



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

MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

**CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) UTILIZADO EM CURATIVOS OCLUSIVOS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM
DEFEITOS DE ÂNGULO MANDIBULAR DE RATOS.**

FORTALEZÁ

2023

MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) UTILIZADO EM CURATIVOS OCLUSIVOS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM DEFEITOS
DE ÂNGULO MANDIBULAR DE RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.
Área de concentração: Estomatopatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

FORTALEZA

2023

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

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

- Q35c Quezado Lima Verde, Maria Elisa.
Caracterização do colágeno da pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) utilizado em curativos oclusivos e avaliação do potencial de regeneração óssea guiada em defeitos de ângulo mandibular de ratos. / Maria Elisa Quezado Lima Verde. – 2023.
85 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.
1. Tilápia. 2. Matriz Extracelular. 3. Materiais Biocompatíveis. 4. Colágeno. 5. Osso e Ossos. I. Título.
CDD 617.6
-

MARIA ELISA QUEZADO LIMA VERDE

CARACTERIZAÇÃO DO COLÁGENO DA PELE DE TILÁPIA DO NILO
(*OREOCHROMIS NILOTICUS*) UTILIZADO EM CURATIVOS OCLUSIVOS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM DEFEITOS
DE ÂNGULO MANDIBULAR DE RATOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Estomatopatologia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Rafael Lima Verde Osterne
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. Rafael Linard Avelar
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

A Deus

Aos meus pais, Sandra e Alexei.

Aos meus tios, Marcus Aurélio e Olívia.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À **Universidade Federal do Ceará (UFC)**, instituição que é alicerce da minha formação profissional, na pessoa do magnífico reitor, Prof. Cândido Albuquerque.

À **Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC**, na pessoa de sua diretora, profa. Lidiany Karla Azevedo Rodrigues Gerage.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará**, na pessoa do coordenador, Prof. Vicente de Paulo Aragão Saboia.

Ao **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos**, na pessoa do professor Manoel Odorico de Moraes Filho, pela excelente estrutura e suporte de pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Programa Institucional de Internacionalização (PrInt)** (processo número 88887.583211/2020-00) pela concessão da bolsa de Doutorado sanduíche no exterior.

À **Oregon Health and Science University**, na pessoa do Prof. Luiz Eduardo Braga Bertassoni, por me receber como aluna visitante durante um ano, nas dependências da *School of Dentistry* e do *Biofabrication Hub (Knight Cancer Institute)*. Obrigada pelas oportunidades de aprendizado únicas a mim concedidas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, verdadeiro Autor de tudo, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Alexei Rabelo Lima Verde e Sandra Orlene Quezado Lima Verde, meus exemplos, meu tesouro e porto seguro. Cada um, com seu jeito especial, ajudou a formar minha personalidade e a sedimentar virtudes que sempre levarei comigo. Grata por todo o apoio, educação e amor dedicados a mim desde sempre. Vocês são o grande alicerce da minha vida, a maior e mais concreta manifestação do amor incondicional de Deus em mim.

Aos meus irmãos e melhores amigos, Francisco Tarcísio Guedes Lima Verde Neto (Maninho) e Maria Clara Quezado Lima Verde, pelo amor, amizade, paciência, companheirismo e compreensão de uma vida inteira.

Ao meu afilhado, Tarcísio Bisneto (TB), por ter chegado e despertado em mim um amor tão grande e genuíno.

À minha avó materna, Agripina Cavalcante Janja (Mainha), por ser única e indispensável com esse jeito amoroso, divertido e com suas incansáveis preces.

Ao meu amado tio Marcus Aurélio Rabelo Lima Verde (*in memoriam*), minha eterna saudade, exemplo, referencial e incentivo. A emoção vem à tona todas as vezes que imagino que ele estaria ao meu lado, fazendo-se presente, participando de todas as minhas decisões, alegrando-se e orgulhando-se de cada uma das minhas conquistas. Te amo para sempre, tio.

A toda a minha família, pelo testemunho constante de fé, fortaleza e união. Por torcerem e acreditarem em mim, perto ou longe.

À minha mãe profissional e eterna orientadora, Ana Paula Negreiros Nunes Alves, pela incomparável formação ao longo desses anos; por me incentivar a superar dificuldades e a enfrentar tantos desafios ao longo desses quase dez anos de orientação. Obrigada por muitas vezes acreditar em mim mais do que eu mesma e me encorajar a alçar voos que eu jamais imaginei poder encarar. A senhora sempre foi e será uma grande inspiração para mim, professora, e eu tenho um orgulho imenso de ter sido sua orientanda. Obrigada também por estar ao meu lado em situações tão importantes e marcantes da minha vida. Qualquer crescimento meu, direta ou indiretamente, é atribuído a você.

