

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANANDA MANGILI DE PAULA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO USO DE MEMBRANA DE COLÁGENO TIPO II NO PROCESSO  
DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM  
RATOS WISTAR**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2021**

ANANDA MANGILI DE PAULA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO USO DE MEMBRANA DE COLÁGENO TIPO II NO PROCESSO  
DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM  
RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota.

**UBERLÂNDIA - MG**

**2021**

**ANANDA MANGILI DE PAULA RODRIGUES**

**AVALIAÇÃO DO USO DE MEMBRANA DE COLÁGENO TIPO II NO PROCESSO  
DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES EXPERIMENTALMENTE INDUZIDAS EM  
RATOS WISTAR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade  
Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção  
do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 22 de Outubro de 2021.

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota, UFU/MG**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aracelle Elisane Alves, UFU/MG**

---

**M.V. Residente em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais Lara Grama de Lima, UFU/MG**

## AGRADECIMENTOS

Há alguns anos atrás eu me vi em uma situação de não confiar no meu trabalho e no caminho que o futuro traria para mim e com a graça de Deus eu pude ter a grande oportunidade de conhecer o caminho da cirurgia de pequenos animais. Gostaria de agradecer primeiramente à cirurgia por trazer essa paixão.

Quero agradecer aos meus amados pais, Luís Cláudio e Carla Silvia, por sempre me apoiarem, por estarem sempre dispostos a me ajudar, por serem pais tão maravilhosos, por nunca terem medido esforços para me proporcionar um ensino de qualidade durante toda minha vida.

Aos meus irmãos, Bruno e Gabriel, por todo o companheirismo, amizade, conselhos e momentos inesquecíveis.

Aos meus avós tão amados, Agenor, Arailde, Carlos Eduardo e Yara, por contribuírem diretamente na minha alfabetização, criação e construção de sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota, por todas as oportunidades que ele pacientemente me deu, por todos os ensinamentos, conselhos e amizade que me fizeram acreditar cada vez mais no meu potencial e no meu amor pela área da cirurgia.

Agradecer minhas amigas Aline, Maria Cecília, Pâmella, Mireli e amigo Lucas Maurício por todos os conselhos, amizade, carinho, força e compreensão que vocês me deram em todo o período de realização desse trabalho, sei que vocês estão em vários momentos importantes para mim e se tornaram minha segunda família em Uberlândia.

Aos meus amigos Marco Vinício, Gayer, Ana Laura e Letícia, que apesar da distância física, não deixam de estar sempre presentes e participativos na minha vida, vocês estiveram sempre comigo no decorrer da faculdade.

Aos meus companheiros de Diretório Acadêmico, em especial Vitor, Andressa, Lize, Amanda que proporcionaram muito aprendizado, momentos inesquecíveis e amizade onde eu pude crescer tanto.

Quero agradecer às meninas da República “Balanga Teta” e agregadas como Anna Júlya e República “Mama Cadela”, vocês me ajudaram em muitos momentos e estiveram sempre junto e presentes para que o período da faculdade se tornasse inesquecível para mim.

Ao restante dos amigos que se fazem presentes e estão comigo em todos os tipos de momentos da minha vida.

Aos residentes e equipe do setor de Clínica Cirúrgica de pequenos animais HOVET-UFU que pacientemente me ajudaram na caminhada, auxiliando no meu aprendizado e sempre

dando forças para que a paixão pela área da cirurgia cresça ainda mais, além de toda a amizade.

E principalmente à Deus e São Francisco por me guiarem e colocarem a “mão” em tudo que eu faço.

*"Não considere nenhuma prática como imutável. Mude e esteja pronto a mudar novamente. Não aceite verdade eterna. Experimente." - B. F. Skinner*

## RESUMO

Mediante ao crescente mercado e interesse por novas ciências que visam auxiliar ou melhorar o tempo de cicatrização de feridas, é importante que o cirurgião tenha conhecimento dos fatores que levam à recomposição do tecido ou, ao menos, à continuidade epitelial. A pele é um dos órgãos mais importantes, já que faz a proteção do ambiente interno do externo, mantendo a homeostase e regulando a temperatura. Objetou -se com esse estudo verificar a ação do colágeno tipo II no processo de reparação de feridas cutâneas excisionais criadas experimentalmente em ratos Wistar. Foram utilizados 54 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 300 gramas foram submetidos a criação de uma ferida excisional de pele, de 7,5mm próximo da cernelha. Diariamente, após a cirurgia, os animais dos grupos “controle positivo” e tratado com UCII eram submetidos à limpeza da ferida utilizando gaze embebida em água ultrapura. Sendo que no grupo controle positivo, após a limpeza era instilado 1 mL de água ultrapura sobre o ferimento. Já no grupo tratamento, imediatamente após a limpeza, a ferida era coberta por uma película de colágeno bovino não hidrolisado que foi hidratada no ferimento. As amostras foram submetidas às análises macroscópica, de colágeno total onde foi possível constatar que, no grupo tratado, houve aumento na porcentagem de colágeno na ferida e diminuição significativa de crosta, significando que a taxa de cicatrização foi mais rápida no grupo tratado.

**Palavras-chave:** Colágeno não hidrolisado; Fatores de crescimento; Feridas; Injúria.

## ABSTRACT

Due to the growing market and interest in new sciences that aim to help or improve wound healing time, it is important that the surgeon is aware of the factors that lead to tissue recomposition or, at least, to epithelial continuity. The skin is one of the most important organs, as it protects the internal environment from the external one, maintaining homeostasis and regulating temperature. The aim of this study was to verify the action of type II collagen in the repair process of excisional skin wounds created experimentally in Wistar rats. A total of 54 male Wistar rats, weighing approximately 300 grams, were submitted to the creation of a 7.5mm excisional skin wound near the withers. Daily, after surgery, animals in the "positive control" and UCII-treated groups were submitted to wound cleaning using gauze soaked in ultrapure water. In the positive control group, after cleaning, 1 mL of ultrapure water was instilled over the wound. In the treatment group, immediately after cleaning, the wound was covered by a film of non-hydrolyzed bovine collagen that was hydrated in the wound. The samples were submitted to macroscopic analysis of total collagen where it was possible to verify that, in the treated group, there was an increase in the percentage of collagen in the wound and a significant decrease in crust, meaning that the healing rate was faster in the treated group.

**Keywords:** Unhydrolyzed collagen; Growth factors; Wounds; Injury.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tecido de granulação em MPD de cão .....	17
<b>Figura 2.</b> Interrelação fundamental das fases de cicatrização de feridas -inflamação (azul), proliferação (laranja) e remodelação do tecido(rox) .....	20
<b>Figura 3.</b> Animal em aparelho anestésico no pré-operatório.....	26
<b>Figura 4.</b> Posicionamento em decúbito ventral e utilização de máscara para manutenção anestésica. (A) tricotomia por arrancamento piloso. (B) realização de antissepsia .....	26
<b>Figura 5.</b> Confeção da ferida cirúrgica. (A) Utilização do trepano para incisão da pele. (B) Utilização de tesoura de íris para remover o fragmento de pele por completo .....	27
<b>Figura 6.</b> (A) recorte da membrana de UC -II de acordo com o diâmetro da ferida. (B) Umidificação da membrana depositada na ferida com água ultrapura .....	27
<b>Figura 7.</b> Animal do Grupo de Tratamento (grupo III) recebendo a membrana de colágeno não hidrolisado sobre a ferida .....	28
<b>Figura 8.</b> Animal do Grupo veículo (grupo II) recebendo água ultrapura sobre a ferida .....	29
<b>Figura 9.</b> Incisão realizada com auxílio de um punch no fragmento de análise histomorfométrica.....	30
<b>Figura 10.</b> A imagem mostra como foi realizado o posicionamento da câmera para a aquisição das imagens padronizadas das feridas. ....	31
<b>Figura 11.</b> Evolução do processo de cicatrização de ferida cutânea excisional criada experimentalmente no dorso de rato Wistar. Em A, aspecto da ferida imediatamente após sua criação com 1 cm de diâmetro. Em B, aspecto após 15 dias de tratamento.....	31
<b>Figura 12.</b> A imagem mostra como foi utilizada a ferramenta Polygon para a determinação da área da ferida no software Image J. ....	32
<b>Figura 13.</b> Tratamento em 8-bit no software ImageJ, utilizando um limiar de vermelho em 143%, que é convertido em um escudo preto pelo comando Threshold. Circulado em amarelo observa-se a área de interesse para a mensuração da porcentagem de colágeno .....	33
<b>Figura 14.</b> Imagem proveniente software Aperio ImageScope View oriunda do escaneamento através do Scanscope AT, demonstrando uma área de ferida de um animal no 15º dia com a coloração Picrosirius Red .....	33
<b>Figura 15.</b> Os gráficos mostram o comportamento da quantidade média de colágeno na ferida dos grupos em relação ao tempo decorrido, todos os gráficos apresentam uma linha de tendência crescente. ....	34
<b>Figura 16.</b> Comportamento da diminuição média da ferida dos grupos em relação ao tempo decorrido, todos os gráficos apresentam uma linha de tendência crescente .....	36
<b>Figura 17.</b> Os gráficos apresentam o score médio encontrado em cada grupo nos dias 5, 10 e 15, levando em conta a presença de crosta na ferida. A linha de tendencia apresenta-se decrescente.....	37



