

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araçatuba

ANA PAULA PRADO ANTUNES DE FARIA

**Avaliação do hidrogel de celulose bacteriana na
cicatrização de feridas em equinos**

Araçatuba

2021

ANA PAULA PRADO ANTUNES DE FARIA

**Avaliação do hidrogel de celulose bacteriana na
cicatrização de feridas em equinos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica.

Orientador(a): Prof^a. Ass. Dr^a. Flavia
de Almeida Lucas

Araçatuba

2021

F224a

Faria, Ana Paula Prado Antunes de

Avaliação do hidrogel de celulose bacteriana na cicatrização de feridas em equinos / Ana Paula Prado Antunes de Faria. -- Araçatuba, 2021

63 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Flavia de Almeida Lucas

1. Biocelulose. 2. Cavalo. 3. Cicatrização de feridas. 4. Citocinas. 5. Colágeno. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM EQUINOS

AUTORA: ANA PAULA PRADO ANTUNES DE FARIA

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Participação Virtual)
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara-UNIARA

Araçatuba, 25 de janeiro de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM EQUINOS

AUTORA: ANA PAULA PRADO ANTUNES DE FARIA

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Participação Virtual)
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara-UNIARA

Araçatuba, 25 de janeiro de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: AVALIAÇÃO DO HIDROGEL DE CELULOSE BACTERIANA NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS EM EQUINOS


AUTORA: ANA PAULA PRADO ANTUNES DE FARIA

ORIENTADORA: FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FLAVIA DE ALMEIDA LUCAS (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Participação Virtual) 
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara-UNIARA

Araçatuba, 25 de janeiro de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico,
Aos meus pais, Ana Cristina Prado Antunes e Marcus Vinícius de Faria (*in
memorian*) e minha amada irmã Ana Flávia Prado Antunes de Faria.
Eles que sempre me apoiaram e me incentivaram a seguir em frente.
Aos meus queridos amigos, que sem citar nomes, estiveram presentes me apoiando em
vários momentos, tornando os dias mais doces e leves.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Professor Titular Iveraldo dos Santos Dutra e do vice-diretor Professor Associado Alicio Martins Júnior.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Assistente Dr^a. Flavia de Almeida Lucas, atenção e apoio durante o processo de definição e orientação neste trabalho.

À Pesquisadora Dr^a. Flávia Lombardi Lopes, pelo auxílio nas análises laboratoriais moleculares realizadas nas dependências do Laboratório de Epigenética do Departamento de Produção e Saúde Animal, juntamente com suas orientadas, em especial Natália Scaramele que me auxiliaram e me introduziram a parte básica da técnica de RT-qPCR. Muito obrigada!

À Seven Indústria de Produtos Biotecnológicos, representada pelo Professor Dr. Hernane Barud.

Aos colegas de Laboratório Daniela S. Denadai, Mariana Z. Guiati, Gabriel F. Urzedo e Leonardo Bentin que me auxiliaram nas várias etapas deste projeto de pesquisa.

Ao Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” e os funcionários, por ceder espaço para o desenvolvimento da fase experimental deste projeto.

À minha família e os meus amigos do coração que tornaram os momentos de dificuldade e tensão mais leves e que fazem parte importante do meu ser.

Aos nossos parceiros, companheiros que aceitam nossas imposições, **os cavalos**. Sem eles o mundo seria incompleto.

*“E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente onde quer que a gente vá
E é tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho por mais que pense estar”*

Caminhos do coração - Gonzaguinha

FARIA, A. P. P. A. **Avaliação do hidrogel de celulose bacteriana na cicatrização de feridas em equinos**. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