Aos professores que aceitaram compor as bancas de qualificação, pré defesa e defesa deste trabalho, profa. Raquel Carvalho Montenegro, Prof. Mário Rogério Lima Mota, prof. Felipe Augusto Rocha Rodrigues, prof. Carlos Roberto Korsky Paier, prof. Rafael Lima Verde Osterne, prof. Rafael Linard Avelar e Prof. Fábio Wildson Gurgel Costa, pelas contribuições e

lapidações dos estudos que compuseram essa tese, enriquecendo-os para as publicações, tanto as já realizadas quanto as futuras.

Ao professor Mário Rogério Lima Mota, outra grande inspiração para mim desde a graduação. Obrigada pela paciência, por todos os ensinamentos e por participar ativamente da minha formação; por todo apoio, incentivo, e pela amizade sedimentada ao longo dessa caminhada.

Ao professor Fabrício Bitu Sousa, por todos os ensinamentos em nível pessoal e profissional. Obrigada por todas as oportunidades e portas abertas ao longo da minha formação.

Aos demais integrantes do Laboratório de Patologia Bucodental: profa. Karuza Maria Alves Pereira, colegas de pós-graduação, alunos de iniciação científica e técnicos. Em especial, agradeço aos amigos Paulo Goberlânio de Barros Silva (Paulinho), Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior, Camila Carvalho de Oliveira, Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues, Manuela da Silva Moreira, Dayrine Silveira de Paula e João Eudes Pinheiro Teixeira, amigos com os quais convivi estritamente em diferentes fases da minha formação, e cuja companhia faz qualquer serviço ou aprendizado ficar mais leve, divertido e empolgante. Obrigada por dividirem comigo momentos de descontração e por ajudarem a mostrar a importância da união e do trabalho em equipe.

Aos alunos da iniciação científica, pela indescritível ajuda durante os experimentos e análises. Vocês são o pilar de qualquer laboratório! Obrigada pela parceria, disponibilidade e dedicação de sempre; pela incessante e incansável prontidão durante os experimentos deste e de outros estudos em paralelo, mesmo em feriados e recessos. Tudo isso foi possível graças à ajuda de vocês!

À Juliana Ximenes Damasceno, por se fazer presente e por ser apoio em tantos momentos importantes, e por também me inspirar a ser alguém melhor a cada dia! Agradeço a nossa amizade, parceria e partilha de sempre, em âmbito pessoal e profissional. Obrigada por tanto e por ser parte da minha vida.

À Carolina Rodrigues Teófilo, que desde a minha iniciação científica me ensina tanto, como profissional e como pessoa íntegra, humana e resiliente que sempre foi... por ser dona de um coração maior que ela mesma. Obrigada pela nossa amizade, Cacá.

Aos demais colegas da pós-graduação, pelos bons momentos de aprendizado, pelos ensinamentos e diversão compartilhados durante esse tempo. Obrigada por toda a paciência, carinho e solidariedade, mesmo frente aos meus momentos de inquietação e desespero. Destaco, entre os quais, Malena Regina de Freitas e Silva, Thâmara Manoela Marinho Bezerra, José Ronildo Lins do Carmo Filho, João Eudes Teixeira Pinheiro Filho, Sthefane Gomes Feitosa,

Thales Salles Angelim Viana, Breno Souza Benevides, Karine Cestaro Mesquita, Isabelly Vidal do Nascimento, Talita Arrais Daniel Mendes, Vilana Maria Adriano Araújo, Diana Araújo Cunha e Francisco Samuel Rodrigues de Carvalho.

Ao prof. Luiz Bertassoni, por me receber maravilhosamente bem e por abrir as portas do seu laboratório para que eu vivesse uma das melhores experiências que eu já tive na vida. Luiz, obrigada por apostar em mim, por todas as oportunidades e por ser uma grande inspiração profissional e pessoal. Você é um exemplo da liderança que eu sempre acreditei ser a ideal.

Agradeço, ainda, aos demais integrantes e amigos do Bertassoni Lab, pela convivência diária intensa, mas leve e produtiva. Aprender ao lado de vocês é um privilégio. Em especial, aos amigos Maurício Gonçalves, Rahul Visalakshan, Avathamsa Athirasala, Anissa Bartolome, Cristiane França, Ramesh Subbiah, Anthony Tahayeri, Sofia Vignolo e Haylie Helms; e aos amigos do Pfeiffer Lab, Lincoln Borges, Genine Guimarães, Marcelo Icimoto, Fernanda Lucena e Fernanda Tsuzuki.

Aos professores do curso de Odontologia da UFC e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Cada um, em sua particularidade, se fez exemplo e contribuiu para o meu progresso acadêmico durante a graduação e pós-graduação. Tenho um orgulho imenso de ser formada por essa casa.

