



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**FERNANDA SOARES MACEDO**

**CURATIVO PELE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) MODULA A FASE  
INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS  
SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS**

**FORTALEZA**

**2021**

FERNANDA SOARES MACEDO

CURATIVO PELE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) MODULA A FASE  
INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS  
SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS

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

Orientador: Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientador: Profa. Dra. Marisa Jadna Silva Frederico

FORTALEZA

2021

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)

---

M121c Macedo, Fernanda.  
CURATIVO PELE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) MODULA A FASE  
INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM  
CAMUNDONGOS / Fernanda Macedo. – 2021.  
85 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Nylane Maria Nunes de Alencar.

Coorientação: Prof. Dr. Marisa Jadna Silva Frederico.

1. Pele de tilápia. 2. Cicatrização. 3. Inflamação. 4. Queimaduras. 5. Remodelamento Tecidual. I. Título.

CDD 615.1

---

FERNANDA SOARES MACEDO

CURATIVO PELE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) MODULA A FASE  
INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS  
SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Prof. Dra. Jacqueline Ramos Machado Braga  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)

---

Prof. Dra. Tamiris de Fátima Goebel de Souza  
Centro Universitário Estácio do Ceará (ESTÁCIO/FIC)

A Deus, o farol que ilumina a minha vida.

À Nossa Senhora, o maior exemplo de resiliência da história.

Aos meus pais e meu irmão, pois não estaria aqui sem eles.

Aos meus amigos pelo apoio incondicional.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me sustentar como filha. Por iluminar cada passo de minha vida, trazendo toda proteção, força e coragem para enfrentar cada obstáculo.

À Nossa Senhora, a mãe de todas mães, a quem consagrei esse trabalho e toda minha vida.

Aos meus pais Rosa de Lourdes e John Valber e meu irmão Fernando Soares, que são a base de tudo aquilo que sou hoje e sonham comigo cada projeto de minha vida. Por todo amor e paciência, por enfrentarem comigo todos meus medos e incertezas. Por não medirem esforços e renunciarem a inúmeros sonhos para que eu chegasse até aqui.

A minha orientadora professora Dra. Nylane Alencar, por absolutamente tudo o que tem me ensinado como profissional e como pessoa. Por ter me confiado esse projeto e acreditado em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava. Por cuidar tão bem de toda nossa equipe, manter o nosso clima sempre muito saudável e conduzir como uma grande família. Obrigada por tudo!

Aos membros desta banca examinadora: professor Dr. Odorico Moraes, que juntamente com o Dr. Edmar Maciel diariamente lutam e levam a frente todas as pesquisas desse projeto tão inovador e que transforma inúmeras vidas. Obrigada a cada um por tão gentilmente nos integrar em seu grupo de pesquisa e confiar este trabalho tão importante. A professora Dra. Jacqueline Braga, que além da parceria científica, se tornou uma grande amiga, colaboradora e inspiração como profissional. A professora Dra. Tamiris Goebel, no qual tanto me ensinou e moldou, eu não teria chegado até aqui sem o seu apoio incondicional, abraçando essa luta comigo.

A minha co-orientadora professora Marisa Jadna, por toda paciência, ensinamentos, apoio e conselhos.

Ao Dr. Carlos Paier e Dr. Felipe Rocha e todos os estudantes de iniciação científica do laboratório de Cicatrização, que são verdadeiras forças motrizes em todo projeto com a pele da tilápia. Obrigada por todo conhecimento e disponibilidade em sempre ajudar.

Aos professores que participaram da banca de qualificação, que tanto enriqueceram e colaboraram com este trabalho: Roberta Jeane, Ingrid Figueiredo e Paulo Goberlânio.

As minhas incríveis amigas pós-graduandas, companheiras de laboratório e de vida Gisele Rangel, Bianca Kurita, Taiana Pierdoná, Kayanne Ferreira e Marília Nunes. Obrigada

pelo companheirismo, sorrisos diário e ajuda em todos os aspectos. Obrigada por serem verdadeiros anjos na minha estrada.

Aos nossos técnicos Patricia Samara e Dr. Manuel Monteiro pelo companheirismo e por diariamente contribuírem com bom funcionamento de nosso laboratório, garantindo a boa execução de todos nossos projetos.

A todos os nossos estudantes de iniciação científica que estão ou estiveram em nosso laboratório, Rebeca Duarte, Liviane Rabelo, Anderson Dantas, Carol Oliveira, Brenda Uchôa, Gracinha Gomes e Rafael Lopes, que lutam como verdadeiros soldados incessantemente ao nosso lado em todas batalhas, para que cada uma de nossas pesquisas aconteçam. Falta-me palavras para agradecer a imensa contribuição e amizade de cada um.

A profa. Ana Paula Negreiros, por toda realização da avaliação histológica deste trabalho, pela atenção e contribuição científica. Além de todo o seu maravilhoso time que tanto me ajudou e contribuiu significativamente para os resultados desse trabalho: Débora, Dayrine, Ernando, Osias, Elisa e o professor Paulo Goberlânio (Paulinho), que foi membro da banca de qualificação e colaborador deste trabalho.

A todos professores do programa de Farmacologia que tanto contribuíram com seus ensinamentos, em especial ao nosso querido coordenador de pós-graduação prof. Dr. Roberto César.

Aos meus amigos de todas as horas, que sempre estão ao meu lado, me alegrando e apoiando minha jornada Dayanne Feitosa, Najla Walerya, Lara Lucena e George Nascimento.

A todos os meus amigos e colegas de pós-graduação, pelas reflexões, apoio e leveza.

A Kelly e o Pedro do laboratório de Neurociências e Comportamento por sempre tão gentilmente me ajudar com a microscopia.

Ao veterinário e amigo Dr Wesley Lyeverton, por todo apoio e ensinamentos execução de projetos com animais, bem como toda equipe de funcionários e técnicos do biotério do NPDM e DFF. Em especial a Marta, Regis, Graziely, Allison, Augusto, Diego, seu Francisco, seu Adalto e seu Moreira, que não economizaram esforços em ajudar toda vez que o protocolo era executado. Minha sincera gratidão a todo esse time.

As nossas secretárias Laura e Milena, e demais funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do NPDM, por toda atenção e prestatividade.

Aos nossos órgãos de fomento CAPES, FUNCAP e CNPq pelo apoio financeiro e manutenção de toda a pesquisa.

“Que haja uma luz nos lugares mais escuros,  
quando todas as outras luzes se apagarem”  
(J.R.R.Tolkien)

## RESUMO

### **CURATIVO PELE DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) MODULA A FASE INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DA CICATRIZAÇÃO DE QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS**

As queimaduras são um problema de saúde pública global, responsável por cerca de 180.000 mortes anuais e danos de ordem psicológica e social. A pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) possui características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e elevada resistência à tração, o que suporta sua possível aplicação como biomaterial. Estudos demonstraram que o curativo oclusivo de pele de tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas causadas por queimaduras de segundo grau superficiais, em animais e em humanos, minimizou o exsudato e a formação de crosta interferindo positivamente no processo cicatricial. Contudo ainda não existem estudos que avaliem o mecanismo de ação cicatrizante da pele da tilápia. Neste sentido o estudo avaliou o mecanismo de ação do curativo oclusivo da pele da tilápia irradiado e liofilizado em queimaduras superficiais de 2º grau produzidas em camundongos *Swiss* fêmeas (22g ± 3,0g). Os animais foram submetidos a queimadura superficial (100°C/ 6seg) induzida por placa inoxidável (1,5 cm<sup>2</sup> de diâmetro). Imediatamente após a lesão os animais foram divididos randomicamente em grupos (8-10 animais) e os tratamentos foram iniciados: (1) Grupo Controle Negativo (*Sham*): receberam solução fisiológica 0,9% uma vez ao dia; (2) Grupo Sulfadiazina de Prata 1% (Sulfa): receberam aplicação diária do creme (3) Pele de tilápia: animais tratados com curativo oclusivo de pele de tilápia liofilizada e irradiada a 25K Gy. Foram avaliados no 3º, 7º e 14º dia de tratamento o percentual das contrações das lesões, edema e hiperemia; parâmetros histológicos por coloração H&E e *Picrosirius red* (polarizado e não polarizado); mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10) e níveis dos fatores de crescimento TGF- $\beta$  e VEGF. O curativo preparado com a pele de tilápia para tratar queimaduras superficiais foi capaz de acelerar o processo de contração da queimadura por meio da alta produção de fatores de crescimento, aumento dos níveis de colágeno total e maior conversão do colágeno do tipo III para o tipo I, assim como possui uma provável atividade anti-inflamatória através da redução de infiltrado inflamatório, redução de MPO, MDA, das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e KC e aumento de IL-10. Dessa forma, esse trabalho suporta as possíveis vias de atuação do curativo pele de tilápia nas fases da cicatrização, assim como reforça a sua utilização na medicina regenerativa como um biomaterial.

**Palavras-chave:** Pele de tilápia. Cicatrização. Inflamação. Queimaduras. Remodelamento Tecidual.

## ABSTRACT

### **NILE TILAPIA SKIN (*Oreochromis niloticus*) DRESSING MODULATES THE INFLAMMATORY AND PROLIFERATIVE PHASE OF WOUND HEALING IN SUPERFICIAL BURNS IN MICE**

Burns is a global public health problem, responsible for about 180,000 annual deaths and psychological and social damage. Tilapia skin (*Oreochromis niloticus*) has microscopic characteristics similar to the morphological structure of human skin and high resistance to traction, which supports its possible application as a biomaterial. Studies have shown that the tilapia skin occlusive dressing showed good adhesion on the bed of wounds caused by superficial second-degree burns, in animals and humans, minimized exudate, and the formation of crust, positively interfering in the healing process. However, there are still no studies that evaluate the mechanism of healing action of tilapia skin. In this sense, the study evaluated the mechanism of action of the occlusive dressing of the irradiated and lyophilized tilapia skin in 2nd-degree superficial burns produced in female Swiss mice ( $22g \pm 3.0g$ ). The animals were subjected to superficial burn ( $100^{\circ}\text{C} / 6\text{sec}$ ) induced by a stainless plate ( $1.5 \text{ cm}^2$  in diameter). Immediately after the injury, the animals were randomly divided into groups (8-10 animals) and treatments were started: (1) Negative Control Group (Sham): received 0.9% saline solution once a day; (2) Silver Sulfadiazine Group 1% (Sulfa): received daily application of the cream (3) Tilapia skin: animals treated with lyophilized tilapia skin occlusive dressing irradiated at 25KGy. The percentage of lesion contractions, edema, and hyperemia were evaluated on the 3rd, 7th, and 14th days of treatment; histological parameters by H&E and Picrosirius red (polarized and non-polarized); inflammatory mediators (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC and IL-10) and levels of TGF- $\beta$  and VEGF growth factors. The dressing prepared with tilapia skin to treat superficial burns was able to accelerate the process of contraction of the burn through the high production of growth factors, increased levels of total collagen and greater conversion of type III collagen to type I, as well as having a probable anti-inflammatory activity through the reduction of inflammatory infiltrate, reduction of MPO, MDA, of the cytokines IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and KC and increase of IL-10. Thus, this work supports the possible ways in which the tilapia skin dressing can act during the healing phases, as well as reinforcing its use in regenerative medicine as a biomaterial.

**Keywords:** Tilapia skin. Healing. Inflammation. Burns. Tissue Remodeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da pele.....	14
Figura 2	Camadas da epiderme.....	15
Figura 3	Profundidade da queimadura.....	18
Figura 4	Zonas de lesão da queimadura.....	19
Figura 5	Fases do processo de cicatrização.....	20
Figura 6	Interface da pele de tilápia limpa após o processo de filetagem.....	29
Figura 7	Paciente submetido ao tratamento com a pele de tilápia.....	31
Figura 8	Representação esquemática da indução de queimadura superficial.....	37
Figura 9	Representação do protocolo experimental.....	38
Figura 10	Percentual da contração das queimaduras superficiais induzidas em camundongos Swiss e submetidas aos tratamentos com soro fisiológico a 0.9% ( <i>Sham</i> ), Sulfadiazina de prata a 1% (Sulfa) e pele liofilizada e irradiada de tilápia do Nilo.....	47
Figura 11	Evolução representativa das lesões por queimadura tratadas com o curativo de pele de tilápia do Nilo durante 14 dias de avaliação.....	48
Figura 12	Contagem de leucócitos por campo após tratamento com o curativo pele de tilápia no 3º dia em queimaduras experimentais.....	49
Figura 13	Fotomicrografia de área ulcerada na pele de camundongo no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	51
Figura 14	Fotomicrografias de área ulcerada na pele de camundongo no 7º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	51
Figura 15	Fotomicrografia do epitélio na pele de camundongo com queimadura superficial no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	53

Figura 16	Deposição de colágeno total, tipo I e tipo III em queimaduras no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	55
Figura 17	Fotomicrografia da pele de camundongo representando a deposição de colágeno total e tipo I em queimadura superficial após no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	56
Figura 18	Fotomicrografia da pele de camundongo representando a deposição de colágeno total e tipo I em queimadura superficial no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	57
Figura 19	Níveis da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais.....	58
Figura 20	Níveis de malonaldeído (MDA) e glutathiona sintetase (GSH) no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais.....	59
Figura 21	Níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10 no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	61
Figura 22	Níveis de TGF- $\beta$ e VEGF no 7º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	62
Figura 23	Níveis de TGF- $\beta$ e VEGF no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia.....	63

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Parâmetros	histológicos	para	análise	por	
	H&E.....					40

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Representação por escores da análise de edema e hiperemia.....	48
Tabela 2	Representação por escores da análise histológica das queimaduras superficiais.....	50
Tabela 3	Representação por escores da análise de reepitelização.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha$ -SMA	actina-alfa de músculo liso
ABA	<i>American Burn Association</i>
CEUA	Comissão de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal do Ceará
CONCEA	Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DNOCS	Departamento Nacional de Obras Contra a Seca
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento fibroblastos
GAGs	Glicosaminoglicanos
GSH	Glutathiona reduzida
HE	Hematoxilina e eosina
ICAM1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IPEN-SP	Instituto de Pesquisa Energética Nuclear
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
MAPK	Proteína quinases ativadas por mitogênio
MCPs	Peptídeos de colágeno marinho
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MPO	Mieloperoxidase
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBM	Fotobiomodulação

PBS	Solução salina tamponada
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG	Poli(etilenoglicol)
PGE2	Prostaglandina E2
PSR	Picrosirius red
PVA	Álcool polivinílico
RENAME	Relação de Medicamentos Essenciais
SCQ	Superfície corporal queimada
SELE	e-selectina
SVF	Fração vascular estromal
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TLRs	Receptores Toll-Like
TMB	3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine
TNF- $\alpha$	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
VCAM1	molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Morfologia da pele</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2 Queimaduras</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2.1 Cicatrização de queimaduras</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3. Curativo biológico de pele de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	<b>29</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1. Objetivos específicos</b> .....	<b>34</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1. Obtenção da pele de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2. Esterilização da pele de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3. Procedimento cirúrgico de indução de queimaduras superficiais em camundongos</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3.1. Animais</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3.2. Procedimento anestésico e cirúrgico</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3.3. Grupos experimentais</b> .....	<b>37</b>
<b>4.4. Parâmetros avaliados</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4.1. Análise Macroscópica</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4.1.1. Contração das feridas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.4.1.2. Avaliação de edema e hiperemia</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4.2. Coleta das amostras para estudo</b> .....	<b>39</b>
<b>4.4.3. Avaliação Histopatológica</b> .....	<b>40</b>
<b>4.4.3.1 Avaliação do infiltrado de leucócitos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4.3.2 Avaliação de reepitelização</b> .....	<b>41</b>
<b>4.4.4. Análise de fibras colagênicas por <i>Picrosirius red</i></b> .....	<b>41</b>
<b>4.4.5. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)</b> .....	<b>42</b>
<b>4.4.6. Avaliação do estresse oxidativo</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4.6.1 Determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4.6.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4.7. Dosagem <i>in situ</i> de citocinas pró- e anti-inflamatórias TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, KC (IL-8) IL-10 e fatores de crescimento TGF-<math>\beta</math> e VEGF</b> .....	<b>44</b>
<b>4.5 Análise estatística</b> .....	<b>45</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>

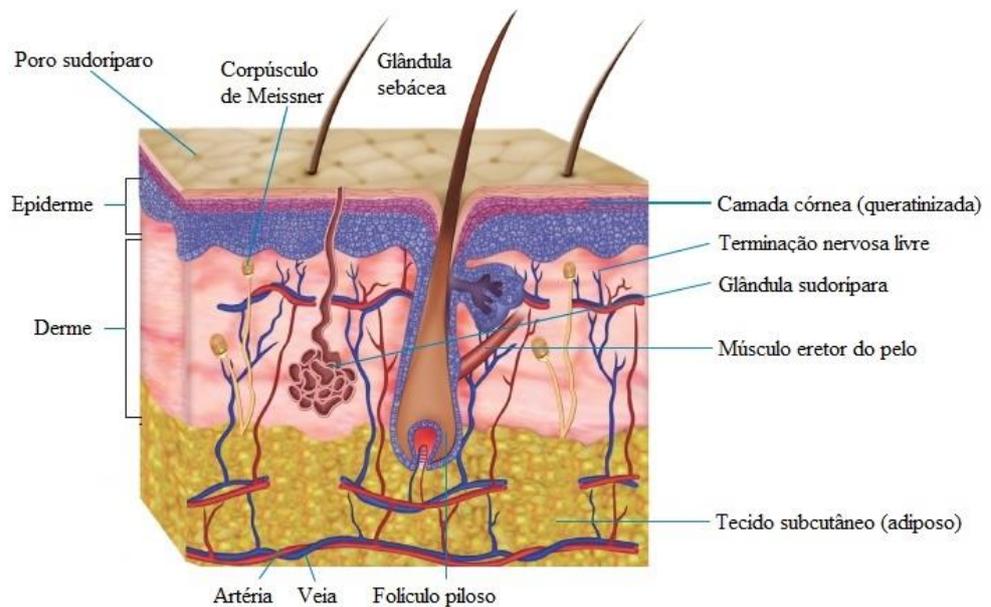
<b>5.1 Efeito do tratamento com o curativo pele de tilápia do Nilo na área das queimaduras superficiais. ....</b>	<b>46</b>
<b><i>5.1.1. O curativo pele de tilápia do Nilo foi capaz de acelerar a contração das feridas no 7º dia. ....</i></b>	<b>46</b>
<b><i>5.1.2. O curativo pele de tilápia foi capaz de reduzir a hiperemia nas queimaduras superficiais. ....</i></b>	<b>47</b>
<b>5.2. Efeito do tratamento com o curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais sob parâmetros histológicos. ....</b>	<b>49</b>
<b><i>5.2.1. O curativo pele de tilápia não evidenciou aumento da reepitelização nas queimaduras superficiais. ....</i></b>	<b>54</b>
<b>5.3. O curativo pele da tilápia aumenta a deposição de colágeno do tipo I na queimadura .....</b>	<b>54</b>
<b>5.4. O curativo de pele de tilápia reduz os níveis de mieloperoxidase (MPO) .....</b>	<b>58</b>
<b>5.5. O curativo de pele de tilápia reduz os níveis de malonaldeído (MDA), mas não de glutathiona sintetase (GSH). ....</b>	<b>59</b>
<b>5.6. O curativo de pele de tilápia reduz os níveis de TNF-<math>\alpha</math>, IL-1<math>\beta</math>, KC (IL-8), e aumenta os níveis de IL-10 .....</b>	<b>60</b>
<b>5.7. O curativo de pele de tilápia aumentou os níveis dos fatores de crescimento TGF-<math>\beta</math> e VEGF apenas no 14º dia de tratamento.....</b>	<b>62</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO A – CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO B – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS..</b>	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Morfologia da pele

Consistindo em aproximadamente em 15% do peso corpóreo e área variando entre 1,5 a 2 m<sup>2</sup> em um indivíduo adulto, a pele é o maior órgão de nosso corpo. Esta encobre toda a superfície corporal e funciona como uma barreira protetora contra patógenos, perda indesejada de líquido e contra danos diversos, sejam térmicos, físicos ou químicos (RIVITTI, 2014). A pele é constituída por uma camada mais externa denominada epiderme, outra mais interna chamada derme e entre elas está a membrana basal. Trata-se de um órgão complexo, no qual é composto por inúmeras terminações nervosas que respondem a estímulos dolorosos, mecânicos e pressóricos (Figura 1). A pele possui funções imunogênicas, fotoprotetoras, termorreguladoras, e é responsável pela síntese de vitamina D. Além disso, pode ser utilizada como uma via para a administração de medicamentos e/ou cosméticos (STONE *et al*, 2018; ALLOWAY, 2011).

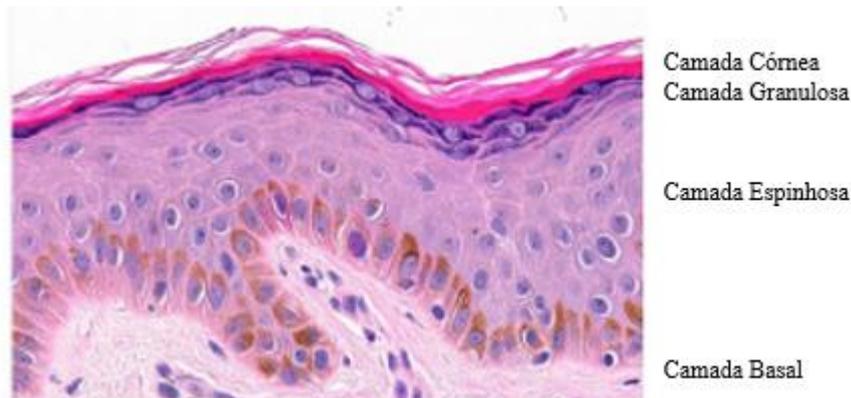
**Figura 1** – Estrutura da pele



Fonte: Adaptado de CESTARI, 2018.

A epiderme possui formato irregular e compreende o estrato córneo, a camada granulosa, a camada espinhosa e a camada basal, como representado na Figura 2. Ela é composta por um epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado, portanto, as células que a constituem são predominantemente os queratinócitos. Estes são provenientes da membrana basal e representam uma das principais células no processo cicatricial. Eles se diferenciam, amadurecem e avançam essas camadas em direção ao estrato córneo, mudando a sua conformação para uma forma mais achatada e se conectando através de junções celulares denominadas de desmossomas, estruturas importantes na manutenção da integridade do tecido epitelial (VIG, *et al.* 2017; GANTWERKER; HOM, 2012). O estrato córneo funciona então como uma barreira contra a entrada de microorganismos e materiais exógenos, além de evitar a perda excessiva de água. Estas células são renovadas constantemente, sendo que as células mais externas são eliminadas e assim novas células da camada basal sofrem divisão celular (VIG, *et al.* 2017; GANTWERKER; HOM, 2012; JUNQUEIRA; BOSKO, 2019).

**Figura 2** – Camadas da epiderme



Fonte: Adaptado de BOSKO, 2019

Além dos queratinócitos, existem outros tipos celulares com importantes funções na epiderme como os melanócitos, as células de Merkel, e as células de Langerhans. Os melanócitos são células dendríticas responsáveis pela síntese e armazenamento de melanina, e também podem ser encontrados nas mucosas, matrizes dos pelos, olhos, ouvidos e sistema nervoso central. Já as células de Merkel estão dispostas entre os queratinócitos e funcionam como receptores sensoriais, estando localizadas nas extremidades distais dos dedos, lábios, gengivas e bainha externa dos folículos pilosos. As células de Langerhans são células dendríticas residentes e funcionam como apresentadoras de antígenos aos linfócitos T,

originam-se na medula óssea a partir de células-tronco hematopoiéticas e compõem cerca de 2% a 8% das células da epiderme (CESTARI, 2018).