Os equinos estão predispostos a traumas e as feridas resultantes normalmente cicatrizam por segunda intenção, sendo comum complicações neste processo, como a formação de tecido de granulação exuberante. O hidrogel à base de biocelulose é uma nova possibilidade terapêutica para o tratamento de feridas na medicina equina. A biocelulose ou celulose bacteriana é um biopolímero produzido por nanotecnologia com propriedades que auxiliam na cicatrização de feridas epiteliais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso tópico do hidrogel à base de biocelulose a 1% em feridas experimentais realizadas em equinos. Foram realizadas feridas experimentais na região lombar (4 cm²) em 4 cavalos adultos hígidos. Nas feridas do grupo controle o curativo foi realizado apenas com solução fisiológica 0,9 % e as feridas do grupo tratado receberam hidrogel à base de biocelulose a 1%. Biópsias das feridas cutâneas foram realizadas dias 3, 7, 14 e 21 após o procedimento cirúrgico. Análises macroscópicas referentes à área das feridas e taxa de contração foram realizadas. Análises microscópicas e análises moleculares de expressão gênica de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β) e colágeno (tipo I e tipo III) utilizando a técnica RT-qPCR após isolamento do RNA das amostras de biópsias de tecido, tratadas ou não com hidrogel de biocelulose. A avaliação macroscópica e microscópica revelou que a utilização do hidrogel foi benéfica ao melhor aspecto do novo tecido cicatricial formado e seu efeito celular anti-inflamatório. Já a avaliação molecular não apresentou diferença estatística entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados. Assim, os dados deste estudo permitem afirmar que o hidrogel de biocelulose é uma alternativa no tratamento de feridas em equinos, sendo necessário dar continuidade nas pesquisas que investiguem sua ação molecular na cicatrização de feridas em equinos.

Palavras-chave: Biocelulose. Cavalos. Cicatrização de feridas. Citocinas. Colágeno.

FARIA, A. P. P. A. **Evaluation of bacterial cellulose hydrogel in wound healing in horses**. 2021. 67 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

Horses are predisposed to trauma and the resulting wounds usually heal by second intention, with complications in this process, such as the formation of exuberant granulation tissue, being common. The biocellulose-based hydrogel is a new therapeutic possibility for the treatment of wounds in both human and equine medicine. Biocellulose or bacterial cellulose is a biopolymer produced by nanotechnology that has properties that aid in the healing of epithelial wounds. The aim of the present study was to evaluate the topical use of hydrogel based on 1% biocellulose in experimental wounds performed on horses. Experimental wounds were performed in the lumbar region (4 cm²) on 4 healthy adult horses. In the wounds of the control group, the dressing was applied only with 0.9% saline solution and the wounds of the treated group received hydrogel based on 1% biocellulose. Skin wound biopsies were performed 3, 7, 14 and 21 days after the surgical procedure. Macroscopic analyzes referring to the wound area and contraction rate were performed. Microscopic and molecular analyzes of gene expression of cytokines (IL-6, IL-10, TNF- α and TGF- β) and collagen (type I and type III) using the RT-qPCR technique after isolation of RNA from biopsy samples of fabric, treated or not with biocellulose hydrogel. The results of the analyzes compared at each evaluated moment whether or not there was a significant between the treatments. The macroscopic and microscopic evaluation revealed that the use of the hydrogel was beneficial in terms of the best aspect of the new scar tissue formed and its anti-inflammatory cell effect. The molecular evaluation did not show any statistical difference between the groups at any of the moments evaluated. Thus, the preliminary data of this study allow to affirm that the biocellulose hydrogel is an alternative in the treatment of wounds in horses, being necessary to continue the researches that investigate its molecular action in the healing of wounds in horses.

Keywords: Bacterial cellulose. Horse. Wound healing. Cytokines. Collagen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem ilustrativa esquemática da semelhança epidérmica entre equinos e humanos. A) Áreas epidérmicas semelhantes em humanos e equinos, mostrando a distribuição do músculo <i>panniculus carnosus</i> . B) Cortes esquemáticos de pele de humanos e de equinos.....	18
Figura 2	Gráfico ilustrativo das fases da cicatrização em mamíferos.....	20
Figura 3	A) Cultivo da biocelulose em meio estático, interface ar/líquido e membrana de biocelulose sob sua forma natural, com 4 dias de cultivo. B) Fotoetromicrografia com vista superior da rede microfibrilar da membrana de CB em sua forma natural.....	25
Figura 4	Membrana de biocelulose porosa utilizada como biocurativo em sua forma comercial, produzida pela empresa Nexfill.....	26
Figura 5	Hidrogel à base de biocelulose a 1% aplicado sobre o leito irregular de uma ferida epitelial experimental realizada na região lombar de um equino.....	26
Figura 6	Imagens fotográficas das feridas dos grupos controle e tratado, de acordo com os dias de avaliação.....	37
Figura 7	Médias e desvios padrão das áreas das feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel à base de biocelulose a 1% (GT).....	38