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Fatores de crescimento importantes da cicatrização de feridas.....	19
<b>Tabela 2.</b> Fatores que interferem na cicatrização de feridas .....	22
<b>Tabela 3.</b> Compilado de dados estatísticos referentes ao a porcentagem de diminuição da ferida ao longo do tempo.....	37
<b>Tabela 4.</b> Compilado de dados estatísticos referentes a porcentagem de colágeno na ferida ao longo do tempo.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>BFGF</b>	<i>“Basic Fibroblast Growth Factor”</i> – Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética na Utilização de Animais
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicano
<b>KGF</b>	<i>“Keratinocyte Growth Factor”</i> – Fator de Crescimento de Queratinócitos
<b>MPD</b>	Membro Pélvico Direito
<b>MEC</b>	Matriz Extracelular Amorfa
<b>PDGF</b>	<i>“Platelet-Derived Growth Factor”</i> – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
<b>REBIR</b>	Rede de Biotérios de Roedores
<b>UC-II</b>	<i>“Unhydrolyzed Chologen II”</i> – Colágeno Não-Hidrolizado Tipo II
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1	<b>Injúrias tissulares</b> .....	<b>14</b>
2.2	<b>Reparação de injúrias</b> .....	<b>15</b>
2.2.1	<b>Fase inflamatória</b> .....	<b>15</b>
2.2.2	<b>Fase proliferativa</b> .....	<b>16</b>
2.2.3	<b>Fase de remodelação</b> .....	<b>18</b>
2.3	<b>Terapia tópica das lesões</b> .....	<b>21</b>
2.4	<b>O colágeno como opção para tratamentos</b> .....	<b>21</b>
2.5	<b>Fatores que podem interferir na reparação tecidual</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
4.1	<b>Local de execução</b> .....	<b>25</b>
4.2	<b>Animais</b> .....	<b>25</b>
4.3	<b>Procedimento cirúrgico</b> .....	<b>25</b>
4.4	<b>Tratamento</b> .....	<b>27</b>
4.5	<b>Grupos experimentais</b> .....	<b>27</b>
4.6	<b>Eutanásia</b> .....	<b>28</b>
4.7	<b>Análise macroscópica</b> .....	<b>29</b>
4.8	<b>Análise do colágeno total</b> .....	<b>31</b>
4.9	<b>Porcentagem de colágeno na ferida</b> .....	<b>32</b>
4.10	<b>Análise estatística</b> .....	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
5.1	<b>Área das feridas</b> .....	<b>35</b>
5.2	<b>Aspecto macroscópico das feridas</b> .....	<b>35</b>
5.4	<b>Dados estatísticos</b> .....	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>40</b>
	<b>ANEXO A: PARECER CEUA SOBRE O PROJETO</b> .....	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Progressos recentes na pesquisa sobre gerenciamento de feridas expandiram consideravelmente o conhecimento dos processos envolvidos no reparo de lesões. Injúrias são danos físicos que resultam em um efeito de abertura ou deletério na pele (UDHAYAKUMAR et al., 2017).

O campo de tratamento de feridas aparentemente contém tantas opções e modalidades de tratamento diferentes quanto profissionais dispostos a realizar tal tratamento. Embora muitos cirurgiões confiem e obtenham bons resultados com tratamentos "experimentados e verdadeiros" mais antigos, continua um fluxo constante de novos produtos e tecnologias para adicionar ao arsenal do tratamento de feridas. Alguns desses produtos são atualizações ou variações aprimoradas de tratamentos anteriores, enquanto outros são o resultado de campos de estudo inteiramente novos. Como em qualquer novo produto, muitas vezes a preocupação para a introdução no uso clínico precede um estudo controlado adequado e a eficácia é então definida pela experiência clínica. Isso pode levar a perguntas não respondidas sobre o uso e as indicações apropriadas (MURPHY; EVANS, 2012). Acredita-se, portanto, que a cicatrização de feridas tenha recebido muita atenção, tanto do ponto de vista científico básico quanto da perspectiva dos negócios. A ciência básica de como uma ferida cicatriza é fascinante, com novas descobertas elucidando mecanismos de reparo fisiológico de feridas constantemente sendo relatadas (HAN; CEILLEY, 2017).

Nos últimos anos, os pesquisadores se concentraram em projetar novos materiais de cicatrização de feridas à base de colágeno, considerando sua potência de cicatrização, biocompatibilidade superior, durabilidade e menor imunogenicidade, em comparação com outros produtos (UDHAYAKUMAR et al., 2017). Foi relatado o uso de película de colágeno quitosano-revestido para regular os metabólitos envolvidos no processo de cicatrização para constatar a biocompatibilidade *in vivo* de filmes colágenos derivados de uma nova fonte a camada do rúmen bovino (SHANKAR et al., 2016).

O cuidado de feridas tornou-se cada vez mais importante, dado o surgimento de feridas crônicas e a morbidade associada a elas. Um conceito importante no tratamento de feridas é o papel do desbridamento ou a remoção de material não viável do tecido. Isso pode ser alcançado através de mecanismos cirúrgicos ou enzimáticos. Em ambos os casos, o objetivo é expor tecidos saudáveis e bem vascularizados, capazes de proliferar e povoar o leito da ferida por meio da migração celular epitelial, em vez de manter componentes necróticos, que servem apenas como combustível para a infecção e impede a cicatrização de feridas (HAN; CEILLEY, 2017).

O colágeno é uma proteína fibrosa que desempenha um papel importante na manutenção da integridade biológica e estrutural da matriz extracelular (MEC) e fornece aos tecidos força mecânica e funções fisiológicas (FELICIAN et al., 2018). O campo de produtos biológicos para feridas visa acelerar a cicatrização aumentando ou modulando esses mediadores inflamatórios. Embora a maioria das investigações sobre essas substâncias sejam pequenos estudos de laboratório, existem alguns benefícios claros nas investigações clínicas (MURPHY; EVANS, 2012).

Mediante uma injúria tissular, vários processos hemostáticos são iniciados na tentativa de diminuir perda sanguínea e elementos quimiotáticos, como receptores e macrófagos, por exemplo, são convocados para que a ferida se mantenha livre de patógenos e o contato com o meio externo seja evitado. Geralmente os eventos de cicatrização são divididos em três fases principais de: inflamatória, proliferativa e remodelação (HAN; CEILLEY, 2017).

As feridas encolhem nas fases finais; à medida que os fibroblastos se movem, eles puxam as fibras de colágeno. Esse processo reduz cicatrizes e reduz feridas abertas e é chamado de contração. É influenciado por fatores de crescimento e inibido por esteroides anti-inflamatórios (HUNT; HOPF, 1997).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Injúrias tissulares

O processo de cicatrização de feridas cutâneas é incrivelmente complexo, dependente de uma interação complexa entre vários fatores altamente regulados que trabalham em conjunto para restaurar a pele lesionada em direção centrípeta à função de barreira reparada. Essa sequência de eventos ocorre normalmente na grande maioria das feridas superficiais; no entanto, pode dar errado em várias etapas ao longo do caminho, especialmente com estados de doença subjacentes, como diabetes. Quando a cicatrização da ferida não progride normalmente, pode ocorrer uma ferida crônica e isso representa um ônus significativo para o paciente e expectativas médicas (HAN; CEILLEY, 2017)

Com o objetivo de diminuir o tempo desse processo e buscando a composição, morfologia e funcionalidade inicial da pele. A restauração dos tecidos compreende em dois mecanismos, sendo eles: a regeneração e cicatrização (ABLA, 1995; SANTOS, 2000). A regeneração compreende em restauração tissular “original” na ausência da formação de cicatriz (somente observada no desenvolvimento embrionário) e cicatrização uma replicação celular em um ambiente modificado em comparação ao anterior à injúria (WIEMAN, 1998).

Mediante um evento de lesão (por exemplo, térmica, materiais perfuro cortantes, antígeno, anticorpo) que perturba o ambiente local, principalmente por danificar sua microcirculação. As plaquetas agregam e liberam uma variedade de fatores de crescimento de seus grânulos. A coagulação resultante obstrui os vasos e evita a exsudação vascular, mas também aumenta a área de circulação prejudicada. A fibrina contribui com sequências do tipo fator de crescimento e quimiotaxia. A microcirculação é então ainda mais perturbada por uma descarga de bradicinina e complemento e liberação de histamina pelos mastócitos (HUNT; HOPF, 1997).

Ferida de espessura parcial (derme incompleta): ocorre após muitos procedimentos dermatológicos como a dermoabrasão, por exemplo. Pode também ser causada por traumatismos. A reparação faz-se pela reepitelização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado final tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível. Já as feridas de espessura total (derme completa ou extensão do tecido celular subcutâneo) necessitam da formação de um novo tecido, granulação. A epitelização, base da cicatrização nas feridas de espessura parcial, acontece apenas nas margens da ferida. Nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível e muitas vezes, pronunciada (ex. queloides) (MANDELBAUM,2003).

## **2.2 Reparação de injúrias**

A cicatrização de lesões tissulares envolvendo regeneração de tecidos é um processo biológico desafiante. Um curativo eficaz da ferida deve protegê-la contra infecções secundárias, manter um ambiente úmido após a absorção dos exsudados da mesma, proporcionar troca gasosa adequada e exibir boa biocompatibilidade com tecidos e sangue (SHEN et al., 2017). O processo biológico de cicatrização de feridas é o mesmo para todas os tipos de injúria de tecidos, mas os mecanismos específicos podem variar (figura 2). Feridas superficiais e às vezes de espessura média completam a cicatrização principalmente por meio da epitelização e passam pelo processo de reparo mais rápido do que feridas totalmente espessas, que dependem principalmente do processo de contração. Ao contrário das feridas agudas, as feridas crônicas podem não progredir nas fases de cicatrização de maneira ordenada, levando à inflamação persistente, lesões repetidas e infecção (HANKS J, SPODNICK G., 2005).

A maioria das funções essenciais da pele retornará a uma ferida. No entanto, isso requer a “convocação” de várias células inflamatórias, receptores, citocinas, fatores de crescimento, moléculas da matriz e nutrientes ao local da ferida, com um aumento concordante na demanda metabólica. Esses processos ocorrem simultaneamente e geralmente são divididos em três fases principais de cicatrização: inflamatória, proliferativa e remodelação (HAN; CEILLEY, 2017).

A hemostasia é iniciada por fatores de coagulação que resultam na formação de uma rede de fibrina, que produz um coágulo na ferida, causando a parada do sangramento (KIM et al., 2011).

