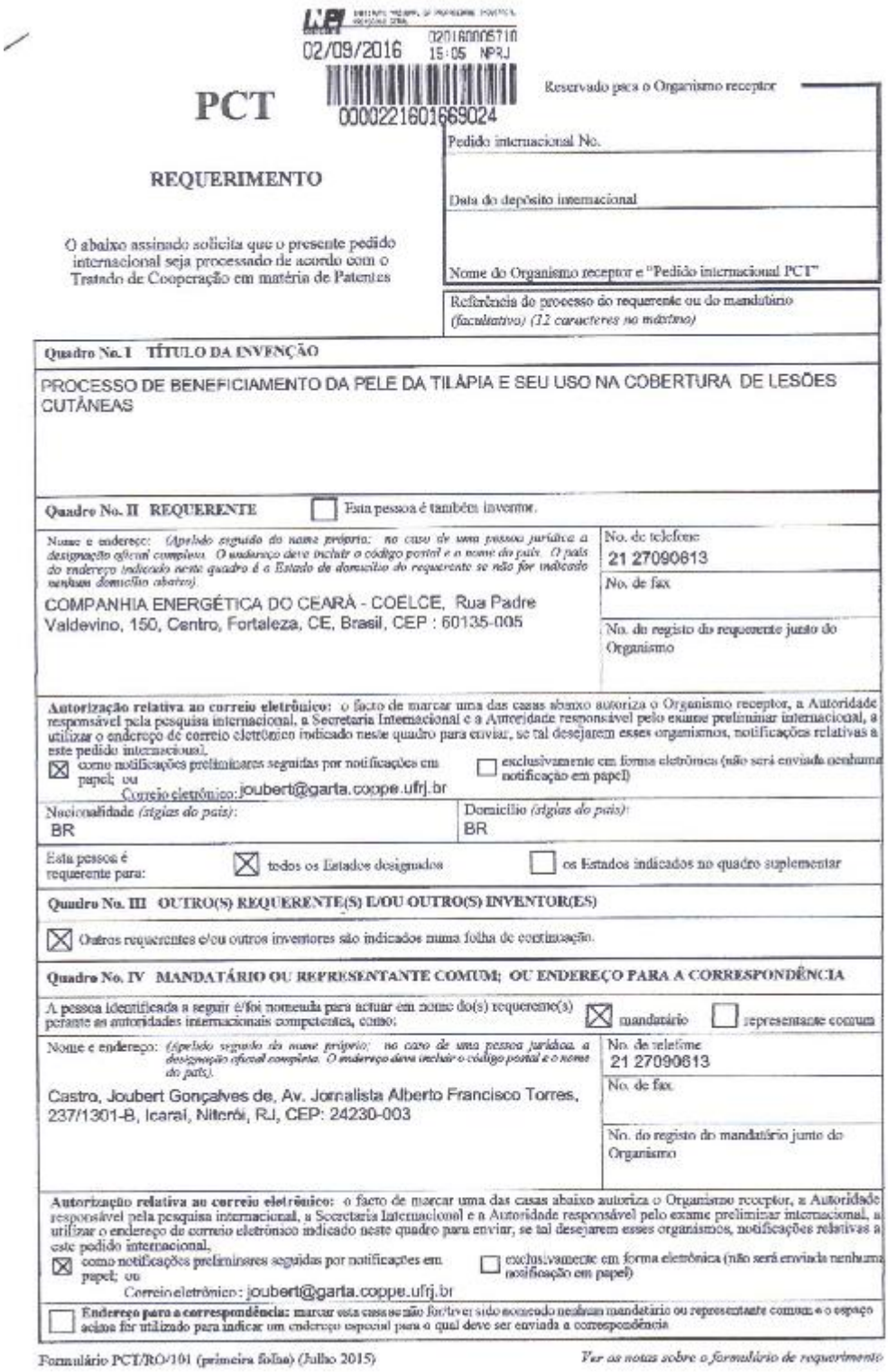
1- Edmar Maciel Lima Júnior, brasileiro, casado, médico, portador do RG: 2007932269-1, inscrito no CPF/MF:109.777.083-49, residente na Rua Visconde de Mauá, 1650 apto 801, Fortaleza, CE, CEP: 60.125-160;

2- Manoel Odorico de Moraes Filho, brasileiro, médico, portador do RG:357360, inscrito no CPF/MF:048.545.433-53, residente na Rua República do Líbano, 881/500, Fortaleza, CE, CEP: 60.160-140;

3- Marcelo José Borges de Miranda, brasileiro, divorciado, médico, portador do RG: 580968, inscrito no CPF/MF:220.127.374-04, residente na Avenida Boa Viagem, 3296 apto 102, Recife, PE, CEP: 51.020-001.

3.2. Pedido de Patente Internacional

Protocolo de pedido de depósito: 0000221601669024.



02/09/2016 15:05 NPRJ

0000221601669024

PCT

Reservado para o Organismo receptor

REQUERIMENTO

O abaixo assinado solicita que o presente pedido internacional seja processado de acordo com o Tratado de Cooperação em matéria de Patentes

Pedido internacional No.

Data do depósito internacional

Nome do Organismo receptor e "Pedido internacional PCT"

Referência do processo do requerente ou do mandatário *(facultativo) (12 caracteres no máximo)*

Quadro No. I TÍTULO DA INVENÇÃO

PROCESSO DE BENEFICIAMENTO DA PELE DA TILÁPIA E SEU USO NA COBERTURA DE LESÕES CUTÂNEAS

Quadro No. II REQUERENTE ☐ Esta pessoa é também inventor.

Nome e endereço: *(Aplicável seguido do nome próprio: no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado do domicílio do requerente se não for indicado nenhum domicílio abaixo).*

COMPANHIA ENERGÉTICA DO CEARÁ - COELCE, Rua Padre Valdevino, 150, Centro, Fortaleza, CE, Brasil, CEP : 60135-005

No. de telefone: 21 27090613

No. de fax:

No. do registo do requerente junto do Organismo

Autorização relativa ao correio eletrônico: o facto de marcar uma das casas abaixo autoriza o Organismo receptor, a Autoridade responsável pela pesquisa internacional, a Secretaria Internacional e a Autoridade responsável pelo exame preliminar internacional, a utilizar o endereço de correio eletrônico indicado neste quadro para enviar, se tal desejarem esses organismos, notificações relativas a este pedido internacional.

☒ como notificações preliminares seguidas por notificações em papel; ou ☐ exclusivamente em forma eletrônica (não será enviada nenhuma notificação em papel)

Correio eletrônico: joubert@garta.coppe.ufrj.br

Nacionalidade *(siglas do país)*: BR

Domicílio *(siglas do país)*: BR

Este pessoa é requerente para: ☒ todos os Estados designados ☐ os Estados indicados no quadro suplementar

Quadro No. III OUTRO(S) REQUERENTE(S) E/OU OUTRO(S) INVENTOR(ES)

☒ Outros requerentes e/ou outros inventores são indicados numa folha de continuação.

Quadro No. IV MANDATÁRIO OU REPRESENTANTE COMUM; OU ENDEREÇO PARA A CORRESPONDÊNCIA

A pessoa identificada a seguir é/foi nomeada para actuar em nome do(s) requerente(s) perante as autoridades internacionais competentes, como: ☒ mandatário ☐ representante comum

Nome e endereço: *(Aplicável seguido do nome próprio: no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país).*

Castro, Joubert Gonçalves de, Av. Jornalista Alberto Francisco Torres, 237/1301-B, Icaraí, Niterói, RJ, CEP: 24230-003

No. de telefone: 21 27090613

No. de fax:

No. do registo do mandatário junto do Organismo

Autorização relativa ao correio eletrônico: o facto de marcar uma das casas abaixo autoriza o Organismo receptor, a Autoridade responsável pela pesquisa internacional, a Secretaria Internacional e a Autoridade responsável pelo exame preliminar internacional, a utilizar o endereço de correio eletrônico indicado neste quadro para enviar, se tal desejarem esses organismos, notificações relativas a este pedido internacional.

☒ como notificações preliminares seguidas por notificações em papel; ou ☐ exclusivamente em forma eletrônica (não será enviada nenhuma notificação em papel)

Correio eletrônico: joubert@garta.coppe.ufrj.br

☐ **Endereço para a correspondência:** marcar esta casa se não for/tiver sido escolhido nenhum mandatário ou representante comum e o espaço acima for utilizado para indicar um endereço especial para o qual deve ser enviada a correspondência

Formulário PCT/RO/101 (primeira folha) (Julho 2015) *Ver as notas sobre o formulário de requerimento*

Folha No. .....

Quadro No. III OUTRO(S) REQUERENTE(S) E/OU OUTRO(S) INVENTOR(ES)

Se não for utilizado nenhum dos seguintes sub-quadros, esta folha não deve ser incluída no requerimento.

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado do domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).

2- Edmar Maciel Lima Júnior, residente na Rua Visconde de Mauá, 1650 apto 801, Fortaleza, CE, Brasil, CEP: 60.125-160;

Esta pessoa é:
- ☐ apenas requerente
- ☒ requerente e inventor
- ☐ apenas inventor *(se esta caixa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registo do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país)*: BR

Domicílio *(siglas do país)*: BR

Esta pessoa é requerente para: ☒ todos os Estados designados ☐ os Estados indicados no quadro suplementar

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado do domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).

Manoel Odorico de Moraes Filho, residente na Rua República do Líbano, 881/500, Fortaleza, CE, Brasil, CEP: 60.160-140;

Esta pessoa é:
- ☐ apenas requerente
- ☒ requerente e inventor
- ☐ apenas inventor *(se esta caixa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registo do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país)*: BR

Domicílio *(siglas do país)*: BR

Esta pessoa é requerente para: ☒ todos os Estados designados ☐ os Estados indicados no quadro suplementar

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).

Marcelo José Borges de Miranda, residente na Avenida Boa Viagem, 3296 apto 102, Recife, PE, Brasil, CEP: 51.020-001.

Esta pessoa é:
- ☐ apenas requerente
- ☒ requerente e inventor
- ☐ apenas inventor *(se esta caixa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registo do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país)*: BR

Domicílio *(siglas do país)*: BR

Esta pessoa é requerente para: ☒ todos os Estados designados ☐ os Estados indicados no quadro suplementar

Nome e endereço: (Apelido seguido do nome próprio; no caso de uma pessoa jurídica a designação oficial completa. O endereço deve incluir o código postal e o nome do país. O país do endereço indicado neste quadro é o Estado de domicílio do requerente se nenhum domicílio for indicado abaixo).

Nelson Sario Piccolo, residente na Rua Cinco, 439, Goiânia, Goiás, Brasil, CEP: 74.115-060.

Esta pessoa é:
- ☐ apenas requerente
- ☒ requerente e inventor
- ☐ apenas inventor *(se esta caixa for marcada, não preencher o seguinte espaço).*

No. do registo do requerente junto do Organismo

Nacionalidade *(siglas do país)*: BR

Domicílio *(siglas do país)*: BR

Esta pessoa é requerente para: ☒ todos os Estados designados ☐ os Estados indicados no quadro suplementar

☐ Outros requerentes e/ou outros inventores são indicados numa folha de continuação.

Folha No. .....

Quadro No. V DESIGNAÇÕES

O depósito deste requerimento **constitui, de acordo com a Regra 4.9.a), a designação** de todos os Estados Contratantes vinculados pelo PCT na data do depósito internacional, para os fins da concessão de qualquer tipo de protecção disponível e, se for caso disso, para os fins da concessão tanto de patentes regionais como de patentes nacionais.

Porém,

☐ DE a Alemanha **não é designada** para nenhum tipo de protecção nacional

☐ JP o Japão **não é designado** para nenhum tipo de protecção nacional

☐ KR a República da Coreia **não é designada** para nenhum tipo de protecção nacional

(As casas acima só podem ser utilizadas para excluir (irrevogavelmente) as designações em questão se, no momento do depósito, ou ulteriormente de acordo com a Regra 26bis.1, o pedido internacional reivindicar, no Quadro No. VI, a prioridade de um pedido nacional anterior depositado no Estado em questão, para evitar que esse pedido nacional anterior deixe de produzir efeitos, em virtude da legislação nacional).

Quadro No. VI REIVINDICAÇÃO E DOCUMENTO DE PRIORIDADE

A prioridade do(s) seguinte(s) pedidos anterior(es) é reivindicada:

Data do depósito do pedido anterior (dia/mês/ano)	Número do pedido anterior	No caso de o pedido anterior ser: um pedido nacional: país ou membro da OMC	um pedido regional: Organismo regional	um pedido internacional: Organismo receptor
Ponto 1) 03/09/2015	BR102015021435-9			
Ponto 2)				
Ponto 3)				

☐ Outras reivindicações de prioridade são indicadas no quadro suplementar.

Fornecimento do(s) documento(s) de prioridade:

☐ Pede-se que o **Organismo receptor** prepare e transmita à Secretaria Internacional uma cópia certificada do(s) pedido(s) anterior(es) *(se o(s) pedido(s) anterior(es) tiver(em) sido depositado(s) junto ao Organismo receptor que, para os fins deste pedido internacional, é o Organismo receptor)* identificado(s) acima como:

☐ todos os pontos ☐ ponto 1) ☐ ponto 2) ☐ ponto 3) ☐ outros, ver o quadro suplementar

☐ Pede-se que a **Secretaria Internacional** obtenha a partir de uma biblioteca digital uma cópia certificada do(s) pedido(s) anterior(es) identificado(s) acima, utilizando, se for caso disso, o(s) código(s) de acesso indicado(s) abaixo *(se a Secretaria Internacional puder obter o(s) pedido(s) anterior(es) a partir de uma biblioteca digital)*:

☐ ponto 1) código de acesso ☐ ponto 2) código de acesso ☐ ponto 3) código de acesso ☐ outros, ver o quadro suplementar

Restaurar o direito de prioridade: pede-se que o Organismo receptor restaure o direito de prioridade a respeito do(s) pedido(s) anterior(es) identificado(s) acima ou no quadro suplementar como ponto(s): ( ). *(Ver também as notas sobre Quadro No. VI; é necessário fornecer mais informações para apoiar um pedido de restauração do direito de prioridade).*

Incorporação por referência: se um elemento do pedido internacional mencionado no Artigo 11.1)iii)d) ou e), ou uma parte da descrição, das reivindicações ou dos desenhos mencionada na Regra 20.5.a), não estiver de outro modo contido neste pedido internacional mas figurar integralmente num pedido anterior cuja prioridade é reivindicada na data em que um ou mais elementos mencionados no Artigo 11.1)iii) foram recebidos inicialmente pelo Organismo receptor, esse elemento ou essa parte é, sob reserva da confirmação prevista na Regra 20.6, incorporado por referência neste pedido internacional, para os efeitos da Regra 20.6.

Quadro No. VII AUTORIDADE RESPONSÁVEL PELA PESQUISA INTERNACIONAL

Escolha da Autoridade responsável pela pesquisa internacional (ISA) *(se duas ou mais Autoridades responsáveis pela pesquisa internacional forem competentes para efectuar a pesquisa internacional, indicar a Autoridade escolhida; o código de duas letras pode ser utilizado)*:

ISA / INPI - BR

Folha No. .....

Quadro No. IX LISTA DE CONTROLE para depósitos feitos em PAPEL – esta folha só deve ser utilizada quando o depósito de um pedido internacional for feito em **PAPEL**

Este pedido internacional **contém o seguinte:**	Número de folhas
a) formulário de requerimento PCT/RO/101 (incluindo quaisquer declarações e folhas suplementares) ..... :	4
b) descrição (excluindo qualquer parte da listagem de sequências da descrição, ver f) abaixo) ..... :	4
c) reivindicações ..... :	2
d) resumo ..... :	1
e) desenhos (se for caso disso) ..... :	
f) parte da listagem de sequências da descrição (se for caso disso) ..... :	
Número total de folhas :	11

Este pedido internacional é **acompanhado** pelo(s) seguinte(s) documento(s) *(marcar as casas apropriadas e indicar na coluna da direita o número de cada documento)*	Número de documentos
1. ☐ folha de cálculo das taxas ..... :	
2. ☐ procuração separada original ..... :	
3. ☒ procuração geral original ..... :	2
4. ☐ cópia da procuração geral; número de referência : .... :	
5. ☐ documento(s) de prioridade indicado(s) no Quadro No. VI no(s) ponto(s): ..... :	
6. ☐ tradução do pedido internacional em *(língua)*: ..... :	
7. ☐ indicações separadas relativas a microrganismos depositados ou a outro material biológico ..... :	
8. ☐ *(somente quando o item (f) estiver marcado na coluna esquerda)* cópia da listagem de sequências em forma eletrônica (ficheiro texto segundo o Anexo C/ST.25) em suporte(s) físico(s) de dados, não fazendo parte do pedido internacional, **fornecida apenas para os fins da pesquisa internacional** de acordo com a Regra 13*ter* (tipo e número de suportes físicos de dados) .... :	
9. ☐ *(somente quando o item (f) (na coluna esquerda) e o item 8 (acima) estiverem marcados)* uma declaração confirmando que "as informações em forma eletrônica submetidas de acordo com a Regra 13*ter* são idênticas à listagem de sequências contida no pedido internacional" depositado em papel ..... :	
10. ☐ cópia dos resultados de pesquisa(s) anterior(es) (Regra 12*bis*.1.a)) ..... :	
11. ☐ outros documentos *(especificar)*: ..... :	

Figura dos desenhos que deve acompanhar o resumo:	**Língua do depósito** do pedido internacional: Português

Quadro No. IX ASSINATURA DO REQUERENTE, DO MANDATÁRIO OU DO REPRESENTANTE COMUM
Junto a cada assinatura, indicar o nome e a qualidade de quem assina (se sua qualidade não for evidente para quem lê o requerimento).