Figura 8	Médias e desvios padrão da taxa de contração das feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel à base de biocelulose a 1% (GT).....	39
Figura 9	Fotomicrografias das biópsias das feridas do GC (A) e GT (B) realizadas com 14 dias de pós-operatório.....	40
Figura 10	Médias e erro padrão para a expressão relativa dos genes colágenos tipos I e tipo III aos 3, 7, 14 e 21 dias de avaliação pós-operatório nos grupos controle e tratado com hidrogel à base de biocelulose a 1%.....	44
Figura 11	Médias e erro padrão para a expressão gênica relativa de IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β em amostras de biópsia tecidual de feridas do grupo controle e tratadas previamente com hidrogel à base biocelulose a 1%.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín–Máx) de polimorfonucleares nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado (GT) com hidrogel à base de biocelulose a 1%.....	35
Tabela 2	Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín–Máx) de monócitos nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado (GT) com hidrogel à base de biocelulose a 1%.....	36
Tabela 3	Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín–Máx) de fibroblastos nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado (GT) com hidrogel à base de biocelulose a 1%	36
Tabela 4	Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín–Máx) de neovascularização nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado (GT) com hidrogel à base de biocelulose a 1%.....	37
Tabela 5	Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín–Máx) de deposição de colágeno nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado (GT) com hidrogel à base de biocelulose a 1%.....	37
Tabela 6	Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín–Máx) de remodelação do colágeno nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado (GT) com hidrogel à base de biocelulose a 1%.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Parâmetros e "scores" atribuídos para a avaliação histológica das feridas induzidas experimentalmente em equinos.....	29
Quadro 2	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (Primer) que foram utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

CB – celulose bacteriana

cm – centímetro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GC – Grupo Controle

GT – Grupo Tratado

°C – graus Celsius

Kg – quilograma

mg- miligrama

mm- milímetro

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

ng – nanograma

PMN - Polimorfonucleares

µL – microlitro

µm – micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Cicatrização cutânea em equinos	16
2.2	O equino como modelo experimental ideal em pesquisas na área da cicatrização	17
2.3	Fases da cicatrização	19
2.4	Biocelulose	23
2.5	Colágeno	26
2.6	Citocinas	28
3	OBJETIVO	30
4	JUSTIFICATIVA	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	Caracterização dos animais e obtenção do hidrogel	32
5.2	Realização das feridas	32
5.3	Avaliação das feridas	33
5.4	Avaliação molecular	35
5.5	Análise estatística	37
6	RESULTADOS	38
6.1	Avaliação macroscópica	38
6.2	Avaliação histopatológica	40
6.3	Avaliação molecular	44
7	DISCUSSÃO	46
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO A - Comitê de Ética	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

As feridas cutâneas são um grande problema tanto na medicina equina quanto na medicina humana por acarretar em custos elevados com o seu tratamento, devido principalmente às complicações e quadros de cronicidade já que ambas as espécies desenvolvem tipos particulares de feridas crônicas não respondendo satisfatoriamente às terapias atuais (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019).

O equino é uma espécie que possui comportamento explosivo capaz de gerar reações bruscas e rápidas que o predispõe a traumas e lesões causando danos a sua integridade, principalmente quando sua função está associada a atividades esportivas ou de tração (PAGANELA et al., 2009). Devido a complexidade fisiológica do processo de cicatrização das feridas cutâneas, a perfeita regeneração dos tecidos é difícil de ser alcançada, se tornando necessário lançar mão de novas terapias.

Neste contexto, a biocelulose ou celulose bacteriana, um biopolímero natural produzido em escala comercial principalmente por bactérias do gênero *Gluconacetorbacter* sp., tem sido objeto de pesquisas para que seja utilizado como um biocurativo, ou seja, material de reparação do tecidual (BARUD et al., 2008; LINA et al., 2011; FORESTI et al., 2017). A biocelulose apresenta características capazes de auxiliar na cicatrização da pele. Suas nanofibras podem ser incorporadas a hidrogeis, se despontando a uma promissora possibilidade terapêutica para o tratamento de feridas crônicas, queimaduras, úlceras e lesões irregulares (GUPTA et al., 2016; CARBINATTO et al., 2018; PICOLOTTO et al., 2019). Sendo assim, na medicina equina a justifica-se o desenvolvimento de pesquisas na área da cicatrização de feridas para reduzir as taxas de eutanásia e a proporção de animais retirados do esporte ou trabalho devido aos efeitos retardados da cicatrização deficiente e dos distúrbios fibroproliferativos dérmicos associados como a formação de tecido de granulação exuberante.