### **2.2.1 Fase inflamatória**

O estágio da inflamação começa imediatamente após uma lesão, primeiro com vasoconstrição que favorece a homeostase e libera mediadores da inflamação, dura em média de 3 a 7 dias. Caracterizada principalmente por ser a fase na qual são liberados quimiotáticos para recrutamento de células inflamatórias, fatores de crescimento e ativação de células importantes para a reparação da injúria. É observada nessa fase que a ferida contém o coágulo anteriormente descrito, exsudato serosanguinolento ou purulento, sem presença de tecido de granulação e aproximação das bordas, descrito como processo de contração. (UDHAYAKUMAR et al., 2017).

O primeiro evento ocorre após o sangramento do ferimento e promove limpeza e preenchimento da ferida em questão, removendo antígenos e microrganismo. Logo após, em condições normais, cessamento do sangramento e formação de um tampão plaquetário primário e coágulo sanguíneo. Poucos minutos após o ferimento, os vasos sanguíneos se contraem, reduzindo a hemorragia, auxiliando na agregação de plaquetas e contendo fatores de cura para

o ambiente da ferida. As plaquetas aderem ao colágeno vascular exposto e também umas às outras por meio de glicoproteínas adesivas, como fibrinogênio, fibronectina e fator de von Willebrand, resultando no tampão plaquetário primário (HANKS; SPODNICK, 2005). A crosta formada previne hemorragias e promove proteção à ferida e o processo de reparação ocorre sob ela. As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento (como mostrados na tabela 1) como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) e fator de crescimento epidérmico (EGF), bem como proteases e as aminas vasoativas serotonina e histamina (HARDING; et al. 2002).

Os macrófagos não apenas fagocitam e digerem tecidos inviáveis e neutrófilos restantes, mas também secretam fatores de crescimento e citocinas que promovem a proliferação de tecidos e a migração celular.

O início da cascata de coagulação no local da lesão resulta na clivagem proteolítica do fibrinogênio pela enzima trombina, formando um coágulo de fibrina insolúvel que retém os tecidos danificados e forma a matriz extracelular amorfa (MEC). Esta matriz (é composta por nanofibras de colágeno) contribui para a formação de tecido de granulação através da produção de um andaime ou canal para a migração e ativação de fibroblastos (JUDITH et al., 2010). A MEC é definida como a coleção diversificada de proteínas e açúcares que rodeiam as células em todos os tecidos sólidos. Esse compartimento de tecido fornece suporte estrutural, e isso define a forma e as dimensões características dos órgãos e tecidos complexos. A MEC é composta principalmente de uma intrincada malha interligada de colágenos fibrilares e não fibrilares, fibras elásticas e glicoproteínas não colágenas contendo glicosaminoglicano (GAG) (hialuronano e proteoglicanos) (COX; ERLER, 2011).

### **2.2.2 Fase proliferativa**

A fase proliferativa na cicatrização é caracterizada pela formação de tecido de granulação (figura 1) principalmente por fibroblastos e angiogênese. Após cerca de 3 dias da ferida inicial, a fase proliferativa gira em torno dos fibroblastos e da produção de colágeno e substância fundamental que formarão a base do suporte de tecido da área anterior da ferida (figura2). Enquanto isso, as células endoteliais entram em uma fase de rápido crescimento e a angiogênese ocorre dentro do tecido de granulação, criando uma rica rede vascular promovendo botões endoteliais na lesão e neutrófilos e macrófagos farão o papel de modificar a MEC temporária onde o tecido de granulação irá se formar (figura 1), essa é área muito ativa de cicatrização. Após cerca de 2 a 3 semanas, a ferida passa para uma fase de remodelação ou maturação (HAN; CEILLEY, 2017).

Os fibroblastos replicam e migram principalmente em resposta a fatores de crescimento



e quimiotaxia, promovem colágeno, elastina e reticulina que vão compor a MEC. A extensão da fibroplasia é proporcional à tensão do oxigênio (SHANKAR et al., 2016). Quanto maior for o tecido de granulação composto na ferida, maior será o número de queratinócitos, que iniciam o processo de reepitelização. É importante a presença de água no processo de cicatrização, pois auxilia na migração de células epiteliais, portanto, é necessário que a ferida esteja úmida (HARDING, 2002)

Na ferida os fibroblastos adotam um fenótipo sintético de colágeno (miofibroblastos) sob a influência de fatores de crescimento e a alta concentração de lactato. O lactato e alguns fatores de crescimento regulam a síntese de mRNA do colágeno e a atividade das oxigenases que hidroxilam os resíduos prolina e lisina. A hidroxilação permite que os peptídeos de colágeno se agregam em hélices triplas. A estrutura helicoidal tripla é necessária para permitir a liberação da célula e confere força ao tecido, o processo de contração deve ser acompanhado, pois pode ocorrer contração em excesso, comprometendo a elasticidade natural da epiderme quando essas unidades se condensam em fibras de colágeno. A atividade das hidroxilases depende criticamente da vitamina C e da tensão do oxigênio no tecido. A força da ferida, resultante da deposição de colágeno, é, portanto, altamente vulnerável às variáveis respiratórias e de perfusão (HUNT; HOPF, 1997).

**Figura 1.** Tecido de granulação em MPD de cão.



Fonte: Imagem cedida por HOVET-UFU (2021).

### 2.2.3 Fase de remodelação

Remodelação ocorre no colágeno e na matriz; dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. O estágio de remodelação é um passo final que envolve reformulação e aprimoramento dos componentes da fibra de colágeno recém-formada que aumenta a resistência à tração do tecido e pode durar de seis meses até anos, depende do tamanho e gravidade da injúria (UDHAYAKUMAR et al., 2017).

Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. As collagenases e outras proteases produzidas por macrófagos e células epidérmicas dão direção correta às fibras colágenas difusas. A neoformações vasculares diminuem, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatrização normalmente tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana; sua coloração pode variar de rosada à esbranquiça (MANDELBAUM, 2003).

Os fatores de crescimento: FGF, PDGF, TGF- $\beta$ , citocinas, enzimas proteolíticas e collagenases (tabela 1) regulam a síntese e a lise de colágeno, passando a ser mais organizado e gerando aumento na força de tensão. O aspecto macroscópico do tecido se mostra como uma superfície epitelial rosada com a pele mais espessa e contração das bordas da ferida é evidente (HANKS;, SPODNICK 2005).

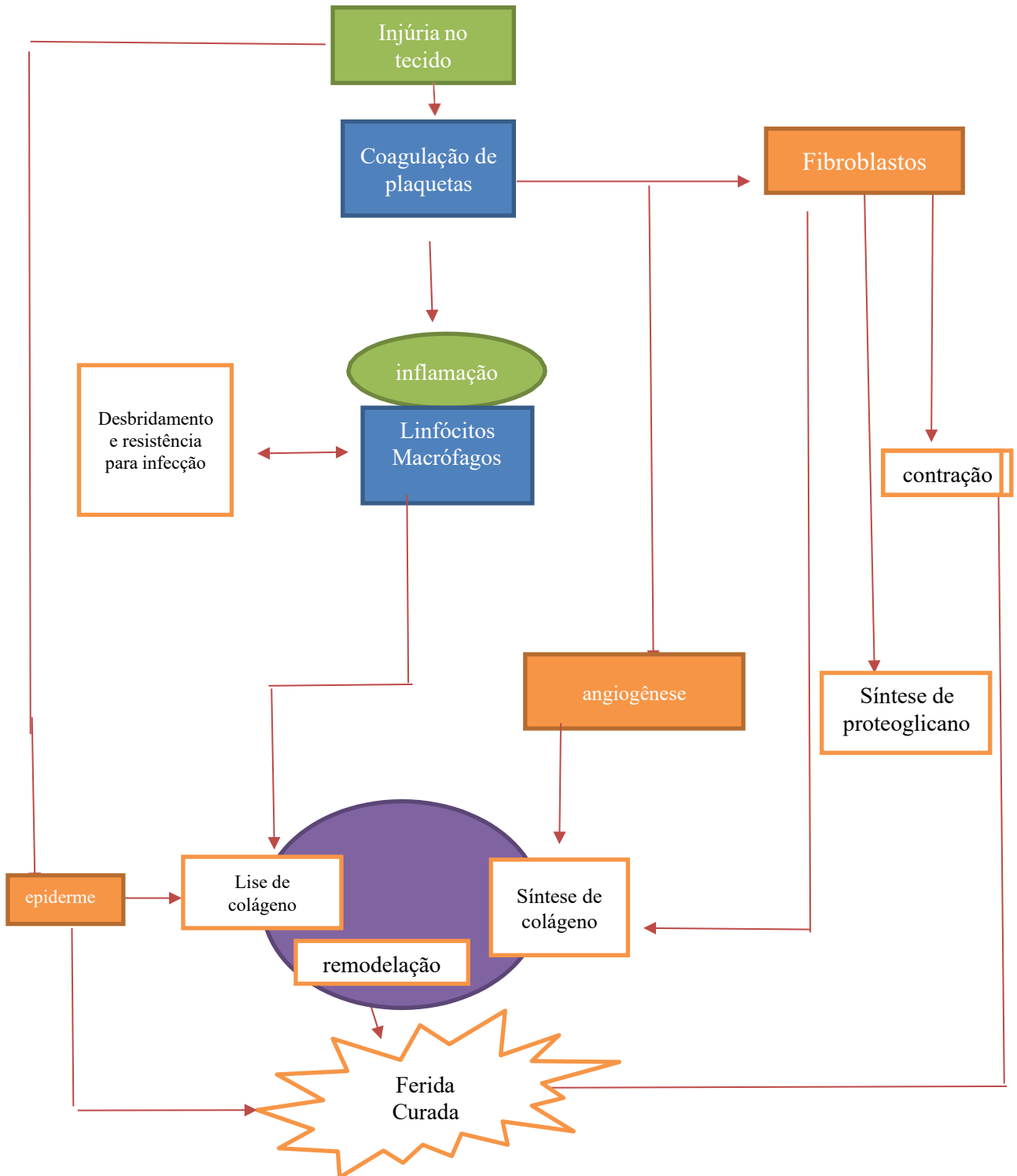
O TGF- $\beta$  contribui para a cicatrização de feridas, em parte através da estimulação da vascularização, proliferação de fibroblastos, diferenciação de miofibroblastos, síntese de colágeno, formação de tecido de granulação e reepitelização (BECK et al, 1991).