Abaixo da epiderme, encontramos a derme, que é a camada mais espessa da pele. Esta é composta por algumas fibras de elastina produzidas por fibroblastos, que junto com a água e grandes moléculas de proteoglicanos, compõem a matriz extracelular (MEC). Dentro da derme, existe uma região de tecido conjuntivo areolar frouxo com papilas, e mais abaixo encontra-se a derme reticular, que contém fibras colágenas compostas principalmente por colágeno do tipo I. Essa camada da pele fornece resistência mecânica, além de ser substrato para a difusão de água e nutrientes; por conter vasos sanguíneos, nervos e células envolvidas no crescimento, reparo e defesas imunes (NYAME *et al.*, 2014; VIG, *et al.* 2017). Abaixo da derme temos o tecido subcutâneo, que é constituído principalmente de gordura. Ele não faz parte da pele em si, mas possui uma importante função de conexão entre a pele, a camada muscular, o osso subjacente, e possibilita a caracterização da profundidade das lesões que acometem o órgão frequentemente. (YE; DE, 2017).

A pele é um órgão que facilmente é alvo de diversos tipos de lesões devido à sua total exposição ao ambiente externo. Dentre estas, se destacam as queimaduras por serem lesões frequentes em nosso dia-a-dia e que podem trazer graves danos à saúde e à qualidade de vida dos indivíduos acometidos (YE; DE, 2017). Desta forma, é importante conhecer as características, funções, estrutura e propriedades de uma pele saudável para uma melhor compreensão do processo de evolução de uma lesão e de sua cicatrização. O entendimento destes mecanismos nos tornam agentes de saúde capazes de interferir no processo do reparo tecidual e desta forma poder de forma direta, melhorar a qualidade de vida das pessoas acometidas (YE; DE, 2017; MARTIN; FALDER, 2017).

## 1.2 Queimaduras

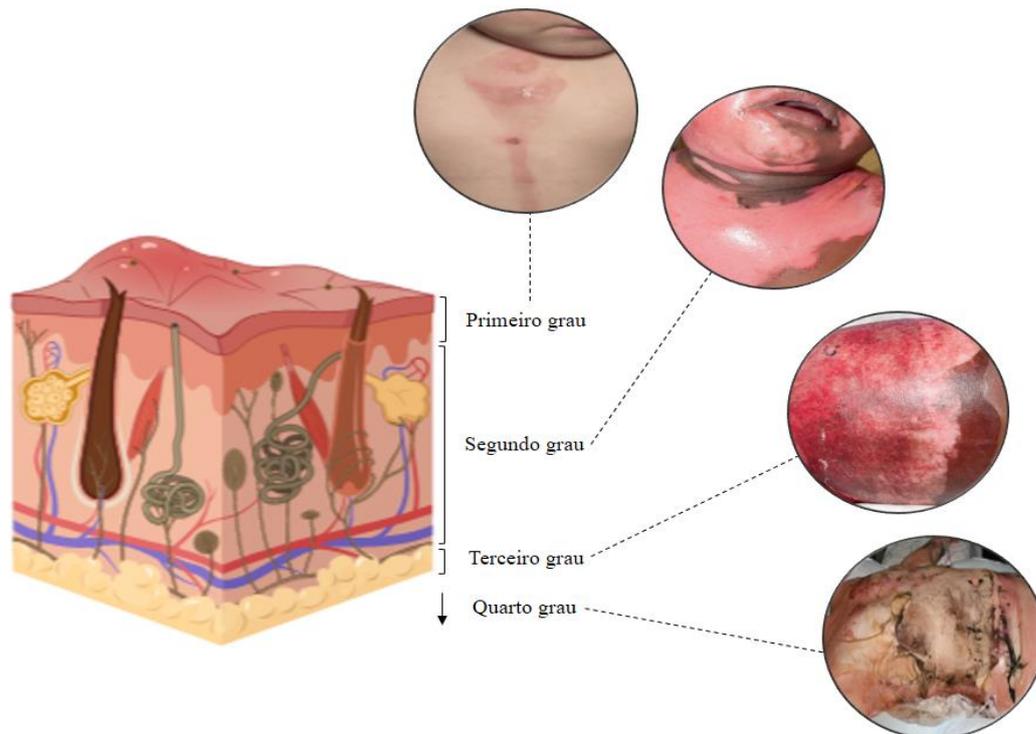
A queimadura é uma lesão na pele ou em outro tecido orgânico causado principalmente pelo calor ou diversos fatores como radiação, radioatividade, eletricidade, fricção ou contato com produtos químicos (WANG *et al*, 2018). As queimaduras térmicas são responsáveis pela maioria das queimaduras cutâneas relatadas. Elas podem desencadear diversas complicações, desde uma desidratação inicial, seguida de infecção e um desequilíbrio eletrolítico, até insuficiência respiratória e choque. Associado a estes fatores existem danos psicológicos e emocionais que podem advir da hospitalização prolongada, dor, perda da função e formação de cicatrizes e deformidades (WANG *et al*, 2018; EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER., 2010).

As queimaduras atualmente se tornaram graves problemas de saúde mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) estas lesões afetam mais de 300 milhões de pessoas ao ano no mundo, o que gera em torno de 11 milhões de indivíduos que necessitam de atenção médica especializada e provoca 180.000 mortes anualmente e consiste em uma das principais causadoras de morbidade, principalmente em países em desenvolvimento (WHO, 2018). Na Índia, por exemplo, mais de um milhão de pessoas são queimadas moderada ou severamente todos os anos. Em Bangladesh, Colômbia, Egito e Paquistão, 17% das crianças com queimaduras têm uma deficiência temporária e cerca de 18% possuem deficiências permanentes em decorrência das queimaduras (HAMBLIN, 2018; GREENHALGH, 2019).,A Associação Americana de Queimados (*American Burn Association - ABA*) estimou que em 2016, 486.000 pessoas procuraram atendimento para queimaduras, com 3.275 óbitos relacionados a lesões e inalação de fumaça; 2.745 óbitos i resultantes de incêndios residenciais; 310 incêndios relacionados a acidentes de veículos, e 220 de outras causas. Estimou-se também que o país norte-americano tenha gastos aproximados de U\$ 95.000 para cada paciente que tenha necessidade de enxertos em queimaduras extensas de terceiro grau. Além disso, os custos diretos de atendimento a crianças com queimaduras ultrapassaram U\$ 211 milhões no ano 2000 (HAMBLIN, 2018; GREENHALGH, 2019).

No Brasil, o panorama é muito preocupante, com cerca de um milhão de pessoas a cada ano acometidas por queimaduras, 200 mil atendidas em serviços de emergência, e 40 mil demandam hospitalização. Por fim, isso resulta em 2.500 óbitos como consequência direta ou indireta das queimaduras no país (WANG *et al.*, 2018, BRASIL, 2017). Ainda é possível observar que as crianças são registradas como principais vítimas (80% dos casos) de queimaduras que ocorrem principalmente no ambiente doméstico (ARAGÃO *et al.*, 2012; CRUZ; CORDOVIL; BATISTA, 2012).

As queimaduras podem ser categorizadas de acordo com o grau de destruição celular causada na pele e tecidos subcutâneos, considerando aspectos como cor, exsudato, reabastecimento capilar e sensação (STONE *et al.*, 2018; GILL; FALDER, 2017). Classicamente, as queimaduras são categorizadas como de primeiro (superficiais), segundo (espessura parcial) ou terceiro grau (espessura total) (Figura 3).

**Figura 3** – Grau de profundidade das queimaduras

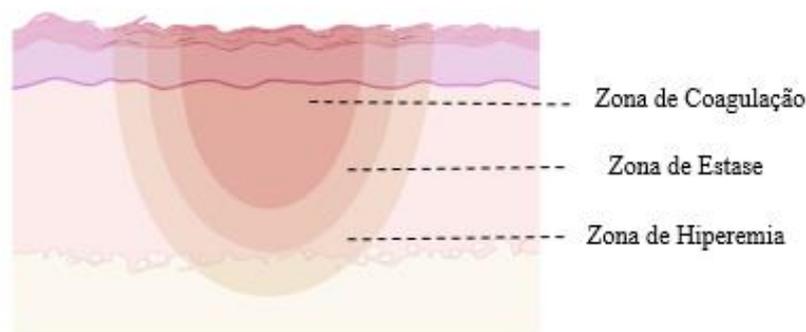


Fonte: Adaptado no BioRender.com. de GREENHALGH, 2019; GILL; FALDER, 2017.

As queimaduras de primeiro grau são aquelas que não ultrapassam a epiderme, mantendo a barreira íntegra, se caracterizando apenas com secura e vermelhidão. Como exemplos têm as queimaduras solares, que apresentam fácil resolução e nenhuma ou pouca necessidade de tratamento (GREENHALGH, 2019). Na queimadura de segundo grau ocorre a perda da barreira epidérmica chegando a penetrar na derme. Ocorre formação de bolhas, às vezes extravasamento de líquido intersticial, além da dor intensa. À medida que as queimaduras de segundo grau se tornam mais profundas, menos anexos cutâneos, como pelos e glândulas permanecem; portanto requerem mais tempo para curar. Por último as queimaduras de terceiro grau se estendem abaixo da pele, destruindo a derme e danificando o tecido adiposo subcutâneo, a fáscia, os músculos ou os ossos. Essas feridas podem ser de qualquer cor e mais secas do que as demais queimaduras, com a destruição dos nervos da derme ela torna-se menor indolor se comparada a queimadura de segundo grau. Com a destruição dos anexos dérmicos, a migração epitelial torna-se limitada, portanto a cicatrização é mais lenta. Elas requerem intervenção cirúrgica, podendo levar a cicatrizes hipertróficas e aumento do o risco de infecção, choque e morte (GREENHALGH, 2019; GILL; FALDER, 2017).

A injúria térmica leva à desnaturação proteica e perda da integridade da membrana plasmática, com formação de necrose no centro que vai atenuando à medida em que percorre para a periferia. Em 1953, Jackson definiu três zonas diferentes de lesão tecidual após a queimadura: a zona de hiperemia, a zona de estase e a zona de coagulação (Figura 4) (KECK *et al.*, 2009; SALIBIAN *et al.*, 2016).

**Figura 4** – Zonas de lesão da queimadura



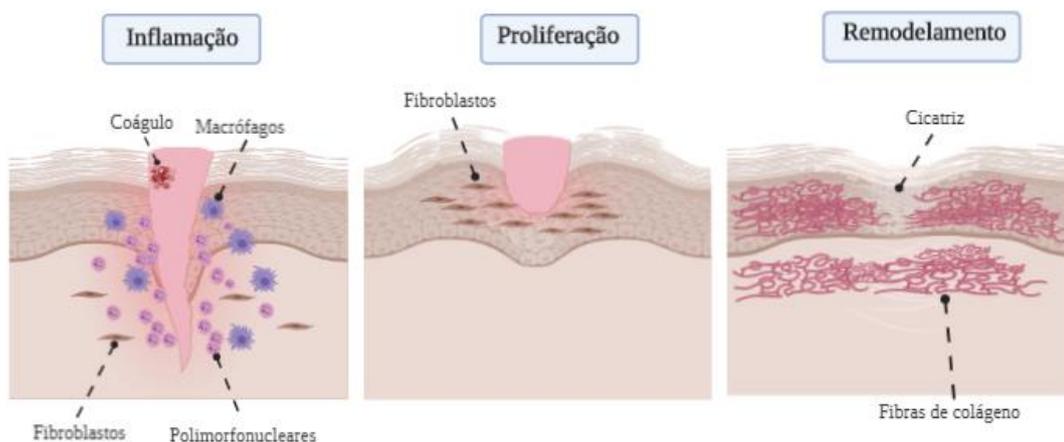
Fonte: Elaborada pelo autor no BioRender.com.

A zona de hiperemia caracteriza-se por inflamação e um aumento da irrigação sanguínea por um período de tempo maior, tendendo a se auto recuperar caso não haja sepse local ou período prolongado de hipotensão arterial sistêmica. Já a zona intermediária da estase é uma área considerada terapeuticamente crítica a ser tratada, visto que ela pode contribuir para o aumento da área de superfície e profundidade da queimadura por perda do curso natural de perfusão. Esta zona é inicialmente significativamente edematosa, e envolve a zona interna de coagulação que pode não ser recuperada (SALIBIAN *et al.*, 2016; JOHNSON, 2018). A zona de coagulação por sua vez consiste na área de maior dano térmico, onde ocorre desnaturação de proteínas, levando à morte celular, trombose vascular e conseqüentemente dano irreversível ao tecido. Tais feridas com maior profundidade acarretam em conseqüências locais e sistêmicas que aumentam as complicações e a morbidade (SALIBIAN *et al.*, 2016; JOHNSON, 2018).

### **1.2.1 Cicatrização de queimaduras**

O termo cicatrização de feridas se refere a uma série complexa de eventos biológicos que são normalmente descritos como a sucessão de três fases sobrepostas: inflamação, formação de tecidos (ou fase de proliferação) e remodelação de tecidos (Figura 5). A fase inflamatória tem como objetivo a prevenção da infiltração de patógenos, ocorrendo o recrutamento de células inflamatórias para remover detritos celulares (REF?). Ao mesmo tempo, são ativadas as cascatas de sinalização celular para iniciar a cicatrização de feridas. Na fase proliferativa ocorre a proliferação de queratinócitos e a contração de miofibroblastos, com a formação de uma matriz vascularizada que busca o fechamento da área lesionada. Por fim, na fase de remodelação é vislumbrado o amadurecimento e o desenvolvimento de um novo epitélio, formando um tecido cicatricial (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER 2010; STRONG *et al.*, 2017).

**Figura 5** – Fases do processo de cicatrização



Fonte: Elaborado pelo autor no BioRender.com.

O dano tecidual faz com que as células residentes da pele reconheçam sinais de perigo como os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Esses sinais são reconhecidos por receptores expressos nas células hospedeiras chamados *Toll-like* (TLRs) que induzem a ativação das vias de sinalização intracelulares como as o fator nuclear NF- $\kappa$ B e as vias de proteína cinases ativadas por mitógenos (MAPK). Estas vias, quando ativadas, desencadeiam a expressão de um grande número de genes, incluindo mediadores inflamatórios, citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos, para iniciar e perpetuar a resposta inflamatória (LANDÉN; LI; STAHL, 2016).

Durante a resposta inflamatória, um dos primeiros mediadores liberados é a histamina, pelos mastócitos. Estes aumentam a vasodilatação e a permeabilidade vascular, gerando edema no tecido. Além disso, ocorrem a hipercoagulabilidade e a trombose do vaso comprometendo a perfusão dérmica. A partir destes eventos, este local se torna propício para a migração de neutrófilos, linfócitos e monócitos, que por sua vez fornecem mais sinais quimiotáticos que recrutam mais leucócitos (VAUGHN & BECKEL, 2012; LATEEF *et al.*, 2019; SINGER & BOYCE, 2017). Os leucócitos são recrutados imediatamente para o sítio da lesão, enquanto que os neutrófilos aderem no vaso por meio da indução da expressão de mediadores inflamatórios como as moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM1), moléculas de adesão celular vascular1 (VCAM1) e e-selectinas (SELE) nas células endoteliais. (NIELSON *et al.*, 2017; LANDÉN; LI; STAHL, 2016). Os neutrófilos atuam através de três principais mecanismos para destruir detritos e bactérias: através do processo clássico de fagocitose, através da liberação de substâncias bactericidas e desbridadoras como lactoferrina, proteases,

elastase de neutrófilos e catepsina, e através da produção de 'armadilhas' de cromatina e protease que capturam e matam bactérias no espaço extracelular. Além disso, os neutrófilos liberam espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio como ânion superóxido, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, óxido, nitrogênio óxido (NO) e peroxinitrito (SORG *et al.*, 2016; SINGH; YOUNG; MCNAUGHT., 2017; VAUGHN; BECKEL, 2012).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio têm sido consideradas como mediadores de danos progressivos nos tecidos após lesão inicial por queimadura. Elas se relacionam ao aumento da atividade de enzimas pró-oxidativas, tais como a xantina oxidase e a NADPH oxidase, que levam à peroxidação lipídica das membranas celulares, causando desequilíbrio osmótico, e resultando na morte da célula afetada na zona de estase (SALIBIAN *et al.*, 2016; VAUGHN; BECKEL, 2012). Além disso, ocorrem diminuições nas quantidades de antioxidantes como a glutathiona reduzida (GSH) e nos eliminadores de radicais livres na queimadura causam mais estresse oxidativo e subsequentes danos aos tecidos. Assim, a resposta clínica à queimadura depende do equilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres (SALIBIAN *et al.*, 2016; VAUGHN; BECKEL, 2012; NIELSON *et al.*, 2017).

Na fase de cicatrização da ferida causada por queimadura, as células T reguladoras (Treg) têm sido implicadas como principais imunorreguladores da inflamação dos tecidos através da atenuação da produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e do acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios (LADAK; TREDGET, 2009; SORG *et al.*, 2016). Os macrófagos são um outro grupo de células importantes na resposta inflamatória gerada por lesão térmica. Mastócitos tipo M1 estão associados à atividade fagocítica e são os principais produtores de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandina E2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Entretanto, os macrófagos tipo M2 estão envolvidos na síntese de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10, estimulam a produção da matriz extracelular (MEC) por meio da produção de fatores de crescimento como VEGF, PDGF, TGF- $\beta$  e EGF, e atuam na fagocitose de neutrófilos, bactérias e detritos celulares iniciando um processo de limpeza no local da lesão. (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017; SORG *et al.*, 2016; HESKETH *et al.*, 2017). Apesar do processo descrito gerar reparo da queimadura, muitas vezes este pode estar exacerbado em algumas fases. Quando isso ocorre, podemos ter um estado chamado hipermetabolismo, onde ocorre o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias que resultam em alteração da função imune. O hipermetabolismo, por sua vez, provoca uma utilização desnecessária de proteínas, resultando na indução de um estado hipercatabólico dinâmico, o que é prejudicial ao reparo da lesão (FINNERTY, 2008).

Os fatores de crescimento são os principais reguladores moleculares que controlam a evolução da ferida por queimadura. Destes, se destacam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (EVERS; BHAVSAR; MAILÄNDER 2010). Quando esses fatores são liberados, se inicia a cascata de coagulação que culmina na formação de um coágulo de fibrina que serve como um alicerce para as células migratórias repararem a ferida (MARKESON *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2018). A partir disso, o fator de crescimento de queratinócitos (KGF) recruta os queratinócitos que secretam metaloproteinases da matriz (MMPs) e outras proteases para ajudar a remover o tecido danificado enquanto se forma uma nova camada epidérmica. Ao mesmo tempo, fibroblastos se proliferam e produzem colágeno, fibronectina, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos para constituição da nova matriz extracelular (MEC). Por fim, células endoteliais criam novos vasos sanguíneos e sofrem apoptose após atingir o nível suficiente de formação desses vasos (MARKESON *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2018).

O coágulo de fibrina formado no local da lesão é então substituído por tecido fibroso rosa, vascularizado, denominado tecido de granulação. Este tecido é composto majoritariamente por colágeno do tipo II (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). Para que esse processo ocorra, inicialmente os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos estimulados por TGF- $\beta$ . Os miofibroblastos possuem forças contráteis aumentadas através da alfa actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA) e possuem propriedades de células musculares lisas. Essas células migram através da MEC recém-formada e conectam-se às proteínas circundantes, fibronectina e colágeno, que estimulam mecanicamente essa matriz causando contração (HALL *et al.*, 2018). Os miofibroblastos também promovem a angiogênese através da mediação da atividade da MMP. À medida que a fase de remodelação progride, o colágeno tipo III previamente secretado durante a fase proliferativa é degradado e substituído pelo colágeno tipo I. Após o fechamento da ferida, a população de miofibroblastos regride em resposta a sinais apoptóticos. Este novo tecido possui uma porcentagem maior que o normal de cálcio, com mais reticulações e confere uma resistência à tração máxima de aproximadamente 80% da pele não lesionada. Todo esse processo de contração da queimadura pode resultar em ferida semi-fechada, se a lesão for mais profunda. Em decorrência disso, os sobreviventes de queimaduras podem ser submetidos a procedimentos cirúrgicos por meses a anos para melhorar a função local (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017; HALL *et al.*, 2018; YOUNG; DEWEY; KING., 2018).

Alguns fatores podem interferir nesse processo resolutivo. O fator nutricional está associado a uma melhora da cicatrização, enquanto que a desnutrição prolongada promove a inflamação, inibe a função dos fibroblastos, reduz a angiogênese e a deposição de colágeno. O tabagismo afeta o processo cicatricial pelo aumento do estresse oxidativo, ou redução da migração e proliferação de fibroblastos, ou ainda pela diminuição da síntese e da deposição de colágeno, entre outros. Quanto menor o grau de hipóxia, maior a reepitelização, visto que a presença de oxigênio é essencial para a deposição de colágeno. Diversos outros fatores também podem ser citados como a presença de doenças crônicas, presença de infecção, idade, condição do sistema imunológico e genética do indivíduo (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

#### 1.2.2.1. Tratamento convencional

As queimaduras alteram as percepções sensoriais de dor, temperatura e toque. A perda da integridade da pele desencadeia perda de fluidos corporais que são seguidos por desidratação, desequilíbrio eletrolítico, insuficiência renal e circulatória (NIELSON *et al.*, 2017). Essas séries de alterações fisiopatológicas acabam gerando grandes efeitos sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica do uso de drogas no tratamento de queimaduras graves, aumentando os desafios clínicos como a ocorrência de uma cicatrização lenta, aumento da suscetibilidade a infecções e formação de cicatrizes hipertróficas (cicatriz elevada em relação ao tecido original, devido ao excesso da deposição de colágeno) (NIELSON *et al.*, 2017; SHPICHKA *et al.*, 2019, WANG *et al.*, 2017).

Até o momento descrevemos a profundidade das lesões causadas por queimaduras. Contudo, para a realização do manejo destes pacientes diversos fatores são analisados: a localização da lesão, idade do paciente, presença ou ausência de inalação, origem da queimadura, trauma associado, doenças pré-existentes e a extensão atingida. Nesse último parâmetro utiliza-se a regra dos “nove” criada por Wallace e Pulaski (1951), a chamada superfície corporal queimada (SCQ). Em queimaduras pequenas ou irregulares, para se fazer a estimativa pode-se usar a área da superfície da palma da mão de um paciente. Indivíduos com queimaduras que atingem acima de 20% em adultos e 10% em crianças da área total da superfície corporal são considerados graves (BRASIL, 2012; NÍMIA *et al.*, 2018; MORGAN; BLEDSOE; BARKER 2000). Estes pacientes são frequentemente atendidos na unidade de terapia intensiva. O tratamento requer o manejo das vias aéreas com a realização de suporte respiratório, ressuscitação de fluidos, estabilização cardiovascular e controle da dor (VIGANI *et al.*, 2017).

O processo de atendimento destes pacientes requer uma sequência de passos: 1) avaliação inicial, 2) higienização da ferida, 3) remoção do tecido necrótico através do desbridamento e 4) escolha do melhor agente tópico ou curativo (KOWALSKE, 2011; VIGANI *et al.*, 2017). No paciente, a colonização de vários patógenos no leito da ferida, e a suscetibilidade das infecções ocorrem devido ao comprometimento da barreira cutânea somada à hiperinflamação aguda, seguida de imunossupressão. Por esses motivos, as infecções são a principal causa de morte e morbidade, onde 51% dos falecimentos são atribuídos à septicemia (STONE *et al.*, 2018; GREENHALGH *et al.*, 2007; KRISHNAN *et al.*, 2013). A aplicação sistêmica e tópica de antimicrobianos é o tratamento geralmente recomendado com o uso de bacitracina, nistatina, mupirocina, sulfadiazina de prata em creme ou pomadas, além de soluções com veículos aquosos como acetato de mafenida e nitrato de prata (STONE *et al.*, 2018; ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI 2017).