Além disso, pesquisas recentes têm sugerido o cavalo como modelo experimental ideal para realização de pesquisas na área do tratamento de feridas, já que eles possuem uma estrutura dérmica semelhante em anatomia, fisiologia e morfologia à derme humana, que pode garantir um maior sucesso nas pesquisas desta área. Outra vantagem de se utilizar o cavalo, como modelo experimental é que assim como os seres humanos eles desenvolvem naturalmente distúrbios

fibroproliferativos dérmicos durante as fases do processo cicatricial servindo como modelo experimental superior para o desenvolvimento de substâncias cicatrizantes, quando comparado a outras espécies de mamíferos, ratos e camundongos por exemplo (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019).

Apesar da importância da biocelulose como uma opção terapêutica, existem poucas pesquisas avaliando o seu uso nas diferentes fases do processo cicatricial dos animais, sobretudo na espécie equina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cicatrização cutânea em equinos

O tipo de atividade desenvolvida pelo equino e as diferentes regiões onde estes animais vivem podem influenciar a quantidade e o tipo das lesões observadas (SÁNCHEZ-CASANOVA et al., 2014). As áreas mais comumente afetadas são a região distal dos membros (metacarpo e metatarso), além do carpo e tarso e região peitoral (WILMINK, VAN WEEREN, 2004).

Independente do tipo da lesão, a cicatrização é um processo fisiológico que ocorre em quatro fases e que se inicia a partir da perda de integridade da pele, uma solução de continuidade que pode atingir os planos subjacentes em diversos graus. Esse processo fisiológico depende da interação entre as células e vários outros fatores que vão gerar uma série de reações químicas (SENGUPTA et al., 2015).

Independente da região afetada, a cicatrização por primeira intenção é considerada ideal, no entanto nem sempre possível de ser realizada, não sendo incomum a ocorrência de deiscência parcial ou total da sutura em inúmeros casos, sendo a cicatrização por segunda intenção em muitos casos preconizada, por ser a melhor opção, quando não a única, nos casos em que a ferida se encontra muito contaminada, com grave comprometimento tecidual e vascular e extensa perda tecidual.

Geralmente a região distal de membros sofrem maior contaminação, possuem maior mobilidade devido à proximidade com articulações, baixa taxa de contração e baixo suprimento sanguíneo que está relacionada à ausência de panículo carnoso o que predispõe a formação de tecido de granulação exuberante (TGE) (HENDRICKSON, VIRGIN, 2005; THEORET, WILMINK, 2013). Desta forma, a cicatrização por segunda intenção é prolongada, e as complicações como infecção e formação de tecido de granulação exuberante ou cicatriz hipertrófica são frequentes.

2.2 O equino como modelo experimental ideal em pesquisas na área da cicatrização

As feridas em cavalos são de complicado e longo tratamento, frequentemente requerem múltiplas intervenções de um profissional veterinário, principalmente quando as feridas estão localizadas nos membros, pois na maioria das vezes levam ao desenvolvimento de um distúrbio fibroproliferativo dérmico denominado de tecido de granulação exuberante ou carne orgulhosa. Estas lesões apresentam preocupações estéticas e problemas funcionais, muitas vezes levando a claudicação, sendo uma preocupação em termos de bem-estar (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019). O ser humano também desenvolve um distúrbio fibroproliferativo dérmico denominado quelóide. Um estudo histológico comparativo de quelóides e tecido de granulação exuberante determinou que as semelhanças em ambos os tecidos foram caracterizadas principalmente por fibras de colágeno desorganizadas e espessas e um número semelhantes de fibroblastos. Além disso, ambos os tecidos incluem acúmulo excessivo de matriz extracelular uma cobertura epitelial espessada em lesões com longo tempo de evolução (THEORET, C. L. e WILMINK, J. M., 2013).