**Tabela 1.** Fatores de crescimento importantes da cicatrização de feridas.

<b>Cítocina</b>	<b>Célula de origem</b>	<b>Função</b>
PDGF	<i>plaquetas, macrófagos, células endoteliais</i>	<i>Estimula a angiogênese Estimula a contração da ferida</i>
TGF- $\alpha$	<i>macrófagos, linfócitos T, queratinócitos</i>	<i>Mitogênicos para queratinócitos e fibroblastos Estimula a migração de queratinócitos</i>
TGF- $\beta$	<i>plaquetas, macrófagos, células endoteliais, Linfócitos T, queratinócitos</i>	<i>Quimiotaxia celular Estimula a fibroplasia Estimula a angiogênese</i>
ECF	<i>plaquetas, macrófagos</i>	<i>Mitogênicos para queratinócitos Estimula a migração de queratinócitos</i>
BFGF	<i>macrófagos, mastócitos, linfócitos T, Células endoteliais</i>	<i>Quimiotática para fibroblastos Mitogênico para fibroblastos Estimula a angiogênese</i>
VEGF	<i>células endoteliais</i>	<i>estimula a angiogênese interleucinas de macrófagos, mastócitos, linfócitos induzem febre Ativa neutrófilos, macrófagos, células T Induz liberação de ACTH</i>
KCF	<i>queratinócitos</i>	<i>estimulam a epitelização</i>
Histamina	<i>Mastócitos</i>	<i>Vasodilatação, permeabilidade vascular</i>

Fonte: Autoria própria, 2021.

**Figura 2.** Interrelação fundamental das fases de cicatrização de feridas -inflamação (azul), proliferação (laranja) e remodelação do tecido(rox).)



Fonte: Autoria própria, 2021.

### **2.3 Terapia tópica das lesões**

Segundo Blanes (2004), é necessário favorecer condições locais através de terapia tópica adequada viabilizando o processo cicatricial. A terapia tópica de feridas é norteada pelos seguintes princípios: remover tecidos necróticos e corpos estranhos do leito da ferida, identificar e eliminar processos infecciosos, obliterar espaços mortos, absorver o excesso de exsudato, manter o leito da ferida úmido, promover isolamento térmico e proteger a ferida de traumas e invasão bacteriana. A limpeza e cobertura caracterizam as etapas da terapia tópica.

De acordo com Yamada (1999), limpeza se refere ao uso de fluidos para, suavemente remover bactérias, fragmentos, exsudato, corpos estranhos, resíduos de agentes tópicos, o desbridamento consiste na remoção de tecidos necrosados aderidos ou de corpos estranhos do leito da ferida, usando técnicas mecânica e/ou química. Os tipos de desbridamento diferem-se pelos métodos: autolítico, enzimático ou químico, mecânico e cirúrgico/instrumental.

Um curativo oclusivo úmido ajuda a suportar a fase inflamatória, criando um ambiente com baixa tensão de oxigênio (ativando fatores como fator indutível por hipóxia-1) e também aumenta a taxa de reepitelização (HAN; CEILLEY, 2017). Alguns fatores também são fundamentais para a reparação tissular, tais como: idade, estado nutricional, vascularização, condições sistêmicas, infecção, fatores mecânicos, presença de corpos estranhos (como fragmentos de tecidos desvitalizados) e linhas de tensão (BLANES, 2004).

### **2.4 O colágeno como opção para tratamentos**

O tratamento bem-sucedido da ferida envolve a otimização das condições locais e sistêmicas do paciente em conjunto com um ambiente ideal para a cicatrização de feridas. Muitos produtos diferentes foram desenvolvidos para influenciar esse ambiente da ferida, fornecendo uma área livre de patógenos, protegida e úmida para a cura. Atualmente, produtos mais recentes estão sendo usados para substituir ou aumentar vários substratos na cascata de cicatrização de feridas. (MURPHY; EVANS, 2012).

Avanços recentes no desenvolvimento de curativos avançados têm visto o uso de materiais e / ou a incorporação de produtos biológicos capazes de estimular ou promover eventos na cicatrização de feridas, desde a migração celular até a produção de componentes da matrix extracelular. (FARRUGIA et al; 2018). Pensando dessa forma, o colágeno é um biomaterial que apresenta mais uso na indústria farmacêutica por conta de sua segurança e biocompatibilidade tecidual. Além de ser um material biodegradável com aproveitamento múltiplo. As aplicações do colágeno derivam em tratamentos oftálmicos, para queimaduras de pele, pomadas tópicas e até mesmo na indústria alimentícia. Ele desempenha um papel importante na composição orgânica e várias expressões funcionais nas células. As propriedades

tensoativas e elásticas desse componente contribuem para a eleição do seu uso se comparado a outros polímeros. (FONSECA et al., 1996).

O colágeno é um dos principais componentes do corpo animal e é encontrado em grandes quantidades nos tendões, ossos, pele, córnea e cartilagem. Grande debate sobre a formação de moléculas de colágeno em fibrilas levou a um consenso sobre a importância da estrutura das fibras de colágeno nos últimos anos. Houve também progresso na descrição da relação entre a estrutura e os mecanismos de deformação dos tecidos ricos em colágeno. Os princípios para crescimento de fibrilas de colágeno em estruturas de maiores proporções sempre são objeto de estudos nos dias atuais. (FRATZL, 2003)

O colágeno é um bom material de base para curativos em potencial e também possui baixa antigenicidade, boa biocompatibilidade e capacidade de promover a proliferação e fixação celular. Foi processado em uma variedade de formas físicas, incluindo microotas, comprimidos e nanopartículas, para uso como veículo de entrega de medicamentos e genes, suspensão injetável para aumento de tecidos moles, matrizes para curativos de feridas e como uma construção para vasos sanguíneos projetados, válvula cardíaca, tendão e substitutos da pele (JUDITH et al., 2010). O colágeno também faz boa quimiotaxia para células necessárias para a formação de tecido de granulação (PAL et al., 2016). O colágeno e os materiais matriciais à base de colágeno são os biomateriais mais usados na engenharia da pele, tecido conjuntivo e tecido nervoso (PANELTHANGAVELUMUTHUKUMAR et al., 2014). Possui uma das principais proteínas estruturais da maioria dos tecidos e é capaz de se inserir no complexo de fibrilas sob as condições físicas (VEERURAJ et al., 2019).

Acredita-se que o colágeno ajude a facilitar um ambiente que atraia tipos de células essenciais e receptores para que a ferida se cure, ao mesmo tempo em que empobrece fatores negativos, como radicais livres e proteases (HAN; CEILLEY, 2017).

## **2.5 Fatores que podem interferir na reparação tecidual**

Por se tratar de um processo muito complexo, amplo e que envolve uma sincronia de eventos bioquímicos e moleculares, a cicatrização pode sofrer interferências por vários de fatores (tabela 3) que causam desordem em algum componente ou interrupção de qualquer estágio, resultando em atraso cicatricial, cronicidade ou ferida incurável (HANKS; SPODNICK, 2005).

Na Tabela 2, tem-se alguns dos possíveis fatores que podem interferir na cicatrização de feridas:

**Tabela 2.** Fatores que interferem na cicatrização de feridas.

Hospedeiro	Intrínsecos	Externos
Idade	Corpo estranho	Corticóides
Doenças Imunossupresoras	Temperatura	Manejo errado
Desnutrição	Umidade	Citotoxia por soluções
Doenças Hepáticas	Infecções	Estresse
Hipoadrenocorticismo	Vascularização	
Diabetes Mérito	Trocas Gasosas	
Uremia	Laceração	
Obesidade	Necrose	

Fonte: Autoria própria, 2021.

### **3 OBJETIVOS**

Objetou -se com esse estudo verificar a ação do colágeno tipo II no processo de reparação de feridas cutâneas excisionais criadas experimentalmente em ratos Wistar.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local de execução**

O experimento foi realizado no Laboratório de Experimentação Animal do Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).

### **4.2 Animais**

O trabalho foi aprovado pela comissão de ética na utilização de animais sobre o protocolo de registro CEUA/UFU 020/20 (Anexo I).

Para este experimento, foram utilizados ratos Wistar, cedidos pela Rede de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia, sendo 54 animais machos, com peso aproximado de 300 gramas e idade de 12-15 semanas.

Os ratos foram mantidos em microisoladores na Rede de Bioterismo da Universidade Federal de Uberlândia durante o período do experimento. A ração e a água foram oferecidas ad libitum e o ambiente possuirá temperatura controlada de 22°C (+ ou - 2°C), luminosidade no sistema de 12 horas claro/12 horas escuro e com controle de exaustão de ar.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, após aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia.

### **4.3 Procedimento cirúrgico**

Para a confecção da ferida cirúrgica, os animais foram submetidos à anestesia intramuscular, com cloridrato de quetamina 10%, na dose de 100 mg/kg, e cloridrato de xilazina 2%, na dose de 15 mg/kg. Através de máscara facial, foi feita a manutenção anestésica com uma concentração de isoflurano variando entre 2-3 V% (FLECKNELL, 2009), concentração mínima para que os animais atinjam o 2º plano do 3º estágio anestésico de Guedel.