Tradicionalmente a sulfadiazina de prata 1% tem sido largamente utilizada há mais de 40 anos no tratamento de queimaduras de segundo e terceiro grau. Este fármaco possui a função de prevenir eventuais infecções e estimular o processo de desbridamento dos tecidos necrosados, possuindo um amplo espectro contra bactérias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella* sp e *Pseudomonas aeruginosa*), gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) e também contra o fungo *Candida albicans*. Trata-se de um medicamento de fácil aplicação, baixo custo e indolor. Atualmente é o primeiro medicamento incluso na Relação de Medicamentos Essenciais (RENAME) para este fim (NÍMIA *et al.*, 2018; FERREIRA; PAULA, 2013). Por outro lado, neste tratamento encontram-se diversas desvantagens como a necessidade de troca diária de curativos, o que gera extremo desconforto ao paciente, reações de hipersensibilidade às sulfonamidas e leucopenia. Além disso, o medicamento é contraindicado em mulheres grávidas, lactantes e recém-nascidos. Diversos estudos relatam que o tratamento para queimaduras com sulfadiazina de prata 1% gera toxicidade dos agentes de prata nos fibroblastos e nos queratinócitos, o que não favorece o processo de cicatrização (NÍMIA *et al.*, 2018; FERREIRA; PAULA, 2013; MORGAN; BLEDSOE; BARKER 2000). Diante dos desafios a serem superados para o tratamento das queimaduras expostos até aqui, a pesquisa de novos tratamentos é de essencial interesse para a sociedade.

Outras estratégias de tratamento diferentes têm sido usadas para gerenciar feridas por queimadura (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI 2017). Alguns estudos destacam a aplicação de laser terapêutico no tratamento que resultou em maior vascularização, proliferação de células e organização de fibras colágenas. Porém ainda não há uma padronização quanto à profundidade da lesão, bem como sobre qual o tipo de lesão que apresenta melhor resposta a essa terapêutica (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010).

#### 1.2.2.2. Biomateriais

Há aproximadamente 50 anos os biomateriais foram introduzidos no tratamento de queimaduras (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017). O uso de biomateriais no processo de cicatrização da pele possui basicamente duas funções: prevenir a piora do ferimento e limitar a quantidade de droga utilizada através de uma liberação controlada (SON *et al.*, 2019).

Os biomateriais possuem diversas finalidades, tipos de aplicações e tratamentos. São assim chamados por poderem ser de origem natural ou sintética e/ou produzido por técnicas de bioengenharia. Os biomateriais podem executar, ampliar ou repor funções de células, tecidos ou órgãos. Atualmente diversos tipos de biomateriais são utilizados na medicina para diversos fins. Podemos citar, por exemplo, substitutos de válvulas do coração, implantes dentais, dispositivos de regeneração da pele, dentre outros. Para que seja considerado um biomaterial, o mesmo deve possuir uma boa biocompatibilidade com o local do corpo onde será aplicado, e o estudo da biocompatibilidade depende de análises feitas sob a luz da biologia celular e molecular (BHAT; KUMAR, 2012).

Tanto os polímeros naturais quanto os sintéticos podem ser utilizados na medicina regenerativa inclusive para o tratamento de queimaduras (SHANMUGAN; SHADEVAN, 2018). Os polímeros constituem um grupo de biomateriais extremamente versátil para tratamentos médicos, sendo formados a partir de unidades monômeros que unidos, via ligação covalente, constituem macromoléculas. A composição química dos monômeros depende do tipo de polímero. Nos plásticos, os monômeros são majoritariamente constituídos por átomos de carbono. Em alguns polímeros naturais, como os polissacarídeos, as subunidades estão ligadas entre si via ligações glicosídicas entre átomos de oxigênio (AYMERICH, 2010).

O poli(etilenoglicol) (PEG) e o álcool polivinílico (PVA) são polímeros sintéticos não-tóxicos, bioinertes e biocompatíveis com tecidos humanos. Estes podem originar hidrogéis que possuem uma excelente aplicação no tratamento de feridas. Além disso, este tipo de material pode ser manipulado para garantir uma boa adesão ao tecido através de suas propriedades mecânicas. Os hidrogéis produzidos a partir de PEG, por exemplo, conseguem aumentar a deposição de colágeno em ratos, o que mostra vantagens da utilização dos biomateriais no processo de cicatrização (SON *et al.*, 2019).

Os polímeros obtidos a partir de proteínas naturais isoladas da matriz celular, tais como o colágeno e a elastina, possuem um grande potencial para atuarem na regeneração de tecidos lesionados, induzindo os processos de especificação e reconhecimento celular do local lesionado (BHAT, KUMAR 2012). Por exemplo, a criação de um curativo de hidrogel à base de quitosana, mel e gelatina apresentou ação antibacteriana contra *S. aureus* e *E. coli*, e contribuiu para a cicatrização de queimaduras (MOVAFFAGH, JEBRAIL *et al.*, 2019). O colágeno bovino quando combinado aos queratinócitos autólogos humanos e fibroblastos têm sinalizado resultados para um possível uso no tratamento de queimaduras severas (SHANMUGAN, SHADEVAN 2018; WANG, 2012; BHAT, KUMAR 2012). No entanto, em geral, esses curativos são caros, difíceis de aplicar e nem sempre estão disponíveis (MORGAN; BLEDSOE; BARKER 2000). Assim, o uso de biomateriais no processo de cicatrização da pele possui funções de prevenir o agravamento do ferimento e limitar a quantidade de droga utilizada através de uma liberação controlada (SON *et al.*, 2019).

#### 1.2.2.2.3. Enxerto de pele

A metodologia da engenharia de tecidos vem se ganhando cada vez mais destaque e vem sendo aplicada no tratamento de pacientes queimados, tendo como princípio levar à restauração, manutenção ou melhoria da estrutura e função dos tecidos danificados de maneira biocompatível, com vistas à reduzir limitações dos tratamentos convencionais, acelerar e otimizar a cura, além de reduzir a dor nas queimaduras superficiais. Apesar do alto custo, torna-se uma alternativa eficaz em longo prazo. Na engenharia de tecidos diversas novas formas de tratamento estão sendo realizadas como a produção de *Scaffolds* (suportes teciduais), de fatores promotores de cura, pesquisa com células-tronco e terapia gênica (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017).

O enxerto de pele autólogo é considerado como método padrão ouro no tratamento de queimados (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017). Este fornece cobertura com baixo risco de rejeição e correspondência de cor e textura. Contudo, muitas limitações são encontradas. Resultados insatisfatórios em ferimentos extensos, aumento do risco de complicações, formação de cicatrizes hipertróficas, falhas sensoriais e na termorregulação da pele enxertada (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2017; MARKESON *et al*, 2013). Além disso, este tratamento não é de fácil acesso à população e nem disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Entretanto, apesar de o aloenxerto cadavérico, ter sido associado a bons resultados, a sua disponibilidade é limitada devido à inconveniente colheita da pele no necrotério e à baixa qualidade das peças coletadas, devido à possibilidade de contaminação microbiana (ATIYEH; HAYEK; GUNN, 2005; OBENG *et al*, 2001).

Novas alternativas têm sido associadas a bons resultados, como o uso de pele de animais (xenoenxertos), sendo esta uma alternativa viável e disponível no Brasil onde existe uma grande variedade de espécies com potencial clínico para uso das peles como curativo biológico em humanos. (ATIYEH; HAYEK; GUNN, 2005; CHIU; BURD, 2005; YAMAMOTO *et al.*, 2018). A pele suína é utilizada desde a década de 1960 para o tratamento de queimaduras, sendo o xenoenxerto mais utilizado na atualidade. Sua eficácia é justificada pela semelhança da sua composição e estrutura histológica com a pele humana. As principais vantagens desse material é o seu baixo custo e disponibilidade da fonte. No entanto, há um risco teórico de zoonoses, como a infecção por retrovírus endógenos suínos (CHIU; BURD, 2005).

A *Rana catesbiana*, uma espécie de rã conhecida como rã-touro, é amplamente distribuída no país e comercializada mundialmente para o consumo de sua carne. Sua pele foi testada como um possível curativo temporário para queimaduras em cães e apresentou resultados promissores por ter substâncias ativas na sua pele, e mostrou resultados promissores em humanos na cobertura temporária de queimaduras de segundo grau profundas, feridas cirúrgicas de escarotomias e fasciotomias, bem como para áreas doadoras. Entretanto, apesar dos seus bons resultados, a pele de rã ainda não é registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (PICCOLO; PICCOLO; PICCOLO, 2002).

Visto esse panorama, é possível refletir que mesmo com todos os avanços na tecnologia de tratamento de queimaduras, são necessárias otimizações nessas terapêuticas, como a redução no tempo de internação, aumento na qualidade do tecido restaurado, na pigmentação, sensação, flexibilidade e função da cicatriz formada. Além disso, são necessários melhores estudos e evidências acerca dos novos tratamentos (HORST *et al.* 2018).

### 1.3. Curativo biológico de pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), faz parte do segundo grupo mais importante de peixes cultivados em viveiro depois das carpas (ZENG *et al.*, 2009). Esta espécie pertence à família dos ciclídeos, originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África e encontra-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais. Esta espécie possui alto índice de rendimento comercial, pois apresenta rápido crescimento, grande rusticidade, fácil manejo, e carne de ótima qualidade (ZENG *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2015; AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2011). A tilápia do Nilo 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. No estado do Ceará é encontrada nas pisciculturas ao longo do rio Castanhão, que forma uma das principais bacias hidrográficas neste estado (ZENG *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2015; AZEVEDO-SANTOS *et al.*, 2011).

Estudos histológicos da pele de tilápia demonstraram que esta possui uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado e uma camada mais profunda da derme com feixes finos de fibras colágenas, sobrepostos e cruzados no sentido transversal à superfície da pele (FRANCO *et al.*, 2013). Esta pele é considerada subproduto de descarte na piscicultura, pois após as tilápias passarem pelo processo de filetagem para destino comercial, menos de 1% do material de descarte é aproveitado apenas no artesanato local (SOUZA *et al.*, 1997; CASTAGNOLLI, 1996). Por outro lado, as peles de tilápia do Nilo, após o curtimento, sua resistência e seu desenho de flor resultam em uma matéria-prima nobre, de alta qualidade e de aspecto peculiar (Figura 6) o que chamou a atenção de pesquisadores.

**Figura 6** – Interface da pele de tilápia limpa após o processo de filetagem



Alves *et al* (2015) verificaram que as características microscópicas da pele de tilápia são semelhantes à estrutura morfológica da pele humana, possuindo elevada resistência e extensão quando submetidas a teste tensiométrico. Esses autores verificaram ainda que esta pele é constituída por cerca de 51% de colágeno do tipo I, o mais frequente no corpo humano, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens e podendo ser comparado aos materiais derivados de mamíferos. Assim, 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 tratar-se de uma proteína de matriz extracelular importante para diversas aplicações cosméticas e farmacológicas no geral (CARVALHO *et al*, 2009; DELISTOIANOV *et al*, 2008, TOVAR 2009; MIMURA *et al*, 2008; FRENKEL *et al*, 1997). Estudos realizados na China constataram que peptídeos de colágeno marinho (MCPs) preparados a partir da pele de tilápia são constituídos de pesos moleculares inferiores a 5 kDa e 58% dos seus resíduos de aminoácidos são hidrofílicos. Esses peptídeos conseguiram promover o fechamento de arranhões em ensaio de *Scratch* em cultura de queratinócitos humanos (HaCat) (ZHOU *et al*, 2017).

Ademais, outros experimentos realizados utilizando nanofibras produzidas a partir de colágeno de pele de tilápia, não provocaram resposta imunológica, resultaram em aumento significativo da proliferação de queratinócitos humanos (HaCat) e estimulação da diferenciação epidérmica através da expressão gênica regulada de involucrina, filagrina e transglutaminase tipo I nessa mesma linhagem (ZHOU *et al*, 2015; ZHOU *et al*, 2016). O mesmo estudo mostrou também um aceleramento do processo cicatricial de feridas em ratos de maneira eficaz associando esses efeitos aos múltiplos aminoácidos contidos nas nanofibras. Outro estudo recente mostrou que o colágeno de tilápia induz significativamente a expressão do fator de crescimento epidérmico e do fator de crescimento de fibroblastos, no qual são peças importantes na proliferação e diferenciação de fibroblastos e queratinócitos (ZHOU *et al*, 2015; ZHOU *et al*, 2016; CHEN *et al*, 2019)

Estudos realizados com ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem *Wistar* utilizando a pele de tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras apresentaram resultados de não inferioridade em relação ao tratamento convencional com o antimicrobiano sulfadiazina de prata do grupo controle, tendo boa aderência ao leito da ferida e ausência de alterações nos exames laboratoriais de função hepática, renal e hemograma (LIMA-JÚNIOR *et al.*, 2017). Tais achados favoráveis, encorajaram o grupo de pesquisa a dar seguimento ao estudo com a realização da fase clínica. Inicialmente, foi realizado um estudo clínico para

avaliar a segurança e o potencial de irritabilidade e sensibilização cutânea da pele de tilápia pela empresa Allergisa. Os resultados deste estudo demonstraram que a pele de tilápia não causou irritação ou sensibilização significativa na pele dos sujeitos de pesquisa saudáveis, demonstrando segurança na sua utilização em seres humanos (DADOS NÃO PUBLICADOS).

Ao ser apontada a segurança do uso da pele de tilápia em humanos, a equipe de pesquisadores do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), iniciou em 2016 um estudo clínico em paciente internados na unidade de queimados do Instituto Dr. José Frota (Fortaleza-Ceará), publicados posteriormente como relatos de caso (Figura 7) (LIMA- JUNIOR *et al*, 2019).

**Figura 7** – Paciente submetido ao tratamento com pele de tilápia



Fonte: LIMA JUNIOR, 2017.

A eficácia da pele de tilápia como curativo biológico oclusivo no tratamento de queimaduras de 2º grau foi avaliada e comparada com o tratamento convencional utilizado com sulfadiazina de prata. Os resultados obtidos foram promissores, a pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas, reduzindo a dor e o sofrimento dos pacientes. Sua utilização reduziu o número de dias até a completa reepitelização, assim como o número de troca de curativos e conseqüentemente o número de anestésias e analgesias utilizadas, auxiliando no processo de cicatrização, diminuindo a perda de líquidos, demonstrando benefícios para os pacientes (LIMA-JUNIOR *et al*, 2017; COSTA *et al*, 2019; LIMA-JUNIOR *et al*, 2019).

Posteriormente, outro estudo clínico realizado com 30 pacientes aleatoriamente tratados com pele de tilápia e hidrofibra com prata Aquacel Ag® no Hospital São Marcos, Recife/PE revelou similaridade entre os grupos para a média de dias de tratamento (completa cicatrização da ferida). Apresentou também não inferioridade relacionada à dor após os curativos e suas trocas (quando existentes), e na quantidade de substituições (MIRANDA; BRAND, 2019). Além da sua utilização para o tratamento de queimaduras e feridas, recentemente foi realizada com sucesso a primeira cirurgia de reconstrução de vagina utilizando pele de tilápia, caracterizando a experiência como de baixo custo, de fácil aplicação e alta eficácia (DIAS *et al*, 2019; DIAS *et al*, 2019). A reconstrução apresentou bons resultados anatômicos e funcionais, atuando como um *scaffold*, permitindo que o tecido cicatricial sofra metaplasia e epitelização. A pele de tilápia possibilitou uma neovagina anatômica e funcional por meio de um procedimento simples, seguro, fácil, eficaz, rápido e minimamente invasivo em pacientes com síndrome de Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser e estenose vaginal (DIAS *et al*, 2019; DIAS *et al*, 2019). Em análise histológica foi observada características do tecido vaginal adulto saudável, com a presença de epitélio escamoso estratificado com alta expressão de citoqueratinas, FGF e expressão fraca de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (DIAS *et al*, 2019; DIAS *et al*, 2019). Sua utilização também trouxe outros resultados promissores como enxerto de pele escrotal para aumento neovaginal na vaginoplastia primária na transição de gênero masculino para o feminino (SLOGO *et al*, 2019; RODRÍGUEZ *et al*, 2020).

A pele de tilápia também foi testada em feridas veterinárias. Em um relato de caso, um cavalo com ferimento traumático tratado com a pele de tilápia apresentou reepitelização completa da lesão, com bons resultados estéticos e funcionais, e sem reações alérgicas ou toxicidade. Além disso, o animal não apresentou sinais de desconforto e respeitou consistentemente o período de tratamento (COSTA; LIMA-JÚNIOR; FECHINE, 2020).

## 2 JUSTIFICATIVA

As queimaduras ainda são responsáveis por grande parte dos ferimentos e óbitos decorrentes de causas externas no Brasil, correspondendo a cerca de 38% dos principais agravos atendidos no Sistema Único de Saúde do Brasil (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010). Estas lesões são responsáveis por um grande número de afastamentos do trabalho e sequelas funcionais e estéticas, especialmente na população masculina, sendo as térmicas, as mais comuns (METSAVAHT, 2017; ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010). A Sulfadiazina de prata, presente na RENAME, vem sendo recomendada pelo Ministério da Saúde brasileiro como tratamento padrão antimicrobiano tópico para queimaduras disponível pelo SUS, que apesar do fácil acesso, tem baixa evidência científica, com baixa penetração, atraso na cicatrização da lesão e ainda pode favorecer a resistência bacteriana (METSAVAHT, 2017; SAEIDINIA *et al.*, 2017; WATTANAPLOY *et al.*, 2017). Neste contexto, a pele de tilápia, vem se destacando como um produto de baixo custo de produção e com bom potencial cicatrizante (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017).

Em 2016, no Núcleo de Pesquisa e Produção de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, foi iniciado um projeto com objetivo de investigar a utilização da pele da tilápia do Nilo como curativo oclusivo no tratamento de queimaduras de pacientes da unidade de queimados do Instituto Dr. José Frota – Fortaleza-Ceará. A eficácia da pele da tilápia como curativo biológico no tratamento de queimaduras de 2º grau foi avaliada e comparada com o tratamento convencional utilizando Sulfadiazina de prata. Os resultados obtidos foram promissores, e o curativo pele da tilápia apresentou boa aderência no leito das feridas, trazendo menor número de trocas de curativos, reduzindo assim a dor e o sofrimento dos pacientes. Além disso, a pele tem apresentado excelente desempenho para outras aplicações clínicas como em cirurgias de neovagina e redesignação sexual (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2019; DIAS *et al.*, 2019; SLOGO *et al.*, 2019).

Com base nisso, estudos pré-clínicos precisam ser desenvolvidos para propiciar uma melhor compreensão do mecanismo de ação pelo qual o curativo pele de tilápia atua com foco no modelo *in vivo* de queimaduras experimentais e dessa forma, fornecer subsídios para o desenvolvimento de um biomaterial de baixo custo, fácil acesso e eficaz no reparo de afecções cutâneas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no efeito cicatrizante do curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais em camundongos.

#### 3.1. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a contração das queimaduras tratadas com o curativo pele de tilápia através da mensuração da lesão;
- ✓ Avaliar macroscopicamente o efeito do curativo pele de tilápia sobre os parâmetros de edema, hiperemia e reepitelização em queimaduras experimentais;
- ✓ Determinar as alterações histopatológicas em cortes histológicos em queimaduras tratadas com o curativo pele de tilápia e corados com hematoxilina e eosina (HE);
- ✓ Avaliar a colagênase em cortes histológicos das queimaduras tratadas com o curativo pele de tilápia e corados com *Picrosirius red*;
- ✓ Quantificar o infiltrado inflamatório neutrofílico nas queimaduras tratadas com o curativo pele de tilápia, por meio de contagem direta de células e da atividade da mieloperoxidase (MPO);
- ✓ Avaliar o estresse oxidativo nas queimaduras tratadas com o curativo pele de tilápia através da avaliação de malonaldeído (MDA) e glutathiona reduzida (GSH);
- ✓ Quantificar citocinas pró- e antiinflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10) e fatores de crescimento (TGF- $\beta$  e VEGF) nas queimaduras tratadas com o curativo pele de tilápia.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

As peles foram obtidas de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), provenientes da piscicultura do açude Castanhão (Jaguaribara, CE). Após o abate, as peles foram removidas, retiradas as escamas, submetidas à lavagem em água corrente e colocadas em soro fisiológico (solução de NaCl a 0,9%) estéril, previamente resfriado a 4°C para o transporte entre os municípios de Jaguaribara e Fortaleza, onde foi realizada a limpeza final. Em seguida, foram retirados os excessos de músculo, que ainda permaneceram ligados à pele, lavados com soro fisiológico e obedecendo as etapas de esterilização.

### **4.2. Esterilização da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

O processo de esterilização da pele seguiu as etapas descritas por Lima-Júnior *et al*, 2017 e foi realizado no Banco de Pele Animal do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC. Para tanto, as peles foram submetidas a uma limpeza final e retirada dos excessos de músculos. Em seguida, sob condições estéreis, as peles foram lavadas em gluconato de clorexidina a 2%, e posteriormente colocadas em soro fisiológico, à temperatura ambiente, sob agitação orbital branda de 5 min. Logo após, o soro foi descartado e repostado em quantidade suficiente para cobrir a peça, este processo foi repetido por mais duas vezes finalizando com a disposição das peles com a face escamosa voltada para baixo em badeiras metálicas as quais foram armazenadas sob refrigeração a -80°C para posterior liofilização. Por fim, as peles liofilizadas foram seladas à vácuo e encaminhadas para a etapa de radioesterilização complementar, no Instituto de Pesquisa Energética Nuclear (IPEN-SP), em gama cobalto a 25 KGs. Finalmente, após a realização de todo processo, as peles foram embaladas à vácuo e têm validade para uso de até dois anos.

### **4.3. Procedimento cirúrgico de indução de queimaduras superficiais em camundongos**

#### **4.3.1. Animais**

Os protocolos envolvendo o uso de animais de experimentação foram realizados conforme o Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), sendo avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisas com Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA) sob o número 7304051018 (ANEXO A).

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem *Swiss* (22g ± 3,0g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (Biocen - UFC). Uma semana antes do início do procedimento cirúrgico, os animais foram acomodados em caixas de polipropileno, limpas e individuais, na sala de manutenção do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), onde permaneceram por todo o período experimental, sob condições adequadas de luz (fotoperíodo - 12h de luz), temperatura (25 °C), umidade (55 ± 10%) e acesso à ração e água *ad libitum*.

#### **4.3.2. Procedimento anestésico e cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (10mg/Kg) associado ao cloridrato de cetamina 10% (100mg/Kg), por via intraperitoneal (i.p.) (HALL; CLARKE, 1991). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região dorsal por tração manual e assepsia com iodopovidona 1%, seguido de álcool etílico a 70%. Em seguida, os animais foram submetidos à queimadura superficial induzida pelo contato direto por 6 segundos de uma placa quadrada de inox (1,5 cm<sup>2</sup> de diâmetro) aquecida à temperatura de 100°C (adaptado de Lima-Junior *et al.*, 2017). Após a indução da lesão, os animais foram reidratados com soro fisiológico 0,9%, resguardados em ambiente aquecido e sob observação até a completa recuperação.

Todos animais foram mantidos em gaiolas individuais higienizadas em estante ventilada após a indução da cirurgia durante todo o protocolo experimental. Para evitar possível contaminação do ferimento recém realizado, a maravalha foi adicionada apenas após 48h do protocolo e durante esse período foi estimulada a troca de caixa a cada 48h ou 72h.

