



## Avaliação da membrana de Colágeno Tipo II na cicatrização de feridas cutâneas excisionais em ratos Wistar

Naiara Ribeiro Vieira<sup>1</sup>,\*, Francisco Claudio Dantas Mota<sup>2</sup>, Isabele Yukie Akiba<sup>3</sup>, Ananda Mangili de Paula Rodrigues<sup>4</sup>, Márcio de Barros Bandarra<sup>5</sup>, Marcelo Emílio Beletti<sup>6</sup>, Matheus Matioli Mantovani<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9936-3749>

<sup>2</sup> Professor adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1798-3213>

<sup>3</sup> Graduada em Medicina, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0031-6278>

<sup>4</sup> Graduada em Medicina, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7125-5399>

<sup>5</sup> Professor adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8122-2865>

<sup>6</sup> Professor associado, Departamento de Biologia Celular, Histologia e Embriologia, Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9320-7278>

<sup>7</sup> Professor adjunto, Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), Universidade Federal Rural de Uberlândia (UFU), Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. ORCID: 0000-0001-8783-5235

\*Autor para correspondência: Naiara Ribeiro Vieira - [naiara.rv.bio@gmail.com](mailto:naiara.rv.bio@gmail.com)

INFO ARTIGO	RESUMO
<p>Palavras-chaves:</p> <p>Cicatrização; Ferida de pele; UC II; Curativo; Biomaterial</p> <p>Received: 10/08/21 Accepted: 17/08/21 Published: 27/09/22</p> 	<p>Novos estudos apontam a produção de curativos, sintéticos ou com biomateriais, que possam influenciar de maneira benéfica na maioria dos tipos de feridas, seja por liberação de substâncias para a cicatrização ou por entrega de drogas nas células. A utilização de colágeno para esse fim está sendo amplamente estudada, a principal vantagem desse composto é sua alta degradabilidade e biocompatibilidade. O objetivo desse estudo foi verificar se o processo cicatricial da pele submetida à lesão cutânea induzida em ratos Wistar, responde positivamente usando membrana de colágeno tipo II não hidrolisado como curativo. Utilizaram-se 52 ratos da linhagem Wistar. Em cada animal foi realizada uma ferida com um trépano de 10mm na altura da cernelha. Os animais foram distribuídos em 3 grupos, grupo Controle, grupo Controle Positivo e grupo Tratamento. Foram avaliadas as respostas da cicatrização macro e microscópicas aos 5, 10 e 15 dias. As análises macroscópicas levaram em conta a área da ferida pós tratamento, já as análises microscópicas avaliaram a porcentagem de colágeno e características de reepitelização, infiltrado linfoplasmocitário e presença de crosta. Pode-se perceber que o tratamento com colágeno tipo II foi benéfico em relação a produção de colágeno na ferida aos 15 dias, além disso ao 10º dia pode-se observar uma taxa maior de reepitelização, diminuição do infiltrado linfoplasmocitário e ausência de crosta em relação aos outros grupos. O uso de UCII em feridas excisionais em ratos mostrou se eficaz em relação a melhora na produção final de colágeno e iniciando a fase proliferativa mais rapidamente.</p>

### 1. Introdução

A pele é constituída por duas camadas, epiderme e derme, que são estruturadas por células, matriz extracelular, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Serve como uma barreira protetora contra danos mecânicos, altas temperaturas, raios ultravioletas e infecções (Rodrigues et al, 2019; Cañedo-Dorantes e Cañedo-Ayala, 2019). Após uma injúria, a pele lesionada passará por diversas fases até chegar na cura. Para que se atinja o reestabelecimento da pele após uma lesão, é necessário que haja um desencadeamento de vários processos que podemos analisar como: período de inflamação, proliferação e remodelamento. Assim, observa-se a cicatrização como um evento complexo e dinâmico que tem como objetivo final o reparo da continuidade e função da pele (Lazarus, 1994; Aramwit, 2016).

As feridas, na medicina veterinária, são originadas geralmente através de traumas por mordidas, queimaduras, avulsões de pele e até mesmo por descência de sutura em cirurgias (Fahie e Shettko, 2007). Um dos desafios no tratamento de feridas é promover o processo de cicatrização em um menor tempo, objetivando a diminuição da dor, a prevenção de

infecção, perda de água e redução das cicatrizes. A garantia da minimização do tecido necrótico produzido e proteção

contra a contaminação microbiana demonstra um tratamento bem sucedido (Mayet et al, 2014).