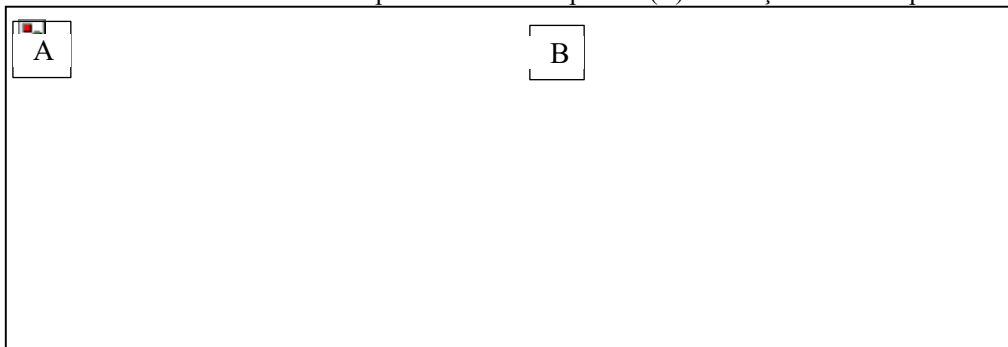
**Figura 3.** Animal em aparelho anestésico no pré-operatório.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e após tricotomia foi realizada antissepsia da região com álcool iodado a 3% (Figura 5).

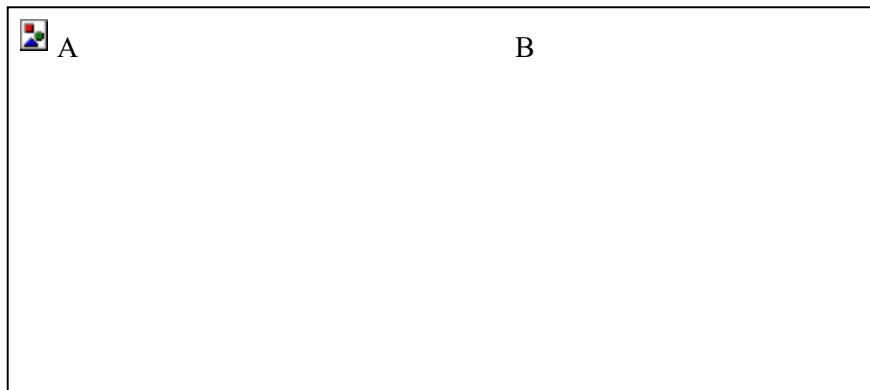
**Figura 4.** Posicionamento em decúbito ventral e utilização de máscara para manutenção anestésica. (A) tricotomia por arrancamento piloso. (B) realização de antissepsia.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

Um trépano de 7,5 mm de diâmetro foi utilizado para a demarcação da área da pele a ser resseccionada, 1 cm caudal à cernelha, que foi removida em espessura total por meio de tesoura de íris, (Figura 6). Para analgesia, todos os animais foram submetidos à aplicação de cloridrato de tramadol, na dose de 12,5 mg/kg, por via intraperitoneal, imediatamente após a cirurgia e a cada 24 horas durante 4 dias.

**Figura 5.** Confeção da ferida cirúrgica. (A) Utilização do trepano para incisão da pele. (B) Utilização de tesoura de íris para remover o fragmento de pele por completo.

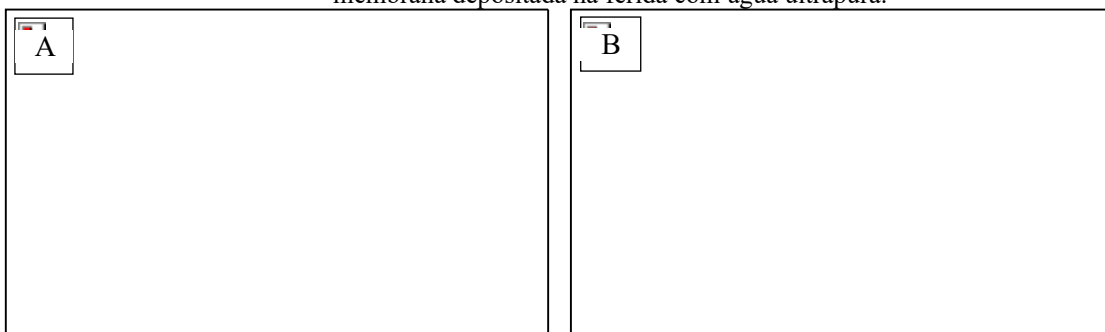


Fonte: Acervo pessoal, 2021.

#### 4.4 Tratamento

Diariamente, após a cirurgia, os animais dos grupos CP e T eram submetidos à limpeza da ferida utilizando gaze embebida em água ultrapura. Sendo que no grupo CP, após a limpeza era instilado 1 mL de água ultrapura sobre o ferimento. Já no grupo T, imediatamente após a limpeza, a ferida era coberta por uma película de colágeno bovino não hidrolisado nas dimensões de 0,3 mm de espessura e 7,5 mm de diâmetro. Em seguida a membrana era umedecida com 1 mL de água ultrapura, promovendo desta forma sua aderência sobre o ferimento. (Figura 7).

**Figura 6.** (A) recorte da membrana de UC -II de acordo com o diâmetro da ferida. (B) Umidificação da membrana depositada na ferida com água ultrapura.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

#### 4.5 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos com 18 animais cada. Todos os animais foram submetidos a criação da lesão cutânea excisional no dorso. Cada grupo foi subdividido em três subgrupos com 6 animais cada e analisados aos cinco 5, 10 e 15 dias pós lesão.

- Grupo Controle (C): submetido à lesão, porém sem receber qualquer tipo de tratamento.
- Grupo Controle Positivo (CP): Lesão tratado diariamente com água ultrapura.
- Grupo Tratado (T): Lesão era submetido à aplicação diária da membrana de UC-II umedecida com água ultrapura-

**Figura 7.** Animal do Grupo de Tratamento (grupo III) recebendo a membrana de colágeno não hidrolisado sobre a ferida.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

**Figura 8.** Animal do Grupo veículo (grupo II) recebendo água ultrapura sobre a ferida.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

#### **4.6 Eutanásia**

Os animais de ambos os grupos foram submetidos a eutanásia no final dos respectivos dias de observação (5, 10 e 15 dias de pós-operatório), submetidos à anestesia inalatória com isoflurano na taxa de 7 a 8 % e com sobredose de tiopental sódico (200 mg/kg) por via intraperitoneal e após a insensibilização foi realizado o deslocamento cervical. Após a eutanásia foi coletado um segmento (figura 9) com auxílio de um punch de 9,0 mm da área de transição entre a ferida e pele intacta para a análise histomorfométrica.

**Figura 9.** Incisão realizada com auxílio de um punch no fragmento de análise histomorfométrica.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

#### **4.7 Análise macroscópica**

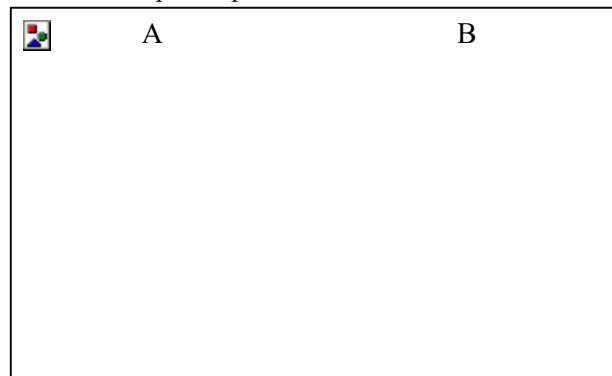
As feridas foram analisadas quanto a presença (score 1) ou ausência (score 0) de crostas. As feridas de todos os animais foram fotografadas imediatamente após a cirurgia (dia 0), e posteriormente, a cada 5 dias até o fim do tratamento proposto (5, 10 e 15 dias após a cirurgia), utilizando uma câmera digital modelo Xiaomi Mi 9 SE, de 48 megapixels e com resolução de 8000x6000 pixels, mantida em tripé com distância (foco-ferida) constante de 14 cm, sempre com um marcador milimétrico padronizado ao lado (régua) (Figura 10 e Figura 11).

**Figura 10.** A imagem mostra como foi realizado o posicionamento da câmera para a aquisição das imagens padronizadas das feridas.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

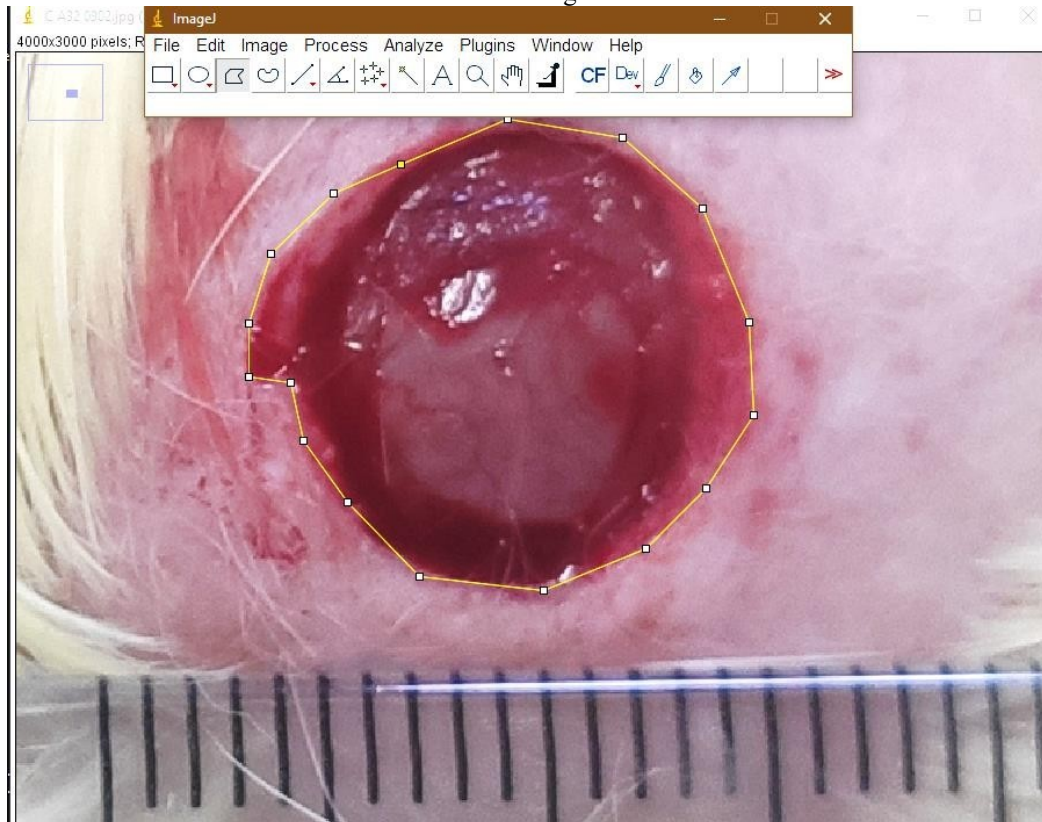
**Figura 11.** Evolução do processo de cicatrização de ferida cutânea excisional criada experimentalmente no dorso de rato Wistar. Em A, aspecto da ferida imediatamente após sua criação com 1 cm de diâmetro. Em B, aspecto após 15 dias de tratamento.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