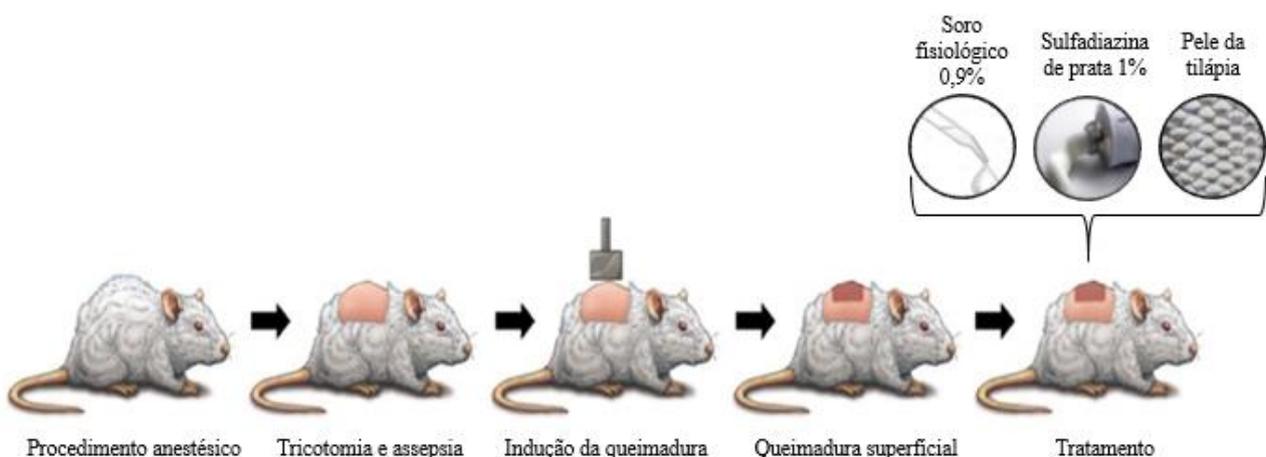
### 4.3.3. Grupos experimentais

Após recuperação da anestesia, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos, (10 animais/grupo) conforme o tratamento aplicado nas úlceras descrito abaixo:

- I. Grupo controle (*Sham*): animais cujas lesões receberam diariamente apenas solução fisiológica 0,9%;
- II. Grupo Sulfadiazina de prata 1% (Sulfa): animais cujas lesões foram tratadas diariamente com creme de sulfadiazina de prata 1%, medicamento padrão, utilizado no SUS, para tratamento de queimaduras;
- III. Grupo curativo pele de tilápia: animais cujas lesões foram tratadas com curativo oclusivo de pele de tilápia, fixado com sutura de fio de nylon 5-0 (LIMA-JÚNIOR *et al*, 2017).

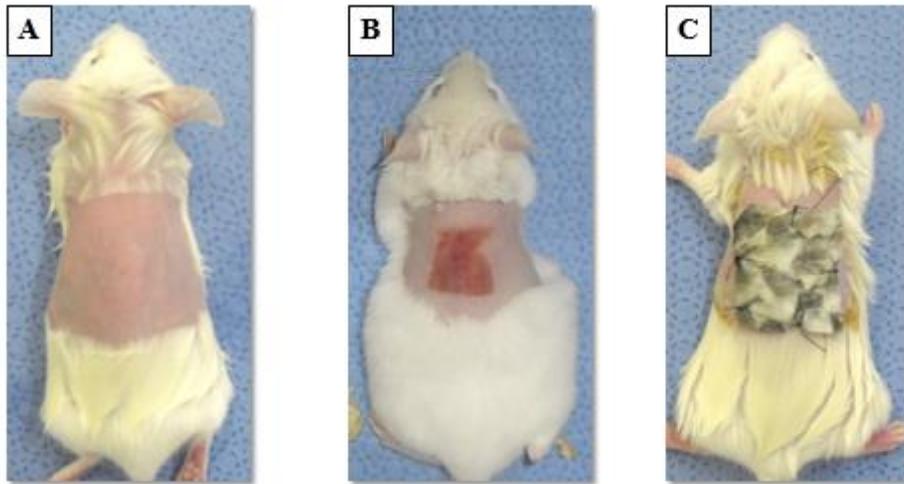
A aplicação tópica dos tratamentos Sulfa de prata e pele de tilápia era sempre precedida da remoção de resíduos presentes nas lesões através da lavagem com solução fisiológica 0,9%, inclusive no grupo controle. Nos animais do grupo pele da tilápia que permaneceram até o 14º dia houve uma troca do curativo no 7º dia.

**Figura 8** – Representação esquemática da indução de queimadura superficial



Fonte: Modificado de SOUZA, 2019

**Figura 9** – Representação do protocolo experimental



Fonte: Elaborada pelo autor.

A ilustração (A) representa a região tricotomizada e posteriormente desinfetada, a (B) caracteriza a superfície após a indução da queimadura e (C) consiste no tratamento utilizado, no caso, a queimadura encoberta com uma sutura de pele de tilápia.

#### 4.4. Parâmetros avaliados

##### 4.4.1. Análise Macroscópica

###### 4.4.1.1. Contração das feridas

Objetivando avaliar a contração das lesões durante o processo cicatricial nos diferentes grupos experimentais, as áreas das queimaduras dos animais foram quantificadas nos dias 0, 7 e 14 pós lesão. Devido a uma ausência de delimitação das bordas das feridas na grande maioria dos animais tratados com o curativo pele de tilápia no 3º dia, não houve mensuração desse período.

Utilizando paquímetro digital, as medidas horizontais (h), e verticais (v) das lesões foram obtidas e, através destas, as áreas foram calculadas pela multiplicação das duas variáveis,  $A = h \times v$  (mm<sup>2</sup>). Em seguida, a taxa de contração da lesão foi calculada pela fórmula conforme descrita abaixo.

$$\text{Taxa de contração (\%)} = \frac{\text{área inicial} - \text{área dia } X}{\text{área inicial}} \times 100$$

A evolução do processo cicatricial das queimaduras foi também acompanhada por registros fotográficos (Câmera fotográfica Nikon L20) sem flash e com altura de 15 cm padronizada em relação as feridas, realizados nos dias 3, 7 e 14 após a indução da lesão.

#### **4.4.1.2. Avaliação de edema e hiperemia**

O edema e a hiperemia são sinais flogísticos característicos da fase inflamatória. O edema foi categorizado por um inchaço devido ao acúmulo de líquido no leito e/ou bordas da lesão. A hiperemia foi verificada pela presença de vermelhidão no ferimento, no caso, o rubor. Ambos os parâmetros foram registrados no 3º dia após a indução cirúrgica da lesão e antes do sacrifício dos animais para a coleta de amostras teciduais para histologia e análise de mediadores. A classificação desses parâmetros varia conforme a intensidade na ferida, atribuindo escores que representam: ausência (0), leve (1), moderado (2) e intenso (3) (MELO *et al.*, 2011).

#### **4.4.2. Coleta das amostras para estudo**

Nos dias 3, 7 e 14 após a queimadura, dez animais de cada grupo e de cada dia estabelecido foram aleatoriamente selecionados e eutanasiados pela administração de superdosagem de cloridrato de xilazina (30 mg/kg, i.p.) e cloridrato de cetamina (300 mg/kg, i.p.). Cuidadosamente, os tecidos das lesões foram removidos até a camada muscular, contornando as margens do local atingido e abrangendo um centímetro de pele não queimada. Estas amostras foram fixadas em solução tamponada de formaldeído 10% (v/v) (pH 7,4) para posterior estudo histopatológico (coloração com hematoxilina-eosina e *Picrosirius red*).

#### 4.4.3. Avaliação Histopatológica

As amostras de tecido coletadas das lesões como descrito no item 4.4.2., foram incluídas em parafina a 58°C em processador automático de tecidos (Lupe®). Em seguida, com o auxílio de um micrótomo semi-automático (Leica®), foram feitos segmentos de 4 µm de espessura para serem realocados em lâminas microscópicas e submetidos a coloração hematoxilina-eosina (H&E). Estes procedimentos foram executados no Laboratório de Histopatologia (NPDM/UFC) sob coordenação da profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

As lâminas histológicas de amostragem dos grupos experimentais nos dias 3, 7 e 14 pós lesão, foram analisadas em microscópio óptico seguindo os parâmetros de escores descritos no quadro 2. Fotomicrografias foram feitas, padronizando-se a objetiva, a intensidade da luz do microscópio e a altura do condensador. As imagens foram salvas em formato JPEG para posterior análise e representação histológicas dos grupos experimentais em diferentes períodos do processo de cicatrização, e posteriormente analisadas com base nos parâmetros de escores descritos conforme o quadro 1.

**Quadro 1** – Parâmetros histológicos para análise por H&E

<b>Escore</b>	<b>Parâmetros</b>
<b>0</b>	Sem úlcera + epitélio normal + hiperqueratose Tecido conjuntivo remodelado
<b>1</b>	Sem úlcera + epitélio atrófico + hiperqueratose Fibrose + discreto a moderado infiltrado inflamatório crônico
<b>2</b>	Superfície desnuda de epitélio Fibrose + discreto a moderado infiltrado inflamatório crônico
<b>3</b>	Com úlcera Tecido de granulação
<b>4</b>	Com úlcera Infiltrado inflamatório agudo (ectasia, vasos dilatados, infiltrado leucocitário misto)

Fonte: Adaptado de CAVALCANTE *et al.*, 2011.

#### **4.4.3.1 Avaliação do infiltrado de leucócitos**

Foram utilizadas as lâminas histológicas do 3º dia após a indução das queimaduras coradas pela técnica de H&E para a análise do infiltrado de leucócitos no local. O infiltrado foi categorizado conforme a presença de células polimorfonucleares ou células mononucleares nos campos microscópicos. Para a execução dessa análise as lâminas foram fotomicrografadas em 6 campos diferentes, no aumento de 400x em microscópio óptico, abrangendo de 3 regiões da derme papilar e 3 da derme reticular. Os resultados foram expressos como a média do número de células/campo (CAVAZANA *et al.*, 2014).

#### **4.4.3.2 Avaliação de reepitelização**

A reepitelização baseia-se no aumento da espessura do tecido após a migração das células epiteliais da borda da lesão para o centro, formando camadas de tecido que cobrem o ferimento e se prendem à matriz abaixo (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017).

A partir das lâminas histológicas coradas pelo método de H&E correspondentes aos dias 14 após a cirurgia foram obtidas por fotomicrografias no aumento de 40x de cada ferida abrangendo suas bordas. A espessura do novo epitélio foi analisada através de escores que representam: ausência (0), 25-50% de epitelização (1) e 50-100% de epitelização (2) (ORYAN *et al.*, 2018).

#### **4.4.4. Análise de fibras colagênicas por *Picrosirius red***

O método de coloração por *Picrosirius red* (PSR) consiste em uma técnica que se baseia nas propriedades birrefringentes do colágeno. Ela é capaz de destacar seletivamente as redes de colágeno através do sistema de cor RGB (vermelho, verde, azul) e se torna mais específica quando combinada com a detecção de luz polarizada (RITTIÉ, 2017).

Para confecção da lâmina foram feitos cortes histológicos de aproximadamente 3µm do tecido coletado das lesões dos grupos no 14º dia pós-cirúrgico. Estes passaram por processo de desparafinização em estufa a 60°C por 3h, banhados em xilol por 5 min, reidratados em soluções de álcool decrescente (100%, 90% e 70%, respectivamente) e corados com solução de *Picrosirius red* (ScyTek®) por 30 min. Posteriormente essas lâminas foram lavadas com ácido clorídrico 5%, contra coradas com hematoxilina de Harris por 45 seg e feito a montagem com a lamínula utilizando Entellan®.

As análises foram realizadas em microscópio de luz polarizada (Leica® modelo DM 2000 com câmera DFC 295 acoplada) no Laboratório de Patologia Bucal da UFC em colaboração com a Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves (ALVES et al, 2015). Foram capturadas imagens fotografando em (aumento de 400x) de três campos diferentes com e sem luz polarizada. A avaliação foi feita através do software Image J® com o plugin Color Deconvolution (RGB), ajustando a cor com o Threshold (Adjust>Image>B&W) e obtendo o percentual de área marcada em relação a área total da imagem (Analyze>Measurement). Os resultados foram expressos pelo percentual de área marcada  $\pm$  E.P.M.

#### 4.4.5. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase é uma enzima encontrada em grande quantidade nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, esta é utilizada como marcador da presença de polimorfonucleares no local da lesão, sua atividade é comumente determinada por método colorimétrico (SOUZA et al., 2001; PATTERSON et al., 2014).

A ferida coletada no 3º dia de tratamento e armazenada anteriormente em freezer - 80 foi triturada e homogeneizadas com o auxílio de um triturador (POLLYTRON®) em 200µL utilizando tampão gelado contendo NaCl 0,1M, NaPO<sub>4</sub> 0,02M, EDTA 0,012M com pH 4,7. Esse material foi centrifugado a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado recebeu um choque hipotônico com 1000µl de NaCl 0,2%, esse conteúdo passou por uma nova centrifugação de 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O novo *pellet* formado foi ressuspense em tampão NaPO<sub>4</sub> 0,05M (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) e novamente homogeneizado no triturador (POLLYTRON®). A seguir, o homogeneizado obtido foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 50 µL do sobrenadante foram colocados em uma placa de 96 poços para o ensaio. Em cada poço, adicionaram-se 25 µL de TMB (3, 3', 3, 3-tetramethylbenzidine; 1,6 mM) e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) e posteriormente a placa foi incubada por 5 min a 37 °C. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 4M. A quantificação dos neutrófilos foi realizada a partir de uma curva padrão de neutrófilos (1x 10<sup>5</sup> neutrófilos/poço/50 µL) e absorbância determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos como número de células/mg de tecido (ALVES-FILHO et al., 2006).

#### **4.4.6. Avaliação do estresse oxidativo**

##### ***4.4.6.1 Determinação dos níveis de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)***

O malonaldeído (MDA) é um biomarcador amplamente aceito de estresse oxidativo e reflete o grau de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Este foi mensurado pela reação de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados oriundo do processo de estresse da lesão com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) (TSIKAS, 2017; DRAPER; HADLEY, 1990).

Após armazenamento em freezer -80, as amostras dos ferimentos coletados no 3º dia foram trituradas e homogeneizadas a 10% (peso/volume) em um homogenizador (POLLYTRON®) com tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4). Posteriormente, separou-se 250 µL do homogenato obtido e levados ao banho de água a 37°C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 400 µL de ácido perclórico 35% às amostras para interromper o processo de peroxidação, esse conteúdo foi centrifugado por 14000 rpm, à 4°C durante 15 minutos. Desse sobrenadante, foi retirado 600 µL para um microtubo de tampa rosqueada, nele foi acrescentado 200 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% e levados em seguida ao banho de água a 95°C por 30 minutos. Após o resfriamento das amostras e da curva padrão, foi realizado o plaqueamento de todos os componentes e posteriormente a leitura da absorbância em leitora de microplacas no comprimento de onda de 532 nm. A concentração de MDA nas amostras foi calculada através da equação da reta através da curva-padrão com concentrações conhecidas de tetrametoxi-propano (TMP) e os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

##### ***4.4.6.2 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)***

A glutathiona reduzida (GSH) é um tripeptídeo antioxidante hidrossolúvel que desempenha um papel importante em fornecer e manter um ambiente intracelular equilibrado. Sua mensuração se baseia na reação de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB) com compostos de sulfidrila do GSH, formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico e glutathiona oxidada (GSSG) (BEIRAGHI-TOOSI *et al*, 2018; SEDLAK; LINDSAY, 1968).

As amostras de tecido dos tecidos lesionados, previamente armazenadas em freezer -80, foram homogeneizadas e trituradas a 10% (peso/volume) em um homogenizador (POLLYTRON®) com solução de EDTA 0,02 M. Adicionou-se a 40 µL de cada amostra com 60 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% para que ocorresse a precipitação das proteínas presentes no material biológico. O conteúdo foi centrifugado a 5000 rpm, por 15min, a 4°C e em seguida, 60 µL do sobrenadante obtido foi adicionado na placa, juntamente com uma curva-padrão com concentrações conhecidas de GSH. Por fim, adicionou-se 102 µL da solução de leitura (Tris-EDTA, DTNB 0,01 M) e a absorbância foi medida imediatamente no comprimento de onda de 412 nm em leitora de microplacas. A concentração de GSH nas amostras foi calculada com base na equação da reta para a curva-padrão e os resultados expressos em µg de GSH/g de tecido.

#### **4.4.7. Dosagem *in situ* de citocinas pró- e anti-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC (IL-8) IL-10 e fatores de crescimento TGF- $\beta$ e VEGF**

Foram coletadas amostras das lesões no 3º dia de tratamento para quantificação das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10 e os fatores de crescimento TGF- $\beta$  e VEGF foram dosados das amostras de 7º e 14º dia através do método imunoenzimático (ELISA) (FUJIMI *et al.*, 2009; INFANGER *et al.*, 2004; JANG *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2001). Os tecidos (n=8-10/grupo) foram descongelados, triturados em um homogenizador (POLYTRON®) em solução de PBS (pH 7,4) sob temperatura de 4°C formando uma solução a 10% (mg tecido/µL), este material em seguida foi centrifugado a 5000 rpm por 5 min para separar o que não foi completamente triturado. Em placas separadas de 96 poços de alta ligação foram incubados previamente 50 µl/poço do anticorpo de captura anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 $\beta$ , anti-KC, anti-IL-10, anti-TGF- $\beta$  e anti-VEGF (kits da R&D systems: Cat. N° DY410, DY401, DY501, DY427 e DY1679, respectivamente) por 12h a 4°C. Após sensibilização das placas, elas foram bloqueadas com BSA 1% (em PBS), e adicionadas as amostras em duplicata, além da diluição seriada da curva padrão (concentrações iniciais de 1000 pg/mL para IL-1 $\beta$  e KC, e 2000 pg/mL para TNF- $\alpha$ , IL-10, TGF- $\beta$  e VEGF), no qual permaneceram incubadas por 2h a 4°C. Na dosagem de TGF- $\beta$  foi necessária uma etapa de ativação antes da incubação com a placa sensibilizada, onde as amostras foram acidificadas com 20 µL de ácido clorídrico (HCl) 1N por 20 minutos em temperatura ambiente, e em seguida neutralizadas com a adição de 20 µL de solução alcalina 1,2N NaOH/0,5M HEPES pH 7,4. Terminado o tempo de incubação, essas placas passaram por três lavagens consecutivas com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05% SIGMA)

e incubadas novamente por 2h, agora com anticorpo de detecção monoclonal biotilado correspondente de cada dosagem. Após esse período, as placas foram novamente lavadas e em seguida foi adicionado 100 µL do complexo diluído (1:40) de HRP-streptavidina por 20 minutos, a partir dessa etapa as placas foram protegidas da luz em temperatura ambiente. Depois foi acrescentado o substrato para a enzima as placas e submetidas à nova incubação por mais 20 minutos. Esta reação enzimática foi interrompida com 50 µL de solução contendo ácido sulfúrico 2N (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) após esse tempo. No fim do processo realizou-se a leitura em espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 450 nm. Os resultados foram expressos em picograma de citocinas/mL de homogenato com base na curva padrão de cada fator.

#### **4.5 Análise estatística**

Todos os resultados foram levantados através do programa GraphPad Prism® (v 5.0), no qual foram expressos estatisticamente utilizando média ± erro padrão da média (EPM) ou em valores de mediana, dependendo do parâmetro avaliado em questão. Foi utilizado teste de ANOVA, seguido por Tukey para comparações múltiplas de valores numéricos entre os grupos e Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's, para avaliação das medianas. Os resultados que obtiveram diferença estatística foram derivados de valores mínimos de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

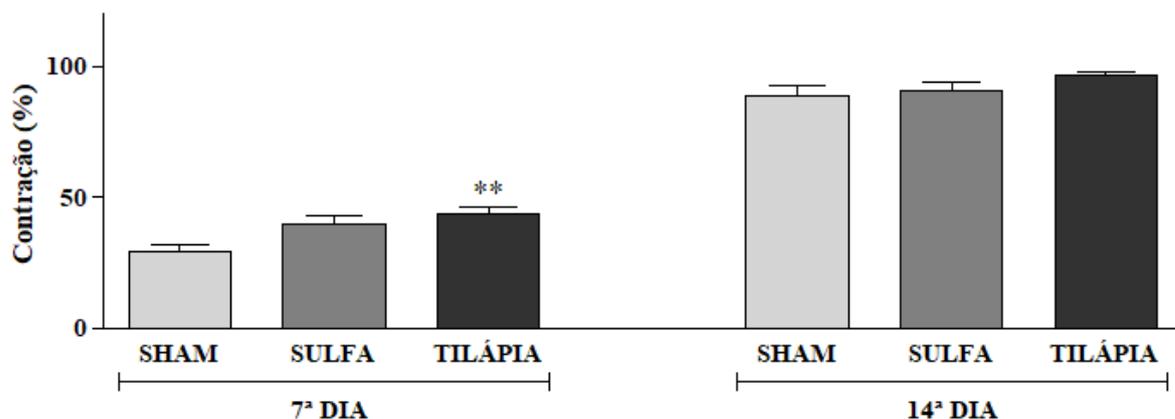
### 5.1 Efeito do tratamento com o curativo pele de tilápia do Nilo na área das queimaduras superficiais.

#### 5.1.1. O curativo pele de tilápia do Nilo foi capaz de acelerar a contração das feridas no 7º dia.

O processo evolutivo cicatricial das queimaduras nos grupos experimentais, foi avaliado através da mensuração da contração das lesões nos 7º e 14º dias após a indução da queimadura, conforme descrito anteriormente na metodologia.

Como observado na figura 10, a análise morfométrica das queimaduras mostrou que no 7º dia, somente o tratamento com a pele de tilápia promoveu um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da porcentagem de contração das lesões (média±DP: 43.55±2.90) em relação aos animais que foram submetidos à queimadura e foram tratados somente com soro fisiológico sobre a lesão, grupo *Sham* (média±DP: 29.40±2.67), contudo não houve diferença em relação ao grupo Sulfa (média±DP: 39.43±3.68). No 14º dia após a queimadura, os valores da porcentagem de contração das lesões não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos experimentais *Sham* (média±DP: 89.04± 3.77), Sulfa (média±DP: 90.87± 2.95) e pele de tilápia (média±DP: 96.74± 1.24).

**Figura 10** – Percentual da contração das queimaduras superficiais induzidas em camundongos Swiss e submetidas aos tratamentos com soro fisiológico a 0.9% (*Sham*), Sulfadiazina de prata a 1% (Sulfa) e pele liofilizada e irradiada de tilápia do Nilo



Os animais foram submetidos ao protocolo de queimadura superficial e distribuídos entre os grupos experimentais. O tratamento tópico foi realizado com: pele da tilápia liofilizada e irradiada e sulfadiazina de prata 1%. Os animais pertencentes ao grupo *Sham* foram sujeitos ao procedimento cirúrgico, mas não receberam nenhum tratamento. A área das feridas foi mensurada após 7 e 14 dias após a cirurgia. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM da área média das feridas. \*\* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo Sham (N=10 animais/grupo; ANOVA seguido de Tukey).