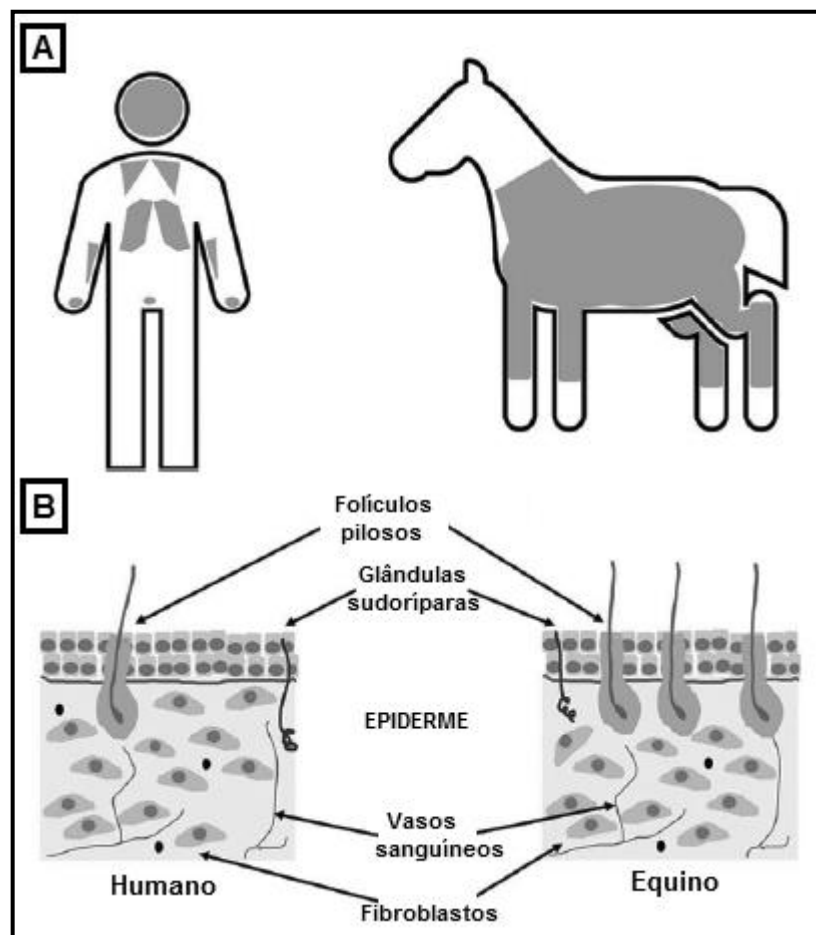
Por razões éticas existe uma dificuldade para desenvolver pesquisas na área da cicatrização de feridas e a formação de cicatrizes em seres humanos, principalmente em estudos *in vivo*. Os quelóides além de desfigurantes são muitas vezes pruriginosos, dolorosos, de difícil tratamento e possuem uma elevada taxa de recorrência. Assim, visto o impacto econômico e social que a cicatrização de feridas acarreta em todo mundo, há uma necessidade de desenvolvimento de pesquisas na área (THEORET C.L. et al., 2013).

Quando comparamos humanos e equinos, ambos possuem semelhanças anatômicas e morfofisiológicas na estrutura da pele. Já entre pequenos mamíferos e seres humanos esta semelhança diminui. A cicatrização dos camundongos, por exemplo, ocorre principalmente pelo mecanismo de contração devido à presença do músculo *panniculus carnosus* em seu tecido subcutâneo. Este músculo está ausente nos humanos e na região de membros dos equinos (GERBER P.A. et al., 2014).

Isso confere semelhanças anatômicas entre algumas regiões da superfície epitelial de cavalos e humanos, já que ambas as espécies são caracterizadas por terem uma pele rígida ou aderida, o que significa que a pele está firmemente presa à

base do tecido conjuntivo subcutâneo. Nos cavalos esta "pele rígida" está presente principalmente na região dos membros e pode variar em outras regiões da superfície corporal, como o tronco que é caracterizado por apresentar uma "pele solta", típica de roedores de laboratório. Morfologicamente, nos estratos dérmicos de humanos e equinos, a principal diferença observada é a densidade dos folículos pilosos, maior neste último (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019; GERBER P.A. et al., 2014) (**Figura 1**).