Joubert Gonçalves de Castro

Reservado apenas para o Organismo receptor

1. Data efectiva de recepção do alegado pedido internacional:	2. Desenhos: ☐ recebidos: ☐ não recebidos:
3. Data efectiva de recepção, corrigido devido à recepção ulterior, mas dentro do prazo, de documentos ou desenhos que completam o alegado pedido internacional:	
4. Data da recepção, dentro do prazo, das correcções exigidas de acordo com o Artigo 11.2) do PCT:	
5. Autoridade responsável pela pesquisa internacional (se duas ou mais forem competentes): ISA /	6. ☐ Transmissão da cópia de pesquisa diferida até ao pagamento da taxa de pesquisa.

Reservado para a Secretaria Internacional

Data da recepção da via original pela Secretaria Internacional:

4. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS

4.1. Caracterização da Microbiota da Pele e Cavidade Oral Da Tilápia

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: 10.12662/2317-3076. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 193-197, 2016.

CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF THE MICROFLORA OF THE SKIN AND ORAL CAVITY OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*)

Edmar Maciel Lima Júnior[1]; Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira[2]; Marcelo José Borges de Miranda[3]; Manoel Odorico Moraes[4]; Guilherme Emilio Ferreira[5]; Ezequiel Aguiar Parente[5]; Nelson Sarto Piccolo[6]

1) Full Member Brazilian Society of Plastic Surgery, Clinical Pharmacology Master Student, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil.

2) Medical School Teacher at Christus University Centre (UNICHRISTUS), Fortaleza, Ceará, Brazil.

3) SOS Burns and Wounds Coordinator, Hospital São Marcos, Rede D´Or, Recife, PE, Brazil.

4) Professor and Chair, Clinical Pharmacology, School ofr Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

5) Member of the Brazilian Society of Plastic Surgery (SBCP), Head of the Plastic Surgery Service of the Emergency Room for Burns, Goiânia / GO, Brazil.

6) Student of the Medical School of the University Centre Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza / CE, Brazil.

Corresponding Author: Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira

Telephone: +55 85 99953-3720

Address: Rua João Adolfo Gurgel, 133, Cocó.

CEP: 60.190-060. Fortaleza,CE-Brazil

Email: coordmedicina02@unichristus.edu.br

ABSTRACT

Introduction: Fish are usually exposed to higher microbial loads than animals in land or air. Microflora profile in fish raising ponds is constituted predominantly by gram negative species. This flora contains mostly *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Shewanella putrefasciens*, *Acinetobacter* spp., and *Moraxella* spp. The objective of this study is to analyse the oral cavity, skin and subcutaneous tissue microflora on the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus)*, commercially raised in net pons at Castanhão, in Jaguaribe, state of Ceará, Brazil.

Methods: this is an observational, quantitative, transverse study, performed by the Research and Medication Development Nucleus of the the Federal University of Ceara and LabPasteur. 20 specimens of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) weighting approximately 1,000 grams each had their oral and skin microflora cultivated in sheep blood agar plate (BAP) and chromID® CPS® plates (CPS) and were analyzed. All colonies with distinct morphological characteristics were selected, and re-isolated.

Results: 113 microorganisms were isolated within the CPS and BAP plates. Table I shows the frequency of microorganisms, relating that gram-negatives are the most prevalent. Gram-positive *Globicatella, Streptococcus* and *Enterococcus* were also found. *Pseudomonas aeruginosa* and Enterobacteriacae were isolated in all study plates. Gram-positive *Enterococcus faecalis* was prevalent in 70 and 60% of the skin and oral samples, respectively.

Conclusion: The absence of disease in the fishes' samples and the UFC´s values found in this study characterize microflora and not an infectious process.

Key words : Microflora. Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Farming in Brazil.

INTRODUCTION

Fish farming was originated 2500 years ago in China, being introduced in Brazil in the 1930´s. Our country presents several extremely favorable conditions for fish production in large scale, such as large territorial extent, tropical climate, and extense river basins.[1,2]

Currently, there is an increase in fish farming production in Brazil, which represented 82.3% of the continent production in 2010. Also there was a 6% increase in 2009 in relation to 2007, mostly due to new government incentives and public policies developed by the Ministry of Agriculture and Fishing. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercial culture has increased 105% between the years 2003 and 2009, being currently considered the species in largest commercial production in Brazil.[3]

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is native to Africa and Minor Asia, and predominantly found in warm waters (20 to 30 degrees). This species was introduced in Brazil originally by a governmental program of the National Department of Measures Against Draughts (DNOCS) in the Northeast of the country, in 1971. There was a very modest production initially, probably due to the lack of know-how regarding standardized raising methods.[2]

This species' characteristical rusticity is compounded by a high rate of proliferation, domesticity, and precociousness, while having very little susceptibility to parasitic ailments and upon commercialization of the carcass, being easily filleted, yielding a most palatable white meat, where microbione are practically absent.[2]

Currently, the most frequently method used for fish farming is an intensive method when a high density of animals is placed on net pens, which allows water exchange from the pen to the larger body of water, and vice versa, and the fish are nourished appropriately with the weight gain plan. This method is very effective and its relatively low cost is the main advantage. However, as a disadvantage, there is always the risk of evasion from the pens, and

the difficulty in recovering them, as well the need for a progressive changing diet, as required to allow the evolution and growth of this species.[3,4]

These fish are naturally exposed to a very large microbial load in this environment, proportionally much more than animals in air or land. As this exposure to the water most certainly will affect upper gastrointestinal flora, some authors bring about the hypothesis that this will influence the microflora of the entire intestine, and feeding will also eventually influence these animals' microflora during all stages of their development in captive life..[5,6,7]

Acqueous vertebrates live in a highly favorable environment for the development of several microorganisms, which represent a large environmental challenge for the immune system with possible development of several diseases in these animals. Main entrance sites for pathogenic microorganism in fish are the skin, gills and gastrointestinal tract. [5,6]

According to Molinari et al (2003), microflora in fish farming is mainly constituted by gram negative bacterial. In his study, he compared and evaluated microflora diversity in different systems for Nile tilapia raising (1-brick pen with commercial feed, 2-soil pen with commercial feed and 3-soil pen with organic fertilizers. Enterobacteriaceae (45 samples), Micrococcaceae (87 sample), Pseudomonadaceae (65 sample) e Vibrionaceae (115 samples) were found. Bacterial population was much higher in the soil pen with organic fertilizers ($P \leq 0,05$), followed by the brick pen with commercial feed, and then soil pen with commercial feed ($P < 0,01$).[8]

Fish microflora is mainly constituted by *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Shewanella putrefasciens*, *Acinetobacter* spp. and *Moraxella* spp..[9]

Alvarez and Agurto (2000), had shown on their study (1999-2000) of the microflora of wild tilapia raised in central Venezuela that in this microflora there were predominantly the genders *Aeromonas, Plesiomonas* and members of the Enterobacteriaceae family, and with much smaller proportions, Pseudomonas spp. and Vibrio spp. Within *Aeromonas* gender, *A.*

caviae, A. *Hydrophila subspecies anaerogenes*, *A. hydrophila subspecies hydrophila*, *A. schubertii*, *A. sobria and A. veronii* were identified .[10]

With this previous knowledge, the objective of this study is to analyse the oral cavity, skin and subcutaneous tissue microflora on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) commercially raised in net pens at Castanhão, in Jaguaribe, state of Ceara, Brazil, and to compare the results with the literature and to define if the microflora usually present in these animals as to which can be considered normal our infectious.

MATERIAL AND METHODS

This study was developed at the Reseach and Medication Development Nucleus of the Federal University of Ceara (Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos – NPDM), and at the Clinical Pathology Department of LabPasteur (Certified by the Brazilian Society of Clinical Pathology and Laboratory Medicine).

20 ten month old Nile tilapia (Oreochromis niloticus) animals with approximately 1,000 grams each were obtained from net pens at Castanhão Dam. These fish are raised on a 23 fish/ 2 cubic meter density.

These animals were retrieved from net pens and immediately placed individually in sterile plastic bags which were sealed and immersed in ice at 0 degrees centigrades. Upon arrival in the lab, they were placed on stainless steel tables with sinks, previously cleaned with 70% ethanol.

From each tilapia (Oreochomis niloticus) skin sample, a 1,5 x 1,5 cm fragment was obtained. With sterile technique, this fragment was seeded by imprinting both sides in BAP and CPS (Biomerieux®). Another fragment of the same skin sample was transferred to an empty sterile Petri dish, to which was added 1ml sterile saline solution. Using a scalpel, this

fragment was shredded in several pieces and mixed with the saline solution until a cloudy aspect was obtained. From this "solution", 0.01 ml was instilled with a sterile pipette at the extremity of BAP and CPS plates and this material was then distributed with inoculation loops in the entire plate within horizontal and vertical lines. The remaining material was then transferred to a test tube with 3ml of Brain-Heart-Infusion (BHI). These plates and tubes were then incubated at 35° C (+/- 1) for 24 hours. After this incubation time, the plates were inspected quantitatively and qualitatively for colony forming units (CFU).

For the counting of CFU´s, 20 different (non inoculated) nile tilapia (Oreochromis niloticus) skin samples were used. These samples measured 1.5 x 1.5 cm with an average weight of 0.19 gm. The number of colonies was multiplied by the dilution and divided by the weight of the tissue in grams, thus finding the number of CFU´s / gram of tissue.[11]

Colonies with morphologically distinct characteristics were selected in BAP´s and CPS´s plates and re-isolated. Pure colonies were then obtained from selective culture media and then submitted to identification via Gram staining and Vitek2 (Biomerieux®).[12]

This study statistical analysis is only the descriptive analysis of the collected data. This study design was previously submitted to the Ethical Research Review Board and approved under number 48/2016 by the Federal University of Ceara Ethical Committee in Animal Studies.

To determine if the amount of CFU´s were to be considered "normal" or infectious microflora, the results were confronted with the norms of the ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária = National Sanitary Surveillance Agency) manual (ANVISA, 2013) which dictate that tissue infection is to be recognized when there are more than 100,000 CFU´s units per gram of tissue.[11]

RESULTS

The isolates obtained from BAP and CPS plates, as shown in Tables, 1, 2 and 3. All 20 samples yielded bacterial growth upon 48 hours of incubation. 9 different bacterial species and Enterobacteriaceae family groups were identified on selective culture media (table 1). Gram negative microorganisms are the most prevalent, as gram positive bacteria are represented only by the Globicatella, Streptococcus and Engerococcus genders.

Pseudomonas aeruginosa and Enterobacteriaceae family genders were found in all 40 oral and skin samples, yielding a 100% prevalence (Table 1). When compounded, the Aeromonas gender (*A. hydrophyla, A. sobria* and *A veronii*) prevalence is higher than *P. aeruginosa* and the Enterobacteriaceae family. When considering gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis* occurred in 70 and 60% of skin and oral cavity samples respectively. In the case of *Aeromonas* gender species, A. sobria was 85% more frequent than the other two species (*A. hydrophila e A. veronii*).

Tables 2 and 3 demonstrate the CFU´s count per sample and per gram of cultivated tissue. *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas sobria* and Enterobacteriacae family species were isolated most frequently, in decreasing order.

Quantitatively, as shown in Tables 2 and 3, *P. aeruginosa*, besides being isolated in all samples, also yielded the highest number of isolated CFU´s, 637 (53,6%) in skin samples and 759 CFU´s (58,5%) in oral samples. In relation to the Enterobacteriaceae family, despite being present in 100% of the 20 plates, quantitatively showed a lower number of CFU´s than the *Aeromonas* family, which in Tables 2 and 3, comes in second place.

DISCUSSION

In this study, gram-negative bacteria are predominant in relation to gram-positive, and the most frequent gram negative species is *P. aeroginosa*, as other authors have already

shown (Santos, 1981). *Aeromonas* gender were the most frequent, isolating *Aeromonas sóbria*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas veronii*, which represent 17, 8 and 1% of skin samples, and 16, 9 and 1% of oral samples, respectively. This is also similar to what Santos has previously presented, which showed that fresh water fish microflora, in several countries, was composed of a higher frequency of gram negative species, and also that microflora is usually composed by *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp. and some coliform species.[13]

Rodrigues et al. (2007) using different sellective culture media for Nile tilápia samples had obtained four different bacteria gender. In 420 plates, they observed these species as follows: *Aeromonas* spp. 286 (68,1%), *Vibrio* spp. 69 (16,4%), Enterobacteriaceae 51 (12,2%) and *Pseudomonas* spp. 14 (3,3%). When compared to this study, except for the *Vibrio* spp, we obtained, in our study, similar results.[14]

Globicatella gender was present in 6 (30%) skin samples and in 4 (20%) oral cavity samples. Surprisingly, in a PubMed survey, only 13 articles were found to mention *Globicatella anguinis*, and of these, 10 were associated with human diseases and only 3 in animals (2 in sheep and 1 in horses) [15,16,17]

CONCLUSION

When considering absence of infectious sinals in the fishes and a load less than 100,000 CFU´s as standardized for the National Sanitary Surveillance Agency - ANVISA (Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria), we conclude that the CFU´s values found in this study consist normal, non-infectious, microflora.

CONFLICT OF INTERST:

The authors declare no conflict of interest.

Table 1. Microorganism isolation proportion in 20 oral and skin Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), collected at Castanhão Dam, Fortaleza, Ceara, Brazil, in November 2015

Microrganisms	Skin Samples (20) n (%)	Oral Cavity Samples (20) N (%)
Pseudomonas aeruginosa	20 (100)	20 (100)
Enterobacteriaceae	20 (100)	19 (95)
Aeromonas sóbria	17 (85)	16 (80)
Aeromonas hydrophila	8 (40)	9 (45)
Enterococcus faecalis	14 (70)	12 (60)
Globicatella sanguinis	6 (30)	4 (20)
Aeromonas veronii	1 (5)	1 (5)
Streptococcus uberis	1 (5)	2 (10)
Candida parapsilosis	1 (5)	1 (5)
Streptococcus suis	1 (5)	1 (5)
Total	89	73

Table 2. Colonies distribution in 20 Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin samples collected in net pens at Castanhão Dam, Fortaleza, Ceará, Brazil, in November 2015.

	CFU's /sample																					CFU's/g tissue
Isolates	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	Total	
P. aeruginosa	50	58	30	18	15	21	45	22	36	28	45	31	35	37	27	48	45	12	15	19	637	16,76
A. sobria	0	0	15	15	12	10	6	5	16	23	8	0	12	0	5	20	8	18	14	0	187	4,92
Enterobacteriaceae	14	1	4	4	1	8	23	12	10	9	8	0	12	12	23	18	8	10	8	0	185	4,87
A. hydrophila	10	12	0	0	0	0	0	20	6	0	0	6	0	19	0	0	0	0	8	8	89	2,34
E. faecalis	0	0	0	0	0	0	3	6	4	5	6	5	4	3	2	2	6	6	6	4	62	1,63
G. sanguinis	2	2	3	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0,34
A. veronii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	0,21
S. uberis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	5	0,13
C. parapsilosis	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
S. suis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0,03
Total	76	75	52	40	29	41	77	65	72	61	67	46	66	73	57	88	67	46	45	45	1189	

Colony Forming Units (CFU´s).

Table 3. Colonies distribution in 20 Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) oral samples collected in net pens at Castanhão Dam, Fortaleza, Ceará, Brazil, in November 2015.

	CFU's /sample																					CFU's/g tissue
Isolates	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	Total	
Pseudomonas aeruginosa	80	68	61	74	36	36	27	36	36	25	27	22	35	27	29	32	18	34	27	29	759	19,97
Enterobacteriaceae	3	1	5	5	4	6	25	0	17	10	23	2	15	15	13	21	8	26	15	9	223	5,87
Aeromonas sóbria	0	0	8	8	17	11	8	5	11	10	8	0	14	21	8	18	8	9	12	0	176	4,63
Enterococcus faecalis	0	0	0	0	0	0	0	5	2	7	6	2	8	2	6	4	6	6	6	0	60	1,58
Aeromonas hydrophila	2	16	0	0	0	0	0	11	5	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	12	54	1,42
Globicatella sanguinis	2	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0,21
Aeromonas veronii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	0,21
Streptococcus uberis	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6	0,16
Candida parapsilosis	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
Streptococcus suis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0,05
Total	87	90	75	89	57	53	63	57	71	52	64	34	75	67	56	75	40	75	60	58	1298	

Colony Forming Units (CFU´s).

REFERENCES:

1. Zago AC. Análise parasitological e microbiológica de tilápias do Nilo (Oreochromis niloticus), criadas em tanques-rede no reservatório de Água Vermelha- SP e suas inter-relações com as variáveis limnológicas e fase de criação [dissertação de mestrado]. Botucatu: UNESP; 2012.
2. Chechim, FE. Características morfológicas do epitélio intestinal e desempenho de tilápia do Nilo, Oreochromis niloticus, suplementada com mananoligossacarídeo (MOS) [dissertação de mestrado]. Dois Vizinhos: UTFPR; 2013.
3. Sousa ADL. Mananoligossacarídeo e B-glucano na suplementação dietária para juvenis de tilápia do Nilo mantidos em tanque-rede [tese de doutorado]. Jaboticabal: UNESP; 2010.
4. Pupo HDD. Diversidade em microbiota gram-negativa em sistemas de cultivo de tilápia do nilo (Oreochromis niloticus) [dissertação de mestrado]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2006.
5. Pereira FMAM, Rocha AS, Silva BC, Borges AM, Martins TPA, Navarro RD. Uso de polissacarídeos não amiláceos na aquicultura. Revista Científica de Medicina Veterinária. 2015;13(25).
6. Lanzarin M, Almeida Filho ES, Ritter DO, Mello CA, Corrêa CSS, Ignácio CMS. Ocorrência de Aeromonassp. e microrganismos psicrotróficos e estimativa do prazo de validade comercial de filé de pintado (Pseudoplatystomacoruscans) mantidos sob refrigeração. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011;63(6):1541-1546.
7. Giatsis C, Sipkema D, Smidt H, Heilig H, Benvenuti G, Verreth J, Verdegem M. Impact of rearing environment on the development of gut microbiota in tilapia larvae.