As imagens foram identificadas e transferidas para o software Image J, onde foram calibradas e as áreas das feridas de cada indivíduo foram calculadas utilizando a ferramenta Polygon (Figura 12). Este dispositivo consiste em delimitar manualmente todo o perímetro da ferida da imagem, e em seguida, um comando (measure) no próprio programa executa o cálculo da área, neste caso em  $\text{mm}^2$ . Os dados obtidos foram enviados para o programa Microsoft Excel® e foi produzida uma planilha com os dados da área para todas as feridas, diferenciando os grupos e os dias.

**Figura 12.** A imagem mostra como foi utilizada a ferramenta Polygon para a determinação da área da ferida no software Image J.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

Após a obtenção do valor da área nos dias 0, 5, 10 e 15, a porcentagem de fechamento foi calculada a partir da fórmula:

$$F = \frac{(A_a - A_0)}{A_0} \times 100$$

Onde:

F: Fechamento da ferida em %

$A_a$ : Área da ferida no dia atual

$A_0$ : Área da ferida no dia zero

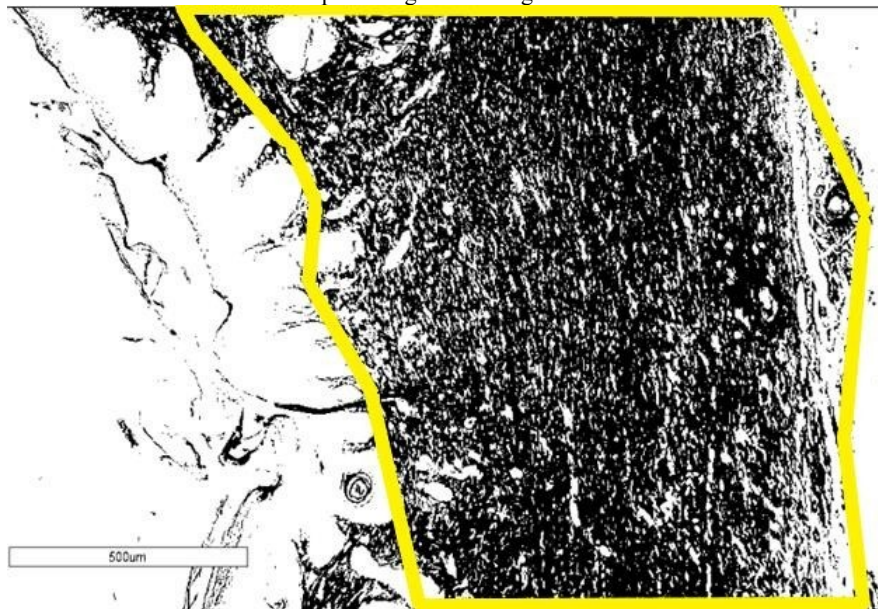
#### 4.8 Análise do colágeno total

Para análise quantitativa de colágeno total, realizou-se a coloração por Picrosirius Red. Posteriormente, essas lâminas foram escaneadas por meio do Scanscope AT (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA), e analisadas em um aumento de 5x no software Aperio ImageScope View Software (Aperio Technologies Inc, Vista, CA, USA). Para que fosse feita uma abordagem de todas as regiões da ferida, foram analisadas 3 imagens de pontos diferentes contemplando as bordas e o meio da ferida. As imagens foram capturadas no software Aperio



ImageScope View, e posteriormente analisadas no software Image J, as imagens foram então configuradas no tipo 8-bit, sendo utilizada a opção Image/adjust/Threshold, o limiar em vermelho foi ajustado até abranger e coincidir com as áreas das feridas que apresentavam o colágeno (Figura 13), essas áreas são caracterizadas por apresentarem uma coloração mais escura em relação as outras estruturas, após, com a ferramenta Polygon a área da ferida foi selecionada e a porcentagem de colágeno existente nessa região foi calculada através da ferramenta Analyse/Measure. Os dados foram compilados em uma tabela no Microsoft Excel®, considerando todos os grupos e dias, o resultado final foi dado pela média do valor obtido para cada uma das 3 imagens capturadas de cada animal.

**Figura 13.** Tratamento em 8-bit no software ImageJ, utilizando um limiar de vermelho em 143%, que é convertido em um escudo preto pelo comando Threshold. Circulado em amarelo observa-se a área de interesse para a mensuração da porcentagem de colágeno.

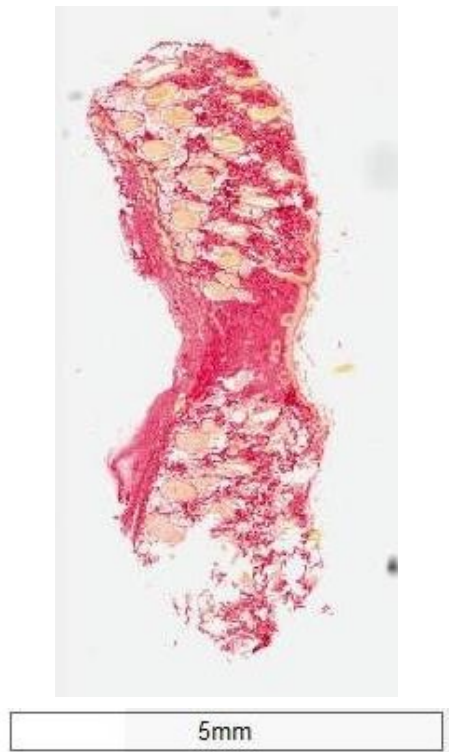


Fonte: Acervo pessoal, 2021.

#### 4.9 Porcentagem de colágeno na ferida

A porcentagem de colágeno na ferida foi obtida através da coloração por Picrosirius Red, as imagens de alta resolução foram obtidas pelo escaneamento das lâminas (Figura 14).

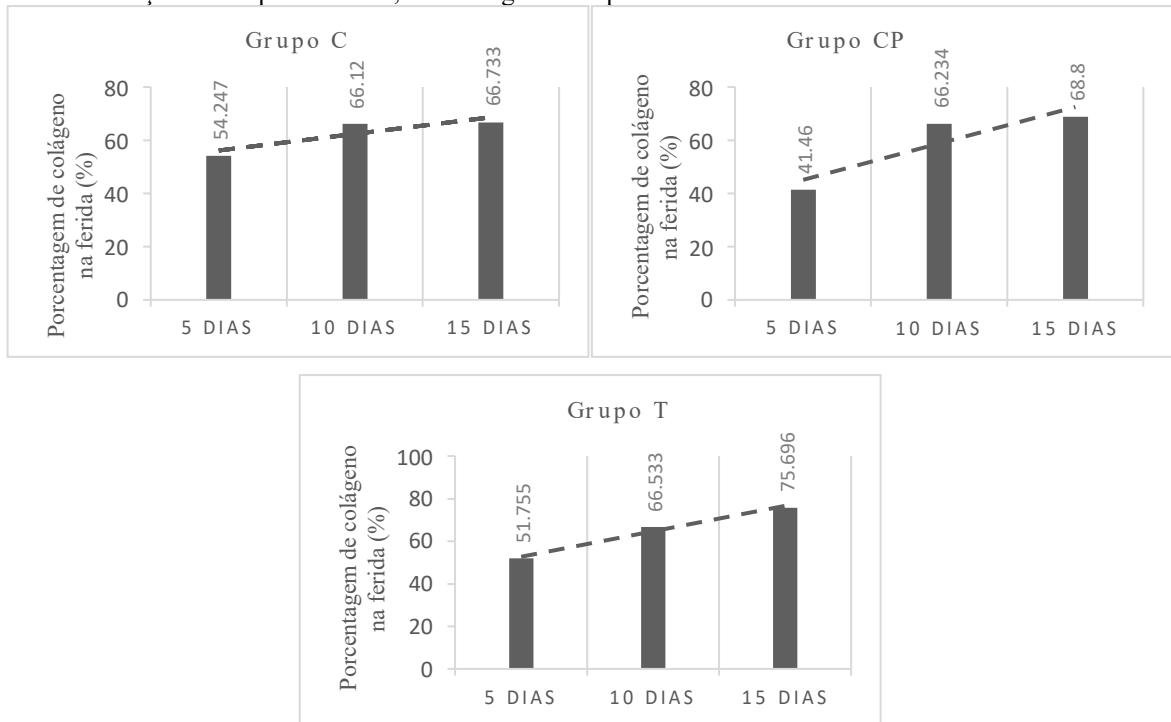
**Figura 14.** Imagem proveniente software Aperio ImageScope View oriunda do escaneamento através do Scanscope AT, demonstrando uma área de ferida de um animal no 15º dia com a coloração Picrosirius Red.



Fonte: Acervo pessoal, 2021.