Os curativos encontrados atualmente, em sua grande maioria, são constituídos a base de polímeros e hidrogel, novos estudos realizados propõe tecnologias para que a função dos curativos não fique restritas somente ao recobrimento e proteção das feridas, mas que explorem também a capacidade bioativa de diversos materiais, potencializando a regeneração até a cicatrização da pele (Bianchera et al., 2020 Davoodi-roodbordeii et al., 2019, Oryan et al., 2016). Como as feridas são oriundas de diversas injúrias e apresentam características únicas como a liberação de exsudatos e aparência do leito, não é possível selecionar um único curativo para seu tratamento. Logo, o grande desafio é a produção de novos curativos, sintéticos ou com biomateriais, que possam influenciar positivamente na maioria dos tipos de feridas, seja por liberação de substâncias para a cicatrização ou por entrega de drogas nas células (Aramwit, 2016; Murray et al., 2019, Mayet et al, 2014).

Os biomateriais utilizados no tratamento de feridas, são classificados de acordo com sua natureza química, origem e tipo de aplicação. Podem ser sintéticos os polímeros orgânicos e inorgânicos, ou naturais, como os polissacarídeos, proteínas ou macromoléculas (Bianchera et al., 2020), geralmente são oriundos de animais como por exemplo a pele de tilápia (Ge et al, 2020), de vegetais como a *Aloe vera* (Oryan et al., 2016), de fungos como o *Acremonium* (Kim et al, 2021) ou de bactérias como a *Polaribacter sp* (Sun et al, 2020).

O colágeno é um biomaterial que apresenta baixa imunogenicidade e boa complacência, além de ser a proteína mais abundante nos animais, pode ser um componente eficaz no tratamento de feridas (Mir et al., 2018; Bianchera et al., 2020). Segundo Chattopadhyay e Raines (2014), o uso de colágeno como curativo proporciona vantagens práticas e econômicas em comparação com o uso de fatores de crescimento no processo cicatricial.

Objetivou-se com esse estudo avaliar a ação da membrana de colágeno não hidrolisado no processo de cicatrização de feridas cutânea excisionais em ratos.

## 2. Material e Métodos

O Trabalho foi aprovado pela comissão de ética na utilização de animais sobre o protocolo de registro CEUA/UFU 020/20.

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.

### 2.1. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em três grupos com 18 animais cada: Grupo Controle (C): submetido a lesão, porém sem receber qualquer tipo de tratamento. Grupo Controle Positivo (CP): submetidos a lesão, tratado diariamente com água ultrapura. Grupo Tratado (T): Submetidos a lesão e a aplicação diária da membrana de UC-II umedecida com água ultrapura.

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, 10 e 15 dias pós lesão.

### 2.2. Confeção da ferida cirúrgica

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. Foi administrado cloridrato de tramadol, na dose de 12,5 mg/kg, 10 minutos antes da cirurgia, ambos por via intramuscular. 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 estagio anestésico de Guedel.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e após tricotomia, foi realizado antissepsia da região com álcool iodado à 3%. Um punch dermatológico, de 7,5mm de diâmetro foi utilizado para a demarcação da área da pele a ser resseccionada, 1cm caudal à cernelha, que foi removida em espessura total por meio de tesoura de íris. 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.

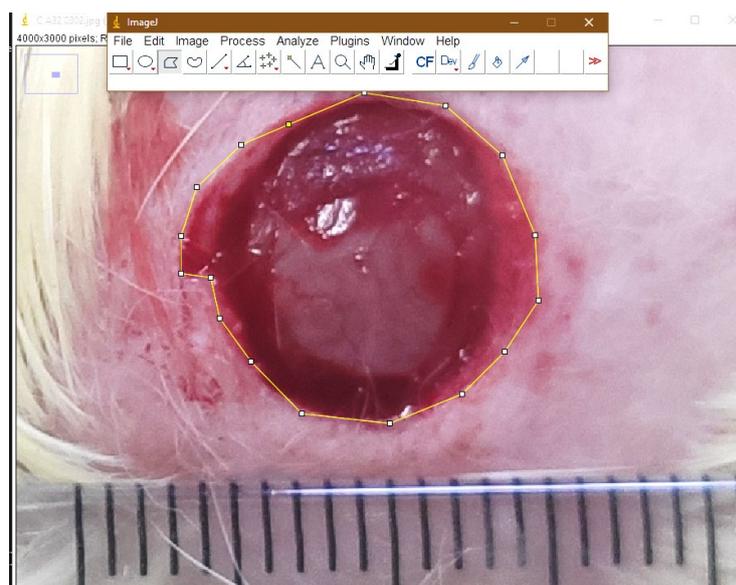
### 2.3. Tratamento

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 a 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.