Aos colegas de graduação da turma 2016.2, pela união e harmonia constantes na nossa convivência enquanto acadêmicos. Obrigada pelo caminho que trilhamos juntos.

Ao Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE), por, desde a graduação, semear em mim uma visão ainda mais humana e inclusiva da Odontologia. Agradeço a todos os pós-graduandos, alunos de graduação e pacientes, pela inenarrável experiência.

A todos os funcionários da UFC, por serem essenciais ao funcionamento de todos os serviços da universidade. Especialmente, ao Rui Lino, Sônia Loiola (Soninha) (*in memoriam*), Maria Luiza (Malu), Marta Praciano (Martinha). Também aos técnicos de laboratório Alceu Machado, David Queiroz, e Débora Rodrigues.

Ao Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), pela estrutura de excelência com a qual pude contar durante todo o período da minha pós-graduação. Em especial, aos professores Carlos Payer e Felipe Rodrigues, pela parceria durante o período da pesquisa com a pele da tilápia.

Ao Centro Universitário Christus, sobretudo ao curso de Odontologia, seus professores, funcionários e alunos. Primeira instituição que me abriu as portas para o exercício da docência e da gestão, a Unichristus me proporcionou uma experiência engrandecedora e um constante incentivo em busca dos meus objetivos profissionais. Gratidão à reitoria, ao corpo docente,

discente, à coordenação pedagógica, e a todos os funcionários por me permitirem tamanha experiência e aprendizado.

Aos demais amigos que, com sua companhia e amizade, foram responsáveis por tornar esta caminhada mais leve.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que tudo isso fosse possível.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

- Carl Jung

RESUMO

A pele de tilápia do Nilo (PTN) é um subproduto das atividades de piscicultura em regiões tropicais e subtropicais. A pele, escamas e espinhas de várias espécies de peixes têm sido amplamente demonstradas como uma fonte potencial de proteínas nativas da matriz extracelular para uso em medicina regenerativa. Assim, objetivando revisar a literatura acerca do uso de proteínas da matriz extracelular derivadas da tilápia do Nilo como *scaffolds* naturais pra regeneração tecidual, o primeiro capítulo desta tese evidencia estudos que têm apontado a tilápia como fonte satisfatória de colágeno por sua qualidade e custo-benefício, com boas respostas e *in vivo*, principalmente estudos envolvendo a pele como principal fonte de obtenção. O 2º capítulo desta tese objetivou descrever os aspectos ultraestruturais da PTN, avaliar sua quantidade e organização de colágeno e comparar métodos quantitativos de análise histoquímica e imunoistoquímica (em todas as etapas de esterilização para uso em curativos de queimaduras). Foram comparadas a pele *in natura* (IN), esterilizada quimicamente (CH), com irradiação adicional (30 kGy) (IR) e peles usadas no tratamento de queimaduras (BT). Uma quantidade significativa de colágeno tipo I foi observada apesar da esterilização, embora a aplicação clínica reduza, posteriormente, a quantidade de colágeno tipo I. Esta quantificação mostrou resultados confiáveis tanto através do método de imunoistoquímica quanto de Picrosirius Red. Ambos os métodos não só não apresentaram diferença no valor quantificado ($p = 0,247$), mas uma correlação positiva ($r = 0,927$; IC 95% = 0,720–0,983)($p=0.001$) foi observada entre eles, com concordância na quantificação de colágeno em amostras semelhantes, apresentando baixo índice de erro sistemático (coeficiente de Dalberg: 6,70). Estudos clínicos têm mostrado que os curativos oclusivos derivados de PTN demonstram resultado clínico superior aos curativos convencionais para tratamento de queimaduras, o que incentivou o uso da PTN na regeneração de tecidos moles. No entanto, o uso da PTN para tratar defeitos de tecidos duros tem sido pouco estudado. Portanto, no 3º capítulo desta tese, visou-se determinar o potencial regenerativo da PTN em defeitos mandibulares de tamanho crítico para regeneração óssea guiada (ROG). Em modelo murino, realizou-se defeitos ósseos mandibulares bilaterais de tamanho crítico, a fim de testar duas formulações de NTS: um *scaffold* de membrana de pele dérmica (DS) e a pele liofilizada (LS). Um colágeno comercial (BioGide®) foi usado como controle positivo (C+), enquanto nenhuma membrana foi usada como controle negativo (C-). Os animais foram eutanasiados após 1 e 16 semanas para posterior análise radiográfica e histológica. Os resultados desse estudo mostraram que, após 16 semanas, há ausência de infiltrado inflamatório na maioria dos grupos, com exceção do DS, que apresentou persistência de inflamação moderada associada a remanescentes de membrana e presença de células gigantes multinucleadas. Uma formação óssea proeminente foi observada no grupo C+ ($p<0,05$), enquanto a formação óssea nos grupos DS e LS não foi estatisticamente diferente quando comparada ao grupo C+ ou C- ($p>0,05$). Apesar de ser um biomaterial bastante promissor e apresentar benefícios clínicos em procedimentos regenerativos de tecidos moles, a aplicação das duas formulações testadas de colágeno da PTN não apresentou resultados favoráveis para a ROG. Outras formulações e ajustes para retardar o processo de reabsorção da membrana e reduzir a citotoxicidade local são necessários para futuras aplicações clínicas destinadas a ROG.