Os índices e níveis de colágenos foram adquiridos no programa image J após serem tratados com alterações do limiar vermelho de cada imagem. O grupo C teve em média no 5º dia 54,247% de colágeno na ferida, tendo uma variação de 45,595% - 61,512%, no 10º dia apresentou média de 66,12%, variando de 59,003% - 70,749% e no 15º dia apresentou uma média de 66,733%, variando de 59,33% - 71,148%. O grupo CP apresentou uma variação de 22,352% - 51,469%, com uma média de 41,46% no 5º dia, variou entre 55,241% - 77,269%, com média de 66,234% no 10º dia, e variação de 62,977% - 75,521%, com média de 68,8%. Já o grupo T, apresentou aos 5º e 10º, respectivamente médias de 51,755% e 66,533%, com variações de 43,081% - 64,347% e 50,611% - 77,486%, no 15º dia a variação encontrada foi de 73,391% - 81,491% e uma média de 75,696% (Figura 15). Em geral, em todos os grupos ao longo de todo o tempo do estudo a porcentagem de colágeno na ferida aumentou.

**Figura 15.** Os gráficos mostram o comportamento da quantidade média de colágeno na ferida dos grupos em relação ao tempo decorrido, todos os gráficos apresentam uma linha de tendência crescente.



Fonte: Elaboração própria, 2021.

#### 4.10 Análise estatística

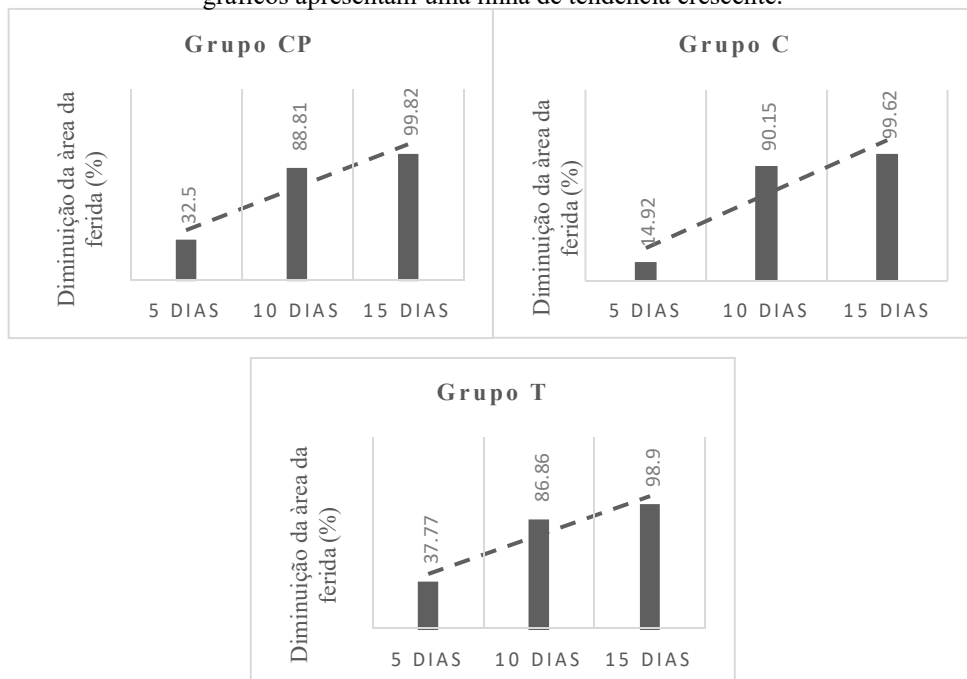
A análise estatística e a construção das tabelas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos em mediana (máximo e mínimo) e analisados pelo teste Kruskal-Wallis para a porcentagem de colágeno e aplicado o teste de ANOVA para análise da porcentagem de diminuição da ferida, confirmados pelo pós teste de Tukey, fazendo comparação múltipla. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Área das feridas

O grupo controle (C) teve uma variação da diminuição da área da ferida de 1% -39,14% ao 5º dia, tendo como média um valor de 14,92%, apresentou uma variação da diminuição da área da ferida de 82,12% - 96,42% ao 10º dia e uma média de 90,15% e obteve uma variação 98,41% -100%, onde o valor 100 encontrado significa um fechamento total da ferida, e uma média de 99,62%. O grupo controle positivo (CP) no 5º dia teve uma variação de 4,4% -64,51%, com um valor médio de 32,5%, no 10º dia a variação foi de 71,19% - 96,23% com uma média de 88,81%, no 15º dia a variação observada foi de 99,58% -100% e uma média de 99,82%. O grupo tratamento (T) teve uma variação da diminuição da área da ferida de 5,9% -58,93% e uma média de 33,77% no 5º dia, no 10º dia observou-se uma variação de 71,65% -95,47% e uma média de 86,86%, no 15º dia a variação encontrada foi de 94,81% -100% e média de 98,9% (Figura 16). Ao longo do tempo, os resultados apontam uma diminuição da ferida em todos os grupos analisados.

**Figura 16.** Comportamento da diminuição média da ferida dos grupos em relação ao tempo decorrido, todos os gráficos apresentam uma linha de tendência crescente.



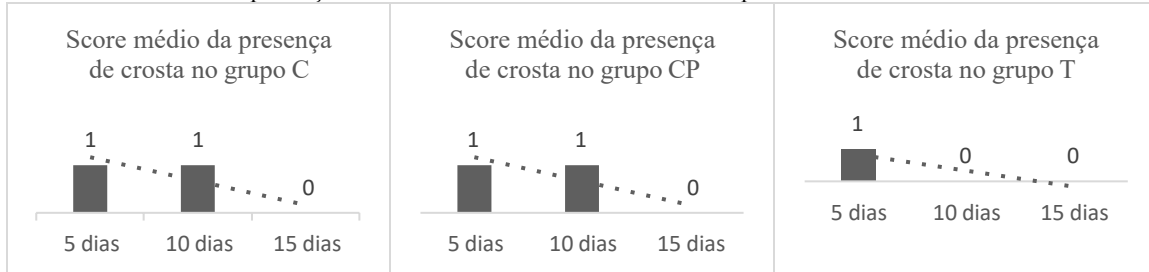
Fonte: Elaboração própria, 2021.

### 5.2 Aspecto macroscópico das feridas

Ao analisar a presença de crosta na ferida, os grupos C e CP obteve-se um score médio de 1 no 5º dia, um score  $\cong$  1 no 10º dia e um score  $\cong$  0 no 15º dia, extrapolando a análise percebemos que em média, a crosta está presente discretamente no 5º e 10º dias e ausente no

15º dia. O grupo T, obteve médias de score  $\cong 1$  no 5º dia, no 10º dia = 0 e no 15º dia  $\cong 0$ , logo a crosta só estava discretamente presente, em média no 5º dia (Figura 17). A crosta nas feridas diminuiu ao longo do tempo de estudo.

**Figura 17.** Os gráficos apresentam o score médio encontrado em cada grupo nos dias 5, 10 e 15, levando em conta a presença de crosta na ferida. A linha de tendência apresenta-se decrescente.



Fonte: Elaboração própria, 2021.

### 5.3 Dados estatísticos

Para a análise da diminuição da área da ferida, os dados estatísticos utilizaram a média e o desvio padrão dos resultados e considerando um  $p < 0,05$ . Observa-se um valor médio da porcentagem da diminuição da ferida no 5º dia de 14,92%, 32,5% e 37,77% respectivamente para os grupos C, CP e T, gerando um valor não significativo de  $p$  igual a 0,167. No 10º dia, observa-se um valor da média de 90,15%, 88,81% e 86,86% respectivamente para os grupos, C, CP e T, produzindo um valor não significativo de  $p$  de 0,7942. Ao analisar a média no 15º dia, obteve-se os seguintes resultados: 99,62%, 99,82% e 98,9% respectivamente para os grupos C, CP e T, gerando um  $p$  de 0,4314 (Tabela 3).

Com base nos valores de  $p$  obtidos, não houve diferença significativa entre o grupo T, grupo C e grupo CP ao longo de 5, 10 e 15 dias em relação a diminuição da área da ferida. Todos os animais tiveram processo de cicatrização significativo demonstrado pelo  $p < 0,0001$ .

**Tabela 3.** Compilado de dados estatísticos referentes ao a porcentagem de diminuição da ferida ao longo do tempo.

	Grupo Controle	Grupo Controle Positivo	Grupo Tratamento	Valor de P
5 dias	14,92 (1 -39,14)	32,5 (4,4-64,51)	37,77 (5,9-58,93)	0,167
10 dias	90,15 (82,12-96,42)	88,81 (71,19 -96,23)	86,86 (71,65-95,47)	0,7942
15 dias	99,62 (98,41-100)	99,82 (99,58-100)	98,9 (94,81-100)	0,4314
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001	

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Na avaliação da porcentagem de colágeno na ferida, levando em consideração um  $p <$

0,05 e a mediana dos dados obtidos, observamos no 5º dia um valor de 54,94% para o grupo C, 42,58% para o grupo CP e 49,93% para o grupo T, produzindo um valor de p de 0,1064. No 10º dia, 66,85% para C, 67,91% para CP e 68,86% para T, gerando um valor de p igual a 0,9464. No 15º dia, 68,72% para C, 67,44 para CP, 74,61 para T com um valor de p igual a 0,0027 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Compilado de dados estatísticos referentes a porcentagem de colágeno na ferida ao longo do tempo.

	Grupo Controle	Grupo Controle Positivo	Grupo Tratamento	Valor de P
5 dias	54,94 (45,6-61,51)	42,58 (22,35-51,47)	49,93 (43,08-64,35)	0,1064
10 dias	66,85 (59-70,75)	67,91 (52,24 -77,27)	68,86 (50,61-77,49)	0,9464
15 dias	68,72 (59,33-71,15)	67,44 (62,98---75,52)	74,61 (73,39---81,49)	0,0027
Valor de P	0,0184	0,0006	0,0003	

Fonte: Elaboração própria, 2021.

Pode-se observar que aos 15 dias o grupo T apresentou uma porcentagem maior de colágeno na ferida levando em conta o valor significativo de p. Ao compararmos a porcentagem de colágeno, independente do tempo dentro de cada grupo nota-se que todas foram significativas, isso é esperado pois houve processo cicatrização em todos os grupos independente se foram tratados ou não.