## 2.4. Análise macroscópica

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). A área da ferida era mensurada pelo programa Image J, utilizando a medição do perímetro da ferida em relação a pele íntegra (Figura 1). Após a obtenção do valor da área nos dias 0, 5, 10 e 15, a porcentagem de fechamento foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{Fechamento da ferida em \%} = \frac{(\text{área da ferida no dia atual} - \text{área da ferida no dia zero}) \times 100}{\text{área da ferida no dia zero}} \quad (1)$$



**Figura 1** – A imagem mostra como foi utilizada a ferramenta Polygon para a determinação da área da ferida no software Image J. Fonte: Autora, 2021.

## 2.5. Eutanásia

Ao final do período de tratamento, todos os animais de ambos os grupos foram submetidos à eutanásia, por aprofundamento anestésico por via intraperitoneal, com cloridrato de lidocaína 2%, na dose de 57 mg/kg, seguido de tiopental sódico 5%, na dose de 200 mg/kg. Após a confirmação de parada respiratória, foi realizado deslocamento cervical.

## 2.6. Análise histomorfométrica

Após eutanásia, foi coletado um fragmento de tecido, envolvendo toda a área da cicatriz, por meio de um trépano de 10 mm de diâmetro. O fragmento coletado passou por processamento, seguindo as técnicas de rotina para produção de lâminas para análise histopatológicas, que incluem desidratação, diafanização e inclusão em parafina. De cada peça foram feitas 7 lâminas, com 5 micrômetros de espessura, que foram coradas pela hematoxilina e eosina.

Foi realizado uma análise descritiva duplo cego, levando em conta a presença de crosta, reepitelização e infiltrado linfoplasmocitário na ferida.

Para a criação de gráficos e um melhor entendimento do comportamento das lesões frente a cada grupo, cada uma dessas classificações foram associadas a um score, 4 para características acentuadas, 3 para moderadas, 1 para as discretas e 0 para as ausentes levando em conta a quantidade de reepitelização e infiltrado linfoplasmocitário e presença de crosta. Para cada grupo e dias, a média do score foi calculada tendo como base os valores de score encontrados para cada animal nos dias 5, 10 e 15 do estudo.

As lâminas foram levadas ao AMG EVOS® digital inverted microscope (Thermo Fisher Scientific®, United States) a um computador PC com placa digitalizadora Data Translation 3153, onde as imagens foram obtidas, com objetiva de 10x e 20x em microscopia de luz comum.

## 2.7. Análise do colágeno total

Para análise quantitativa de colágeno total, realizou-se a coloração por picrossirius 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 feito 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, 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.

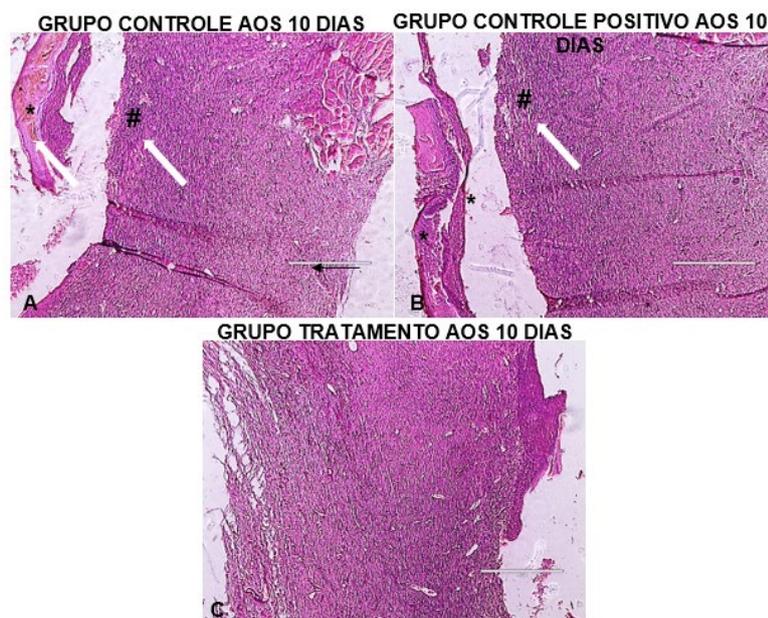
## 2.8. Análise estatística

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.