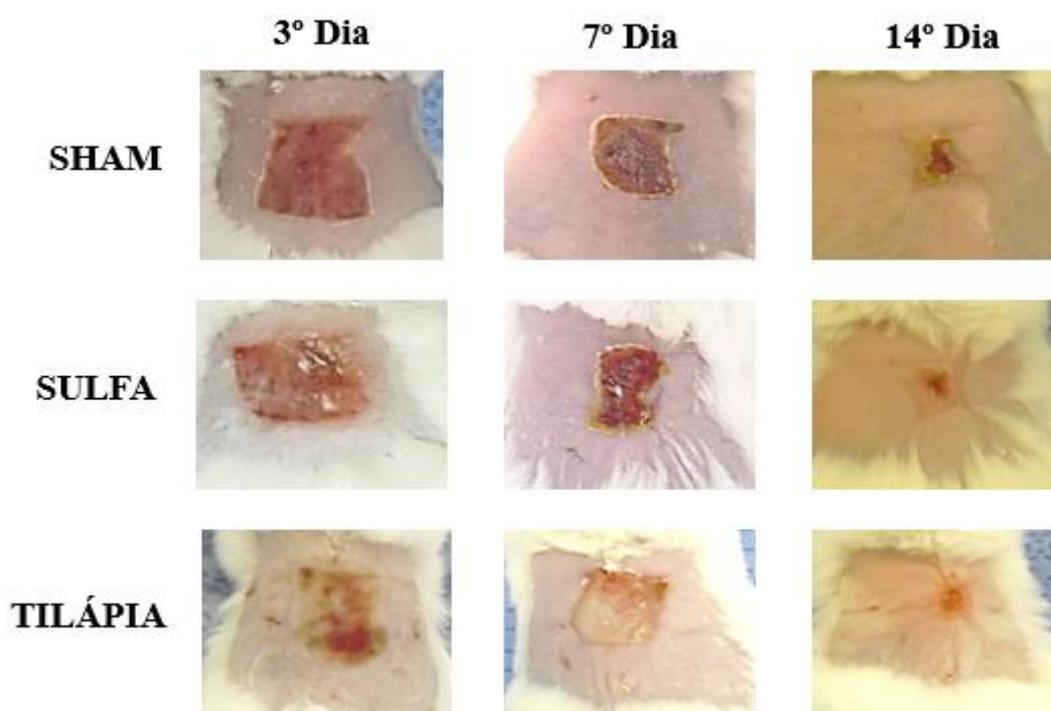
### 5.1.2. O curativo pele de tilápia foi capaz de reduzir a hiperemia nas queimaduras superficiais.

Os parâmetros de edema e hiperemia foram observados no 3º dia após a indução cirúrgica das queimaduras conforme a Tabela 1. A frequência de edema entre os grupos foi baixa, apenas alguns animais apresentaram uma variação na intensidade de leve à moderada, portanto, não se verificou diferença representativa. As feridas do grupo *Sham* e Sulfa apresentaram intenso rubor, com frequência de 100%, apresentando mediana e variações semelhantes de 3,00 (2 – 3). A pele da tilápia foi capaz de atenuar o parâmetro de hiperemia, obtendo uma frequência inferior com relação aos demais grupos, apresentando mediana e variação de 1,00 (0 – 2) com  $p < 0,001$  (Tabela 1).

**Tabela 1** – Representação por escores da análise de edema e hiperemia

<i>Grupos experimentais</i>	<i>Edema</i>	<i>Hiperemia</i>	<i>p-Valor</i>
<b>Sham</b>	0 (0 – 2)	3 (2 – 3)	p>0,05
<b>Sulfa</b>	0 (0 – 1)	3 (2 – 3)	p>0,05
<b>Tilápia</b>	0 (0)	1 (0 – 2) ***###	p<0,001

Os parâmetros de edema e hiperemia foram observados no 3º dia quanto à intensidade (0- ausente, 1- leve, 2- moderado e 3- intenso). Os resultados foram expressos pela mediana e intervalo mínimo e máximo de escores adotados no grupo experimental. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's onde \*\*\*p<0,001 representam diferença em relação ao grupo *Sham* e ###p<0,001 em relação ao grupo Sulfa (N=10-8/grupo/dia).

**Figura 11** – Evolução representativa das lesões por queimadura tratadas com o curativo de pele de tilápia do Nilo durante 14 dias de avaliação

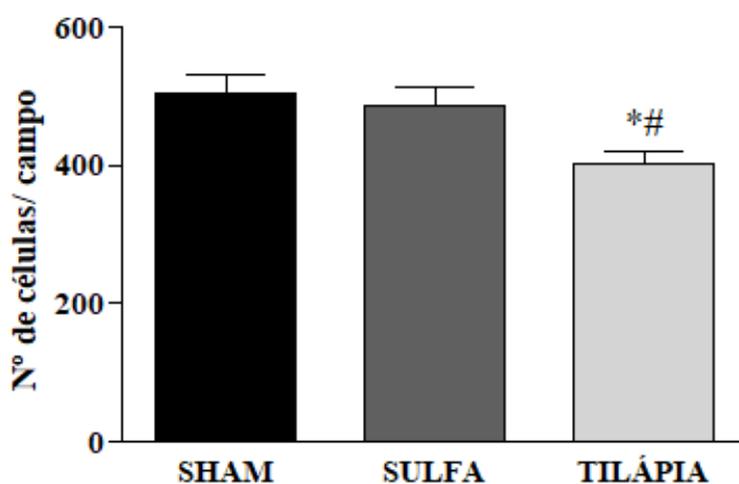
Fonte: Elaborada pelo autor.

As queimaduras superficiais foram fotografadas para acompanhamento macroscópico no 3º, 7º, e 14º dia após a queimadura ser produzida. A representação foi feita por um único animal de cada grupo de acordo com os resultados obtidos pela contração da lesão. Os animais pertencentes ao grupo *Sham* receberam somente soro fisiológico 0,9% em suas lesões. Os animais do grupo Sulfa receberam tratamento com aplicação única diária de creme com sulfadiazina de prata 1%. (N=10 animais/grupo/dia).

## 5.2. Efeito do tratamento com o curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais sob parâmetros histológicos.

No 3º dia de avaliação foi evidenciado nos grupos *Sham* (média±DP: 503,5±27,76) e Sulfa (média±DP: 486,5±26,69) a presença de região ulcerada com infiltrado inflamatório agudo e elevado número de leucócitos por campo e Sulfa (Figuras 12 e 13). Em contrapartida o grupo pele da tilápia obteve diferença com  $p < 0,05$  na redução de seu escore, no qual observa-se presença de tecido de granulação, infiltrado inflamatório moderado e menor contagem de leucócitos por campo (média±DP: 403,1±16,80) (Tabela 2 e Figuras 12 e 13).

**Figura 12** – Contagem de leucócitos por campo após tratamento com o curativo pele de tilápia no 3º dia em queimaduras experimentais



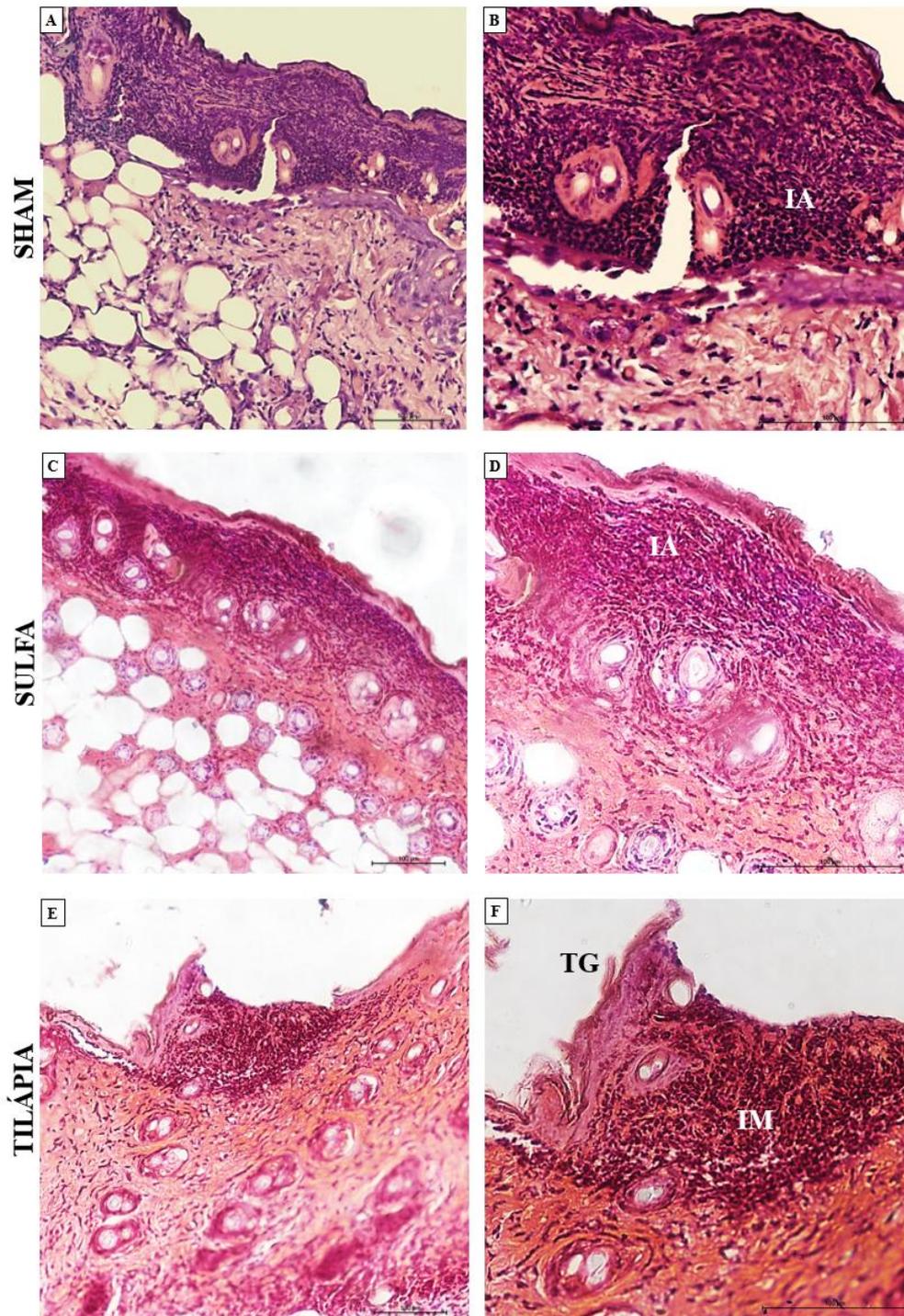
O infiltrado leucocitário foi quantificado em 6 campos/ferida, distribuído entre derme papilar e reticular (aumento de 400x). Os resultados foram expressos como a média do número de células/campo ± EPM. \* $p < 0,05$  indica diferença estatística comparado com o grupo *Sham* e # $p < 0,05$  ao grupo Sulfa (N=8-10 animais/grupo; ANOVA seguido de Tukey).

**Tabela 2** – Representação por escores da análise histológica das queimaduras superficiais

<i>Tratamento x Período</i>	<i>Sham</i>	<i>Sulfadiazina</i>	<i>Tilápia</i>	<i>p-Valor</i>
<b>3° dia</b>	4 (4)	4 (4)	2 (4 – 0) * <sup>#</sup>	p<0,05
<b>7° dia</b>	4 (4)	1,50 (4 – 1) *	2 (4 – 1) *	p<0,05
<b>14° dia</b>	1 (1)	1 (1 – 0)	1 (1 – 0)	p>0,05

Os resultados foram expressos pela mediana e intervalo mínimo e máximo de escores adotados no grupo experimental. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's onde \*p<0,05 representa diferença em relação ao grupo *Sham* e #p<0,05 em relação ao grupo Sulfa (N=8 10/grupo/dia).

**Figura 13** – Fotomicrografia de área ulcerada na pele de camundongo no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia

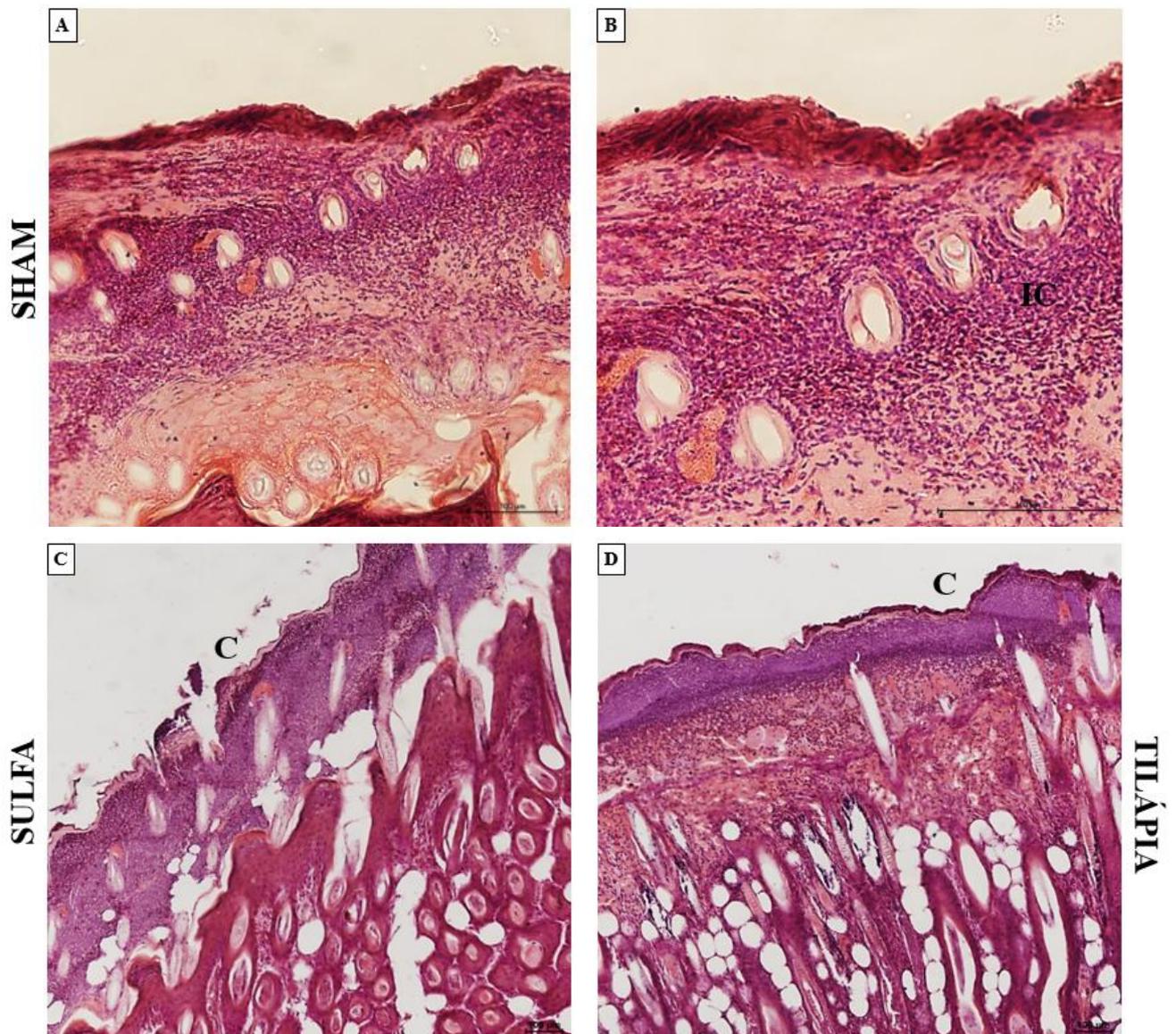


Fonte: Elaborada pelo autor.

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina Eosina de lesões por queimaduras no 3º dia após a cirurgia (aumento de 100x e 200x, respectivamente). (IA) indica o infiltrado leucocitário agudo na área ulcerada, (IM) indica o infiltrado moderado e a (TG) sinaliza o tecido de granulação. Sham (A; B); Sulfadiazina (C; D); Tilápia (E; F) (N= 8-10 animais/grupo/dia).

No 7º dia de tratamento apenas o grupo controle *Sham* permaneceu com intensa área ulcerada e infiltrado inflamatório agudo resultando em diferença estatística ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo Sulfa e ao grupo pele de tilápia (Tabela 2), além disso, nesses dois últimos grupos citados foi observado formação de crosta (Figura 14).

**Figura 14** – Fotomicrografias de área ulcerada na pele de camundongo no 7º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia

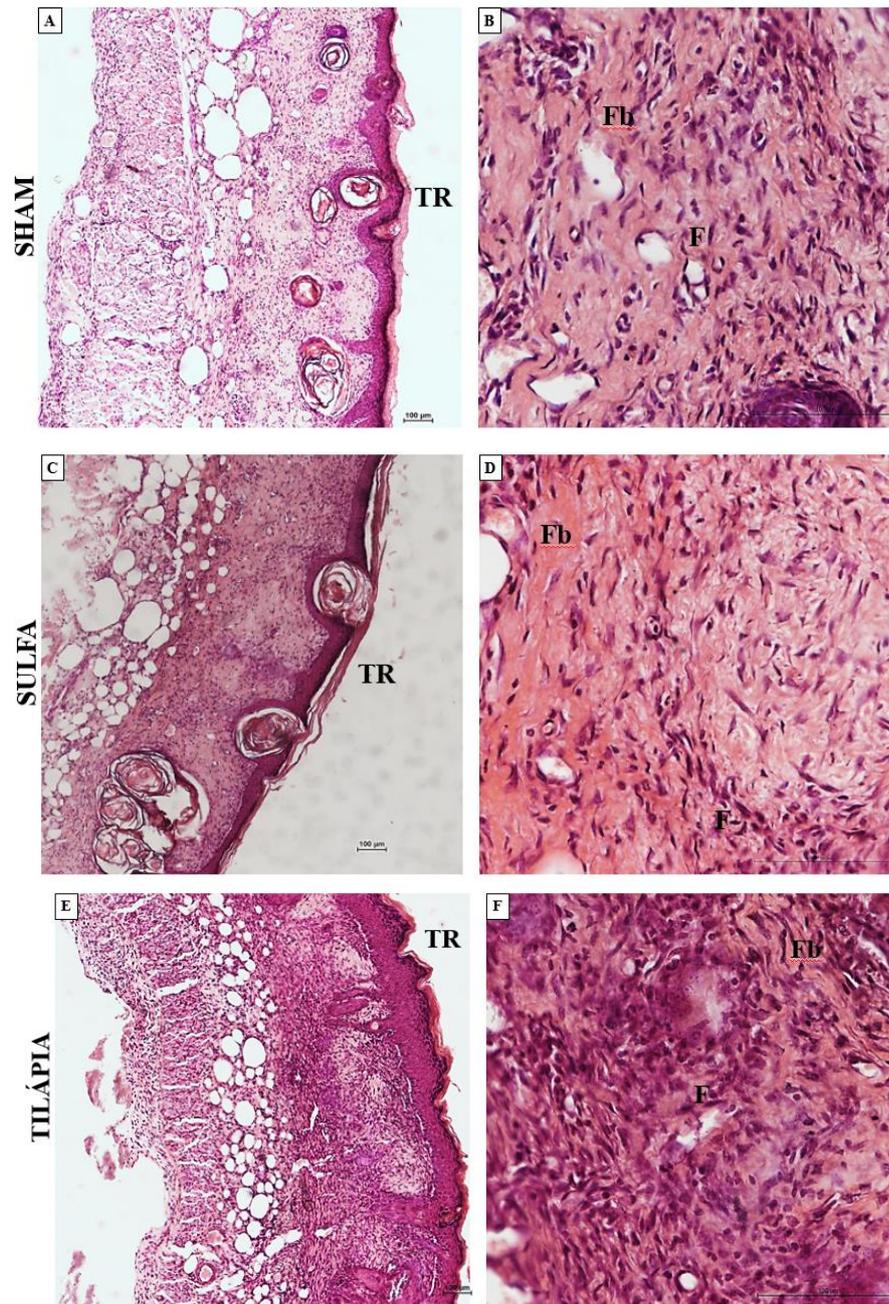


Fonte: Elaborada pelo autor.

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina Eosina de lesões por queimaduras no 7º dia. (IC) caracteriza a presença de infiltrado leucocitário crônico, enquanto (C) indica a presença de crosta. O grupo *Sham* (A; B) está representado, respectivamente, no aumento de 100x e 200x, enquanto os grupos Sulfa (C) e Tilápia (D) estão representados pelo aumento de 40x (N= 8-10 animais/grupo/dia).

No 14º dia, não houve diferença entre os grupos experimentais, o epitélio desses animais se caracterizou sem úlcera, com tecido conjuntivo remodelado. Nota-se ainda a presença de fibrose nos grupos e um aparente povoamento maior de fibroblastos no grupo tratado com o curativo pele de tilápia (Figura 15).

**Figura 15** – Fotomicrografia do epitélio na pele de camundongo com queimadura superficial no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia



Fonte: Elaborada pelo autor.

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por Hematoxilina Eosina de lesões por queimaduras no 14º dia após a cirurgia (aumento de 40x e 200x). (TR) identifica ausência de úlcera e o tecido remodelado, (F) identifica o povoamento de fibroblastos e a (Fb) presença de fibrose. Sham (A;B); Sulfadiazina (C; D); Tilápia (E; F).

5.2.1. O curativo pele de tilápia não evidenciou aumento da reepitelização nas queimaduras superficiais.

Não foi observado diferença no parâmetro de reepitelização nas lâminas coradas por H&E do 14º dia entre os grupos experimentais, mantendo-se uma mediana de um para todos eles (Tabela 3).

**Tabela 3** – Representação por escores da análise de reepitelização

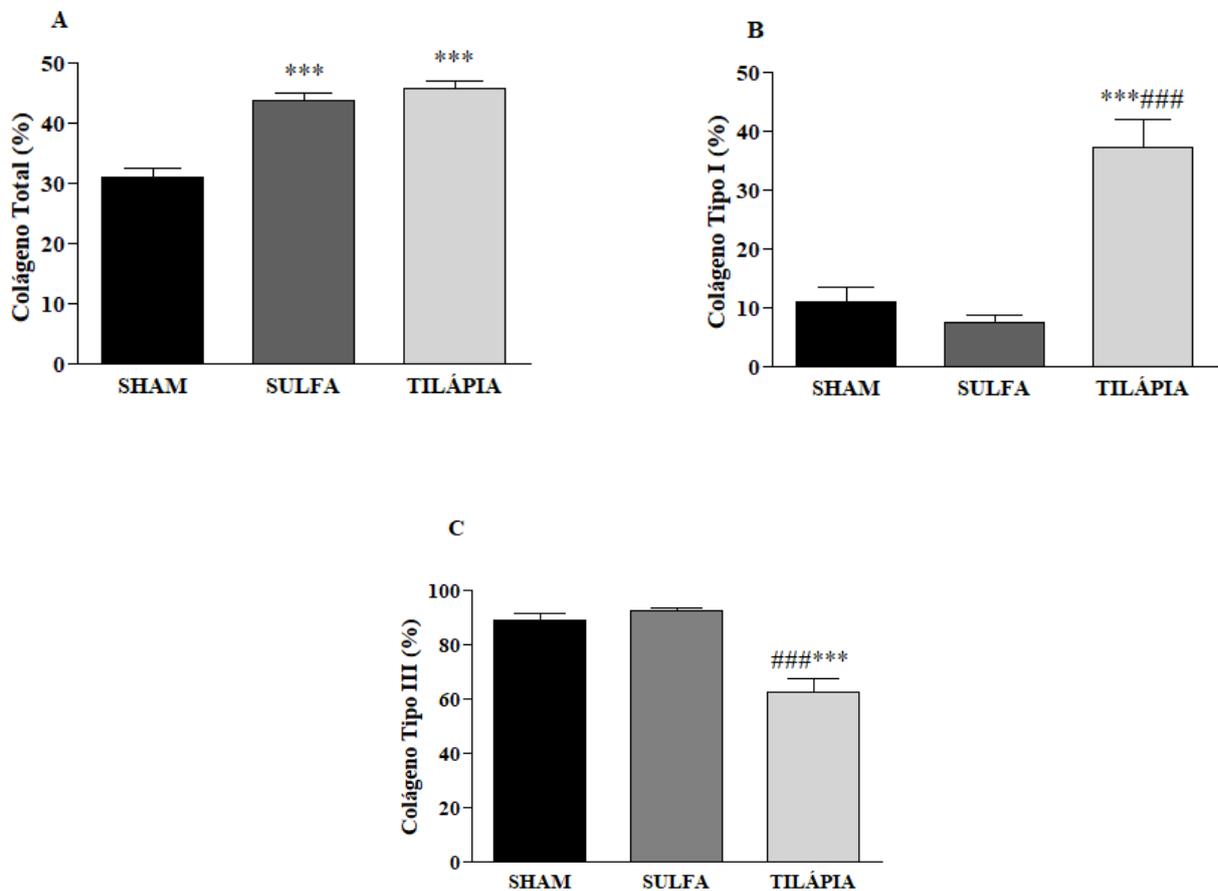
<i>Grupos experimentais</i>	<i>Reepitalização</i>	<i>p-Valor</i>
<b><i>Sham</i></b>	1 (0 – 1)	p>0,05
<b><i>Sulfa</i></b>	1 (0 – 2)	p>0,05
<b><i>Tilápia</i></b>	1 (0 – 2)	p>0,05

Os parâmetros de reepitelização foram observados no 14º dia quanto à intensidade (0- ausente, 1- 25-50%, 2- 50-100%). Os resultados foram expressos pela mediana e intervalo mínimo e máximo de escores adotados no grupo experimental. A análise estatística foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. (N=10-8/grupo/dia). Sulfadiazina (C; D); Tilápia (E; F) (N= 8-10 animais/grupo/dia).