Sci. Rep. [internet]. 2015 Dec 11 [acesso em 20 Abr 2016]; 5(18206): disponível em: http://www.nature.com/articles/srep18206. DOI: 10.1038/srep18206.

8. Molinari LM, Scoaris DO, Pedroso RB, Bittencourt NLR, Nakamura CV, Uedanakamura T, DE Abreu Filho BA, Dias Filho BP. Bacterial microflora in the gastrointestinal tract of Nile tilapia, Oreochromisniloticus cultured in a semi-intensive system.ActaScientiarum. BiologicalSciences. 2003;25(2):267-271.
9. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
10. Álvarez RJD, Agurto OCP. Bacterioflora gram-negativa aerobia de tilapias silvestres y cultivadas em La región central de Venezuela durante el período 1999-2000.Veterinaria Tropical. 2000; 25(2):209-228.
11. ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 4: procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final. Brasília: ANVISA; 2013. 95 p.
12. Pincus, DH. Microbial identification using the bioMerieux VITEK 2 System. In: Miller, M. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods, cap. 1, p 1-32, 2006.
13. Santos CAL. The storage of tropical fish in ice. Tropical Science. 1981;23:97-127.
14. Rodrigues, E. Pesquisa de aeromonasspp. em tilápia (oreochromis niloticus), cultivada no estado do Rio de Janeiro-Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana [tese de pós-graduação]. Niterói: Universidade Federal Fluminense; 2007.
15. Elsinghorst TA. First cases of animal diseases published since 2000.Vet Q. 2003;25(4):165-169.

16. Vela AI, Fernández E, Las Heras A, Lawson PA, Domínguez L, Collins MD, Fernandez-Garayzabal JF. Meningoencephalitis associated with Globicatellasanguinis infection in lambs. JClinMicrobiol. 2000;38(11):4254-4255.

17. Collins MD, Rodriguez JM, Lawson PA, Falsen E, Foster G. Characterization of a novel gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of Eremococcus coleocola gen. nov., sp. nov.Int J SystBacteriol. 1999;49(4):1381-1385.

4.2. Análise Histológica e de Propriedades Tensiométricas da Pele de Tilápia

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

Artigo Original

Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo

Microscopic evaluation, histochemical study and analysis of tensiometric properties of the Nile Tilapia skin

Evaluación microscópica, estudio inmunohistoquímico y análisis de propiedades tensiométricas de la piel de tilapia del Nilo

Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Maria Elisa Quezado Lima Verde, Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior, Paulo Goberlânio de Barros Silva, Victor Pinheiro Feitosa, Edmar Maciel Lima Júnior Marcelo José Borges de Miranda Manoel Odorico de Moraes Filho

RESUMO

Objetivo: Caracterizar a pele de tilápia do Nilo, uma possível fonte de biomaterial para enxertia, a partir de suas características físicas (resistência à tração), histomorfológicas e da tipificação da composição do colágeno. **Métodos:** Amostras de pele de tilápia do Nilo foram utilizadas e, para os testes de tração (utilizando a máquina de ensaios universais Instron®), as peles foram submetidas à imersão em soluções de glicerol em crescente concentração. Parte das amostras foi fixada em formol neutro a 10%, processada e corada com o uso da hematoxilina e da eosina, para confecção de lâminas e posterior análise histológica e histoquímica. Todas as etapas foram reproduzidas também em pele humana, doada de cirurgias plásticas, para efeito comparativo. **Resultados:** A morfologia da pele da tilápia mostrou-se semelhante à da pele humana, com derme profunda formada por espessas fibras colágenas organizadas, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical. A pele de tilápia também apresentou maior composição por colágeno tipo I em relação à pele humana ($p=0,015$). Nos testes de tração, a carga média suportada pela pele de tilápia foi de 43,9±26,2 N, enquanto a extensão à tração teve valores médios de 4,4±1,045 cm **Conclusão:** A pele de tilápia possui características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e elevada resistência e extensão à tração em quebra, o que suporta sua possível aplicação como biomaterial. A derme desta pele é composta por feixes organizados de fibras de colágeno denso, predominantemente do tipo I, o que traz considerável importância para seu uso clínico.

DESCRITORES: Materiais Biocompatíveis. Colágeno. Tilápia.

ABSTRACT

Objective: To characterize the Nile tilapia skin, a possible source of biomaterial for grafting, from their physical (tensile strength) and histomorphological characteristics, and from collagen classification. **Methods:** Samples of Nile tilapia skin were used and, for microtensile tests (by Instron® universal testing machine), were subjected to immersion in glycerol solutions of increasing concentration. Part of the samples was fixed in neutral formalin 10%, processed and prepared using routine staining with hematoxylin and eosin into tissue slides, for further histological and histochemical analysis. All steps were also played in human skin, donated by plastic surgeries, for comparative effects. **Results:** The morphology of Nile tilapia skin presented similarities with human skin, showing the deep dermis formed by thick organized collagen fibers, on parallel/horizontal and transversal/vertical arrangement. The tilapia skin also presented a larger composition of type I collagen, compared with human skin ($p=0.015$). On traction tests, the load average supported by tilapia skin was 43.9±26.2 N, while the traction extensile had mean values of 4.44±1.045cm. **Conclusion:** The tilapia skin has microscopic characteristics, similar to the morphological structure of human skin, and high resistance and tensile extension at break, which supports its possible application as biomaterial. The dermis of this skin is composed by organized bundles of dense collagen fibers, predominantly type I ones, which brings considerable importance for its clinical use.

KEYWORDS: Biocompatible Materials. Collagen. Tilapia.

RESUMEN

Objetivo: Caracterizar la piel de tilapia del Nilo, una posible fuente de biomateriales para injertos, a partir de sus características físicas (resistencia a la tracción), histomorfológico y composición de colágeno. **Métodos:** Se utilizaron muestras de piel de tilapia del Nilo para ensayos de tracción (utilizando la máquina universal de ensayos Instron®), las pieles fueron remojadas en glicerol en creciente aumento de la concentración. Parte de las muestras se fijó en 10% de formalina neutra, procesada y se tiñó con hematocilina y eosina, para la fabricación de cortes y el análisis histológico e inmunohistoquímico subsiguiente. Todos los pasos también se produjeron en la piel humana, donada de cirugía plástica, para efectos comparativos. **Resultados:** La morfología de la piel de tilapia era similar a la de la piel humana, con dermis profunda formados por fibra de colágeno gruesas colocadas en disposición paralela / horizontal y lateral / vertical. La piel de tilapia también tenía una composición más alta de colágeno tipo I en relación a la piel humana ($p=0,015$). Los ensayos de tracción en la carga media por la piel tilapia fue 43,9±26,2 N, mientras que la extensión a la tracción tenía valores promedio de 4,4±1,045 cm **Conclusión:** La piel de tilapia tiene características microscópicas similares a estructura morfológica de la piel humana y de alta resistencia a la tracción y la extensión a la rotura, que apoya su posible aplicación como biomaterial. La dermis de esta piel está compuesta por haces organizados por fibras de colágeno densas, predominantemente de tipo I, que aporta una considerable importancia para el uso clínico.

PALABRAS CLAVE: Materiales Biocompatibles. Colágeno. Tilapia.

INTRODUÇÃO

A queimadura é uma das maiores agressões que o nosso organismo pode sofrer. Ela varia desde uma simples insolação, queimadura de primeiro grau, até a destruição total da pele (epiderme e derme) e dos tecidos adjacentes, como nas queimaduras de terceiro grau, causadas pelo choque elétrico. A maioria da população atingida pelas queimaduras é de baixa renda e 97% não tem nenhum plano de saúde[1].

Nas lesões de 2º e de 3º graus, com grande superfície corporal (SCQ) atingida, o tratamento é feito por uma equipe interdisciplinar. O paciente fica internado em um centro de tratamento de queimados. O tratamento clínico inclui reposição hídrica adequada, através de uma veia de grande calibre, controle da diurese (por meio de sonda vesical), suporte enteral (via sonda nasogástrica ou enteral), para evitar a hemorragia digestiva e a translocação bacteriana, boa analgesia horária e, em alguns casos, antibioticoterapia. O tratamento cirúrgico vai desde os curativos, passando pela escarotomia e pela fasciotomia, pelos desbridamentos, pelas amputações, pelos enxertos, pelos retalhos fasciocutâneos, até os retalhos livres[2].

Em nosso país, em todos os centros de tratamento de queimados da rede pública, temos a seguinte conduta, em relação aos curativos: nas queimaduras de segundo grau, é realizado diariamente o banho com clorexidine a 2% e o curativo é feito com o antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, até a completa reparação da lesão (2º grau superficial em torno de 12 dias e profundo entre 21 e 25 dias); nas lesões de terceiro grau, é realizado o desbridamento do tecido necrótico em várias etapas (desbridamento sequencial), feito o curativo com sulfadiazina de prata a 1%, até a preparação do leito da ferida para a enxertia.

Na rede privada, em nosso país, este cenário se modifica e, dependendo do tipo de convênio ou das condições financeiras do paciente, são usados curativos biossintéticos e peles artificiais, todos importados e de elevado custo. Na Europa e nos Estados Unidos da América, são utilizadas, nestas lesões de 2º e de 3º graus, peles homólogas (pelos inúmeros bancos de pele), peles heterólogas, curativos biossintéticos e derme artificial, para melhor sobrevida e boa recuperação funcional. Infelizmente, em um país com as dimensões do Brasil, temos apenas em funcionamento dois bancos de pele, sendo um em São Paulo (Hospital das Clínicas) e o outro em Porto Alegre (Santa Casa de Misericórdia), uma vez que o único banco do Nordeste, localizado em Recife (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP), encontra-se desativado[3].

Estamos muito distantes de ter o substituto cutâneo temporário ideal. Alguns curativos heterólogos já foram testados e usados em nosso país, porém abandonados ao longo do tempo, seja pelo elevado custo de importação, como a pele porcina, ou pela falta de estudos científicos, como a pele de rã ou pela transmissão de doenças animais, que todos podem causar, a não ser quando a pele é irradiada, aumentando os custos[4].

Tecidos biológicos de origem animal, como a pele de porco, a pele de rã, o pericárdio bovino e a camada submucosa de intestino de porco, têm sido utilizados em curativos oclusivos biológicos (heteroenxertos), nas lesões por queimaduras[5-9].

Entretanto, para a liberação e a utilização desses materiais, eles devem ser submetidos a rigorosos protocolos, para a identificação da sua real contribuição, eficácia e biocompatibilidade[10].

A pele da tilápia do Nilo surge como um possível subproduto, com aplicabilidade clínica de novos biomateriais utilizáveis para a bioengenharia. 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. 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 Jaguaretama, seu principal produtor. A pele deste peixe é um produto nobre e de alta qualidade, pois possui resistência peculiar, couro[11]. Entretanto, não existem estudos que evidenciem sua resistência como pele não submetida ao curtimento.

Estudos histológicos da pele da tilápia demonstraram uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno[12]. O colágeno configura-se como um dos principais componentes dos biomateriais, devido à sua característica de orientar e de definir a maioria dos tecidos[13], além de possibilitar biodegradabilidade e biocompatibilidade, que favorecem a sua aplicação[14]. Desta forma, o detalhamento da quantidade e o tipo de colágeno presente configuram-se como formas de caracterização de biomateriais.

A literatura reporta poucos trabalhos em que a pele de tilápia foi submetida ao processo de curtimento para confecção de luvas e de vestimentas. Testes mecânicos de tracionamento são descritos, conferindo o aproveitamento deste material, apesar da sua delgada espessura para este fim[11]. No entanto, ainda não existem trabalhos publicados sobre a possibilidade de utilização desta pele como biomaterial, para recobrimento de feridas na pele humana por queimadura.

Dessa forma, esse estudo objetivou a caracterização da pele de tilápia do Nilo, a partir de suas características histomorfológicas, tipificação do colágeno e características físicas (resistência à tração). O método de processamento, de descontaminação e de esterilização da pele da tilápia e sua aplicação em queimaduras e feridas foi registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número BR1020150214359.

MÉTODO

Amostras de pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (n=7) foram obtidas através da piscicultura do Castanhão (Jaguaribara-CE). Os peixes são cultivados em tanque de rede, com peso entre 800 e 1000 g. Eles foram insensibilizados por choque térmico (caixas isotérmicas com gelo moído e água [1:1]), para, em seguida, realizar-se a sangria. As peles foram removidas com uma turquesa (ferramenta) e submetidas à lavagem com água corrente, para remoção de qualquer resquício de sangue e de outras impurezas. Posteriormente,

foram colocadas em solução fisiológica NaCl a 0,9% estéril (previamente resfriada a 4°C) para a limpeza final. As peles para os testes de microtração foram submetidas a um processo de esterilização, que consta de duas etapas de imersão em clorexidina por 30 minutos e três etapas de imersão no glicerol (50%, 75%, 100%). As peles utilizadas para análise histológica e histoquímica foram armazenadas em solução de formol tamponado a 10%.

Adicionalmente, amostras de pele humana de descarte, oriundas de cirurgias estéticas, foram armazenadas em solução de formol tamponado a 10% para análise histológica e histoquímica. Paralelamente, outras amostras foram submetidas aos testes de microtração e passaram pelas mesmas etapas de esterilização que a pele da tilápia. Destaca-se, ainda, que estas peles humanas foram utilizadas apenas em laboratório, não sendo realizada nenhuma intervenção terapêutica nas mesmas.

Análise Histológica

Após o período de fixação, as amostras foram analisadas macroscopicamente e clivadas para remoção de tecidos muscular e adiposo excedentes. Em seguida, os fragmentos foram processados em 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. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina[13] e analisadas com o auxílio de microscópio óptico.

Análise Histoquímica

Cortes de 3µm foram dispostos em lâminas de vidro e desparafinizadas em estufa a 60°C por 3h, seguidos de três banhos de xilol (5 minutos cada). Após reidratação em série decrescente de álcool, as lâminas foram incubadas em solução de picrosirius red (ScyTek®) por 30 minutos e lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contracorados com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Leica® modelo DM 2000), o que permite visualizar o colágeno tipo I (maduro), com coloração vermelho-alaranjada, e o colágeno tipo III (imaturo), com cor verde.

Para quantificação dos diferentes tipos de colágeno, seis campos em um aumento de 200x foram fotografados com uso de câmera DFC 295, acoplada ao Microscópio Leica® DM 2000. As fotomicrografias foram avaliadas pelo software de análise de imagem Image J® (RSB), após calibração das imagens pelo comando Color Thershold (Image > Adjust > Color Thersold) na função RGB, para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92).

Depois da calibração, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e foi mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (Analyse > Analyse Particles). Após a polarização de luz, o mesmo protocolo foi realizado, ajustando-se as cores na função RGB para Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32).

Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary), e foi mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo-avermelhado (correspondente ao colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela marcação amarelo-avermelhada. A área verde-esbranquiçada, relativa ao colágeno tipo III, foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e o percentual marcado unicamente pela cor amarelo-avermelhada[14].

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio do teste t de Student [nível de significância: 5%, dados paramétricos descritos na forma: média ± erro-padrão da média (EPM)].

Testes de Tração

Os ensaios de tração foram realizados no equipamento Instron® 3345 com célula de carga de 50N, no módulo de tração, utilizando-se garras de ação mecânica em cunha (Figura 1).

Todas as amostras (pele de tilápia e humana) foram reidratadas com solução fisiológica NaCl 0,9% (3 lavagens de 5 minutos) e cortadas, obtendo-se 26 corpos de prova de formato retangular, medindo 10,0 x 2,0 cm, sendo 17 da pele da tilápia e nove de pele humana. Em seguida, foram realizados cortes adicionais, a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro

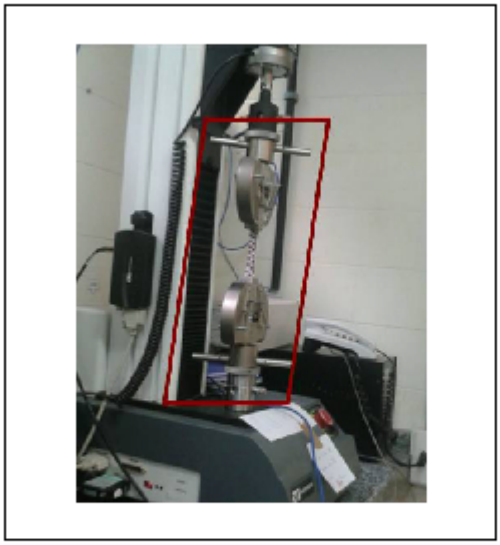


Figura 1 - Corpo de prova de pele de tilápia montado em Single Column Universal Testing Systems for Capacity Testing up to 5 kN Instron® 3345, no módulo de tração.

apresentava 1,0 cm de largura (Figura 2). No momento do teste, a espessura de cada corpo de prova foi aferida, referente à região do centro da ampulheta, utilizando-se um paquímetro digital Mitutoyo®.

Em cada ensaio, um corpo de prova foi posicionado entre as garras e, com o uso do software Bluehill 2®, foram mensuradas a carga máxima observada (N), a deformação à tração em máximo de carga (%), a carga em quebra (N) e o esforço à tração em quebra (N/mm²), além da extensão à tração em máximo de carga (cm). Todos os ensaios foram realizados com uma velocidade de deslocamento de 5 mm/min.

Figura 2 - Corpo de prova para o ensaio de tracionamento medindo 10,0 x 2,0 cm (altura x largura) mostrando região central em forma de ampulheta com 1,0 cm de largura.