## 6 DISCUSSÃO

As crostas que se formam sobre a superfície de uma ferida cutânea são essenciais durante o processo de cicatrização. São compostas por glóbulos brancos, tecidos mortos e fluidos. Sua formação se inicia em média 24 horas após a injúria. E tem por objetivo evitar a perda de água e a entrada de agentes infecciosos (MACPHAIL, 2015). A presença da crosta sobre as feridas, faz com que as células da epiderme atravessem o tecido dérmico e se movam abaixo da mesma (WINTER, 1962). No entanto, sua permanência reduz a velocidade de migração das células epidérmicas adjacentes sobre a superfície da ferida, pois a mesma age como barreira mecânica, levando um retardo no processo de cicatrização (WINTER, 2006).

No presente trabalho, a análise macroscópica identificou ausência de crosta sobre a ferida em todos indivíduos do grupo tratado ao 10º dia de observação, quando comparado aos demais grupos no mesmo período. O que indica um processo de cicatrização mais avançado no grupo submetido a aplicação da membrana de UCII, pois de acordo com Winter (2006) a perda precoce da crosta indica uma taxa de cicatrização mais rápida.

Este fato provavelmente ocorreu pela aplicação diária da película de colágeno e sua aderência sobre a ferida, o que pode ter inibido a formação prolongada da crosta, visto que a membrana estaria exercendo a função protetora da crosta, com a vantagem de ser degradada rapidamente.

A produção de colágeno na região da cicatriz, foi estatisticamente superior no grupo tratado com a membrana, comparado aos demais grupos observados ao 15º dia. Resultado este, atribuído a aplicação diária da membrana de UC-II sobre a ferida, pois a mesma serve como um precursor principalmente de prolina para a nutrição da ferida (ALBAUGH et al. 2017), fornecendo aminoácidos que suplementam e proporcionam aumento na síntese de colágeno na lesão, além disso, durante a degradação do colágeno exógeno, ocorre a liberação de endopeptidases, que por sua vez servem como um quimiotático para variadas células que participam do processo de cicatrização (CHATTOPADHYAY; RAINES, 2014; CHEN et al., 2019).

Outro fator que pode ter contribuído com os resultados aqui encontrados, é o fato do UC-II proporcionar um aumento significativo na proliferação, migração e invasão de fibroblastos na derme, além de aumentar ativação o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) tanto na derme quanto na epiderme, potencializando o processo cicatricial (LAI et al., 2020).

## **7 CONCLUSÃO**

O uso da membrana de colágeno não hidrolisado em feridas excisionais em ratos mostrou se eficaz no processo de cicatrização, acelerando o início da fase proliferativa e a produção final de colágeno na cicatriz.



## REFERÊNCIAS

- ABLA, L. E.; ISHIZUKA, M. M.A. Fisiopatologia das Feridas. In: FERREIRA, L. M. **Manual de cirurgia plástica**. São Paulo: Atheneu, p.5-11. 1995.
- ATZINGEN, D. A.; GRAGNANI, A.; VEIGA, D. F.; ABLA, L. E.; MENDONÇA, A. R.; PAULA, C. A.; JULIANO, Y.; CORREA, J. C.; FARIA, M. R.; FERREIRA, L. M. Gel from unripe *Musa sapientum* peel to repair surgical wounds in rats. **Acta Cir Bras.**, v.26, n.5, p.379-82, 2011.
- BECK, L. S.; DEGUZMAN, L.; LEE, W. P.; XU, Y.; MCFATRIDGE, L. A.; AMENTO, E.P. TGF-beta 1 accelerates wound healing: reversal of steroid-impaired healing in rats and rabbits. **Growth Factors**, v.5, n.4, p.295–304, 1991.
- BLANES, L. Tratamento de Feridas. In: SILVA, J. C. C. B. **Cirurgia Vascular: Guia Ilustrado**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R.T. Collagen-based biomaterials for wound healing. **Biopolymers**, v.101, n.8, p.821-833, 2014.
- COX, R.; ERLER, T.; JANINE, T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. **Disease Models e Mechanisms.**, p.165-178, 2011.
- FELICIAN, F. F.; XIA, C.; QI, W.; XU, H.. Collagen from Marine Biological Sources and Medical Applications. **Chemistry e Biodiversity**, v.15, n.5, p.170-557, 2018.
- FRATZL P. Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction. In: FRATZL, P. (ed) **Collagen**. Boston: Springer, 2008.
- HAN, G.; CEILLEY, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. **Springer: Advances**, p.599-610, 2017.
- HARDING, K. G.; MORRIS, H. L.; PATEL, G. K. **Healing chronic wounds**. pp. 160-163, 2002.
- HANKS, J.; SPODNICK, G. Wound Healing in the Veterinary Rehabilitation Patient. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.35, p.1453-1471, 2005.
- HUNT, T. K.; HOPF, H.W. Wound healing and wound infection: What Surgeons and Anesthesiologists Can Do. **Science Direct: Surgical Clinics of North America**, p.587-606, 1997.
- JUDITH, R.; NITHYA, M.; ROSE, C.; MANDAL, A. B. Application of a PDGF-containing novel gel for cutaneous wound healing. **Life Sciences**, v.87, n.1-2, p.1-8, 2010.
- KIM, B. S.; PARK, I. K.; HOSHIBA, T.; JIANG, H. L.; CHOI, Y. J.; AKAIKE, T.; CHO, C. S. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v.36, n.2, p. 238-268, 2011.
- LAI, C. S.; TU, C. W.; KUO, H. C.; SUN, P. P.; TSAI, M. L.. Type II Collagen from Cartilage of *Acipenser baerii* Promotes Wound Healing in Human Dermal Fibroblasts and in

Mouse Skin. **Marine Drugs**, [S.L.], v. 18, n.10, p.511, 2020.

MACPHAIL, C. M.. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015. p. 1-855.

MANDELBAUM, D.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **An bras Dermatol**, v.78, n.4, p.393-410, 2003a.

MANDELBAUM, D.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. **An bras Dermatol**, v. 78, n.4, p.393-410, 2003b.

MUTHUKUMARA, T.; PRABU, P.; GHOSH, K.; SASTRY, T.P. Fish scale collagen sponge incorporated with *Macrotyloma Uniflorum* plant extract as a possible wound/burn dressing material. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.113, p.207–12, 2014.

PAL, P.; SRIVAS, P. K.; DADHICH, P.; DAS, B.; MAITY, P. P.; MOULIK, D. Accelerating full thickness wound healing using collagen sponge of mrigal fish (*Cirrhinus cirrhosus*) scale origin. **Int J Biol Macromol.**, v.93, p.1507–18, 2016.

SHANKAR, K. G.; KUMAR, S. U.; SOWNDARYA, S.; SRIDEVI, S.; ANGEL, S. .; ROSE, C. Rumen tissue derived decellularized submucosa collagen or its chitosan-treated film as a cutaneous wound healant and 1H NMR-metabolite profiling of plasma. **Rsc Advances.**, v.109, p.10715-108151, 2016.

SHEN, X. R.; CHEN, X. L.; XIE, H. X.; HE, Y.; CHEN, W.; LUO, Q.; YUAN, W. H.; HOU, D. Y. JIANG, D. W.; WANG, Q. R. Beneficial effects of a novel shark-skin collagen dressing for the promotion of seawater immersion wound healing. **Military Medical Research.**, v.33, p.1-12, 2017.

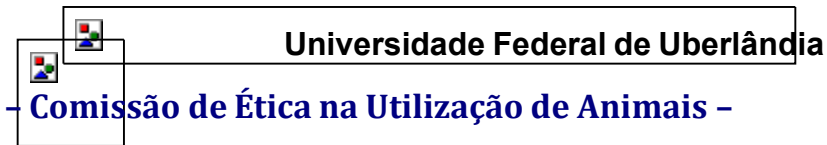
UDHAYAKUMAR, S.; SHANKAR, K. G.; SOWNDARYA, S.; ROSE, C. Novel fibrous collagen-based cream accelerates fibroblast growth for wound healing applications: in vitro and in vivo evaluation. **Biomaterials Science.**, v.5, n.9, p.1868-1883, 2017.

VEERURAJ, A.; LIU, L.; ZHENG, J.; WU, J.; ARUMUGAM, M. Evaluation of astaxanthin incorporated collagen film developed from the outer skin waste of squid *Doryteuthis singhalensis* for wound healing and tissue regenerative applications. **Science Direct: Materials Science and Engineering: C.**, v.95, p.29-40, 2019.

WINTER, G. D. Formation of the scab and the rate of epithelisation of superficial wound in the skin of the young domestic pig. **Narure Lond** v.193 p 293-94, 1962.

WINTER, G.D. Some factors affecting skin and wound healing. **Journal Of Tissue Viability**, [S.L.], v.16, n.2, p.20-23, 2006.

## ANEXO A: PARECER CEUA SOBRE O PROJETO

**CERTIFICADO**

**Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da película colageno tipo I em lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de ratos wistar.” protocolo nº 020/20, sob a responsabilidade de Francisco Cláudio Dantas Mota – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **04 de Setembro de 2020.****

(We certify that the project entitled “Avaliação da película colageno tipo II em lesões cutâneas criadas experimentalmente no dorso de ratos wistar.”, protocol **020/20**, under the responsibility of **Francisco Cláudio Dantas Mota** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **September 04th, 2020**).

Vigência do Projeto	Início: 30/11/2020 Término: 30/11/2021
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Rato heterogênico Wistar
Número de animais	54
Peso / Idade	300 gr / 12-15 sem
Sexo	Macho
Origem / Local	REBIR-UFU
Local onde serão mantidos os animais:	REBIR-UFU

Uberlândia, 08 de Setembro de 2020.

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA**

Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU  
Coordenador da CEUA

Portaria Nº 1234 DE 01 DE OUTUBRO DE 2019