### 5.3. O curativo pele da tilápia aumenta a deposição de colágeno do tipo I na queimadura

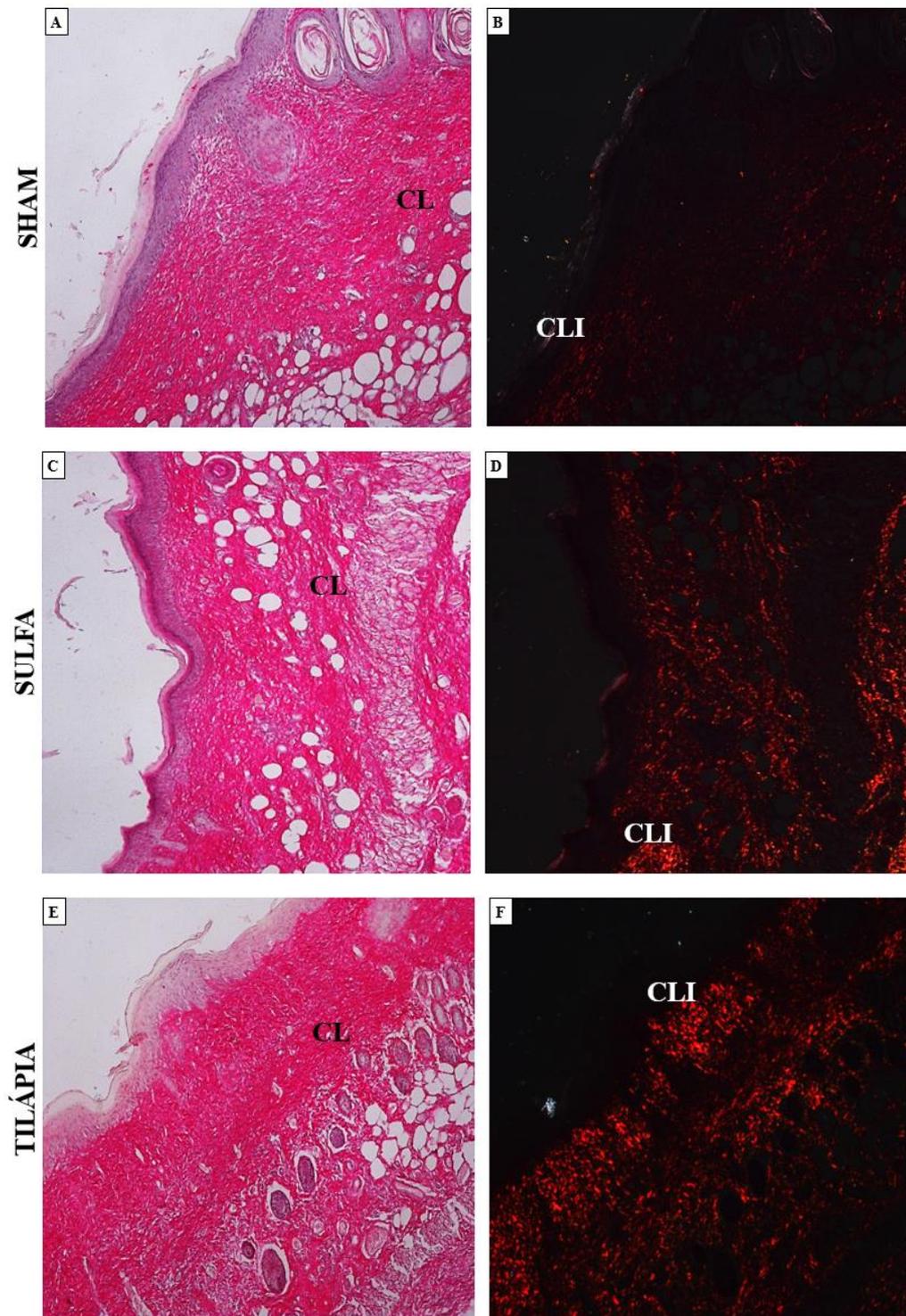
A Figura 16 mostra que as queimaduras do grupo *Sham* (média±DP: 31.09 ± 1.52) no 14º dia de tratamento apresentaram menor deposição de colágeno total em comparações os demais grupos experimentais. O grupo controle positivo Sulfa (média±DP: 43.88 ± 1.22) juntamente com o grupo tratado com o curativo pele da tilápia (média±DP: 45.79 ± 1.18) apresentaram maior percentual de colágeno total, com p<0,001. Com relação ao colágeno do tipo I no mesmo período de tratamento, foi observado baixos níveis no leito da ferida nos grupos experimentais *Sham* (média±DP: 11.00 ± 2.46) e Sulfa (média±DP: 7.57 ± 1.30), enquanto que o grupo tratado com a pele da tilápia (média±DP: 37.25 ± 3.68) revelou um alto teor desse tipo de colágeno (p<0,001) quando comparado aos demais grupos (Figuras 17 e 18). No que se refere ao colágeno do tipo III, foi constatado um percentual maior (p<0,001) desse tipo nos grupos controles *Sham* (média±DP: 89.00 ± 2.46) e Sulfa (média±DP: 92.43 ± 1.30) quando relacionado ao o grupo tratado com o curativo pele da tilápia (média±DP: 62.75 ± 4.913).

**Figura 16** – Deposição de colágeno total, tipo I e tipo III em queimaduras no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia



Após 14 dias de tratamento, os grupos tiveram seu percentual de colágeno total (A), colágeno do tipo I (B), colágeno do tipo III (C) quantificados por meio de fotomicrografias (400x) analisadas no software Image J®. Os resultados (picograma/mL) foram expressos pela média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. Valores de \*\*\* $p < 0,001$  e #### $p < 0,001$  ao grupo Sulfa, veiculo representam diferença estatística em relação ao *Sham* (N=7 animais/grupo/dia).

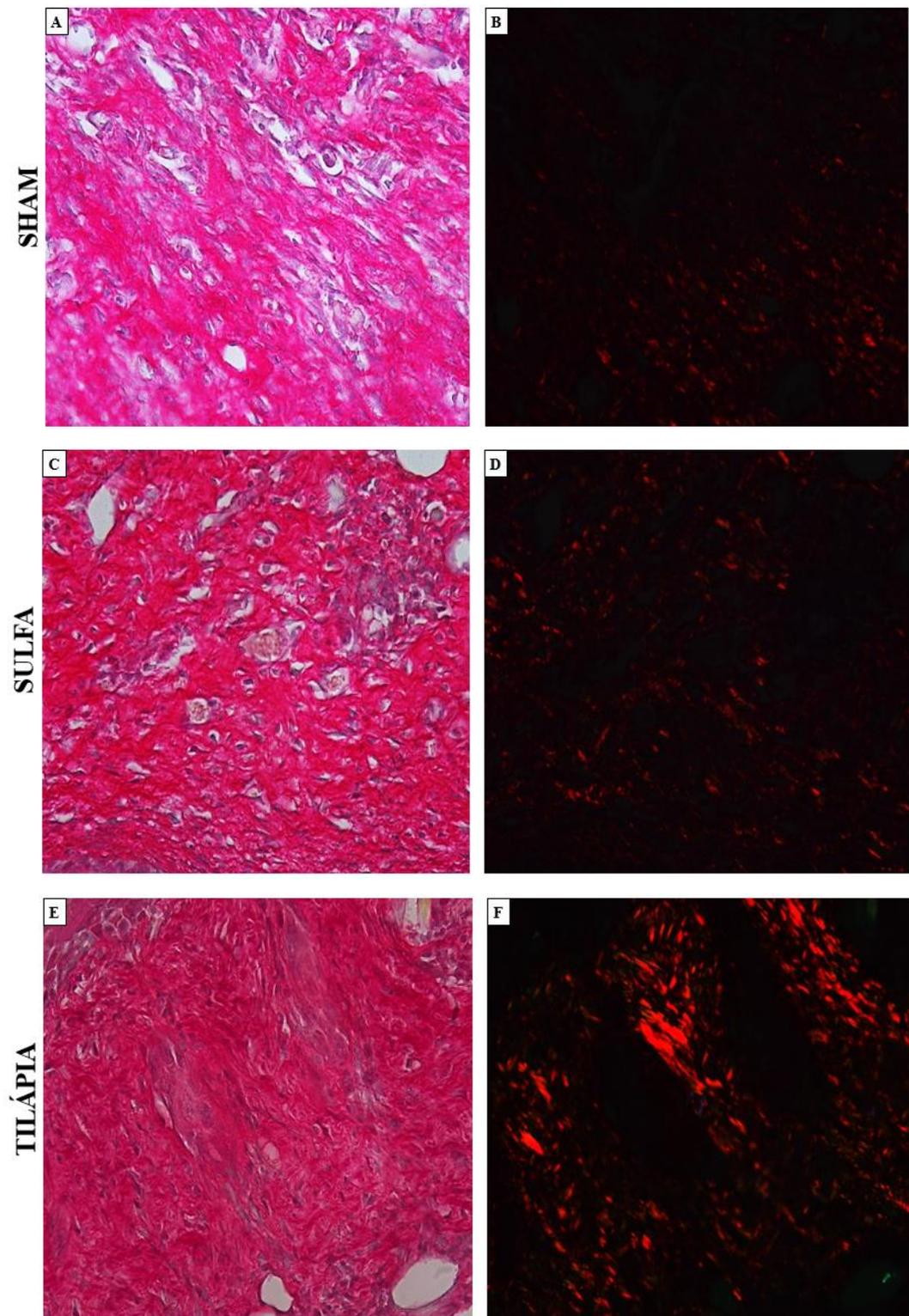
**Figura 17** – Fotomicrografia da pele de camundongo representando a deposição de colágeno total e tipo I em queimadura superficial após no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia



Fonte: Elaborada pelo autor.

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por *Picosirius red* de lesões por queimaduras no 14º dia após a cirurgia (aumento de 100x), demonstrando as fibras colágenas (CL) e respectivamente no mesmo campo em luz polarizada, retratando o colágeno do tipo I (CLI). Sham (A; B); Sulfa (C;D); Tilápia (E; F), (N=7 animais/grupo/dia).

**Figura 18** – Fotomicrografia da pele de camundongo representando a deposição de colágeno total e tipo I em queimadura superficial no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia



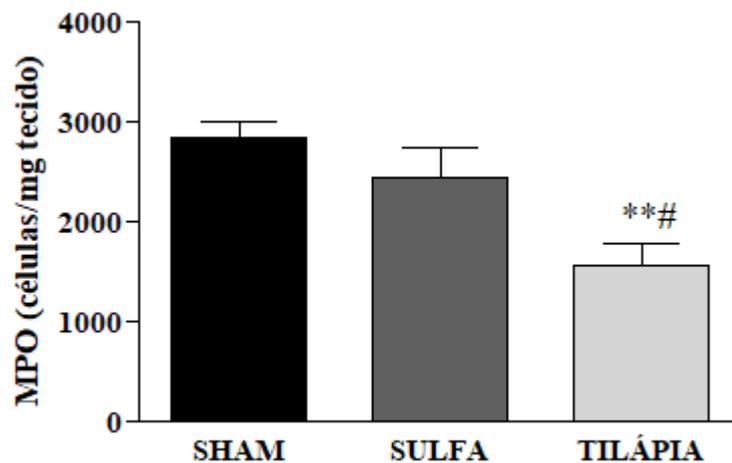
Fonte: Elaborada pelo autor.

Fotomicrografias de lâminas histológicas coradas por *Picrosirius red* de lesões por queimaduras no 14º dia após a cirurgia (aumento de 400x), demonstrando as fibras colágenas e respectivamente no mesmo campo em luz polarizada, retratando o colágeno do tipo I. Sham (A; B); Sulfa (C;D); Tilápia (E; F), (N=7 animais/grupo/dia).

#### 5.4. O curativo de pele de tilápia reduz os níveis de mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO reflete uma medida indireta da atividade dos neutrófilos durante a resposta inflamatória. Dessa forma, a Figura 19 mostra que no 3º dia de tratamento foi observado valores mais acentuados dos controles *Sham* (média±DP: 2839±161,6) e Sulfa (média±DP: 2443±293,0), quando comparados ao obtido com tratamento realizado com o curativo pele da tilápia (média±DP: 1557±217,5).

**Figura 19** – Níveis da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais

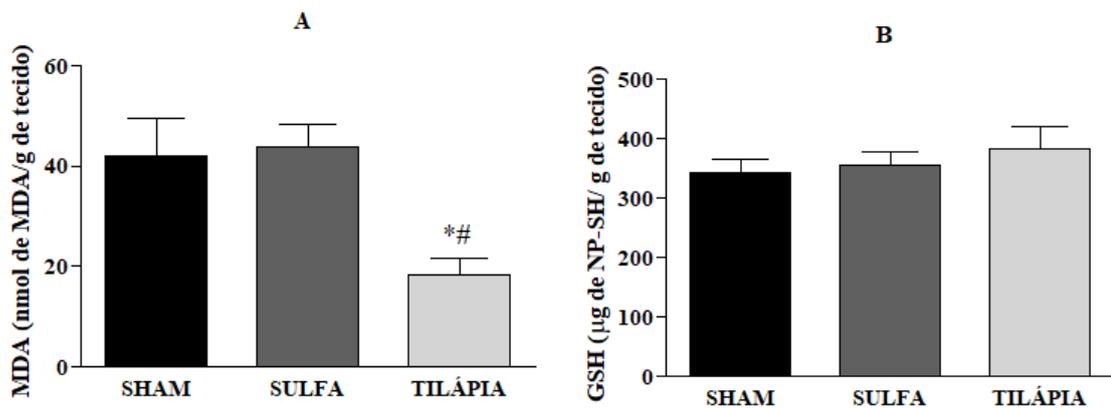


Os níveis de MPO se correlacionam com a atividade de neutrófilos no leito da ferida. Seus níveis foram mensurados no homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais após 3 dias de tratamento com o curativo pele de tilápia. Os resultados foram expressos em células/mg de tecido através da média ± E.P. M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. Onde \*\*p<0,01 representa a diferença significativa em comparação ao grupo controle *Sham* e #p<0,05 ao grupo Sulfa (N=8-10 animais/grupo).

### 5.5. O curativo de pele de tilápia reduz os níveis de malonaldeído (MDA), mas não de glutathiona sintetase (GSH).

O MDA é um marcador de peroxidação lipídica. No 3º dia de tratamento após a indução da queimadura se constatou níveis aumentados nos controles *Sham* (média±DP: 42.09±7.555) e Sulfa (média±DP: 43.70± 4.676), em contrapartida, no grupo pele da tilápia (média±DP: 18.35±3.159) se observou níveis menores do marcador com  $p < 0,05$  (Figura 20). P o marcador GSH, que é um antioxidante fisiológico que neutraliza espécies reativas de oxigênio, não houve diferença significativa entre os grupos: *Sham* (média±DP: 344.0± 22.51), Sulfa (média±DP: 355.8± 21.18) e curativo pele de tilápia (média±DP: 383.0± 38.16) (Figura 20).

**Figura 20** – Níveis de malonaldeído (MDA) e glutathiona sintetase (GSH) no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia em queimaduras superficiais



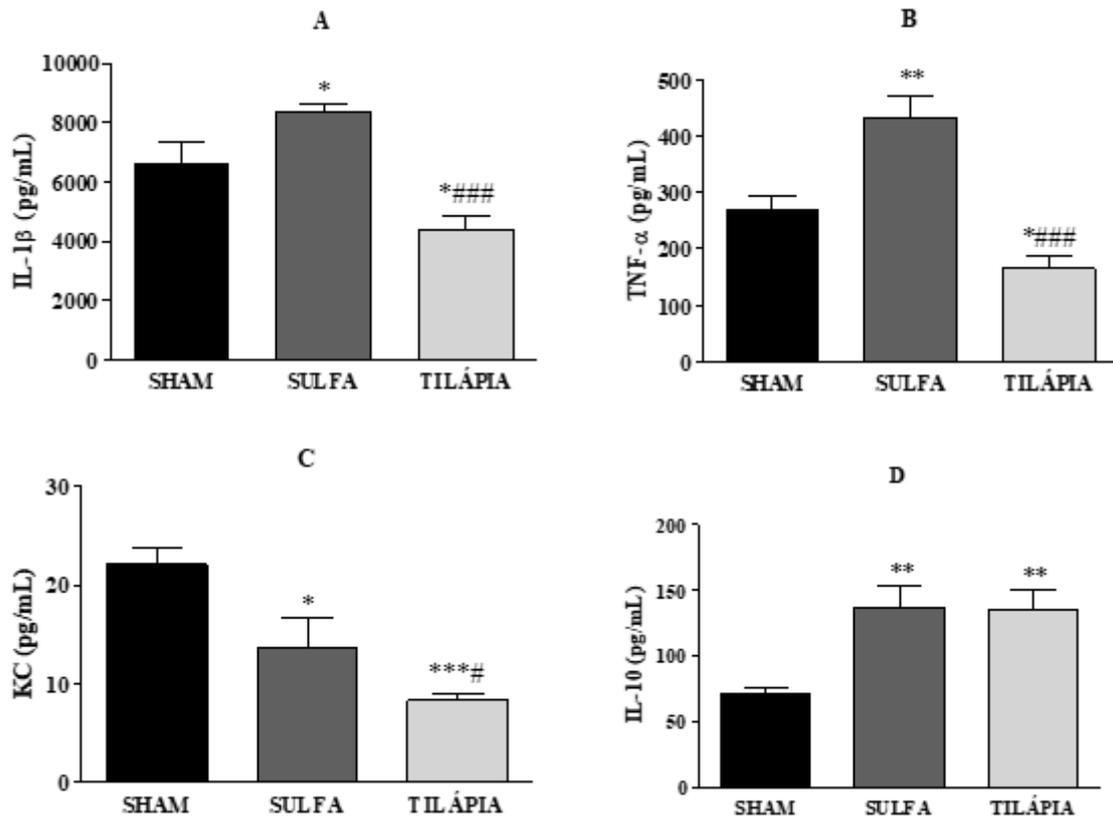
Os mediadores MDA (A) e GSH (B) foram mensurados a partir do homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia. Os resultados foram expressos através da média ± E.P. M e análise estatística com ANOVA, seguida de Tukey. Onde \* $p < 0,05$  representa a diferença significativa em comparação ao grupo controle *Sham* e # $p < 0,05$  ao grupo Sulfa (N=6 animais/grupo).

### **5.6. O curativo de pele de tilápia reduz os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC (IL-8), e aumenta os níveis de IL-10**

No 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia foi observada sua participação na liberação de mediadores importantes na resposta inflamatória. Houve uma redução na liberação de IL-1 $\beta$  (Figura 21 B) no grupo pele de tilápia (média $\pm$ DP: 4408 $\pm$ 426,7pg/mL) quando comparado ao *Sham* (média $\pm$ DP: 6619 $\pm$ 750,6 pg/mL) e ao grupo Sulfa (média $\pm$ DP: 8359 $\pm$ 250,4 pg/mL). O mesmo observou-se para TNF- $\alpha$  (Figura 21 A), onde os grupos controles *Sham* (média $\pm$ DP: 268,9 $\pm$ 24,08 pg/mL) e Sulfa (média $\pm$ DP: 431,7 $\pm$ 40,06 pg/mL) obtiveram médias superiores ao grupo pele de tilápia (média $\pm$ DP: 165,4 $\pm$ 22,52 pg/mL). Para a KC (Figura 21 C), o grupo tratado com a pele de tilápia (média $\pm$ DP: 8,233 $\pm$ 0,7614 pg/mL) também revelou redução desse parâmetro quando comparado aos demais grupos *Sham* (média $\pm$ DP: 22,08 $\pm$ 1,746 pg/mL) e Sulfa (média $\pm$ DP: 13,69 $\pm$ 2,981 pg/mL).

No mesmo período de tratamento foi verificado que aumento significativo dos níveis de IL-10, no grupo pele de tilápia (média $\pm$ DP: 135,4 $\pm$ 14,23 pg/mL), quando comparado ao grupo *Sham* (média $\pm$ DP: 70,58 $\pm$ 5,691 pg/mL), porém em relação ao controle Sulfa (média $\pm$ DP: 137,2 $\pm$ 15,59 pg/mL) isso não ocorreu (Figura 21 D).

**Figura 21** – Níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , KC e IL-10 no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia

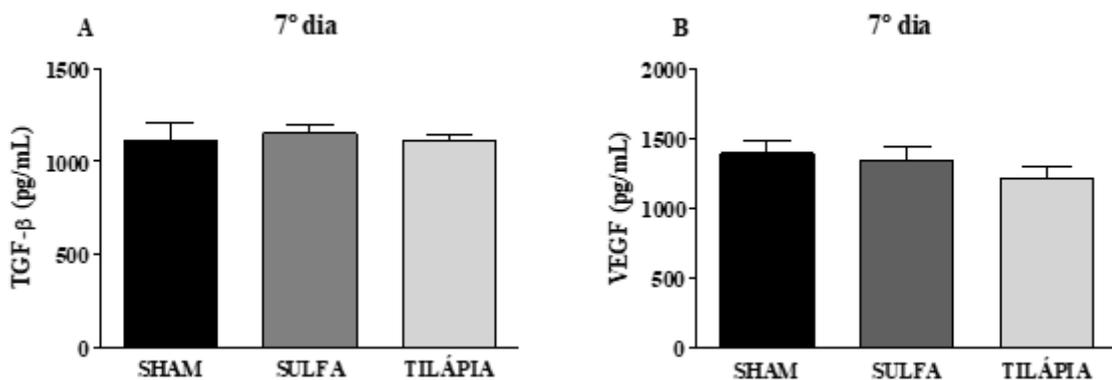


As citocinas TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), KC (C) e IL-10 (D) foram mensuradas no homogenato de tecido produzido após coleta da lesão dos animais no 3º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia. Os resultados foram expressos em picograma/mL através da média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. Onde \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  representam a diferença significativa em comparação ao grupo controle *Sham* e # $p < 0,05$  e ### $p < 0,001$  ao grupo Sulfa, veículo (N=8-10 animais/grupo).

### 5.7. O curativo de pele de tilápia aumentou os níveis dos fatores de crescimento TGF- $\beta$ e VEGF apenas no 14º dia de tratamento

A liberação de TGF- $\beta$  não foi alterada entre os grupos experimentais após 7 dias de tratamentos (Figura 22 A), tendo sido obtido os seguintes valores nos grupos: *Sham* (média±DP: 1112±96,24 pg/mL), Sulfa (média±DP: 1150±45,22 pg/mL) e curativo pele de tilápia (média±DP: 1112±36,78 pg/mL). Da mesma forma, a liberação de VEGF (Figura 22 B) foi similar entre os grupos experimentais: *Sham* (média±DP: 1396±89,75 pg/mL), Sulfa (média±DP: 1348±101,2 pg/mL) e curativo pele de tilápia (média±DP: 1215±89,22 pg/mL).