RESULTADOS

Análise Histológica

Pele de tilápia

A análise microscópica da pele de tilápia demonstrou a epiderme revestida por epitélio pavimentoso estratificado constituído, em diversos trechos, por poucas camadas celulares. As células basais apresentavam morfologia colunar e as espinhosas, poligonais com núcleos ovais. Foram observadas células mucosas dispersas (Figura 3A).

A derme superficial era composta por tecido conjuntivo frouxo, permeado por vasos sanguíneos de calibres variados, com fibras colágenas paralelas e finas, além de melanóforos subepiteliais e melanofagos dispersos (Figura 3A). Na derme profunda, observaram-se espessas fibras colágenas organizadas, compactadas, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical, perpendiculares à superfície da pele (Figura 3B).

Acúmulos de adipócitos típicos e feixes nervosos foram evidenciados na hipoderme (Figura 3C).

Pele humana

Fragmentos de pele humana foram analisados sob microscopia ótica, que revelou um revestimento de epitélio pavimentoso estratificado hiperortoparaqueratinizado, com trechos de atrofia, sob o qual se visualizava tecido conjuntivo fibroso, com aumentada atividade colagênica, células inflamatórias mononucleares dispersas e vasos sanguíneos, por vezes, dilatados (Figura 3D).

Na derme superficial e na profunda, havia tecido conjuntivo fibroso denso não modelado, com as fibras colágenas dispostas em diferentes direções (Figura 3E).

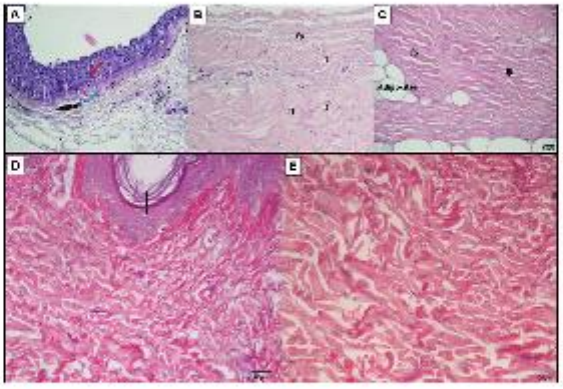


Figura 3 - Fotomicrografia de pele de tilápia (A, B e C) e pele humana (D e E). A. Epiderme (seta vermelha) e derme superficial (seta verde) com melanóforos subepiteliais (seta azul) (HE, 100x); B. Derme profunda mostrando fibras colágenas transversais (ft) (HE, 200x); C. Fibras colágenas paralelas (fp) na derme profunda e trecho de hipoderme com depósitos de adipócitos (HE, 400x); D. Epitélio pavimentoso estratificado hiperorceratinizado sob o qual há córion fibroso denso (seta preta) (HE, 200x); E. Região de derme profunda de pele humana exibindo fibras colágenas em diferentes direções (HE, 400x).

Análise Histoquímica

Foi considerado, para esta análise, o colágeno da derme profunda da pele da tilápia, visto que, na derme superficial, o tecido conjuntivo era disposto frouxamente com poucas fibras colágenas. Como na pele humana não foi visualizada esta diferença, pois tanto a derme superficial como a profunda apresentavam tecido conjuntivo fibroso denso, o colágeno analisado pertencia às duas regiões.

Os fragmentos avaliados da pele da tilápia e da humana revelaram extensa área preenchida por colágeno, representando 91,6±1,1% (média±EPM) e 71,3±2,6% (média±EPM), respectivamente ($p<0,001$) (Figura 4A). A análise quantitativa do colágeno demonstrou que, na pele de tilápia, houve maior percentual de área preenchida por colágeno tipo I (maduro) (área marcada em laranja/vermelho) [52,2±3,0% (média±EPM)], do que o observado na pele humana, na qual a área ocupada por este tipo de colágeno foi 39,2±2,4% (média±EPM), revelando diferença estatística entre os grupos ($p=0,015$) (Figuras 4B e 5). Por outro lado, o percentual de colágeno tipo III (imaturo) (área marcada em amarelo/verde) mostrou-se significativamente superior na pele humana [60,8±2,4% (média±EPM)] em relação à pele da tilápia [47,8±3,0% (média±EPM)] ($p=0,015$) (Figuras 4C e 5).

A razão entre a quantidade de colágeno tipo I:III mostrou-se significantemente aumentada na tilápia [1,12±0,15 (média±EPM)], em relação ao encontrado na pele humana [0,65±0,06 (média±EPM)] ($p=0,029$) (Figura 4D).

Testes de Tração

Pele da tilápia

A ruptura de todos os corpos de prova da pele de tilápia ocorreu na região do centro da ampulheta, onde a espessura variou de 0,66 a 0,96 mm.

Para a análise de carga máxima (N), a qual avalia a carga que a pele suporta sem ocorrer quebra, obtiveram-se o valor maior de 94,013 N e o menor de 15,763 N. A média deste parâmetro ficou em 43,967±26,248 N (média±EPM). Com relação à avaliação da extensão à tração em máximo de carga medida em centímetros (cm), a pele da tilápia suportou uma deformação que variou entre 6,45 a 2,74 centímetros (média = 4,442±1,045 cm), sem sofrer quebra.

O teste de deformação à tração em máxima carga (%) resultou em valores de 62,775% (máximo), de 25,908% (mínimo) e média de 42,529±10,342 %.

A prova de carga em quebra (N) demonstrou ampla variação, visto que os resultados da pele da tilápia oscilaram de um valor máximo de 68,394 N até um mínimo de 4,828 N (média = 22,727±15,673N).

Os valores de esforço à tração em quebra (N/mm²) resultaram em um máximo de 22,393 N/mm² e mínimo de 0,704 N/mm² (média = 4,964±5,236 N/mm²) (Tabela 1).

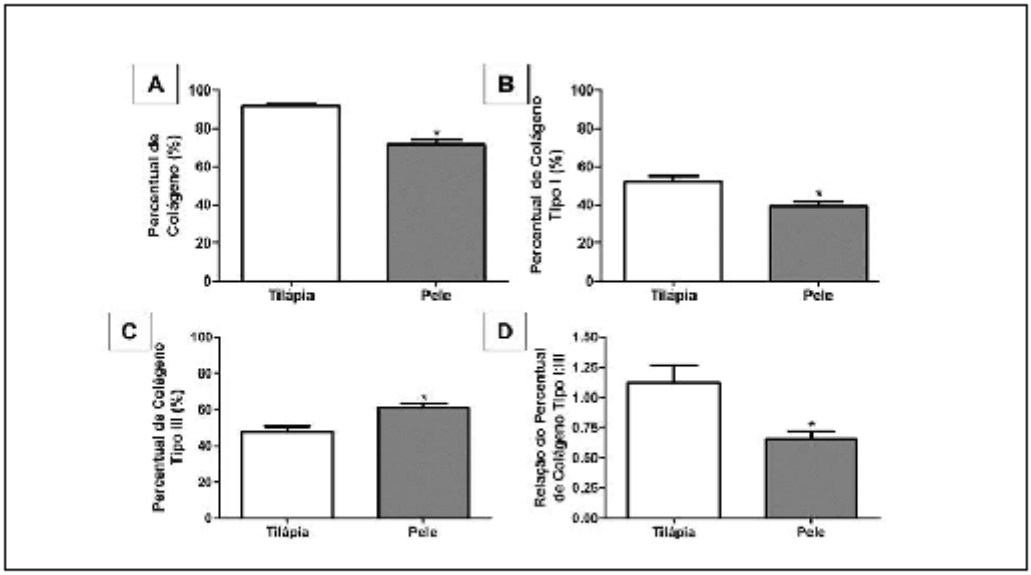


Figura 4 - Avaliação do percentual da área preenchida por colágeno e os diferentes tipos de colágeno (I e III) em tecido conjuntivo de tilápia e humano. *p<0.05, teste t de Student (média ± EPM).

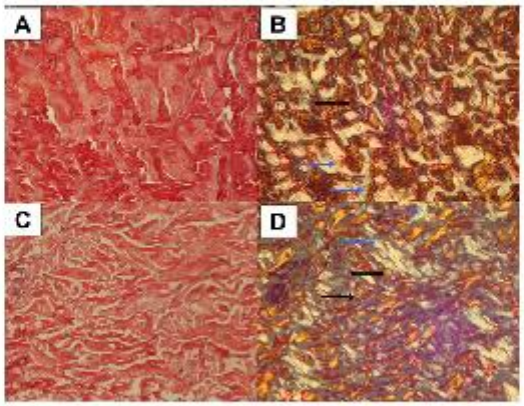


Figura 5 - Perfil de colágeno da pele de tilápia (A e B) e pele humana (C e D) sem (A e C) e com (B e D) polarização de luz (Picrosirius Red, 400x), mostrando a distribuição de colágeno tipo I (amarelo-avermelhado) e tipo III (verde-esbranquiçado). Seta preta: colágeno tipo I. Seta azul: colágeno tipo III.

TABELA 1
Características das queimaduras em crianças internadas no CTQ do HMUE, Ananindeua, PA, nos anos de 2011 a 2014.

	Máximo de Carga (N)	Deformação (%)	Carga em Quebra (N)	Esforço (N/mm²)	Extensão à tração em quebra (cm)
	64,004	54,161	22,393	22,393	6,14
	20,481	43,227	9,000	9,000	2,74
	37,469	32,592	22,441	5,929	3,59
	38,712	39,317	19,501	5,153	4,26
	16,428	30,975	6,082	0,704	3,52
	22,506	41,342	20,615	2,386	4,2
	29,080	53,517	21,066	2,847	5,51
	15,763	31,567	7,478	1,011	3,28
	18,189	40,85	13,363	1,407	4,5
	27,074	48,467	20,120	3,183	4,92
	28,184	39,583	11,93	1,326	4,14
	59,216	62,775	37,804	4,248	6,45
	94,013	32,500	32,627	3,794	3,62
	83,192	39,150	33,488	4,186	4,01
	59,300	54,884	35,24	6,407	5,58
	89,291	52,192	68,394	9,633	5,25
	44,539	25,908	4,828	0,791	3,81
Máximo	94,013	62,775	68,394	22,393	6,45
Mínimo	15,763	25,908	4,828	0,704	2,74
Média	43,967	42,529	22,727	4,964	4,442*
Coeficiente de Variação	688,961	106,974	245,652	27,423	1,093
Desvio Padrão	26,248	10,342	15,673	5,236	1,045

TABELA 2
Valores dos testes de resistência à tração em pele humana realizados no equipamento Instron® 3345 Single Column Universal Testing Systems for Capacity Testing up to 5 kN.

	Máximo de Carga (N)	Deformação (%)	Carga em Quebra (N)	Esforço (N/mm²)	Extensão à tração em quebra (cm)
Máximo	494,511	79,025	475,184	60,921	8,3
Mínimo	9,530	15,475	4,727	1,292	1,79
Média	209,219	42,410	146,216	17,667	4,615*
Desvio Padrão	185,183	25,220	194,553	24,785	2,574

Pele humana

Nove amostras de pele humana foram submetidas à avaliação de propriedades físicas através de testes de tração. Os mesmos parâmetros foram avaliados, e os dados obtidos estão resumidos no quadro acima (Tabela 2).

A extensão à tração em quebra medida em centímetros apresentou média de 4,615 cm, valor semelhante ao encontrado na análise da pele da tilápia.

DISCUSSÃO

Sobre a análise histológica, os achados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados previamente na literatura, em que foi descrito que a pele da tilápia é composta por epiderme representada por epitélio pavimentoso estratificado, com células basais cúbicas ou cilíndricas de núcleo oval e com a possível presença de células mucosas[11]. A derme, por sua vez, é constituída por tecido conjuntivo frouxo (superficial) e denso (profundo). Na camada mais externa da derme profunda, já foram mostradas, também, fibras colágenas horizontais e verticais (perpendiculares à superfície da pele), e na interna, fibras horizontais compactadas e espessas, corroborando os nossos achados[12]. Estudos prévios também evidenciaram, como nesta pesquisa, melanóforos em derme superficial[11].

A família do colágeno é composta por mais de 20 tipos geneticamente diferentes, sendo os mais frequentemente encontrados na derme os tipos I, II, III, IV VI, VII. O colágeno tipo I forma fibras espessas, mecanicamente estáveis e responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. O colágeno tipo III forma fibrilas, geralmente presentes logo abaixo da membrana basal, e participa da fixação da epiderme à derme. O colágeno tipo I é o mais comum, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens, enquanto o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos[17,18].

A diferenciação entre os tipos de colágeno configura-se como um exercício difícil, sendo uma das técnicas mais executáveis a coloração histoquímica de Picrossirius Red, seguida da técnica de polarização da luz, realizada neste estudo, a qual confere diferenciação entre colágenos I e III, sendo essa a justificativa para a análise mais específica desses dois tipos[19].

A maioria dos biomateriais, como pericárdio de porco, apresenta grande quantidade de colágeno tipo I (47%)[20], do mesmo modo que a pele de tilápia (57%, no presente estudo). Sugere-se que este tipo de colágeno possua grande quantidade de grupos reativos, como aminas, ácidos carboxílicos e hidroxilas alcoólicas, que possibilitam alterações químicas do tecido, principalmente através de reações de reticulação e hidrólise seletiva[21], aumentando sua adaptação aos outros tecidos.

A estrutura do colágeno tipo I é caracterizada por um tripeptídeo, no qual há, frequentemente, glicina, prolina e hidroxiprolina. Apesar de a composição por aminoácidos variar de acordo com as espécies, em geral, animais marinhos contêm menor quantidade de hidroxiprolina compondo o colágeno tipo I, o que está diretamente relacionado com a temperatura de degradação dessa estrutura. A temperatura corporal dos mamíferos é, nesse caso, superior à temperatura de degradação do colágeno, o que, por conseguinte, limita seu uso na medicina regenerativa; no entanto, o colágeno tipo I de peixes tropicais, como a tilápia, possui uma temperatura de degradação superior, comparada aos outros peixes. Estudos mostram que, nesse aspecto, o colágeno tipo I derivado da tilápia possui um grande potencial de uso clínico, podendo ser comparado, inclusive, aos materiais em utilização, derivados de mamíferos. O colágeno obtido da pele da tilápia é, ainda, uma opção mais rentável e estável, comparada à obtenção através das escamas[22].

Os feixes de colágeno denso da pele da tilápia são dispostos, predominantemente, de forma paralela e transversal, diferindo da organização da derme humana, em que se encontram fibras com aumentada atividade colagênica em direções diversas. Esses aspectos poderiam contribuir para o entendimento da alta capacidade da pele humana em resistir a grandes cargas, no entanto, esta diferença no arranjo das fibras colágenas não parece interferir no parâmetro da elasticidade da pele da tilápia, visto que os valores encontrados em ambas as peles no teste de extensão à tração, medida em centímetros, apresentaram médias semelhantes (média tilápia = 4,442 cm; média humana = 4,615 cm). Esta característica possibilitaria satisfatória manipulação da pele do peixe nas manobras de recobrimento e sutura, por exemplo.

Os ensaios de resistência à tração se prestam para se verificar qual a tensão máxima que as membranas suportam até que ocorra

sua ruptura, ou seja, para avaliar a capacidade da pele em absorver as cargas impostas, sendo essas informações essenciais para sua possível utilização como matrizes na área de regeneração tecidual, onde estão sujeitas à carga.

Em relação aos valores encontrados nos testes de tração, poucas são as pesquisas reportadas na literatura que apresentam metodologia semelhante à deste estudo. Em avaliação prévia com peritônio de paca, um possível biomaterial de uso clínico, armazenadas em glicerol 98%, em períodos de até 30 dias, evidenciaram-se valores médios de carga máxima (16 N) e esforço a tração (2,8 N/mm²), inferiores ao encontrado para a pele de tilápia em teste, entretanto, com valores de deformação ligeiramente superiores (49%)[23].

Quando comparados com a pele de tilápia submetida ao curtimento, os valores encontrados na literatura são em média superiores, como esperado, em que a pele curtida apresenta valores de carga máxima de 112 N, esforço à tração de 10,87 N/mm² e deformação de 75%[24].

CONCLUSÃO

É possível a utilização da pele da tilápia como promissor biomaterial na medicina regenerativa. As suas características microscópicas, semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e elevada resistência e extensão à tração em quebra possibilitam esta aplicação. A derme desta pele é composta por feixes de colágeno compactados, longos e organizados, predominantemente do tipo I, de considerável importância para seu uso clínico. No entanto, novos estudos são necessários, particularmente em animais, para validação da pele da tilápia como curativo biológico temporário em queimaduras.