Palavras-chave: Tilápia; Matriz Extracelular, Materiais Biocompatíveis; Colágeno; Osso e ossos.

ABSTRACT

Nile tilapia skin (NTS) is a byproduct from fish-farming activities in tropical and subtropical regions. The skin, scale, and spine of various fish species have been extensively demonstrated as a potential source of native extracellular matrix proteins for use in regenerative medicine. Thus, aiming to review the literature on the use of extracellular matrix proteins derived from Nile tilapia as natural scaffolds for tissue regeneration, the first chapter of this thesis highlights studies that have pointed to tilapia as a satisfactory source of collagen due to its quality and cost-effectiveness, with good *in vivo* and *in vitro* responses, especially studies involving the skin as the main source of production. The 2nd chapter of this thesis described the ultrastructural aspects of NTS, assessed its collagen amount and organization, and compared quantitative methods of histochemical and immunohistochemical analysis (in all sterilization steps for use in burn dressings). *In natura* skin (IN), chemical sterilization (CH), additional irradiation (30 kGy) (IR), and skins used in burn treatment (BT) were compared. A significant amount of type-I collagen is observed despite sterilization, although clinical application further reduces type I collagen. This quantification showed reliable results through immunohistochemistry and/or Picrosirius Red. Both methods not only exhibit no difference in the quantified value ($p = 0.247$), but a positive correlation ($r = 0.927$; 95 % CI = 0.720–0.983) was observed between them, with concordance for collagen quantification in similar samples, presenting a low systematic error rate (Dalberg coefficient: 6.70). Clinical studies have shown that NTS-derived occlusive dressings demonstrated superior clinical outcome than conventional dressings for burn treatment, which encouraged the use of NTS in soft tissue regeneration. However, the use of NTS to treat hard tissue defects has been scarcely studied. Therefore, in the 3rd chapter of this thesis, we sought to determine the regenerative potential of NTS in mandibular critical-sized defects for guided-bone regeneration (GBR). In a murine model ($n=8$ /group), we performed bilateral critical-size mandibular bone defects in order to test two formulations of NTS: a dermal skin membrane scaffold (DS), and the lyophilized skin (LS). A commercial collagen (BioGide®) was used as a positive control (C+), whereas no membrane was used as a negative control (C-). Animals were euthanized after 1 and 16 weeks for further radiographical and histological analysis. Our results show that, after 16 weeks, there is absence of inflammatory infiltrate in most groups, with exception of DS, which showed persistence of moderate inflammation associated with membrane remnants and presence of multinucleated giant cells. A prominent bone formation was observed in C+ group ($p<0.05$), whereas the bone formation in DS and LS groups was not statistically different when compared to either C+ or C- group ($p>0.05$). Despite being a very promising biomaterial and presenting clinical benefits in soft tissue regenerative procedures, the application of the two tested formulations of Nile tilapia skin collagen did not show favorable results for GBR. Further formulations and adjustments to slow the membrane resorption process and decrease local cytotoxicity are necessary for future clinical applications aimed at GBR.

Palavras-chave: Tilapia; Extracellular Matrix; Biocompatible materials; Collagen; Bone and bones.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1. A remodelação óssea e o papel do colágeno no processo regenerativo	14
1.2. A importância do colágeno em biomateriais utilizados para fins de regeneração óssea na Odontologia	17
1.3. A pele de tilápia como potencial biomaterial	19
2 PROPOSIÇÃO	21
3 CAPÍTULOS	22
3.1. Capítulo 01: Nile Tilapia Fish Skin, Scales, and Spine as Naturally Derived Biomaterials for Tissue Regeneration	23
3.2. Capítulo 02: Nile tilapia skin (<i>Oreochromis niloticus</i>) for burn treatment: ultrastructural analysis and quantitative assessment of collagen	42
3.3. Capítulo 03: <i>In vivo</i> evaluation of two Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) skin-derived collagen membranes for guided bone regeneration	61
4 CONSIDERAÇÕES GERAIS	76
5 CONCLUSÃO GERAL	78
6 REFERÊNCIAS	79
ANEXO A - Aprovação do projeto de pesquisa pela CEUA – NPDM	82
ANEXO B – Capítulo 01	83
ANEXO C – Capítulo 02	84
ANEXO D – Capítulo 03: Submissão	85