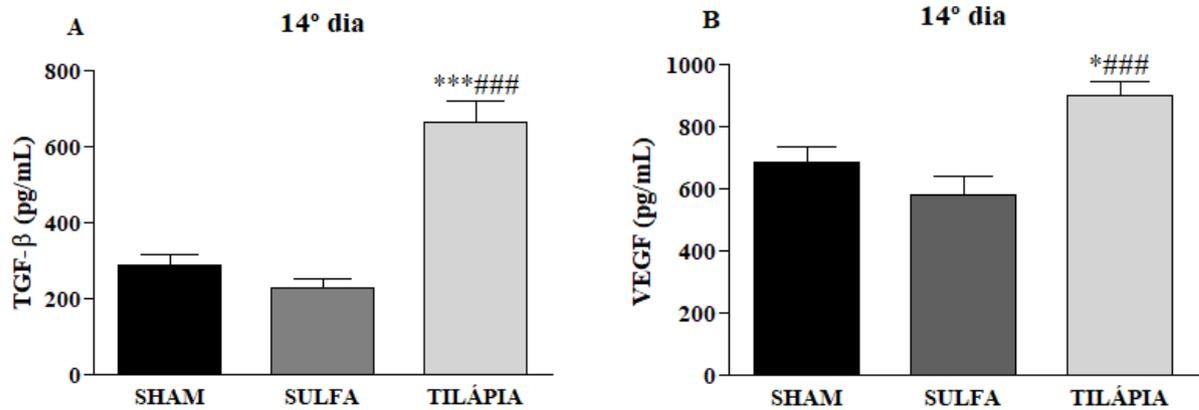
**Figura 22** – Níveis de TGF- $\beta$  e VEGF no 7º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia



No 7º dia de tratamento, os fatores de crescimento TGF- $\beta$  (A) e VEGF (B) foram mensurados através do homogenato das lesões por queimaduras. Os resultados (pg/mL) foram expressos pela média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. Valores de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  representam diferença estatística em relação ao *Sham* (N=6 animais/grupo/dia).

Não obstante, no 14º dia os níveis de TGF- $\beta$  (Figura 23 A) foram elevados no grupo curativo pele de tilápia (média±DP: 662,9±57,18 pg/mL), quando comparado aos grupos *Sham* (média±DP: 288,4±28,10 pg/mL) e Sulfa (média±DP: 226,9±23,91 pg/mL). Observou-se também níveis aumentados de VEGF (Figura 23 B) no grupo tratado com o curativo pele de tilápia (média±DP: 900,9±45,53 pg/mL) em relação a *Sham* (média±DP: 687,0±47,01 pg/mL) e Sulfa (média±DP: 580,9±57,95 pg/mL) para o mesmo período de tratamento.

**Figura 23** – Níveis de TGF- $\beta$  e VEGF no 14º dia de tratamento com o curativo pele de tilápia



No 14º dia os fatores de crescimento TGF- $\beta$  (A) e VEGF (B) foram mensurados através do homogenato das lesões por queimaduras. Os resultados (picograma/mL) foram expressos pela média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi feita com ANOVA, seguida de Tukey. Valores de \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  representam diferença estatística em relação ao *Sham* e #### $p < 0,001$  em relação ao grupo Sulfa. (N=6 animais/grupo/dia).

## 6 DISCUSSÃO

A pele atua como uma importante barreira, protegendo o corpo de agressões externas. Porém as queimaduras quebram o equilíbrio da interface cutânea e acabam por afetar todo o organismo, a depender do grau do acometimento. A cobertura da espessura total desses ferimentos consiste em um procedimento importante para a cicatrização de feridas. Nesse panorama, vários materiais biológicos, sintéticos ou não, são estudados visando aplicações clínicas e buscando a resolução de feridas agudas e crônicas (YOON *et al*, 2019; GROEBER *et al*, 2011).

Nesse trabalho, camundongos *Swiss* foram submetidos à queimaduras superficiais e tratados com a pele da tilápia, e foi constatada uma lesão menos acentuada depois de sete dias de tratamento em relação ao grupo tratado apenas com salina (*Sham*) e o tratamento convencional Sulfadizina. A resolução da lesão é observada ao longo do processo de reparo pela contração da área da lesão. Essa etapa é um importante parâmetro para a cicatrização de uma ferida, considerando que as células presentes nas bordas da lesão, ou seja, que não foram atingidas pela queimadura, se proliferam e se aproximam diminuindo a área do tecido que precisa ser curada. Isto reflete no processo de reepitelização, onde o rápido fechamento da ferida reduz o risco de infecção e distúrbios dessa fase de cura que podem levar à deformidade (SINGH; YOUNG; MCNAUGHT, 2017). No 14º dia de tratamento com a pele de tilápia não houve diferença de escore e reepitelização entre os grupos, possivelmente devido ao metabolismo dos camundongos que favorece um tempo reduzido de cicatrização ou então devido ao processo natural de cicatrização, já que o modelo animal em questão não produziu uma ferida crônica, considerando que não possui fator patológico que atrase o processo (ABDULLAHI *et al*, 2015).

Esses resultados corroboram com estudos recentes realizados em 2019, onde Chen e colaboradores observaram aumento da contração de feridas abertas em ratos tratados com colágeno extraído da pele da tilápia a partir do 7º dia e no 14º dia, relatando a crosta e completa cicatrização. Em estudos anteriores (ZHOU *et al*, 2015; ZHOU *et al*, 2017) utilizando nanofibras fabricadas a partir de colágeno de pele de tilápia em modelo de ferida excisional em ratos, constatou-se uma taxa de cicatrização superior, com desaparecimento da crosta no 7º dia de tratamento, além de cobertura quase completa da ferida com epiderme contínua no 14º dia. A outra abordagem desse mesmo grupo de pesquisa combinou um de hidrogel de quitosana com peptídeos marinhos oriundos da tilápia testado em ensaio de queimadura em coelhos resultou também a partir do 7º dia formação de crostas e início de descamação nas bordas, assim

como mostrou boa qualidade na ferida no 14º dia e queda de crosta no 21º dia. Ainda corroborando com os dados obtidos, a pele liofilizada do sapo *Rana ridibunda* (Ranidae) reduziu a área de feridas abertas de camudongos *Swiss* a partir do 6º dia de tratamento (REZAZADE *et al*, 2013).

O curativo pele da tilápia melhorou visualmente o aspecto flogístico da ferida, verificando-se a ausência de edema e diminuição da hiperemia. Possivelmente esse evento pode estar associado ao fato de ser um curativo oclusivo, atuando como barreira física e evitando perda de fluidos e assim, contribuindo para a melhora desses parâmetros. Um trabalho realizado em ratos *Wistar* com queimaduras de segundo grau superficiais demonstrou que um curativo feito com kiwi fresco foi capaz de atenuar no 3º e 4º dia de tratamento a hiperemia, quando comparado também a um grupo não tratado e à própria Sulfadiazina de prata. Esse mesmo tratamento conseguiu reduzir edema no 9º e 11º dia de tratamento. (MOHAJERI *et al*, 2010). Também utilizando modelo de queimadura, agora em ratos *Sprague-Dawley*, um tratamento que reuniu luz policromática polarizada linear com curativo aberto e pomada antibacterianaa atenuou o grau de hiperemia no 2º dia ao 17º, bem como de edema do 4º dia ao 13º (KARADAG *et al*, 2007).

No presente estudo, a pele da tilápia melhorou visualmente o aspecto flogístico da ferida, verificando-se a ausência de edema e diminuição da hiperemia. Em estudo de Mohajeri *et al.*, (2010), um curativo feito com kiwi fresco foi capaz de atenuar, no 3º e 4º dias de tratamento, a hiperemia em ratos *Wistar* com queimaduras de segundo grau superficiais, quando comparado também a um grupo não tratado e à própria Sulfadiazina de prata, reduzindo o edema no 9º e 11º dias de tratamento.. Utilizando modelo de queimadura em ratos *Sprague-Dawley*, um tratamento que reuniu luz policromática polarizada linear com curativo aberto e pomada antibacterianaa atenuou o grau de hiperemia do 2º dia ao 17º, bem como o edema do 4º dia ao 13º (KARADAG *et al*, 2007).

A redução do infiltrado inflamatório foi evidenciada com o tratamento com a pele de tilápia. A inflamação é um importante evento que reflete a invasão de neutrófilos, monócitos e linfócitos na injúria, pois são células envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio, secreção de citocinas e fatores de crescimento (BURGOYNE; MORGAN, 2003). No 14º dia não houve diferença estatística entre os grupos, constatando-se assim tecido remodelado e com presença de fibrose, porém visualmente, o grupo tilápia obteve uma maior população de fibroblastos. Esses achados corroboram com o estudo de Lima-Junior e colaboradores (2017), no qual ratos com queimaduras de segundo grau superficiais, tratados com a pele da tilápia em glicerol, mostraram reações inflamatórias de intensidade leve a moderada nas feridas recobertas,

com fenótipo mononuclear, diferentemente da intensa resposta aguda observada nos grupos controle não tratado e Sulfaziazina. Assim como também houve uma redução do número de células inflamatórias em feridas abertas em camundongos tratadas com pele do sapo *Rana ridibunda* nos dias 4 e 6 pós-operatório (BAZAZ, MAHERE *et al*, 2013).

Utilizando modelo de queimaduras em camundongos albinos, El-Kased e colaboradores (2017) mostraram que as feridas tratadas com um hidrogel contendo mel e quitosana apresentaram contração contínua na borda da queimadura durante o curso do tratamento em todos os animais. Nesse mesmo estudo foi mostrado que esses animais tratados obtiveram redução de infiltrado, regeneração com hiperqueratose e acantose na epiderme, em substituição ao necrosado, quando comparado aos animais tratados com Sulfadiazina de prata, cujo grupo mostrou necrose focal com acantose na adjacente.

Em estudo recente (YANG *et al*, 2019), pesquisadores utilizaram um *scaffold* contendo um combinado de fibroína da seda, ácido hialurônico e alginato de sódio em ratos queimados, que demonstrou redução de área nos 7º, 14º e 21º dias de tratamento, indicando que o efeito conjunto dos três componentes acelerou a cicatrização da ferida. No sétimo dia, as células inflamatórias estavam menos distribuídas no grupo tratado com o *scaffold*, com presença maior de fibroblastos e reepitelização completa no 21º dia.

Com a finalidade de complementar esses dados obtidos na histologia do período inflamatório, foi realizada a mensuração da enzima Mieloperoxidase a partir das amostras das queimaduras coletadas e, previamente tratadas de acordo com cada grupo experimental no 3º dia. Após a injúria, o sistema imune identifica e neutraliza patógenos através da liberação de enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas armazenadas previamente nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos, tais como mieloperoxidase (MPO) (ANDRADE; LIMA; ALBUQUERQUE, 2010). Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa da enzima nas lesões tratadas com a pele da tilápia. Do mesmo modo Yuhua *et al* (2012) verificaram também redução dos níveis de MPO após 24h em ratos tratados com Poloxamer 188 em queimaduras de segundo grau. A fibroína de seda também foi capaz de reduzir os níveis de MPO após 24h da indução da queimadura em ratos *Wistar* (AYKAC; KARANLIK; SEHIRLI, 2018).

A resposta inflamatória à queimadura é extremamente complexa e resulta em efeitos sistêmicos deletérios, dentre estes está a associação à peroxidação lipídica. Trata-se de um evento autocatalítico, onde espécies reativas de oxigênio (ROS) causam auto-oxidação de ácidos graxos poliinsaturados que leva à destruição das membranas celulares, e consequentemente à morte celular (MUGUREGOWDA; KUMAR; GOVINDARAMA, 2018;

SENER *et al.*, 2005). Dentre os principais mecanismos de defesa que combatem os efeitos deletérios da oxidação, resultantes de espécies reativas de oxigênio, está a glutathiona reduzida (GSH), que é um antioxidante hidrossolúvel que desempenha papéis na catálise, metabolismo, transdução de sinal, expressão gênica e apoptose. É um tripetídeo, reconhecido como o mais importante tiol não protéico intracelular que protege os tecidos, neutralizando os radicais livres (MUGUREGOWDA; KUMAR; GOVINDARAMA, 2018; KILIÇ *et al.*, 2013).

Nesse estudo, o curativo pele de tilápia conseguiu reduzir os níveis de MDA, que se relaciona com a peroxidação lipídica, porém ele não foi capaz de aumentar os níveis do antioxidante GSH, demonstrando que a pele de tilápia não atua sob essa via. Um estudo com a silimarina, o principal componente do cardo de leite, demonstrou ter propriedades antioxidantes em ratos queimados, reduzindo níveis de MDA e aumentando de GSH, 48h após o início do tratamento (TOKLU *et al.*, 2007). Shahouzehi *et al.* (2018) constataram diminuição de MDA em ratos *Sprague-Dawley* queimados tratados com óleo de resina de *Pistacia atlantica* no 14º dia e níveis elevados nos animais tratados com Sulfadiazina.

Após a injúria térmica, ocorre o extravasamento de sangue e formação de coágulos, levando à liberação de citocinas inflamatórias e quimioatrativas. Uma liberação descompensada de citocinas promove disfunção imunológica e inflamação sistêmica significativa, que resultam em danos aos tecidos, falência de múltiplos órgãos ou morte em pacientes queimados (ZIELINS *et al.*, 2015; KUBO *et al.*, 2014; HUR *et al.*, 2015). Os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF e KC foram reduzidos pelo tratamento com o curativo pele de tilápia no 3º dia após a indução da queimadura superficial, corroborando estudos em modelo de queimaduras em camundongos que revelaram aumento bifásico na expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (citocinas pró-inflamatórias) e KC (quimiocina e análoga da IL-8 humana) durante as fases inflamatória (3h a 1 dia) e proliferativa tardia (3 a 7 dias) (REF?).

A secreção de IL-1 $\beta$  ocorre por meio de células endoteliais, neutrófilos, macrófagos e queratinócitos, desencadeando a ativação de Myd88, que desencadeiam na transcrição de genes de genes inflamatórios induzida por NF- $\kappa$ B. Esta citocina está envolvida na resposta à infecção, na indução da produção de outras citocinas inflamatórias e podem refletir a gravidade da condição mórbida após a queimadura persistente (RIDER *et al.*, 2011; AUGER; SAMADI; JESCHKE, 2017; GUO *et al.*, 2017). O TNF- $\alpha$ , também regulado por NF- $\kappa$ B, é responsável em parte pela indução de apoptose de vários elementos celulares, atua nas defesas antimicrobianas pela ativação de neutrófilos e monócitos, além de estimular a secreção de outros mediadores pró-inflamatórios. Elevados níveis de TNF- $\alpha$  contribuem para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aceleração da taxa de lipólise, seus níveis também estão associados à

perda de músculo esquelético e ao prejuízo à cicatrização de feridas pós queimadura (NIELSON *et al.*, 2017; AUGER;SAMADI; JESCHKE,2017). A quimiocina derivada de queratinócitos, KC, é um biomarcador de recrutamento de neutrófilos em resposta à infecção ou dano tecidual, cuja expressão pode ser induzida por IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (SCHWACHA *et al.*, 2010).

Em nossos ensaios também foi verificado aumento dos níveis da citocina IL-10 no terceiro dia após o tratamento com a pele da tilápia. Considerada uma citocina antiinflamatória, a IL-10 é secretada por diversas células como os queratinócitos endoteliais, e tem sua expressão aumentada no período de 12 h até o 7º dia após a lesão térmica, demonstrando ser uma importante reguladora do reparo de feridas (KUBO *et al.*, 2014). Um hidrogel híbrido biodegradável semeado com células-tronco mesenquimais aumentou a marcação de IL-10 em queimadura de terceiro grau de camundongos (ALAPURE *et al.*, 2018). Em modelo de ferida incisional foi constatado que a IL-10 endógena inibiu no local da lesão a infiltração de neutrófilos e macrófagos, bem como a expressão de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (BURGOYNE; MORGAN, 2003).

Corroborando com os nossos resultados, Guo *et al.* (2017) verificaram, por imunohistoquímica, uma diminuição significativa nos níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , e aumento de IL-10 de ratos com queimadura infectada tratada com um *scaffold* de nanocristais de colágeno-celulose contendo microesferas carregadas com curcumina. Um tratamento com proteína de soro de leite desnaturada foi capaz de diminuir significativamente os níveis elevados de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , diminuir a expressão de KC e aumentar a IL-10 no tecido de camundongos diabéticos lesionados (BADR *et al.*, 2012). Não obstante, em nosso estudo, a concentração reduzida de KC está coerente com os achados encontrados na histologia e na dosagem de MPO. Portanto, associada à modulação da liberação dessas citocinas, podemos vislumbrar um favorecimento de um perfil antiinflamatório desencadeado pelo uso da pele da tilápia.

Buscando a oclusão da ferida, durante a resposta inflamatória, células imunes e macrófagos migram para o local da lesão, não apenas para combater possíveis microrganismos invasores, mas também para produzir diversos fatores de crescimento que orientam a reepitelização, o repovoamento de fibroblastos e a remodelação da matriz extracelular (TAKEO *et al.*, 2015). Dentre esses está o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), que tem como principal função atuar como um indutor da diferenciação dos miofibroblastos. Ele é produzido e liberado pelas plaquetas, fibroblastos, células endoteliais, epiteliais e inflamatórias e também está ligado à formação de quelóides e às cicatrizes hipertróficas (WANG *et al.*, 2017). Outro protagonista é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que está intrinsecamente envolvido na angiogênese, ou seja, na formação de novos vasos sanguíneos.

Esse fenômeno é essencial no aporte sanguíneo de nutrientes e oxigênio para a síntese da matriz extracelular e proliferação celular que irão reparar o tecido (LANDÉN *et al.*, 2016).

Nossos achados mostraram aumento considerável desses dois fatores (TGF- $\beta$  e VEGF) apenas no 14º dia de tratamento dos animais com o curativo pele da tilápia. Esses resultados corroboram com o estudo de Chen *et al* (2019), onde o colágeno extraído da pele da tilápia aumentou a expressão de outros fatores de crescimento como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) nos 3º e 7º dia em feridas excisionais. Bayir *et al* (2019) observou que um curativo impregnado com cera de abelha, azeite e manteiga aumentou significativamente as expressões de TGF-  $\beta$ , especialmente no 7º dia em ratos *Wistar* com queimaduras superficiais de segundo grau, em comparação aos animais do grupo não tratado e ao grupo tratado com Sulfadiazina de prata. Esse mesmo estudo ainda relatou um aumento significativo de VEGF em relação ao grupo não tratado no mesmo dia de tratamento.

O aumento desses fatores de crescimento pode se correlacionar com os resultados que mostraram um aumento da deposição de colágeno no leito das queimaduras dos animais tratados com o curativo pele de tilápia, além da maior conversão do colágeno do tipo III para o tipo I. O aumento dos fatores de crescimento estimula o recrutamento de fibroblastos para o local da ferida, e o resultado combinado é o aumento da deposição de colágeno (particularmente dos tipos I e III). O colágeno é a proteína mais abundante em vertebrados e contribui significativamente para a dureza dos tecidos conjuntivos. Como dito anteriormente, a pele da tilápia é demasiadamente rica em colágeno do tipo I, que é o mais comum e de maior resistência, além disso Tang e Saito (2015) demonstraram que o colágeno tipo I da pele da tilápia estimula fatores de crescimento como FGF, os quais expressam e liberam fator de crescimento de queratinócitos (KGF). Esses dados se relacionam com a elevação desse tipo de colágeno em detrimento do colágeno tipo III no leito da ferida, portanto acaba refletindo um processo cicatricial mais robusto e com um tecido de melhor qualidade (BARRIENTOS *et al*, 2008; VALENZUELA-ROJO; LÓPEZ-CERVANTES; SÁNCHEZ-MACHADO, 2018; LIMA-JUNIOR *et al*, 2017).

Bazaz e colaboradores (2013) observaram um aumento gradual do colágeno total em feridas abertas de camundongos *Swiss* tratados com a pele do sapo *Rana ridibunda*. Em outro estudo, um gel de nanofibra de peptídeo sintético foi capaz de elevar a deposição de colágeno em camundongos BALB/C com queimaduras de terceiro grau no 21º dia de tratamento (YERGOZ *et al*, 2017). Lamaro-Cardoso *et al* (2019) observaram aumento de colágeno do tipo I em coloração de *picrosirius* em ratos queimados e tratados com fotobiomodulação (PBM) associada à terapia de fração vascular estromal derivada do tecido adiposo (SVF), quando comparada à sulfadiazina no 30º dia. Em outro trabalho (ZHANG *et al*, 2013) constatou-se aumento da deposição de colágeno do I em queimaduras em ratos *Wistar* que foram tratados com laser no 14º dia.

Muitos esforços têm-se centrado na compreensão da fisiologia e tratamento de feridas com ênfase em novas abordagens terapêuticas e no contínuo desenvolvimento de tecnologias para os cuidados de feridas cutâneas (VELNAR; BAILEY; SMRKOL, 2009). A sulfadiazina de prata é usada tradicionalmente no SUS para tratamento de queimaduras e na minimização dos riscos de infecção, porém esses curativos convencionais tendem a aderir à superfície da ferida e demandam trocas frequentes, o que traumatiza as superfícies recém-epitelizadas e retarda a cicatrização. Além disso, o creme de sulfadiazina de prata também demonstrou baixas evidências de efetividade na cicatrização de feridas, devido a um efeito tóxico observado na regeneração dos queratinócitos (FERREIRA; PAULA, 2013; MORGAN; BLEDSOE; BARKER 2000). Em nosso estudo, a sulfadiazina também não foi capaz de atenuar a maioria dos parâmetros inflamatórios investigados, bem como o processo cicatricial não foi eficaz.

O modelo de queimadura adotado neste trabalho possui algumas limitações como o uso da sutura como curativo oclusivo para manter o curativo no local e a resolução rápida da queimadura no animal, no qual limita a obtenção de informações mais aprofundadas sobre a remodelação tecidual, força tênsil do tecido cicatrizado e a potencial formação de cicatrizes fibrosas devido ao aumento dos fatores de colagênese. Porém, este é um dos primeiros estudos que trazem dados mais aprofundados sobre o modo como a pele da tilápia atua nos mecanismos de cicatrização de queimaduras. Os achados desse estudo corroboram com os recentes trabalhos publicados pelo grupo de pesquisa do NPDM/UFC, e indicam potencial atuação da pele da tilápia na fase inflamatória e na produção de uma matriz extracelular mais arrojada, ajudando a nortear a elucidação das suas possíveis vias. Contudo, ainda são necessárias a investigação de outros parâmetros no processo de cicatrização, com abordagens moleculares para melhor compreensão de atuação da pele da tilápia.