REFERÊNCIAS

1. Lima Júnior EM. Rotina de atendimento ao queimado. Fortaleza: Gráfica LCR; 2009.
2. Crisóstomo MR, Serra MCVF, Gomes RD. Epidemiologia das queimaduras. In: Lima Júnior EM, Serra MC, eds. Tratado de queimaduras. São Paulo: Atheneu; 2004. p.31-5.
3. Lima Júnior EM, Novaes FN, Piccolo NS, Serra MCVF. Tratado de queimaduras no paciente agudo. São Paulo: Atheneu; 2008.
4. Boljiani A, Lima Júnior EM, Serra MCVF. Quemaduras - Conductas Clínicas y Quirúrgicas. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013.
5. Kua EH, Goh CQ, Ting Y, Chua A, Song C. Comparing the use of glycerol preserved and cryopreserved allogenic skin for the treatment of severe burns: differences in clinical outcomes and in vitro tissue viability. Cell Tissue Bank. 2012;13(2):269-79.
6. Haslam IS, Roubos EW, Mangoni ML, Yoshizato K, Vaudry H, Kloepper JE, et al. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. Biol Rev Camb Philos Soc. 2014;89(3):616-55.
7. Leto Barone AA, Mastroianni M, Farkash EA, Mallard C, Albritton A, Torabi R, et al. Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization. Burns. 2015;41(3):565-74.
8. Zaidi AH, Nathan M, Emani S, Baird C, del Nido PJ, Gauvreau K, et al. Preliminary experience with porcine intestinal submucosa (CorMatrix) for valve reconstruction in congenital heart disease: histologic evaluation of explanted valves. J Thorac Cardiovasc Surg. 2014;148(5):2216-4.
9. Gubitosi A, Docimo G, Parmeggiani D, Pirozzi R, Vitiello C, Schettino P, et al. Acellular bovine pericardium dermal matrix in immediate breast reconstruction after Skin Sparing Mastectomy. Int J Surg. 2014;12 Suppl 1:S205-8.
10. Piccolo M, Piccolo N, Daher R, Daher S. Cicatrização e Cicatrizes. In: Lima Júnior EM, Novaes FN, Piccolo N, Serra MCVF. Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p.591-607.
11. Franco MLRS, Franco NP, Gasparino E, Dorado DM, Prado M, Vasco APD. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: histologia, composição e resistência. Arch Zootec. 2013;62 (237):21-32.
12. Sousa MLR, Santos HSL. Análise morfológica da pele da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) através da microscopia de luz. Rev Unimar. 1997;19(3):881-8.
13. Gen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. Pediatr Res. 2008;63(5):492-6.
14. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. Mater Today (Kidlington). 2008;11(5):26-35.
15. Hirth DA, Singer AJ, Clark RA, McClain SA. Histopathologic staining of low temperature cutaneous burns: comparing biomarkers of epithelial and vascular injury reveals utility of HMGB1 and hematoxylin phloxine saffron. Wound Repair Regen. 2012;20(6):918-27.
16. Andrade TA, Iyer A, Das PK, Foss NT, Garcia SB, Coutinho-Netto J, et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. Braz J Med Biol Res. 2011;44(10):1036-47.
17. Coudroy R, Jamet A, Peñuelas O, Thille AW. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative therapy? Intensive Care Med. 2015;41(6):1159-60.
18. Barascuk N, Vassiliadis E, Larsen L, Wang J, Zheng Q, Xing R, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen--A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. Clin Biochem. 2011;44(10-11):900-6.
19. Modak N, Tamgadge S, Tamgadge A, Bhalerao S. Comparative Study of Clinical Staging of Oral Submucous Fibrosis with Qualitative Analysis of Collagen Fibers Under Polarized Microscopy. Iran J Pathol. 2015;10(2):111-9.
20. Vilela ASB. Matriz extracelular de pericárdio fibroso porcino [Tese de doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2006.
21. Bucheim RL, Rosso MPO, Andreo JC, Bucheim DV, Okamoto R, Rodrigues AC, et al. A New Anionic Bovine Tendon as Scaffold for the Repair of Bone Defects: A Morphological, Histomorphometric and Immunohistochemical Study. Br J Med Med Res. 2015;10 (8):1-11.
22. Yamamoto K, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, Ikeda T, Yamada S, Hayashi Y. The characterisation of fish (Tilapia) collagen sponge as a biomaterial. Int J Polym Sci. 2015;2015.
23. Camargo AD, Camargo PC, Leal LM, Garcia Filho SP, Martins LL, Shimano AC, et al. Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (Cuniculus paca) a fresco e conservado em glicerina 98%. Pesq Vet Bras. 2014; 34(2):185-91.
24. Hilbig CC, Foclink DH, Maluf MLF, Boscolo WR, Feiden A. Resistência do couro de tilápia e composição centesimal da pele nas operações de ribeira e curtimento. Sci Agrar Paranaensis. 2013;12(4):258-66.

Titulação dos autores

Ana Paula Negreiros Nunes Alves – Professora Doutora do Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.
Maria Eliza Quezado Lima Verde - Graduanda em Odontologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE, Brasil.
Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior - Cirurgião dentista, aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, CE, Brasil.
Paulo Goberlânio de Barros Silva - Cirurgião dentista, aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, CE, Brasil.
Victor Pinheiro Feitosa - Cirurgião dentista, aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, CE, Brasil.
Edmar Maciel Lima Júnior - Médico, cirurgião plástico do Centro de Queimados do Instituto Dr. José Frota e Instituto de Apoio ao Queimado, Fortaleza, CE, Brasil.
Marcelo José Borges de Miranda - Coordenador Médico do SOS Queimaduras e Feridas, Hospital São Marcos, Recife, PE, Brasil.
Manoel Odorico de Moraes Filho - Professor Doutor do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Correspondência: Edmar Maciel Lima Júnior
Rua Visconde de Mauá, 1650 ap. 801 - Aldeota – Fortaleza, CE, Brasil - CEP 60.125-160- E-mail: edmarmaciel@gmail.com

Artigo recebido: 2/10/2015 • **Artigo aceito:** 15/12/2015

Local de realização do trabalho: Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

4.3. Estudo Pré-Clínico *In Vivo.*

Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras Lima-Junior EM, Picollo NS, Miranda MJB, Ribeiro WLC, Alves APNN, Ferreira GE, *et al*. Uso da pele de tilápia (Oreochromis niloticus), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**. 2017;16(1):10-17

Artigo Original

Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras

*The use of tilapia skin (*Oreochromis niloticus*), as an occlusive biological dressing, in the treatment of burn wounds*

*El uso de piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*), como apósito biológico oclusivo, en el tratamiento de quemaduras*

Edmar Maciel Lima-Junior, Nelson Sarto Picollo, Marcelo José Borges de Miranda, Wesley Lyeverton Correia Ribeiro, Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Guilherme Emílio Ferreira, Ezequiel Aguiar Parente, Manoel Odorico Moraes-Filho

RESUMO

Objetivo: Avaliar a utilização da pele de tilápia do Nilo como curativo oclusivo temporário nas queimaduras de segundo grau superficial e profunda em ratos. **Método:** Estudo prospectivo, qualiquantitativo, no qual foram utilizados 40 ratos machos Wistar submetidos à cirurgia para produção de queimadura, divididos aleatoriamente em quatro grupos: C1, no qual as feridas foram lavadas com solução salina; C2, no qual o curativo aberto foi tratado com sulfadiazina de prata a 1%; T1, queimadura de 2º grau superficial, tratado com curativo oclusivo utilizando a pele de tilápia; e T2, queimadura de 2º grau profundo, igualmente tratado com pele de tilápia. Os animais foram tratados e acompanhados por 22 dias. No último dia, os animais foram anestesiados para realização de biópsia, coleta de sangue e foram eutanasiados. **Resultados:** No dia 21, os grupos T1 e T2 demonstravam melhor delineamento dos bordos da ferida. O exame microscópico revelou que amostras dos grupos T1 e T2 eram representadas por tecido conjuntivo fibroso destituído de revestimento epitelial, exibindo infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário, com graus variados de intensidade, e permeado por ocasionais granulócitos polimorfonucleares neutrófilos restritos à região superficial. Nos grupos C2, T1 e T2 observava-se que o tecido conjuntivo profundo apresentava-se livre de inflamação. Os exames de sangue não apresentaram alterações significativas ($p<0,05$). **Conclusão:** A pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas induzidas por queimaduras nos ratos, interferindo positivamente no processo cicatricial. Estes resultados possibilitam o prosseguimento das investigações para pesquisas em seres humanos, para confirmação de sua segurança e eficácia como curativo biológico.

DESCRITORES: Queimaduras. Materiais Biocompatíveis. Cicatrização. Tilápia. Ferimentos e Lesões.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the use of tilapia skin as a temporary occlusive dressing in superficial and deep second degree burns in rats. **Methods:** A prospective, qualitative and quantitative study, in which 40 Wistar rats randomly divided into four groups and underwent surgery for burn production: C1, the wounds were washed with saline solution; C2, open dressing treated with silver sulfadiazine 1%; T1, superficial 2nd degree burn treated with an occlusive dressing of tilapia skin; and T2, deep 2nd degree burn also treated with tilapia skin. The animals were treated for 22 consecutive days. Blood was collected for hematological and biochemical tests on the last day and the animals were euthanized for histological analysis of the wound. **Results:** On day 21, groups T1 and T2 showed improved delineation of the wound edges. Microscopic examination revealed that samples of groups T1 and T2 were represented by fibrous connective tissue devoid of epithelial lining, displaying lymphoplasmacytic inflammatory infiltrate, with varying degrees of intensity, and permeated by occasional polymorphonuclear granulocytes neutrophils restricted to the surface area. In groups C2, T1 and T2 the deep connective tissue had no inflammation. Blood tests presented no significant changes ($p<0.05$). **Conclusion:** The tilapia skin showed good grip on the wounds caused by burns in the tested rats, interfering positively on the healing process and not causing significant changes in hematological and biochemical parameters. These results allow the continuation of the investigations to clinical trials to confirm the safety and efficacy of its use as a biological dressing.

KEYWORDS: Burns. Biocompatible Materials. Wound Healing. Tilapia. Wounds and Injuries.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el uso de la piel de tilapia del Nilo como un apósito oclusivo temporal en las quemaduras superficiales y profundas de segundo grado en ratones. **Método:** Un estudio prospectivo, cualitativo y cuantitativo, en donde fueron utilizados 40 ratones Wistar machos sometidos a cirugía para producción de quemadura, los cuales fueron divididos de manera aleatoria en cuatro grupos: C1, las heridas se lavaron con solución salina; C2, trató con sulfadiazina de plata al 1%; T1, quemadura de 2º grado superficial tratada con piel de tilapia; y T2, quemadura de 2º grado profunda tratada con piel de tilapia. Los animales fueron tratados y monitoreados durante 22 días. En el último día, fueron anestesiados para biopsia, extracción de sangre y sometidos a la eutanasia. **Resultados:** En el día 21, los grupos T1 y T2 mostraron una mejor delineación de los bordes de la herida. El examen microscópico reveló que los grupos T1 y T2 se representaban por tejido conectivo fibroso de revestimiento epitelial, enseñando infiltración inflamatoria histiolinfoplasmocitário, con diferentes grados de intensidad, y permeado con ocasionales granulocitos polimorfonucleares neutrófilos restringidas a la región superficial. En los grupos C2, T1 y T2 fue observado que el tejido conectivo profundo se presentaba libre inflamación. **Conclusión:** La piel de tilapia presentó una buena adhesión al lecho de las heridas inducidas por quemaduras en los ratones, interfiriendo positivamente en el proceso de cicatrización. Estos resultados permiten la continuación de las investigaciones para el estudio en humanos, para confirmar su seguridad y eficacia como un apósito biológico.

PALABRAS CLAVE: Quemaduras. Materiales Biocompatibles. Cicatrización de Heridas. Tilapia. Heridas y Lesiones.

INTRODUÇÃO

A queimadura é uma lesão dos tecidos orgânicos, em decorrência de um trauma de origem térmica, que varia desde uma pequena bolha até formas graves, capazes de desencadear respostas sistêmicas proporcionais à extensão e à profundidade. Podem levar à desfiguração, à incapacidade e até à morte[1].

Inúmeros estudos têm sido realizados procurando encontrar curativos que reduzam os efeitos da contaminação nas lesões, favoreçam o processo cicatricial e ofereçam melhores resultados estéticos. As coberturas, materiais ou produtos utilizados para tratar ou ocluir a ferida, impregnados ou não com agentes tópicos, podem ser primárias, quando colocadas diretamente sobre a lesão, ou secundárias, quando têm como função cobrir as coberturas primárias[2].

Nos curativos oclusivos podem ser utilizados substitutos temporários de pele, que são materiais eficazes no tratamento de queimaduras superficiais recentes e também na cobertura da pele, enquanto aguarda-se o enxerto definitivo. Podem ser trocados a intervalos regulares ou mantidos até a cicatrização ou enxerto, caso a aderência seja boa ou não haja infecção[2].

Os substitutos de pele têm sido considerados úteis no tratamento de queimaduras superficiais, pois reduzem a frequência de troca do curativo. Entretanto, esses materiais têm alto custo e não são eficazes para o tratamento de queimaduras profundas. Devido aos custos elevados dos curativos oclusivos sintéticos ou biossintéticos, tem-se buscado nos materiais biológicos alternativas para o tratamento local de feridas provocadas por queimaduras[3].

A pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) surge como um possível subproduto, com aplicabilidade clínica de novos biomateriais utilizáveis para bioengenharia. 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. A pele deste peixe é um produto nobre e de alta qualidade, pois possui resistência peculiar como couro, entretanto, não existem estudos que evidenciem sua resistência como pele não submetida ao curtimento[4].

A literatura reporta poucos trabalhos em que a pele de tilápia foi submetida ao processo de curtimento para confecção de luvas e de vestimentas. Testes mecânicos de tracionamento são descritos, conferindo o aproveitamento deste material, apesar da sua delgada espessura para este fim; no entanto, ainda não existem trabalhos publicados sobre a possibilidade de utilização desta pele como biomaterial, para recobrimento de feridas na pele humana por queimadura[4].

A caracterização da pele de tilápia do Nilo, a partir de suas propriedades histomorfológicas, tipificação do colágeno e características físicas (resistência à tração) foi realizada por pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará[3]. Concluiu-se que as características microscópicas da pele da tilápia são semelhantes à estrutura morfológica da pele humana, apresentando derme composta por feixes de colágeno compactados, longos e organizados, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical, predominantemente, do tipo I. A pele também demonstrou elevada resistência e extensão à tração em quebra.

Estes resultados puderam sinalizar a possibilidade de aplicação da pele da tilápia do Nilo como curativo biológico temporário em queimaduras. A realização de estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* deve fornecer informações preliminares de segurança e eficácia para que, posteriormente, sejam realizados estudos em seres humanos que comprovem os benefícios de sua utilização em pacientes com lesões causadas por queimaduras.

Inserido neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a avaliação da utilização da pele de tilápia do Nilo como curativo oclusivo temporário nas queimaduras de segundo grau superficial e profunda em ratos. O método de processamento, de descontaminação e de esterilização da pele da tilápia e sua aplicação em queimaduras e feridas foi registrado no INPI com o número BR102015021435 9.

MÉTODO

Tipo de Estudo e Local da Pesquisa

Trata-se de um estudo prospectivo, qualiquantitativo, realizado em laboratório do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil, no período de julho de 2015 a janeiro de 2016.

Aspectos Éticos

Todas as normas da Nomenclatura Anatômica Veterinária (1983) e os princípios éticos de experimentação animal do *International Council for Laboratory Animal Science* foram seguidos.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, sob o número de protocolo 48/2016.

Obtenção e Processamento das Amostras

As peles para os curativos oclusivos foram obtidas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes da piscicultura de Castanhão (Jaguaribara, CE), cultivadas em tanque rede, de juvenis até o peso de abate, entre 800 a 1000 g, recebendo ração comercial variando de 28 a 38% de proteína bruta. Os peixes foram insensibilizados por choque térmico (caixas isotérmicas com gelo moído e água, proporção 1:1) e, em seguida, realizada a sangria.

Após o abate, as peles foram removidas com uma turquesa (ferramenta) e, posteriormente, retiradas as escamas, submetidas à lavagem em água corrente, para a remoção de qualquer resquício de sangue e outras impurezas e colocadas em soro fisiológico (solução de NaCl a 0,9%) estéril, previamente resfriado a 4°C, para a limpeza final. 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 e obedecendo as etapas de esterilização, para transporte entre os municípios Jaguaribara e Fortaleza (Captação e Acondicionamento Inicial):

1ª Etapa - as peles foram colocadas em um recipiente estéril, contendo gluconato de clorexidina (solução com tensoativos) a 2%, onde permaneceram por 30 minutos.

2ª Etapa - após a operação anterior, as peles foram lavadas com soro fisiológico estéril e removidas para outro recipiente, contendo outra solução de gluconato de clorexidina a 2%, onde permaneceram por 30 minutos.

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 (trecho Jaguaribara-Fortaleza), numa caixa isotérmica contendo gelo.

As etapas seguintes realizadas no NPDM da UFC, em ambiente estéril, com fluxo laminar horizontal.

4ª Etapa - antes de 24h, as peles foram removidas da solução anterior, lavadas com soro fisiológico estéril e colocadas em um recipiente estéril e hermético, contendo 75% de glicerol, 25% de soro fisiológico (massagear 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 37ºC.

5ª Etapa - as peles foram removidas, lavadas com soro fisiológico estéril novamente e colocadas em outro recipiente estéril e hermético contendo 100% de glicerol (massagear as peles por 5 minutos nesta solução) e mantidas em banho-maria, na temperatura de 37ºC e 15 rotações por minuto, por mais 3 horas.

6ª Etapa - ao final da última etapa do glicerol, as peles foram recondicionadas em duplos envelopes plásticos estéreis, com dupla selagem e armazenadas a 4ºC. Após esta etapa, as peles foram enviadas para radioesterilização complementar, no Instituto de Pesquisa Energética Nuclear (IPEN-SP), em gama cobalto a 30 KGs. Quando as peles fossem ser usadas, eram removidas do envelope e lavadas por três vezes, em soluções diferentes de soro fisiológico estéril, por cinco minutos cada. Após este procedimento, as peles eram recortadas do tamanho da ferida e aplicadas como curativo oclusivo.

Foram realizados sete testes microbiológicos, para bactérias gram +, gram - e fungos, iniciando-se na pele *in natura* (antes da primeira etapa) e nas seis etapas descritas acima.

Grupos de Tratamento

Foram utilizados 40 ratos machos adultos jovens, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), procedentes do Biotério do NPDM, com peso corporal médio de 200 g, os quais foram previamente observados quanto às condições gerais de saúde, recebendo ração padrão para ratos e água *ad libitum*.