## 3. Resultados

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%. Ao longo do tempo, os resultados apontam uma diminuição da ferida em todos os grupos analisados.

As características das feridas foram avaliadas de acordo com sua taxa de reepitelização, infiltrado linfoplasmocitário e presença de crosta. Aos 5 dias todos os grupos apresentaram uma taxa de reepitelização ausente, acentuada infiltração linfoplasmocitária e ausência de crosta. No 10º dia todos grupos apresentaram reepitelização variando de acentuada a discreta, diminuição do infiltrado linfoplasmocitário e diminuição da presença de crosta. Aos 15 dias, nota-se uma intensa reepitelização, diminuição do infiltrado linfoplasmocitário e ausência de crosta de modo geral em todos os grupos (Figura 2).



**Figura 2** – Comparação das fotomicrografias de cortes histológicos da região da ferida excisional nos ratos, referente ao grupo controle (A), grupo controle positivo (B) e tratamento aos 10 dias (C), utilizando um aumento de 100x demonstrando a ausência de crosta (\*) e de infiltrado linfoplasmocitário (#) no grupo tratamento (seta branca).

Quando observamos o grupo C notamos que em relação a reepitelização, obteve-se um score médio de 0 no 5º dia, um score  $\cong$  1 no 10º dia e um score  $\cong$  3 no 15º dia, extrapolando a análise percebemos média na reepitelização ausente no 5º dia, discreta no 10º dia e moderada no 15º dia.

No grupo CP, houve um score = 0 no 5º dia, score  $\cong$  a 1 no 10º dia e score  $\cong$  4 no 15º dia, a reepitelização na média das lesões encontrada foi ausente no 5º dia, discreta no 10º dia e acentuada no 15º dia. O grupo T, obteve médias de score igual a 0 no 5º dia, no 10º dia  $\cong$  3 e no 15º dia = 4, logo a reepitelização observada foi ausente no 5º dia, moderada no 10º dia e acentuada no 15º dia. É possível afirmar que ao longo dos dias, mesmo com diferença nas características, todos os grupos atingiram a reepitelização.

Ao observar a infiltração linfoplasmocitária, os grupos C e CP obtiveram um score médios de 4 no 5º dia, um score  $\cong$  3 no 10º dia e um score  $\cong$  0 no 15º dia, extrapolando a análise percebemos média na infiltração linfoplasmocitária acentuada no 5º dia, moderada no 10º dia e ausente no 15º dia. O grupo T, obteve médias de score  $\cong$  3 no 5º dia, no 10º dia = 1 e no 15º dia  $\cong$  0, logo a infiltração linfoplasmocitária observada foi moderada no 5º dia, discreta no 10º dia e ausente no 15º dia. É possível afirmar que ao longo dos dias, mesmo com diferença nas características, todos os grupos diminuíram a quantidade do infiltrado linfoplasmocitário nas lesões.

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. A crosta nas feridas diminuiu ao longo do tempo de estudo (Tabela 1).

	Grupo Controle	Grupo Controle Positivo	Grupo Tratamento
5 dias	1 (presente)	1 (presente)	1 (presente)
10 dias	1 (presente)	1 (presente)	0 (ausente)
15 dias	0 (ausente)	0 (ausente)	0 (ausente)

Tabela 1 – Compilado de dados estatísticos referentes a presença de crosta na ferida ao longo do tempo.

A porcentagem de colágeno na ferida foi obtida através da coloração por picrossirius red, as imagens de alta resolução foram obtidas pelo escaneamento das lâminas.

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%. Em geral, em todos os grupos ao longo de todo o tempo do estudo a porcentagem de colágeno na ferida aumentou.

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.

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  $p < 0,0001$ .

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 2).

	Grupo Controle	Grupo Controle Positivo	Grupo Tratamento	Valor de P
5 dias	54,94	42,58	49,93	0,1064
10 dias	66,85	67,91	68,86	0,9464
15 dias	68,72	67,44	74,61	0,0027
Valor de P	0,0184	0,0006	0,0003	

**Tabela 2** – Compilado de dados estatísticos referentes a porcentagem de colágeno na ferida ao longo do tempo.

Podemos 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.