## 7 CONCLUSÃO

Esse trabalho esclareceu melhor como o curativo pele de tilápia atua na atenuação da inflamação e na melhor organização tecidual dos tecidos lesionados por feridas causadas por lesão térmica. A pele de tilápia exerceu efeito regulatório na resposta inflamatória provocada pela queimadura através da modulação da liberação de mediadores pró- e anti-inflamatórios. Além disso, estimulou a contração da lesão e melhorou a organização tecidual através do aumento da produção de fatores de crescimento e colágeno. Dessa forma, o presente estudo indica as prováveis vias de atuação da pele de tilápia durante a cicatrização, assim como reforça a sua utilização na medicina regenerativa como um biomaterial de baixo custo e eficaz.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A.P.N.N. *et al.* Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. **Rev Bras Queimaduras**, v. 14, n. 3, p. 203-10, 2015.
- ALAPURE, B. V., LU, Y., HE, M., CHU, C.-C., PENG, H., MUHALE, F., ... HONG, S. Accelerate Healing of Severe Burn Wounds by Mesenchymal Stem Cell Seeded Biodegradable Hydrogel Scaffold Synthesized from Arginine-based Poly(ester amide) and Chitosan. **Stem Cells and Development**, 2018.
- AYKAC A, KARANLIK B, SEHIRLI AO. Protective effect of silk fibroin in burn injury in rat model. **Gene**. Jan 30;641:287-291. 2018.
- ANDRADE, A. G. DE; LIMA, C. F. DE; ALBUQUERQUE, A. K. B. DE. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Rev Bras Queim**, v. 9, n. 1, p. 21–30, 2010.
- AUGER, C., SAMADI, O., & JESCHKE, M. G. The biochemical alterations underlying post-burn hypermetabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1863(10), 2633–2644, 2017.
- ATIYEH BS, HAYEK SN, GUNN SW. New technologies for burn wound closure and healing - Review of the literature. **Burns**.31:944-956, 2005.
- BADR, G., BADR, B. M., MAHMOUD, M. H., MOHANY, M., RABAH, D. M., & GARRAUD, O. Treatment of diabetic mice with undenatured whey protein accelerates the wound healing process by enhancing the expression of MIP-1 $\alpha$ , MIP-2, KC, CX3CL1 and TGF- $\beta$  in wounded tissue. **BMC Immunology**, 13(1), 32, 2012.
- BARRIENTOS S, STOJADINOVIC O, GOLINKO MS, BREM H, TOMIC-CANIC M. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**. Sep-Oct;16(5):585-601, 2008.
- BAZAZ, MAHERE *et al.* Pharmaceutical application of frog skin on full-thickness skin wound healing in mice. **Pharmaceutical biology**. vol. 51,12: 1600-6, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Cartilha para tratamento de emergência das queimaduras / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde - Portal da Saúde. Queimados [Internet]. Brasília: **Ministério da Saúde**; 2017 [acesso 2020 Out 18]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/component/content/article/842-queimados/40990-queimados>
- BAYIR, Y., UN, H., UGAN, R. A., AKPINAR, E., CADIRCI, E., CALIK, I., & HALICI, Z. The effects of Beeswax, Olive oil and Butter impregnated bandage on burn wound healing. **Burns**, 2019.
- BEIRAGHI-TOOSI A, ASKARIAN R, SADRABADI HAGHIGHI F, SAFARIAN M, KALANTARI F, HASHEMY SI. Burn-induced Oxidative Stress and Serum Glutathione Depletion; a Cross Sectional Study. **Emerg (Tehran)**. 6(1):e54, 2018.
- BHAT, S.; KUMAR, A. Biomaterials in regenerative medicine. **Journal of Postgraduate Medicine Education and Research**, v. 46, n. 2, p. 81-89, 2012.

- BURGOYNE, R. D., & MORGAN, A. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. **Physiological Reviews**, 83(2), 581–632, 2003.
- CESTARI, S. Dermatologia Pediátrica. **Artes Médicas**, p 9-16. 2018.
- CHEN J, GAO K, LIU S, WANG S, ELANGO J, BAO B, et al. Fish collagen surgical compress repairing characteristics on wound healing process in vivo. **Mar Drugs** 2019; 17:1–12.
- CHIU T, BURD A. Xenograft dressing in the treatment of burns. **Clin Dermatol**; 23:419-423, 2005.
- COSTA, B. O., JÚNIOR, E. M. L., DE MORAES FILHO, M. O., FECHINE, F. V., DE MORAES, M. E. A., JÚNIOR, F. R. S., ROCHA, M. B. S. Use of Tilapia Skin as a Xenograft for Pediatric Burn Treatment: A Case Report. **Journal of Burn Care & Research**, 2019.
- COSTA B. O, LIMA-JÚNIOR E.M.L, FECHINE F.V *et al.* Utilização da pele de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) como xenoenxerto em um equino com ferimento traumático. **Acta Scientiae Veterinariae**, 48(Suppl 1): 506, 2020.
- CRUZ, B. DE F.; CORDOVIL, P. B. L.; BATISTA, K. DE N. M. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura. **Rev Bras Queimaduras**, v. 11, n. 4, p. 246–250, 2012.
- DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**186:421-31, 1990.
- EL-KASED, R. F., AMER, R. I., ATTIA, D., & ELMAZAR, M. M. Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing. **Scientific Reports**, 7(1), 2017.
- EVERS, L. H., BHAVSAR, D., & MAILÄNDER, P. The biology of burn injury. **Experimental Dermatology**, 2010.
- FINNERTY CC, JESCHKE MG, HERNDON DN, GAMELLI R, GIBRAN N, KLEIN M, *et al.* Temporal cytokine profiles in severely burned patients: a comparison of adults and children. **Mol Med**, 2008.
- GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B. Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clin Plastic Surg**, v. 39, p. 85–97, 2012.
- GILL, P., FALDER, S. Early management of paediatric burn injuries. **Paediatr Child Health**, v. 27, n. 9, p.406–414, 2017.
- GREENHALGH, D. G. Management of Burns. **New England Journal of Medicine**, 380(24), 2349–2359, 2019.
- GROEBER, F., HOLEITER, M., HAMPEL, M., HINDERER, S., & SCHENKE-LAYLAND, K. Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 2011.
- GUO R, LAN Y, XUE W, CHENG B, ZHANG Y, WANG C, RAMAKRISHNA S. Collagen-cellulose nanocrystal scaffolds containing curcumin-loaded microspheres on infected full-thickness burns repair. **J Tissue Eng Regen Med**. Dec;11(12):3544-3555. 2017.
- HALL, L.W.; CLARKE, K.W. **Veterinary anaesthesia**, 9. ed, 1991.
- HALL *et al.* Pathophysiologic Mechanisms and Current Treatments for Cutaneous Sequelae of Burn Wounds. **Compr Physiol**, 8:371-405, 2018.
- HAMBLIN, M. R. Novel pharmacotherapy for burn wounds: what are the advancements.

**Exp Opi Pharmacot**, p. 1–17, 2018.

HERMANS MHE. Porcine xenografts vs. (cryopreserved) allografts in the management of partial thickness burns: Is there a clinical difference? **Burns**. 40:408-415, 2014.

HESKETH, M. et al. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. **Int J Mol Sci**, v. 18, p. 1–10, 2017.

HUR, J., YANG, H. T., CHUN, W., KIM, J.-H., SHIN, S.-H., KANG, H. J., & KIM, H. S.. Inflammatory Cytokines and Their Prognostic Ability in Cases of Major Burn Injury. **Annals of Laboratory Medicine**, 35(1), 105, 2015.

JACKSON DM. The diagnosis of the depth of burning. **The British journal of surgery**. 40:588–96, 1953.

JEPPS, O.G.; DANCİK, Y.; ANISSIMOV, Y.G.; ROBERTS, M.S. Modeling the human skin barrier - Towards a better understanding of dermal absorption. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.65, n.2, p.152-158, 2013.

JOHNSON, C. Management of burns. **Surgery**, v. 36, n. 8, p. 435–440, 2018.

KARADAG, C. A., BIRTANE, M., AYGIT, A. C., UZUNCA, K., & DOGANAY, L. The Efficacy of Linear Polarized Polychromatic Light on Burn Wound Healing: An Experimental Study on Rats. **Journal of Burn Care & Research**, 28(2), 291–298, 2007.

KECK, M., HERNDON, D. H., KAMOLZ, L. P., FREY, M., & JESCHKE, M. G. Pathophysiology of burns. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 159(13-14), 327–336, 2009.

KILIÇ C, GÜLEÇ PEKER EG, ACARTÜRK F, KILIÇASLAN SM, ÇOŞKUN CEVHER Ş. Investigation of the effects of local glutathione and chitosan administration on incisional oral mucosal wound healing in rabbits. **Colloids Surf B Biointerfaces**. Dec 1;112:499-507, 2013.

KUBO, H., HAYASHI, T., AGO, K., AGO, M., KANEKURA, T., & OGATA, M. Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury. **Legal Medicine**, 16(1), 8–13, 2014.

LADAK, A.; TREDGET, E. E. Pathophysiology and Management of the Burn Scar. **Clin Plastic Surg**, v. 36, p. 661–674, 2009.

LAMARO-CARDOSO, A., BACHION, M. M., MORAIS, J. M., FANTINATI, M. S., MILHOMEM, A. C., ALMEIDA, V. L., ... LINO-JÚNIOR, R. S. Photobiomodulation associated to cellular therapy improve wound healing of experimental full thickness burn wounds in rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. 2019.

LATEEF Z *et al.* The Cutaneous Inflammatory Response to Thermal Burn Injury in a Murine Model. **Int. J. Mol. Sci.** v.20, p.538, 2019.

LEITE A.P, OLIVEIRA B.G.R.B, SOARES M.F, BARROCAS D.L.R. **Uso e efetividade da papaína no processo de cicatrização de feridas: uma revisão sistemática**. *Rev Gaúcha Enferm.* 33(3):198-207, 2012.

LIMA-JUNIOR EM, DE MORAES FILHO MO, COSTA BA, FECHINE FV, DE MORAES MEA, SILVA-JUNIOR FR, *et al.* Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. **J Surg Case Rep**, 2019.

LIMA JÚNIOR *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Rev Bras Queimaduras**, v. 16(1), p. 10-7, 2017.

- LIMA JÚNIOR EM. Tecnologias inovadoras: uso da pele da tilápia do Nilo no tratamento de queimaduras e feridas. **Rev Bras Queimaduras**.16(1):1-2, 2017.
- LIMA JUNIOR EM, BANDEIRA TJPG, MIRANDA MJB, FERREIRA GE, PARENTE EA, PICCOLO NS, *et al.* Characterization of the microbiota of the skin and oral cavity of *Oreochromis niloticus*. **J Health Biol Sci**.4(3):193-7, 2016.
- MARKESON, D, *et al.* Scarring, stem cells, scaffolds and skin repair. **J Tissue Eng Regen Med** v. 9, p. 649–668, 2013.
- MARTIN, N A; FALDER, S. A review of the evidence for threshold of burn injury. **Burns**, v. 43, p. 1624–1639, 2017.
- MATIOSKI A, DA SILVA CRGBP, DA SILVA-CUNHA D, *et al.* First-year experience of a new skin bank in Brazil. **Plast Aesthetic Res**; 2:326, 2015.
- METSAVAHT, L. Queimaduras e suas cicatrizes. **Surg Cosmet Dermatol**., 9(4):281-4, 2017.
- MIRANDA, M. J. B. D., & BRANDT, C. T. Nile tilapia skin xenograft versus silver-based hydrofiber dressing in the treatment of second-degree burns in adults. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica (RBCP) – Brazilian Journal of Plastic Surgery*, 34(1), 89–95, 2019.
- MORGAN E.D., BLEDSOE S.C., BARKER J. Ambulatory Management of Burns. **Am Fam Physician**. 62(9):2015-2026, 2000.
- MOHAJERI, G., MASOUDPOUR, H., HEIDARPOUR, M., KHADEMI, E. F., GHAFGHAZI, S., ADIBI, S., & AKBARI, M. The effect of dressing with fresh kiwifruit on burn wound healing. **Surgery**, 148(5), 963–968. 2010.
- MUGUREGOWDA HT, KUMAR P, GOVINDARAMA PUE. Wound Healing Potential of Intermittent Negative Pressure under Limited Access Dressing in Burn Patients: Biochemical and Histopathological Study. **World J Plast Surg**. Jan;7(1):58-66, 2018.
- NIELSON, C. B., DUETHMAN, N. C., HOWARD, J. M., MONCURE, M., & WOOD, J. G. Burns: Pathophysiology of Systemic Complications and Current Management. **Journal of Burn Care & Research**, 38(1), e469–e481. 2017.
- OBENG MK, MCCAULEY RL, BARNETT JR, HEGGERS JP, SHERIDAN K, SCHUTZLER SS. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. **Burns**; 27:267–71, 2001.
- NYAME, T.T., CHIANG, H.A., ORGILL, D.P. Clinical Applications of Skin Substitutes. **Surg Clin N Am**, v. 94 p. 839–850, 2014.
- ORYAN, A., ALEMZADEH, E., & MOSHIRI, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. **Journal of Wound Care**, 26(1), 5–19, 2017.
- PATTERSON, E. K. *et al.* Carbon monoxide-releasing molecule 3 inhibits myeloperoxidase (MPO) and protects against MPO-induced vascular endothelial cell activation/dysfunction. **Free Rad Biol Med**, v. 70, p. 167–173, 2014.
- PICCOLO NS, PICCOLO MS, PICCOLO MTS. The Use of Frog skin as a Biological Dressing for Temporary Cover of Burn Wounds. In: Klein ME, Lorenz CN, editors. **Innovations in Plastic and Aesthetic Surgery**, Berlin: Springer, p. 129–137, 2008.
- PICCOLO N, PICCOLO MS, PICCOLO MTS. Uso de pele de rã como curativo biológico como substituto temporário da pele em queimaduras. **Rev Bras Queim**.2:18-24, 2002.
- PINTO MEDEIROS DIAS MT, LIMA JÚNIOR EM, NEGREIROS NUNES ALVES AP,

MONTEIRO BILHAR AP, RIOS LC, COSTA BA, *et al.* Tilapia fish skin as a new biologic graft for neovaginoplasty in Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser syndrome: a video case report. **Fertil Steril** 112:174–6, 2019.

REZAZADE M, *et al.* Pharmaceutical application of frog skin on full-thickness skin wound healing in mice. **Pharm Biol**, v. 51(12), 1600–1606, 2013.

RIDER, P. *et al.* IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **J Immunol.**, v. 187, n. 9, p. 4835-43, 2011.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red- Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods in Molecular Biology**, 395–407, 2017.

ROWAN, M. P., CANCIO, L. C., ELSTER, E. A., BURMEISTER, D. M., ROSE, L. F., NATESAN, S., ... CHUNG, K. K. Burn wound healing and treatment: review and advancements. **Critical Care**, 19(1), 2015.

RIVITTI, E. A. Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti. São Paulo. **Artes Médicas**, p. 01, 2014.

SALIBIAN, A. A. *et al.* Current concepts on burn wound conversion — A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns. **Burns**, v. 42, n. 5, p. 1025–1035, 2016.

SCHMITZ, M. EBERLEIN, T., ANDRIESSEN, A. Wound treatment costs comparing a biocellulose dressing with moist wound healing dressings and conventional dressings. *Wound Medicine*, 6:11-14, 2014.

SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.** Oct 24;25(1):192-205, 1968.

ŞENER, G *et al.* Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. **Burns**, v. 31, n. 5, p. 587-596, 2005.

SHANMUGAM, K.; SAHADEVAN, R. Bioceramics—An introductory overview. *Fundamental Biomaterials: Ceramics*, p. 1-46, 2018.

SHAHOUZEHI B, SEPEHRI G, SADEGHIYAN S, MASOOMI-ARDAKANI Y. Effect of *Pistacia Atlantica* Resin Oil on Anti-Oxidant, Hydroxyprolin and VEGF Changes in Experimentally-Induced Skin Burn in Rat. **World J Plast Surg.** Sep;7(3):357-363, 2018.

SHERIDAN, R. L. Burn Care for Children. **Pediatrics in Review**, 39(6), 273–286, 2018.

SHPICHKA, A., BUTNARU, D., BEZRUKOV, E. A., SUKHANOV, R. B., ATALA, A., BURDUKOVSKII, V., ... TIMASHEV, P. Skin tissue regeneration for burn injury. **Stem Cell Research & Therapy**, 10(1), 2019.

SINGH, S., YOUNG, A., & MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery (United Kingdom)**. Elsevier Ltd, 2017.

SON, YOUNG JU *et al.* Biomaterials and controlled release strategy for epithelial wound healing. **Biomaterials science**, v. 7, n. 11, p. 4444-4471, 2019.

SORG, H. *et al.* Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. **Eur Surg Res**, v. 58, p. 81–94, 2016.

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M.M. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.**, v.134, n.5, p.985-994, 2001.

STONE, R., NATESAN, S., KOWALCZEWSKI, C. J., MANGUM, L. H., CLAY, N. E., CLOHESSY, R. M. CHRISTY, R. J. Advancements in regenerative strategies through the continuum of burn care. **Frontiers in Pharmacology**. Frontiers Media S.A, 2018.

TANG J, SAITO T. Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study. **Biomed Res Int**.139476, 2015.

TELES G.G.A *et al*. Tratamento de queimadura de segundo grau superficial em face e pescoço com heparina tópica: estudo comparativo, prospectivo e randomizado. **Rev Bras Cir Plást**. 27(3):383-6, 2012.

TREDGET, E. E., SHUPP, J. W., & SCHNEIDER, J. C. Scar Management Following Burn Injury. **Journal of Burn Care & Research**, 38(3), 146-147, 2017.

TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. **Anal Biochem**. May 1;524:13-30, 2017.

TOKLU HZ, TUNALI-AKBAY T, ERKANLI G, YÜKSEL M, ERCAN F, SENER G. Silymarin, the antioxidant component of Silybum marianum, protects against burn-induced oxidative skin injury. **Burns**. Nov;33(7):908-16, 2007.

VALENZUELA-ROJO, D.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; SÁNCHEZ-MACHADO, D. Tilapia (*Oreochromis aureus*) collagen for medical biomaterials. In: *Seaweed Biomaterials*. **IntechOpen**, p. 47, 2018.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOL, J.T. **The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms**. *J. Int. Med. Res.*, v.37; p. 1528-1542, 2009.

VIG K, CHAUDHARI A, TRIPATHI S. *et al*. Advances in skin regeneration using tissue engineering. **Int J Mol Sci**. 2017 Apr 7;18(4):789.

VIGANI, A., & CULLER, C. A. Systemic and Local Management of Burn Wounds. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 47(6), 1149–1163, 2017.

WANG N, DING T, ZHOU T, LIU X, SUN J, XUE Y, *et al*. Electrospun tilapia collagen nanofibers accelerating wound healing via inducing keratinocytes proliferation and differentiation. **Colloids Surf B: Biointerfaces**.143:415–22, 2016.

WANG, Y.; BEEKMAN, J.; HEW, J.; JACKSON, S.; ISSLER-FISHER, A.C.; PARUNGAO, R.; LAJEVARDI, S.S.; LI, Z.; MAITZ, P.K.M. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. **Adv. Drug Deliv. Rev**. 2018, 123, 3–17.

WASIAK J, CLELAND H, CAMPBELL F, SPINKS A. Dressings for superficial and partial thickness burns. **Cochrane Database Syst Rev** (3), 2013.

YAMAMOTO T, IWASE H, KING TW, *et al*. Skin xenotransplantation: Historical review and clinical potential. **Burns**.1-12, 2018.

YANG, W., XU, H., LAN, Y., ZHU, Q., LIU, Y., HUANG, S., ... GUO, R. Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair. **International Journal of Biological Macromolecules**. 2019.

YE H; DE S. Thermal injury of skin and subcutaneous tissues: A review of experimental approaches and numerical models. **Burns**, v. 43, n.5, p. 909-932, 2017.

YERGOZ, F. *et al*. Heparin mimetic peptide nanofiber gel promotes regeneration of full thickness burn injury. *Biomaterials*, v. 134, p. 117-127, 2017.

- YOON, D., JOO, S. Y., CHO, Y. S., SEO, C., & CHO, Y. S. A clinical trial with a collagen dermal substitute INSUREGRAF® for wound healing in burn patients. **Biomaterials Science**. 2019.
- YOUNG, A. W., DEWEY, W. S., & KING, B. T. Rehabilitation of Burn Injuries. Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America, 2018.
- YUHUA, S., LIGEN, L., JIAKE, C., & TONGZHU, S. Effect of Poloxamer 188 on deepening of deep second-degree burn wounds in the early stage. **Burns**, 38(1), 95–101, 2012.
- ZHANG, Y.-M., RUAN, J., XIAO, R., ZHANG, Q., & HUANG, Y.-S. Comparative Study of 1,064-nm Laser-Induced Skin Burn and Thermal Skin Burn. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 67(3), 1005–1014, 2013.
- ZHOU C, HONG P, LI S, HU Z, YANG P. Marine collagen peptides from the skin of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): characterization and wound healing evaluation. **Mar Drugs**, 15:102, 2017.

## ANEXO A – CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO SOBRE O EFEITO DE DERIVADOS DA PELE DA TILÁPIA (*Oreochromis niloticus*) NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES PROVOCADAS POR QUEIMADURAS SUPERFICIAIS EM CAMUNDONGOS E EM FERIDAS INCISIONAIS", protocolada sob o CEUA nº 7304051018 (ID 000570), sob a responsabilidade de **Nylane Maria Nunes de Alencar** e equipe; *Fernanda Soares Macedo; Wesley Lyeverton Correia Ribeiro* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 19/10/2018.

We certify that the proposal "STUDY ON THE EFFECT OF TILAP SKIN (*Oreochromis niloticus*) DERIVATIVES ON THE HEALING OF LESIONS CAUSED BY SURFACE BURNS IN MICE AND IN INCISIONAL WOUNDS", utilizing 156 Heterogenics mice (156 females), protocol number CEUA 7304051018 (ID 000570), under the responsibility of **Nylane Maria Nunes de Alencar** and team; *Fernanda Soares Macedo; Wesley Lyeverton Correia Ribeiro* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 10/19/2018.

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

Vigência da Proposta: de 11/2018 a 01/2020

Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [156](#)

Linhagem: [Swiss](#)

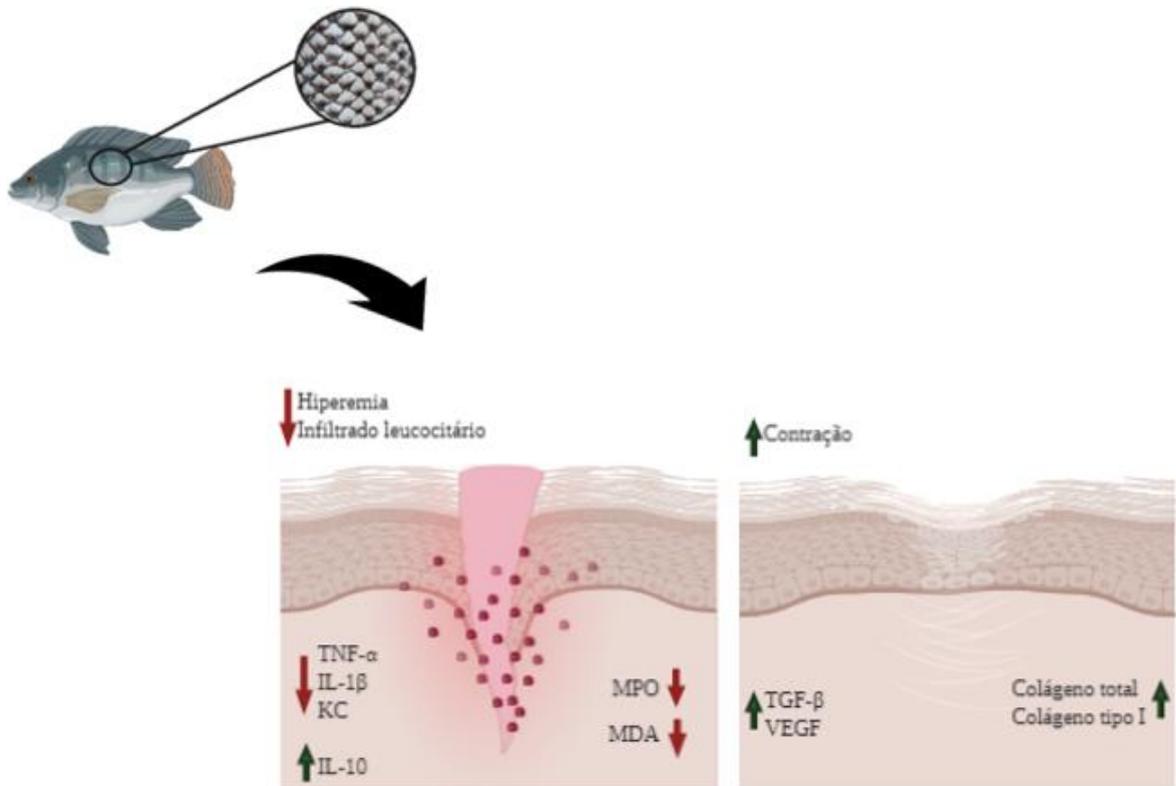
Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos

Fortaleza, 16 de novembro de 2018

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

Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Ceará

**ANEXO B – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS**

Fonte: Elaborado pelo autor no BioRender.com.