Os animais foram igualmente divididos, aleatória e probabilisticamente, em quatro grupos compostos por 10 animais cada, de acordo com o esquema terapêutico previamente determinado:

Grupo C1 (controle 1; n=10) - as feridas foram lavadas com solução de NaCl a 0,9%; Grupo C2 (controle 2; n=10) - foi feito curativo aberto com sulfadiazina de prata a 1%; Grupo T1 (tratamento 1; n=10; queimadura 2º grau superficial) - foi realizado curativo oclusivo com pele de tilápia, sendo suturado com fio de nylon 5-0; Grupo T2 (tratamento 2; n=10; queimadura 2º grau profundo) - utilizou-se curativo oclusivo com pele de tilápia, com sutura de fio de nylon 5-0.

Procedimento Cirúrgico para Produção das Feridas

Os ratos foram retirados das gaiolas, um por vez e pesados para calcular a dose anestésica. Em seguida, após a anestesia com administração intraperitoneal de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), os animais foram imobilizados em decúbito ventral, realizando-se a tricotomia digital dos pelos do dorso, em uma área de aproximadamente 16,0 cm² (4,0 cm x 4,0 cm). Em seguida, foi utilizado um gabarito de acetato de celulose, para demarcar na região dorsal (com caneta permanente) um quadrado de 3,0 x 3,0 cm. Posteriormente, procedeu-se à queimadura de 2º grau superficial e profunda, com chapa de alumínio de 9,0 cm² (3,0 cm x 3,0 cm), aquecida a 100ºC, pressionada na pele do dorso por 6 e 9 segundos, a depender do grupo. Após a cirurgia, os animais foram identificados de 1 a 10 dentro de seus respectivos grupos e mantidos em gaiolas individuais sem serragem, a uma temperatura média de 24ºC.

O padrão de feridas nos grupos C1, C2, T1 (queimadura a 100ºC por 6 segundos) resultou em queimadura de 2º grau superficial. No grupo T2 (queimadura a 100ºC por 9 segundos), o resultado foi uma queimadura de 2º grau profundo.

Tratamento das Feridas com Curativos Abertos (Grupos C1 e C2)

A partir do primeiro dia de pós-operatório, as feridas foram limpas diariamente com solução salina isotônica de NaCl (grupos C1 e C2), seguida, apenas no grupo C2, da aplicação de uma camada do antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, suficiente para cobrir as feridas por completo.

Tratamento das Feridas com Curativos Oclusivos (Grupos T1 e T2)

No pós-operatório, as feridas foram limpas com solução salina isotônica de NaCl, seguida nos grupos T1 e T2 da aplicação da pele de tilápia, fixada com fio de nylon, nas quatro extremidades, avaliadas a cada quatro dias, por um período de 22 dias. Caso a pele estivesse solta, era trocada por uma nova pele. Todos estes procedimentos foram realizados com os ratos em plano anestésico recomendado.

Avaliação Macroscópica

Os animais foram mantidos vivos e avaliados até o 22º dia. Foram realizadas avaliações dos dias D0, D5, D9, D12, D16, D19 e D21. O grupo controle C1 não possuía curativo, o que permitia a visualização e avaliação diária do ferimento; o grupo C2 realizou trocas diárias de curativos de sulfadiazina de prata; os grupos T1 e T2, como possuíam a pele da tilápia recobrindo o ferimento, foram avaliados a cada quatro dias com a abertura do curativo, que foi renovado quando necessário.

Coleta de Sangue e Avaliação de Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos

Após o tratamento, os animais foram anestesiados com uma associação de cloridrato de xilasina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (90 mg/kg) por via intraperitoneal, para coleta de sangue via punção

da veia cava abdominal para avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos grupos.

Retirada das Peças

Todos os animais foram eutanasiados por overdose anestésica (30 mg/kg de xilasina + 270 mg/kg de cetamina). Em seguida, nos grupos com curativos abertos, retirou-se um retalho de pele e de tela subcutânea contendo a ferida cicatrizada, em condições assépticas. Nos grupos do curativo oclusivo, fez-se a retirada da pele de tilápia e procedeu-se da mesma forma com a ferida.

Análise Histológica da Pele dos Ratos

As peças foram identificadas e fixadas em formol a 10%. Após a inclusão em parafina, o material foi cortado a 5 μm e corado pela técnica de hematoxilina e eosina. As lâminas foram analisadas sob microscopia ótica considerando-se a presença ou não de úlcera, disposição dos feixes das fibras colágenas, fenótipo e intensidade do infiltrado inflamatório e necrose.

Análise Estatística

Os resultados das avalições hematológicas e bioquímicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo Teste de Tukey usando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., California, USA), sendo o valor de $p<0,05$ considerado significante.

RESULTADOS

Na avaliação macroscópica nos quatro grupos em estudo, nos dias D0, D5, D9, D12, D16, D19 e D21, foram constatadas as seguintes diferenças:

Nos grupos T1 e T2 não foram necessárias trocas diárias de curativos, como nos grupos C1 e C2, em que a pele da tilápia permaneceu aderida ao leito da ferida. Somente renovou-se a pele quando os ratos removiam o curativo e destruíam a pele, o que aconteceu em oito ocasiões, de um total de 120 avaliações nos grupos T1 e T2 (Figura 1).

No grupo T1 e, especialmente, T2 observou-se presença de exsudato e crostas, especialmente após D12, conforme mostram as fotos destes grupos em D12, D16, D19 e D21 (Figura 1).

No D21 os grupos controles, C1 e C2, ainda apresentavam crostas e alguma presença de tecido de granulação.

Observou-se um melhor delineamento dos bordos da ferida no processo de cicatrização, nos grupos em tratamento com a pele da tilápia.

Com relação aos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Tabela 1), não foram verificadas quaisquer alterações significativas dos parâmetros bioquímicos dos animais tratados nos diferentes grupos ($p<0,05$), exceto para a ureia, que se apresentou discretamente aumentada nos grupos T1 e T2 em relação aos grupos controles, porém sem significância. Além disso, foi observado que os valores de glicose estavam acima do valor estabelecido para essa espécie de animal em todos os grupos, fato justificado pelas doses anestésicas.

Na análise histológica, o grupo controle negativo (queimadura a 100°C, 6 segundos, tratado com solução salina) apresentou derme constituída por tecido conjuntivo fibroso destituído de revestimento epitelial, recoberto por membrana fibrinogranulocítica, exibindo intenso infiltrado inflamatório neutrofílico na região mais superficial. Visualizaram-se, ainda, células inflamatórias linfoplasmocitárias em meio à proliferação de células fusiformes, além de hemácias extravasadas. Na profundidade, observou-se tecido muscular esquelético sem alterações histológicas (Figura 2A).

Os animais do Grupo C2, com queimadura a 100°C, por 6 segundos e tratados com sulfadiazina de prata a 1%, mostraram tecido conjuntivo fibroso destituído de revestimento epitelial exibindo, na superfície, membrana fibrinolítica associada a intenso infiltrado

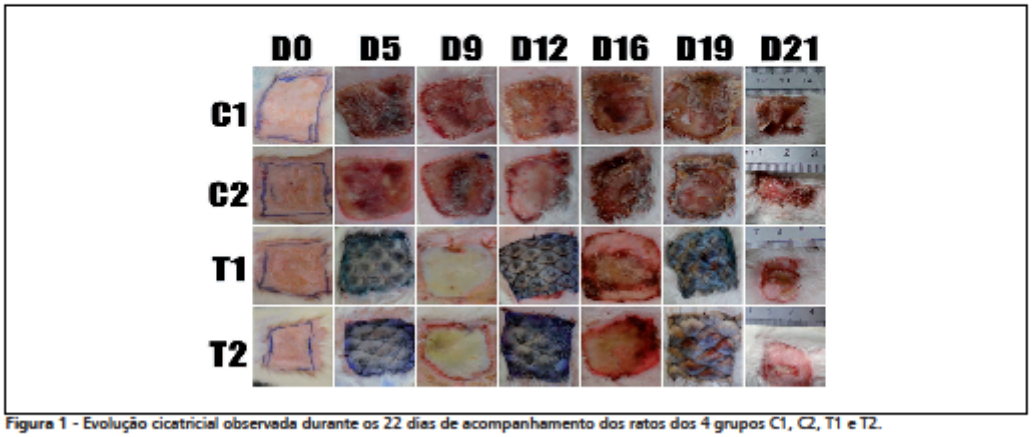


Figura 1 - Evolução cicatricial observada durante os 22 dias de acompanhamento dos ratos dos 4 grupos C1, C2, T1 e T2.

TABELA 1
Parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvergicus*) após queimadura a 100oC, em diferentes e tratamentos.

Parâmetro (unidade)	C1	C2	T1	T2
Leucócitos (109/l)	9,02±1.01	10,64±1,11	8,9±0,7	9,1±1,17
Linfócitos (109/l)	6,33±0,82	7,4±0,77	5,3±0,29	5,7±0,68
Monócitos (109/l)	0,73±0,07	0,45±0,11	0,77±0,1	0,71±0,12
Granulócitos (109/l)	2,29±0,25	2,69±0,32	2,75±0,49	2,68±0,43
RBC (1012/l)	8,66±0,11	7,93±0,20	7,63±0,25	8,02±0,13
HGB (g/dl)	15,18±0,11	14,34±0,28	14,03±0,34	14,38±0,22
HCT (%)	50,67±0,35	48,53±0,61	45,53±1	47,48±0,72
PLT (109/l)	903,7±22,69	856,3±28,32	916,6±33,62	944,8±37,18
BT (mg/dL)	0,038±0,00	0,034±0,00	0,031±0,00	0,037±0,00
BD (mg/dL)	0,02±0,01	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
ALT (U/L)	91,0±3,84	111±6,97	97,3±6,89	100,5±4,67
AST (U/L)	134,3±7,75	165,1±15,06	164±7,51	138,8±4,9
Creatinina (mg/dL)	0,47±0,02	0.37±0.01	0,44±0,02	0,46±0.03
Ureia (mg/dL)	52,78±1,24 A	60±2.21 A	67,1±3,25 B	73,9±2,27 B
Glicose (mg/dL)	196,3±13,05	216,6±14,66	173,1±8,28	193,5±12,01

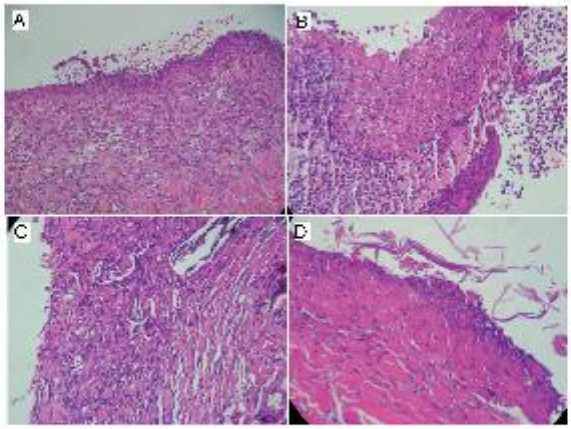


Figura 2 - A: Grupo C1 - úlcera e denso infiltrado inflamatório leucocitário misto; B: Grupo C2 - úlcera recoberta por membrana fibrinolítica e denso infiltrado inflamatório leucocitário misto; C: Grupo T1 - derme destituída de revestimento epitelial e com discreto infiltrado inflamatório mononuclear; D: Grupo T2 - derme sem epitélio de revestimento e com discreto infiltrado inflamatório mononuclear. HE; A - 100x; B - 200x; C - 200x; D - 200x.

leucocitário misto, com granulócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e hemácias extravasadas. Na profundidade, observavam-se feixes colagênicos espessos livres de inflamação (Figura 2B).

No grupo T1, com queimadura a 100°C, por 6 segundos e tratados com curativo biológico de tilápia, observou-se, nas amostras, tecido conjuntivo fibroso sem revestimento epitelial com intenso infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário em ninhos, os quais se estendiam por entre os feixes de colágeno. Em trechos, observavam-se granulócitos polimorfonucleares neutrófilos, predominantemente, na região superficial. Somente em duas amostras foi visualizado um infiltrado intensamente agudo (Figura 2C).

No Grupo T2, em que a queimadura foi igualmente a 100°C, mas por 9 segundos, a análise microscópica revelou tecido conjuntivo fibroso sem epitélio de revestimento, com discreto a moderado infiltrado inflamatório mononuclear (histiolinfoplasmocitário), com ocasionais granulócitos polimorfonucleares neutrófilos restritos à região superficial. Na profundidade o córion fibroso estava livre de inflamação (Figura 2D).

DISCUSSÃO

As feridas decorrentes de queimaduras caracterizam-se como uma solução de continuidade produzida em um tecido, dando lugar a um espaço anormal, à interrupção do fluxo sanguíneo, à perturbação da sensibilidade, ao acúmulo de elementos celulares mortos e a um grau maior ou menor de contaminação, com ou sem infecção. Uma vez estabelecido o dano tecidual, o organismo desencadeia uma complexa sequência de eventos, na tentativa de restaurar morfofisiologicamente o mesmo. Inicia-se um processo inflamatório agudo induzido pela própria lesão, seguido da regeneração das células parenquimatosas, migração, proliferação e remodelação de tecido conjuntivo, síntese proteica, colagenização e aquisição de força tensil[4].

Inúmeros fatores, sistêmicos e locais, podem interferir no processo de reparação tecidual. Um bom fluxo sanguíneo é exigência para uma cicatrização efetiva. Apesar do gradiente de hipóxia ser essencial para alguns eventos da cicatrização, as fases inflamatória e de síntese do colágeno são dependentes de uma perfusão adequada. Infecções causam atraso na regeneração tecidual[7].

Nas lesões de 2° e de 3° graus, com grande superfície corporal atingida, o tratamento clínico inclui reposição hídrica adequada, através de uma veia de grande calibre, controle da diurese (através de sonda vesical), suporte enteral (através de sonda nasogástrica ou enteral), para evitar a hemorragia digestiva e a translocação bacteriana, boa analgesia horária e, em alguns casos, antibioticoterapia. O tratamento cirúrgico vai desde os curativos, passando pela escarotomia e pela fasciotomia, pelos desbridamentos, pelas amputações, pelos enxertos, pelos retalhos fasciocutâneos, até os retalhos livres[7].

O tratamento das feridas causadas por queimaduras representa um desafio diário para a equipe de saúde multidisciplinar hospitalar. Estão disponíveis inúmeros tipos de curativos para o tratamento de queimaduras. Dentre eles, estão o alginato de prata, hidrogéis, curativos úmidos e a sulfadiazina de prata, creme amplamente utilizado atualmente nos serviços públicos de tratamento de queimados[1].

Em nosso país, na maioria dos centros de tratamento de queimados da rede pública, tem-se a seguinte conduta, em relação aos curativos: nas queimaduras de segundo grau é realizado diariamente o banho com clorexidina a 2% e o curativo é feito com o antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, até a completa reparação da lesão (2° grau superficial em torno de 12 dias e profundo entre 21 e 25 dias); nas lesões de terceiro grau é realizado o desbridamento do tecido necrótico em várias etapas (desbridamento sequencial), feito o curativo com sulfadiazina de prata a 1%, até a preparação do leito da ferida para a enxertia.

Na rede privada, em nosso país, este cenário se modifica e, dependendo do tipo de convênio ou das condições financeiras do paciente, são usados curativos biossintéticos e peles artificiais, todos importados e de elevado custo. Na Europa e nos Estados Unidos da América, são utilizadas, nestas lesões de 2° e de 3° graus, peles homólogas (através dos inúmeros bancos de pele), peles heterólogas, curativos biossintéticos e derme artificial para melhorar a sobrevida e ter boa recuperação funcional. Infelizmente, em um país com as dimensões do Brasil, há apenas em funcionamento três bancos de pele, sendo um em São Paulo (Hospital das Clínicas), um no Paraná (Hospital Evangélico) e o outro em Porto Alegre (Santa Casa de Misericórdia), uma vez que o único banco do Nordeste, localizado em Recife (IMIP), encontra-se desativado[1].

No entanto, publicações mais recentes demonstram que curativos biológicos e sólidos têm eficácia superior, notadamente nos quesitos: menor tempo de fechamento de feridas, maior taxa de reepitelização e redução de dor, e que não existem dados suficientes que suportem o uso e a eficácia de sulfadiazina de prata 1%[8,9].

Tais informações corroboram os resultados do presente trabalho, no qual não foi possível observar benefícios de utilização desta formulação na cicatrização das feridas em relação ao grupo controle que utilizou apenas solução fisiológica 0,9%, estimulando um intenso infiltrado inflamatório leucocitário misto, com presença de granulócitos polimorfonucleares neutrófilos.

Na busca por novas alternativas terapêuticas para queimados, vêm se destacando os curativos biocompatíveis e/ou biológicos. Bolsa amniótica, pericárdio e pele de porco já estão sendo utilizados, apresentando adequada biocompatibilidade e eficácia[10]. Neste contexto, surge a possibilidade de se aproveitar a pele da tilápia, que seria um produto de descarte, no intuito de ajudar este tratamento tão sintomático, podendo vir a ser uma opção de biomaterial de custo acessível.

Na pesquisa realizada pela equipe de pesquisadores do NPDM, foi observado que a pele da tilápia, quando submetida aos processos de esterilização química e de irradiação complementar, não apresenta variações quanto à sua estrutura microscópica e tensiométrica, recuperando sua consistência *in natura* após o processo de

reidratação[9]. Também já foi reportado na literatura que a glicerolização e a irradiação em curativos biológicos em doses moderadas possuem a capacidade de fixar os tecidos por meio de redução do fluido intersticial sem, no entanto, provocar degeneração[11].

Estudos histológicos da pele da tilápia demonstraram uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno[12]. O colágeno configura-se como um dos principais componentes dos biomateriais, devido à sua característica de orientar e de definir a maioria dos tecidos, além de possibilitar biodegradabilidade e biocompatibilidade, que favorecem a sua aplicação[13]. Desta forma, o detalhamento da quantidade e o tipo de colágeno presente constituem-se como uma das formas de caracterização de biomateriais.