#### 4. 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 histológica 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 reparação do tecido cutâneo apresenta quatro fases: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (Sorg et al., 2017): A hemostasia inicia-se imediatamente após a injúria, dando início a cascata de coagulação (Serra et al., 2017). A fase inflamatória tem por objetivo limpar a ferida de partículas estranhas e de agentes infecciosos. (Rittié, 2016). A fase proliferativa é caracterizada pela migração e proliferação de diferentes tipos celulares (Gonzalez et al., 2016; Reinke e Sorg, 2012), como os queratinócitos, fibroblastos que iram formar o tecido de granulação e epitélio (Serra et al., 2017).

A presença do infiltrado linfoplasmocitário no processo de cicatrização, representa a fase inflamatória, sendo responsável pela produção de enzimas e radicais livres que defendem a lesão da contaminação por microorganismos, fazem a fagocitose de debris celulares, além disso, são fonte importante de fatores de crescimento e citocinas que iniciam a fase proliferativa para o reparo das feridas (Burgoyne e Morgan, 2003). No entanto, a permanência exacerbada do infiltrado, acarreta em extensos danos aos tecidos devido ao excesso de fagocitose e ação de enzimas culminando em no atraso na fase proliferativa (Singh et al., 2017).

No presente estudo, verificou-se que os animais submetidos a aplicação da membrana de UC-II apresentavam discreta quantidade de infiltrado linfoplasmocitário no 10º dia de observação, quando comparado aos demais grupos no mesmo período, o que indica que esses indivíduos já se encontravam em uma fase mais avançada da cicatrização (fase proliferativa), comprovado pela acentuada reepitelização observado neste grupo aos 10 dias.

Acredita-se que este fato esteja relacionado a inibição dos fatores inflamatórios, proporcionado pelo uso tópico do colágeno não hidrolisado sobre as feridas, visto que o mesmo é capaz de reduzir a produção de citocinas pró inflamatórias IL-2 e IL-17, além de aumentar a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e TGF- $\beta$  (TONG et al., 2009). Pois de acordo com Singh et al., (2017), fatores que que apresentam propriedades anti-inflamatória, reduzindo a resposta imunológica no local, proporcionam uma cicatrização mais rápida por acelerarem a entrada na fase proliferativa.

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).

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 e Raines, 2014; Chen et al., 2019).