Tang & Saito[14] demonstraram que o colágeno tipo I da pele da tilápia estimula Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGF), os quais expressam e liberam Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF), duas citocinas importantes e imprescindíveis para o fechamento das feridas.

O padrão de cicatrização observado nos grupos tratados com a pele da tilápia foi superior devido à sua capacidade de obstruir a ferida, minimizando exsudatos e a formação de crostas. No presente estudo, foram encontradas reações inflamatórias de intensidade leve a moderada nas feridas recobertas pelas peles de tilápia, com fenótipo mononuclear (histiolinfoplasmocitário), diferentemente da intensa resposta aguda observada nos grupos controle, interferindo positivamente no processo de cicatrização, confirmando o benefício de sua utilização.

Notadamente, a inflamação crônica é caracterizada por uma resposta proliferativa, em que os macrófagos desempenham funções importantes no processo de cicatrização associados com deposição de colágeno e neoformação vascular. Os macrófagos do tipo M2 expressam citocinas e fatores de crescimento importantes para a reparação tecidual.

Quanto aos parâmetros hematológicos e bioquímicos, os mesmos mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie estudada, com exceção da ureia, que se apresentou elevada nos grupos tratados, quando comparada aos resultados observados nos grupos controles. Variações deste parâmetro também já foram descritas por outros autores[15].

Outra exceção deve ser feita aos valores de glicose, que se apresentaram superiores aos valores de referência estabelecidos em todos os grupos estudados. Este achado pode ser explicado devido à ação hiperglicêmica do anestésico cloridrato de cetamina utilizado na indução anestésica dos animais[16].

O curativo ideal é aquele de fácil obtenção, de baixo custo, de fácil armazenamento, de estabilidade prolongada, que não apresenta antigenicidade, mas boa flexibilidade, resistência ao estiramento, aderência ao leito, boa adaptação ao contorno das feridas e facilitação dos movimentos articulares. Acrescenta-se, ainda, que o material deve ter aplicação em um único tempo cirúrgico, que seja de fácil manipulação, que suprima a dor, acompanhe o crescimento corporal e mantenha a temperatura do corpo.

Os curativos biológicos devem prevenir as perdas hidroeletrolíticas, evitando a contaminação bacteriana e promovendo a epitelização nas queimaduras de segundo grau superficial e profundo e propiciando a formação de adequado tecido de granulação, para enxertia, nas lesões de terceiro grau[1].

Estamos muito distantes de ter o substituto cutâneo temporário ideal. Alguns curativos heterólogos já foram testados e usados no Brasil, porém abandonados ao longo do tempo, seja pelo elevado custo de importação, como a pele porcina, ou pela falta de estudos científicos adequados, como a pele de rã ou pela transmissão de doenças animais, que todos podem causar, a não ser quando a pele é irradiada, aumentando os custos. Tecidos biológicos de origem animal, como a pele de cão, a pele de porco, a pele de rã, o pericárdio bovino e a camada submucosa de intestino de porco, têm sido utilizados em curativos oclusivos biológicos (heteroenxertos), nas lesões por queimaduras[17-20]. Entretanto, para a liberação e a utilização desses materiais, eles devem ser submetidos a rigorosos protocolos, para a identificação da sua real contribuição, segurança, eficácia e biocompatibilidade[1].

Os resultados obtidos no presente estudo possibilitam o prosseguimento das investigações para Ensaios Clínicos Fase I em seres humanos saudáveis e, posteriormente, para estudos Fase II e III em pacientes com queimaduras, para confirmação da segurança e eficácia de sua utilização, como uma alternativa de curativo biológico para tratamento destas feridas.

CONCLUSÃO

A pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas induzidas por queimaduras nos ratos testados, interferindo positivamente no processo cicatricial e não causando alterações relevantes nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de função renal e hepática, sendo um potencial curativo biológico para o tratamento desta natureza.

AGRADECIMENTO

Os autores gostariam de agradecer aos pesquisadores e pessoal de apoio técnico do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará e ao IPEN-SP; à ENEL, empresa financiadora da pesquisa; ao Instituto de Apoio ao Queimado, ONG que gerencia e coordena a pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Lima Júnior EM, Novaes FN, Piccolo NS, Serra MCVF. Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
2. Gomes FSL, Borges EL. Coberturas. In: Borges EL, Saar SRC, Lima VLAN, Gomes FSL, Magalhães MBB. Feridas: como tratar. Belo Horizonte: Coopmed; 2001. p. 97-120.
3. Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, Cooper ML. Effects of topical antimicrobial agents on the human neutrophil respiratory burst. Arch Surg. 1991;126(5):603-8.
4. Franco MLRS, Franco NP, Gasparino E, Dorado DM, Prado M, Vasco APD. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. Arch Zootec. 2013;62(237):21-32.

5. Alves APNN, Verde MEQL, Ferreira Júnior AEC, Silva PGB, Feitosa VF, Lima Júnior EM, et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. Rev Bras Queimaduras. 2015;14(3):203-210.
6. Boljiani A, Lima Júnior EM, Serra MCVF. Queimaduras: condutas clínica e quirúrgicas. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2013.
7. Lima Júnior EM, Serra MCVF. Tratado de Queimaduras. Rio Janeiro: Atheneu. 2004.
8. Aziz Z, Abu SF, Chong NJ. A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. Burns. 2012;38(3):307-18.
9. Heyneman A, Hoeksema H, Vandekerckhove D, Pirayesh A, Monstrey S. The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. Burns. 2016;42(7):1377-86.
10. Song G, Wu Y, Wang F, Shao Y, Jiang J, Fan C, et al. Development and preparation of a low-immunogenicity porcine dermal scaffold and its biocompatibility assessment. J Mater Sci Mater Med. 2015;26(4):170.
11. Zidan SM, Elsowa SA. Banking and use of glycerol preserved full-thickness skin allograft harvested from body contouring procedures. Burns. 2014;40(4):641-7.
12. Sousa MLR, Santos HSL. Análise morfológica da pele da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) através da microscopia de luz. Rev Unimar. 1997;19(3):881-8.
13. Cen L, Liu WEI, Cui LEI, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. Pediatr Res. 2008;63(5):492-6.
14. Tang J, Saito T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. Biomed Res Int. 2015;2015:139476.
15. Branco ACSC, Diniz MFFM, Almeida RN, Santos HB, Oliveira KM, Ramalho JA, et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas Georgia. Rev Bras Ciênc Saúde. 2011;15(2):209-14.
16. Braslasu MC, Braslasu ED, Bradatan C, Savulescu I, Gojmalestana R, Budai M, et al. Experimental studies regarding the diabetes mellitus induced in white wistar rats. Lucrari Stiintifice Med Vet. 2007;40:109-16.
17. Wei RT. Use of glycerol-preserved skin in plastic surgery. Burns. 1994;20 Suppl 1:S27-30.
18. Ramsey DT, Pope ER, Wagner-Mann C, Benj JN, Swaim SF. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. Am J Vet Res. 1995;56(7):941-9.
19. Leto Barone AA, Mastroianni M, Farkash EA, Mallard C, Albritton A, Tonabi R, et al. Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization. Burns. 2015;41(3):565-74.
20. Zaidi AH, Nathan M, Emani S, Baird C, del Nido PJ, Gauvreau K, et al. Preliminary experience with porcine intestinal submucosa (CorMatrix) for valve reconstruction in congenital heart disease: histologic evaluation of explanted valves. J Thorac Cardiovasc Surg. 2014;148(5):2216-4.

Titulação dos autores

Edmar Maciel Lima-Junior - Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM); Instituto Dr. José Frota, Centro de Tratamento de Queimados, Fortaleza, CE, Brasil.
Nelson Sarto Picollo - Pronto Socorro para Queimaduras, Centro de Atendimento, Goiânia, GO, Brasil.
Marcelo José Borges de Miranda - Hospital São Marcos/Rede Dor, SOS Queimaduras e Feridas, Recife, PE, Brasil.
Wesley Lyverton Correia Ribeiro - Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Fortaleza, CE, Brasil.
Ana Paula Negreiros Nunes Alves - Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Fortaleza, CE, Brasil.
Guilherme Emílio Ferreira - Universidade Christus - Unichristus, Curso de Medicina – Fortaleza, CE, Brasil.
Ezequiel Aguiar Parente - Universidade Christus - Unichristus, Curso de Medicina – Fortaleza, CE, Brasil.
Manoel Odorico Moraes-Filho - Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Fortaleza, CE, Brasil.

Correspondência: Edmar Maciel Lima-Junior
Rua Visconde de Mauá, 1650/501 – Aldeota – Fortaleza, CE, Brasil – CEP 60125-160 – E-mail: edmarmaciel@gmail.com

Artigo recebido: 6/5/2017 • **Artigo aceito:** 1/6/2017
Local de realização do trabalho: Universidade Federal do Ceará, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), Fortaleza, CE, Brasil.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver.

Fonte de financiamento: A pesquisa foi financiada pela ENEL através de um convênio com o Instituto de Apoio ao Queimado.

5. DISCUSSÃO

O tratamento das feridas causadas por queimaduras representa um desafio diário para a equipe de saúde multidisciplinar hospitalar. Estão disponíveis inúmeros tipos de curativos para o tratamento de queimaduras. Dentre eles, estão o alginato de prata, hidrogéis, curativos úmidos e a sulfadiazina de prata, creme amplamente utilizado atualmente nos serviços públicos de tratamento de queimados (LIMA JÚNIOR *et al*., 2008).

Em nosso país, na maioria dos centros de tratamento de queimados da rede pública, tem-se a seguinte conduta, em relação aos curativos: nas queimaduras de segundo grau, é realizado diariamente o banho com clorexidine a 2% e o curativo é feito com o antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, até a completa reparação da lesão (2º grau superficial em torno de 12 dias e profundo entre 21 e 25 dias). Na rede privada brasileira este cenário se modifica, dependendo do tipo de convênio ou das condições financeiras do paciente, são utilizados curativos biossintéticos e peles artificiais, todos importados e de elevado custo. Na Europa e nos Estados Unidos da América, são utilizadas, nestas lesões de 2º e de 3º graus, peles homólogas (através dos inúmeros bancos de pele), peles heterólogas, curativos biossintéticos e derme artificial para melhorar a sobrevida e ter boa recuperação funcional.

Publicações mais recentes têm demonstrado que curativos biológicos e sólidos têm eficácia superior, notadamente nos quesitos: menor tempo de fechamento de feridas, maior taxa de re-epiteliazação e redução de dor, e que não existem dados suficientes que suportem o uso e a eficácia de sulfadiazina de prata 1%. (AZIZ *et al*., 2012; HEYNEMAN *et al*., 2016). Tecidos biológicos de origem animal, como a pele de cão, a pele de porco, a pele de rã, o pericárdio bovino e a camada submucosa de intestino de porco, têm sido utilizados em curativos oclusivos biológicos (heteroenxertos), nas lesões por queimaduras (WAI, 1994; RAMSEY *et al*., 1995; ZAIDI *et al*., 2014; BARONE *et al*., 2015). Entretanto, para a liberação e a utilização desses materiais, eles devem ser submetidos a rigorosos protocolos, para a identificação da sua real contribuição, segurança, eficácia e biocompatibilidade.

Dando início à pesquisa com a pele da tilápia para esta finalidade, a primeira etapa foi estabelecer a forma de processamento e esterilização do material, para que, após isto, os estudos pudessem ser realizados. Este processo gerou os pedidos de patente nacional e internacional.

O primeiro artigo apresentado refere-se ao próximo passo, que foi estudar a microbiota dos peixes retirados do açude Castanhão, localizado em Jaguaribara, Ceará. Foram analisadas a cavidade oral e pele, a fim de caraterizar sua microflora e verificar se os peixes tinham algum tipo de infecção bacteriana que pudesse ser nociva aos seres humanos. 113 microorganismos foram isolados dentro das placas CPS (meio de cultura cromogênico) e ASA (ágar sangue), sendo os Gram-negativos os mais prevalentes. *Globicatella* Gram-positiva, *Streptococcus* e *Enterococcus* também foram encontrados. *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriacae* foram isoladas em todas as placas de estudo. *Enterococcus faecalis* Gram-positivo foi prevalente em 70 e 60% da pele e amostras orais, respectivamente. Em conclusão, ao considerar a ausência de sinais infecciosos nos peixes e uma carga inferior a 100.000 UFC, conforme padronizado pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), concluímos que os valores da CFU encontrados neste estudo consistiam de microflora normal, não infecciosa.

A predominância de bactérias gram-negativas em relação às gram-positivas, e a maior frequência de P. *Aeruginosa* corrobora com os achados de outros autores (SANTOS, 1981). O gênero *Aeromonas* foi o mais frequente, tendo sido isoladas *A. sobria, A. hydrophyla, A. veronii*, representando 17, 8 e 1% nas amostras de pele, e 16, 9 e 1% das amostras orais, o que também está de acordo com os achados de Santos. Foi demonstrado que a microflora de peixes de água fresca, em diversos países, foi composta de uma maior frequencia de espécies gram-negativas, geralmente composta por *Aeromonas spp., Acinetobacter spp., Micrococus spp., Pseudomonas spp.* e algumas espécis coliformes.

Rodrigues *et al*. (2007) também encontraram resultados similares aos deste estudo, exceto pela presença de *Vibrio spp*. em suas amostras.

Em nosso estudo, o gênero *Globicatella* esteve presente em 6 (30%) na pele e em 4 (20%) de amostras orais. Embora tenha sido pouco referida em publicações, a maior parte dos estudos associou sua presença com doenças humanas (10), e apenas 3 em animais, sendo cavalos e ovinos (ELSINGHORST.

2003; VELA *et al*., 2000; COLLINS *et al*., 1999).

Em seguida, a equipe de pesquisadores do NPDM realizou estudo para caracterizar a pele de tilápia do Nilo, a partir de suas características físicas (resistência a tração), histomorfológicas e da tipificação da composição do colágeno, trabalho que resultou na publicação do segundo artigo. Tais características são de extrema importância para que se obtenha um curativo biológico de qualidade para o tratamento de queimaduras. Nesse estudo, as etapas foram reproduzidas também em pele humana, doada de cirurgias plásticas, para efeito comparativo.

As características microscópicas da pele da Tilápia mostraram-se semelhantes à estrutura morfológica da pele humana apresentando derme composta por feixes de colágeno compactados, longos e organizados, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical, predominantemente, do tipo I. Tais achados mostraram-se semelhantes aos encontrados previamente na literatura (FRANCO *et al.*, 2013).

Concluiu-se que a pele de tilápia possui características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e elevada resistência e extensão à tração em quebra, o que suporta sua possível aplicação como biomaterial. A derme desta pele é composta por feixes organizados de fibras de colágeno denso, predominantemente do tipo I, o que traz considerável importância para seu uso clínico.

A maioria dos biomateriais, como pericárdio de porco, apresenta grande quantidade de colágeno tipo I (47%), do mesmo modo que a pele de tilápia (57%, no presente estudo). Sugere-se que este tipo de colágeno possua grande quantidade de grupos reativos, como aminas, ácidos carboxílicos e hidroxilas alcoólicas, que possibilitam alterações químicas do tecido, principalmente através de reações de reticulação e hidrólise seletiva, aumentando sua adaptação aos outros tecidos (VILELA, 2006; BUCHAIM *et al.*, 2015).

Os feixes de colágeno denso da pele da tilápia são dispostos, predominantemente, de forma paralela e transversal, diferindo da organização da derme humana, em que se encontram fibras com aumentada atividade colagênica em direções diversas. Esses aspectos poderiam contribuir para o entendimento da alta capacidade da pele humana em resistir a grandes cargas, no entanto, esta diferença no arranjo das fibras colágenas não parece interferir no parâmetro da

elasticidade da pele da tilápia, visto que os valores encontrados em ambas as peles no teste de extensão à tração, medida em centímetros, apresentaram médias semelhantes (média tilápia = 4,442 cm; média humana = 4,615 cm). Esta característica possibilitaria satisfatória manipulação da pele do peixe nas manobras de recobrimento e sutura, por exemplo.

Em relação aos valores encontrados nos testes de tração, poucas são as pesquisas reportadas na literatura que apresentam metodologia semelhante à deste estudo. Em avaliação prévia com peritônio de paca, um possível biomaterial de uso clínico, armazenadas em glicerol 98%, em períodos de até 30 dias, evidenciaram-se valores médios de carga máxima (16 N) e esforço a tração (2,8 N/mm²), inferiores ao encontrado para a pele de tilápia em teste, entretanto, com valores de deformação ligeiramente superiores (49%) (CAMARGO, 2015).

Quando comparados com a pele de tilápia submetida ao curtimento, os valores encontrados na literatura são em média superiores, como esperado, em que a pele curtida apresenta valores de carga máxima de 112 N, esforço à tração de 10,87 N/mm² e deformação de 75% (HILBIG, 2013).

Estes resultados sinalizaram e enriqueceram ainda mais a possibilidade de aplicação da pele da Tilápia do Nilo como curativo biológico em queimaduras e, assim, dando prosseguimento à pesquisa, foi realizado estudo com animais para avaliar pela primeira vez sua utilização *in vivo.*

O terceiro artigo tratou de avaliar a utilização da pele de tilápia do Nilo como curativo oclusivo temporário nas queimaduras de segundo grau superficial e profunda em ratos. Foram utilizados 40 ratos machos Wistar submetidos à cirurgia para produção de queimadura.

Observou-se que no dia 21, os dois grupos que utilizavam a pele da tilápia como curativo demonstravam melhor delineamento dos bordos da ferida. O padrão de cicatrização dos grupos tratados com a pele da tilápia foi superior devido a sua capacidade de ocluir a ferida, minimizando exsudatos e formação de crostas.

O exame microscópico revelou que amostras destes grupos eram representadas por tecido conjuntivo fibroso destituído de revestimento epitelial, exibindo infiltrado inflamatório histiolinfoplasmocitário, com graus variados de intensidade, e permeado por ocasionais granulócitos polimorfonucleares neutrófilos

restritos à região superficial. Observava-se que o tecido conjuntivo profundo apresentava-se livre de inflamação.

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos não diferiram entre os grupos tratados e controles, estando dentro dos padrões de normalidade para a espécie utilizada.

Tais achados demonstraram que a pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas induzidas por queimaduras nos ratos, interferindo positivamente no processo cicatricial. Além disso, a ausência valores significativamente alterados nos exames laboratoriais sinalizam a segurança da utilização da pele como curativo.

O curativo ideal é aquele de fácil obtenção, de baixo custo, de fácil armazenamento, de armazenamento prolongado, que não apresenta antigenicidade, boa flexibilidade, que apresenta resistência ao estiramento, boa aderência ao leito, que adapta-se ao contorno das feridas, que facilita os movimentos articulares, de aplicação em um único tempo cirúrgico, de fácil manipulação, que suprimi a dor, que acompanha o crescimento corporal, que não apresenta cicatrização viciosa. Além disto, e, principalmente, que previne perdas hidroeletrolíticas, que evita a contaminação bacteriana e que controla a temperatura corporal, além de promover a epitelização nas queimaduras de segundo grau superficial e profundo e propiciar a formação de adequado tecido de granulação, para enxertia, nas lesões de terceiro grau (HERSON, 2008).

O Ministério da saúde preconiza a existência de 13 Bancos de Pele em nosso país. Infelizmente, em um país com as dimensões do Brasil, há apenas em funcionamento três bancos de pele, sendo um em São Paulo (Hospital das Clínicas), um no Paraná (Hospital Evangélico) e o outro em Porto Alegre (Santa Casa de Misericórdia), uma vez que o único banco do Nordeste, localizado em Recife (IMIP), encontra-se desativado (LIMA JÚNIOR *et al*., 2008). Estes bancos suprem menos de 1% da necessidade de pele para o tratamento das queimaduras.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil jamais teve uma pele animal registrada na ANVISA e disponibilizada pelo Ministério da Saúde para o tratamento desta grave enfermidade. Os resultados apresentados pela equipe de pesquisadores do NPDM possibilitam o prosseguimento das investigações para pesquisas em seres humanos, para confirmação de sua segurança e eficácia como curativo biológico.

Estudos clínicos deverão dar continuidade à investigação, avaliando a qualidade do tratamento utilizando este produto em ensaios clínicos fase 1, para avaliar segurança e tolerabilidade, prosseguindo com estudos fase 2 e 3 para confirmar a eficácia do uso deste produto.

Trata-se da primeira pele de animal aquática do mundo para este tratamento e a primeira pele animal do Brasil. Um produto inovador e pioneiro, de fácil aplicação, que vem demonstrando bons resultados, devendo impactar diretamente na qualidade de vida dos pacientes queimados.

7. CONCLUSÃO

As pesquisas pré-clínicas realizadas pela equipe de estudos do NPDM resultaram na produção científica de três manuscritos que demonstraram que a pele de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) possui as características e propriedades necessárias para ser utilizada com segurança e eficácia, confirmando seu potencial como curativo biológico oclusivo para o tratamento de queimaduras em seres humanos.

REFERÊNCIAS

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.** 14(3):203-10, 2015

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.

AZIZ, Z.; ABU, S. F.; CHONG, N. J. A systematic review of silver-containing dressings and topical silver agents (used with dressings) for burn wounds. **Burns**, v. 38, n. 3, p. 307–318, 2012.

BANDA MJ; KNIGHTON DR; HUNT TK; WERB Z. Isolation of a nonmitogenic angiogenesis factor from wound fluid. **Proc Natl Acad Sci** U S A. 79:7773–7777, 1982.

BARONE, AAL.; MASTROIANNI, M; FARKASH, EA; MALLARD, C; ALBRITTON, A; TORABI, R; LEONARD, DA; KURTZ, JM; SACHS, DH; CETRULO JR, CL. Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization. **Burns**, v. 41, n. 3, p. 565–574, 2015.

BELLENZANI MCR; MATERA JM,; GIACÓIA MR. Homologous pericardium as a biological dressing for treatment of distal limb wounds in horses: an experimental study. **Acta Cir Bras**; 13:238-42, 1988.

BIONDO-SIMÕES MLP. Cicatrização. In: Silva Júnior OC, Zucoloto S, Beer Júnior A. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo, Robe, cap.23, p.265-75, 1998.

BOLGIANI, A & SERRA, MCVF. Quemaduras Condutas Clínica e Quirúrgicas. 2ª Edição, **São Paulo: Atheneu Editora**, 2013.

BRASIL. Diretrizes Metodológicas para Estudo de Avaliação Econômica de Tecnologia em Saúde para o Ministério da Saúde. 2007.

BUCHAIM, R. L., ROSSO, M. P. D. O., ANDREO, J. C., BUCHAIM, D. V., OKAMOTO, R., RODRIGUES, A. D. C., GOISSIS, G. A New Anionic Bovine Tendon as Scaffold for the Repair of Bone Defects: A Morphological, Histomorphometric and Immunohistochemical Study. 2015.

BURR HS, HARVEY SC, TAFFEL M. Bio-eletrics correlates of wounds healing. **Yale J Biol Med,** 11:10, 1938.

CAMARGO, A.D. Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (Cuniculus paca) a fresco e conservado em glicerina 98%. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 185-191, 2014.

CARREL A. The treatment of wounds. **J A M A**, 55:2148-50,1910.

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. 46p. 2006.

CASTAGNOLLI, N. Aquicultura para o ano 2000. Brasília: CNPq. 95p. 1996.

CHANDA J, RAO SB, MOHANTY M, MURALEEDHARAN CV, ARTHUR VL, BHUVANESHWAR GS, VALIATHAN MS. Use of glutaraldehyde-gentamicin-treated bovine pericardium as a wound dressing. **Biomaterials.** 15:68-70, 1994.

CHEM WYJ, ROGERS AA, LYDON MJ. Characterization of biologic properties of wound fluid collected during early stages of wound healing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 99, n. 5, p. 559-564, 1992.

COLLINS, M. D., JOVITA, M. R., LAWSON, P. A., FALSEN, E., FOSTER, G.Characterization of a novel Gram-positive, catalase-negative coccus from horses: description of Eremococcus coleocola gen. nov. sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1381-1385, 1999.

CROMACK DT, PORRAS-REYES B, MUSTOE TA. Current Concepts in Wound Healing Growth Factor and Macrophage Interaction**. Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 30, p. 129-133, 1990.

DANILLA, S. Epidemiologia das Queimaduras na América Latina. In: Tratamento de Queimaduras no Paciente Agudo. Lima Júnior, EM; Novaes; FN; Piccolo, NS & Serra MCV editores, 2ª. Edição, São Paulo: Atheneu Editora, 2008.

DIEGELMANN RF, COHEN LK, KAPLAN AM. The role of macrophages in wound repair: a review. Plastic and Reconstructive Surgery, v. 68, n. 1, p. 107-113, 1981.

ELSINGHORST, Th AM. First cases of animal diseases published since 2000. 5. Sheep. **Veterinary quarterly**, v. 25, n. 4, p. 165-169, 2003.

ESCUDERO MD, OTERO J, GAGO E. EL DONANTE DE TEJIDOS. In: Navidade-López A, Kulisevsky J, Caballero F. El donante de órganos y tejidos: evaluación y manejo. Barcelona: Springer; 1997. p. 508-20.

FERREIRA LKI, OLIVEIRA AF, GRAGNANI A, FERREIRA LM. Evidências no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n. 3, p. 95-99, 2010.

FISHEL RS, BARBUL, A, BESCHORNER, WE, WASSERKRUG, HL, EFRON, G. Lymphocyte participation in wound healing. Morphologic assessment using monoclonal antibodies. **Annals of surgery**, v. 206, n. 1, p. 25, 1987.

FRANCO M.L.R.S., FRANCO N.P., GASPARINO E., DORADO D.M., PRADO M., VESCO A.P.D. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. Archivos de zootecnia, v. 62, n. 237, p. 21-32, 2013.

FRANCO, MLRS.; FRANCO, NP.; GASPARINO, E.; DORADO, D.M.; PRADO, M. E VESCO, APD. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: Histologia, composição e resistência. **Archivos de zootecnia**, v. 62, n. 237, p. 21-32, 2013.

GOMES DR, SERRA MC, MACIEIRA L. Queimaduras no Brasil. In: Condutas atuais em queimaduras. **Rio de Janeiro: Revinter**. Condutas atuais em queimaduras. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p.1-3.

GOMES FSL, BORGES EL. Coberturas. In: Borges EL, Saar SRC, Lima VLAN, Gomes FSL, Magalhães MBB, eds. Feridas: como tratar. **Belo Horizonte: Coopmed**, 2001. p.97-120.

GOMES, RD; SERRA, MCVF; PELLON, MA. Queimaduras. **Rio de Janeiro: Revinter**; 1995.

HANSBROUGH JF, ZAPATA-SIRVENT RL, COOPER ML. Effects of topical antimicrobial agents on the human neutrophil respiratory burst. **Archives of Surgery,** v. 126, n. 5, p. 603-608, 1991.

HANSBROUGH, J. F.; ZAPATA-SIRVENT, R.; HOYT, D. Postburn Immune Suppression: An Inflammatory Response to the Burn Wound?. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 30, n. 6, p. 671-675, 1990.

HERSON, MR. Enxertos Homólogos. In: Tratamento de Queimaduras no Paciente Agudo. Lima Júnior, EM; Novaes; FN; Piccolo, NS & Serra MCV editores, 2ª. Edição, **São Paulo: Atheneu Editora**, 2008.

HEYNEMAN, A.; HOEKSEMA, H.; VANDEKERCKHOVE, D.; PIRAYESH, A.; MONSTREY, S. The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. **Burns**, v. 42, n. 7, p. 1377-1386, 2016.

HILBIG, C.C. Resistência do couro de tilápia e composição centesimal da pele nas operações de ribeira e curtimento. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 4, p. 258-266, 2013.

JIA X, ZHU Z, KONG Q. Storage temperature and skin xenograft survival. **Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery],** v. 33, n. 3, p. 184-185, 1995.

KAVANAGH S; JONG A. Nursing Committee of the International Society for Burn Injuries. Care of burn patients in the hospital. **Burns**. 30(8):A2-6, 2004.

KNIGHTON DR, SILVER LA, HUNT TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery**, v. 90, n. 2, p. 262-270, 1981.

KUMAR, V; ABBAS, AK & ASTER, JC. Inflamação e Reparo (pp 29-74) In: Patologia Básica Robbins, 9ª. Edição, **São Paulo: Elsevier Editora,** 2013.

LIMA JÚNIOR EM. Rotina de atendimento ao queimado. **Fortaleza: Gráfica LCR**; 2009.

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: 10.12662/2317-3076. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 193-197, 2016.

LIMA JÚNIOR, EM; NOVAES; FN; PICCOLO, NS; SERRA MCV editores. Tratamento de Queimaduras no Paciente Agudo, 2ª. Edição, São Paulo: Atheneu Ed., 2008.

LINDE LG. Reabilitação de crianças com queimaduras. In: Tecklin JP, ed. Fisioterapia pediátrica. 3ª ed. **Porto Alegre: Artmed**; 2002. p.384-422.

MAGALHÃES HP. Técnica cirúrgica e cirurgia experimental. **São Paulo: Sarvier**, 1983; cap. 17, p. 191-9.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Seminário discute uso do álcool gel para prevenir queimaduras. Disponível em: http;www.portal.saude.gov.br/ portal/aplicações/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=7032 Acesso em 6 de fevereiro de 2015.

ORGILL D; DEMLING RH. Current concepts and approaches to wound healing. **Critical Care Medicine**, v. 16, n. 9, p. 899-908, 1988.

PEIXOTO R, SANTOS DLN. Biofill: uso e avaliaçäo clínica de uma película celulósica em lesöes cutâneas**. Rev. bras. cir**, v. 78, n. 2, p. 141-5, 1988.

PICCOLO NS, PICCOLO MTS, PICCOLO MS, DE PAULA PRS. Xenoenxerto. In: Gomes DR. Queimaduras**. Rio de Janeiro: Revinter**; 1995. p. 153-8.

PICCOLO, MTS; PICCOLO, NS; PICCOLO, MS;DAHER, RP; DAHER, SP. Cicatrização e Cicatrizes, pp 591-606. In: Tratamento de Queimaduras no Paciente Agudo (Lima Júnior, EM; Novaes; FN; Piccolo, NS & Serra MCV editores), 2ª. Edição, **São Paulo: Atheneu Editora,** 2008.

PICCOLO, NS; PICCOLO, MS; PICCOLO, MTS; LIMA JÚNIOR, EM; NOVAES, FN. Uso da Pele de Rã como Curativo Biológico para Cobertura Temporária de Lesões por Queimaduras. In: Tratamento de Queimaduras no Paciente Agudo. Lima Júnior, EM; Novaes; FN; Piccolo, NS & Serra MCV editores, 2ª. Edição, **São Paulo: Atheneu Editora**, 2008.

PREVEL DC; EPPLEY LB; SUMMERLIN DJ; SIDNER R; JACKSON JR; MCCARTY M; BADYLAK SF. Small intestinal submucosa: utilization as a wound dressing in full-thickness rodent wounds. **Annals of plastic surgery**, v. 35, n. 4, p. 381-388, 1995.

RAMSEY DT, POPE ER, WAGNER-MANN C. Effects of three occlusive dressing materials on healing of full-thickness skin wounds in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 56, n. 7, p. 941-949, 1995.

RICHTERS CD, HOEKSTRA MJ, VAN BAARE J, DU PONT JS, KAMPERDIJK EW. Immunogenicity of glycerol-preserved human cadaver skin in vitro. **Journal of Burn Care & Research**, v. 18, n. 3, p. 228-233, 1997.

RODRIGUES JM, MEDEIROS AC. Tratamento de queimaduras do dorso de ratos com pele de rã como curativo biológico. In: 9º Congresso de Iniciação Científica. UFRN 1998, Natal. Anais do 9º Congresso de Iniciação Científica da UFRN. **Imprensa Universitária**; 1998, p. 49.

RODRIGUES, E. Pesquisa de aeromonas spp. em tilápia (Oreochromis niloticus), cultivada no estado do Rio de Janeiro-Brasil: isolamento, identificação de espécies e avaliação da sensibilidade antimicrobiana. **Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense**, p. 98-99, 2007.

SAI KP, REDDY PN, BABU M. Investigations on wound healing by using amphibian skin**. Indian journal of experimental biology**, v. 33, n. 9, p. 673-676, 1995.

SANTOS, C. A. M. storage of tropical fish in ice--a review. **Tropical science**, 1981.

SERRANO, LG. Reposición Cutánea: Heteroinjertos, Homoinjertos y Autoijertos. In: Quemaduras Condutas Clínica e Quirúrgicas. Lima Júnior, EM; Novaes; FN; Piccolo, NS & Serra MCV editores, 2ª. Edição, **São Paulo: Atheneu Editora**, 2013.

SILVA SC, JUNIOR SCS. Queimaduras: tratamento local. In: Raia AA, Zerbine EJ. Clínica cirúrgica Alípio Correia Netto. 4ª ed. **São Paulo: Sarvier**; 1988. p. 217-35.

SILVEIRA JMS, GOMES DR, SERRA MC. Atendimento pré-hospitalar. In: Maciel E, Serra MC, eds. Tratado de queimaduras. 1ª ed**. São Paulo: Atheneu**; 2004. p.51-63.

SOEDA J; INOKUCHI S; UENO S; YOKOYAMA S; KIDOKORO M; NAKAMURA Y; KATOH S; SAWADA Y; OSADA M; MITOMI T. Use of cultured human epidermal allografts for the treatment of extensive partial thickness scald burn in children. **Tokai journal of experimental and clinical medicine**, v. 18, n. 1, p. 65-70, 1993.

VAN BAARE J; LIGTVOET EE; MIDDELKOOP E. Microbiological evaluation of glycerolized cadaveric donor skin. **Transplantation**, v. 65, n. 7, p. 966-970, 1998.

VELA, A. I., FERNÁNDEZ, E., LAS HERAS, A., LAWSON, P. A., DOMÍNGUEZ, L., COLLINS, M. D., FERNANDEZ-GARAYZABAL, J. F. Meningoencephalitis Associated withGlobicatella sanguinis Infection in Lambs. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4254-4255, 2000.

VILELA, A. S. B. Matriz extracelular de pericárdio fibroso porcino. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006.

WAI RTJ. Use of glycerol-preserved skin in plastic surgery. **Burns**, v. 20, p. S27-S31, 1994.

WARD R.S., SAFLLE J.R.. Topical agents in burn and wound care. **Physical Therapy**, v. 75, n. 6, p. 526-538, 1995.

WARDEN, G.D. Tratamento Ambulatorial das Lesões Térmicas*.* **Clin. Cir. Am. Norte**. Interlivros*,* 1: 155. 1987.

WYATT D & MCGOWAN DN. Comparison of hydrocolloid dressing and silver sulfadiazine cream in the outpatient management of second degree burns. **J Trauma** 1990; 30(7):857-65.

ZACHARIOU Z. Amniotic membranes as prosthetic material: experimental utilization data of a rat model**. Journal of pediatric surgery**, v. 32, n. 10, p. 1458-1463, 1997.

ZAIDI, A. H.; NATHAN, M.; EMANI, S.; BAIRD, C.; PEDRO, J.; GAUVREAU, K.; HARRIS, M.; SANDERS, S. P.; PADERA, R. F. Preliminary experience with porcine intestinal submucosa (CorMatrix) for valve reconstruction in congenital heart disease: histologic evaluation of explanted valves. **The Journal of thoracic and cardiovascular surgery**, v. 148, n. 5, p. 2216–2225, 2014.