## 5. 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.

## 6. Referências

- Albaugh VL, Mukherjee K, Barbul A. Proline Precursors and Collagen Synthesis: biochemical challenges of nutrient supplementation and wound healing. *The Journal of Nutrition*, 147:(11); 1-7, 2017. <http://dx.doi.org/10.3945/jn.117.256404>.
- Aramwit P. Introduction to biomaterials for wound healing. *Wound Healing Biomaterials*, 2:(1); 3-38, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-1-78242-456-7.00001-5>.
- Bianchera A, Catanzano O, Boateng J, et al. The Place of Biomaterials in Wound Healing. *Therapeutic Dressings And Wound Healing Applications*, 337-366,2020. <http://dx.doi.org/10.1002/9781119433316.ch15>.
- Burgoyne R D, Morgan A. Secretory Granule Exocytosis. *Physiological Reviews*, 83:(2), 581-632,2003. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00031.2002>.
- Cañedo-Dorantes L, Cañedo-Ayala M. Skin Acute Wound Healing: a comprehensive review. *International Journal of Inflammation*, 2019: (1), 1-15, 2019. <http://dx.doi.org/10.1155/2019/3706315>.
- Chattopadhyay S, Raines, R T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers*, 101:(8), 821-833, 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/bip.22486>.
- Chen J, Gao K, Liu S. et al. Fish Collagen Surgical Compress Repairing Characteristics on Wound Healing Process In Vivo. *Marine Drugs*, 17:(1), 33, 2019. <http://dx.doi.org/10.3390/md17010033>.
- Davoodi-Roodbordeii F, Afshar M, Tabrizi F H A. et al. Topical hydrogel containing *Fumaria vaillantii* Loisel. extract enhances wound healing in rats. *Bmc Complementary And Alternative Medicine*. 19:(1), 1-9, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s12906-019-2645-y>.
- Fahie M A, Shettko D. Evidence-Based Wound Management: a systematic review of therapeutic agents to enhance granulation and epithelialization. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 37:(3), 559-577, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.02.001>.
- Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 3. ed. Newcastle: Elsevier, 2009. ISBN 9780080918990
- Ge B, Wang H, Li J. et al. Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. *Marine Drugs*, 18:(4), 178, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/md18040178>.
- Gonzalez A C O, Costa, T F, Andrade Z A. et al. Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91:(5), 614-620, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>.
- Kim S, Lee Chang W, Park, S. et al. Acremonamide, a Cyclic Pentadepsipeptide with Wound-Healing Properties Isolated from a Marine-Derived Fungus of the Genus *Acremonium*. *Journal Of Natural Products*, 84:(8), 2249-2255, 2021. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c00305>.
- Lai C S.; Tu C W, Kuo H C. et al. Type II Collagen from Cartilage of *Acipenser baerii* Promotes Wound Healing in Human Dermal Fibroblasts and in Mouse Skin. *Marine Drugs*, 18:(10), 511, 2020. <http://dx.doi.org/10.3390/md18100511>.
- Lazarus G S. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Archives Of Dermatology*, 130:(4), 489, 1994. American Medical Association <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1994.01690040093015>.
- Macphail C M. Cirurgia do Sistema Tegumentar. In: Fossum, Theresa Welch. *CIRURGIA de Pequenos Animais*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2015. p. 1-855. ISSN 0323044395
- Mayet N, Choonara, Y E, Kumar P. et al. A Comprehensive Review of Advanced Biopolymeric Wound Healing Systems. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 103:(8),2211-2230, 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24068>.
- Mir M, Ali M N, Barakullah A. et al. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. *Progress In Biomaterials*, 7:(1), 1-21, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s40204-018-0083-4>.
- Murray R Z, West Z. E, Cowin, A J, et al. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns & Trauma*, 7:(2),1-9, 2019. <http://dx.doi.org/10.1186/s41038-018-0139-7>.
- Rasband W., ImageJ documentation. Disponível em: [www.rsb.info.nih.gov](http://www.rsb.info.nih.gov), acesso em 28/06/2021.
- Reinke J M, Sorg H. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49:(1) 35-43, 2012. <http://dx.doi.org/10.1159/000339613>.
- Rittié L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal Of Cell Communication And Signaling*, 10:(2), 103-120, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s12079-016-0330-1>.
- Rodrigues M, Kosaric N, Bonham C A, et al. Wound Healing: a cellular perspective. *Physiological Reviews*, 99:(1), 665-706, 2019. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>.
- Oryan A, Mohammadalipour A, Moshiri A, et al. Accelerated Wound Healing, Modeling, and Remodeling. *Annals Of Plastic Surgery*, 77:(1), 37-46,2016. <http://dx.doi.org/10.1097/sap.0000000000000239>.
- Serra M B, Barroso W A, Silva N N, et al. From Inflammation to Current and Alternative Therapies Involved in Wound Healing. *International Journal of Inflammation*, 2017, 1-17, 2017. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3406215>.
- Singh S, Young A, Mcnaught C. The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 35:(9), 473-477, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.004>.
- Sorg H, Tilkorn D J, Hager S, et al. Skin Wound Healing: an update on the current knowledge and concepts. *European Surgical Research*, 58:(1-2), 81-94,2016. <http://dx.doi.org/10.1159/000454919>.
- Sun M, Zhao F, Chen X, et al. Promotion of Wound Healing and Prevention of Frostbite Injury in Rat Skin by Exopolysaccharide from the Arctic Marine Bacterium *Polaribacter* sp. SM1127. *Marine Drugs*,

18:(1),48,2020.

<http://dx.doi.org/10.3390/md18010048>.

Tong, T, Zhao, W, Wu Y Q, et al. Chicken type II collagen induced immune balance of main subtype of helper T cells in mesenteric lymph node lymphocytes in rats with collagen-induced arthritis. *Inflammation Research*, 59:(5), 369-377, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-009-0109-4>.

Winter G D. Formation of th' scab and the rate of epithelisation of superficial wound. in the skin of the Young domestic pig. *Nature Lond* 193, 293-94, 1962.

Winter, G.D. Some factors affecting skin and wound healing. *Journal Of Tissue Viability*,16;(2), 20-23, 2006.

[http://dx.doi.org/10.1016/s0965206x\(06\)62006-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0965206x(06)62006-8).