Figura 1. Imagem ilustrativa esquemática da semelhança epidérmica entre equinos e humanos. **A)** Áreas epidérmicas semelhantes em humanos e equinos, mostrando a distribuição do músculo *panniculus carnosus*. **B)** Cortes esquemáticos de pele de humanos e de equinos.



Fonte: Adaptado de HARMAN, THEORET, & VAN DE WALLE; 2019.

Os equinos podem fornecer um modelo experimental superior para estudar cicatrizes em comparação com mamíferos de laboratório utilizados em pesquisas, como ratos e camundongos, já que os cavalos são os únicos mamíferos conhecidos,

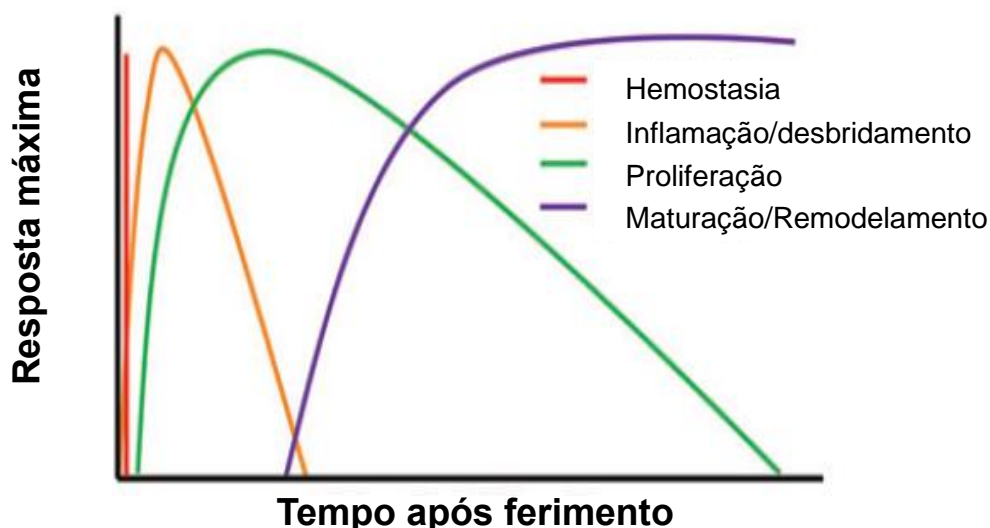
além de seres humanos, capazes de desenvolver distúrbios fibroproliferativos dérmicos (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019). Segundo Theoret, uma das principais limitações ao uso do cavalo como modelo experimental para o estudo de cicatrização e feridas é que ao contrário dos camundongos, os equinos são animais de grande porte e o custo para sua manutenção é alto, exigindo instalações e alojamentos adequados disponíveis apenas em centros de pesquisa ou escolas de veterinária (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019).

Assim sendo, pesquisas que envolvam cicatrização em equinos podem fornecer importantes resultados na área de cicatrização de feridas e oportunidades sem precedentes para desenvolver e testar novos tratamentos que acelerem e melhorem o processo de formação de tecidos fibroproliferativos avançando duplamente no tratamento de feridas humanas e veterinárias.

2.3 Fases da cicatrização

O processo cicatricial é dinâmico e complexo, abrange matriz extracelular, as células sanguíneas, e os mediadores inflamatórios (citocinas e fatores de crescimento), podendo ser dividido em fases que sobrepõem-se temporalmente, caracterizadas por eventos que vão culminar na cicatrização (HARMAN, THEORET & VAN DE WALLE, 2019) (**Figura 2**).

Figura 2. Gráfico ilustrativo das fases da cicatrização em mamíferos. As fases compreendem uma série de eventos que se sobrepõe temporalmente. Imediatamente após a lesão, o sangramento é interrompido pela hemostasia, seguido por um processo inflamatório intenso que serve para limpar patógenos e induzir proliferação de células necessárias para preencher o espaço da ferida. A fase de remodelação continua muito tempo após a cicatrização.



Fonte: Adaptado de HARMAN, THEORET, & VAN DE WALLE; 2019.

Segundo alguns autores o processo cicatricial pode ser dividido em 4 fases, que são elas: **hemostasia, inflamatória/desbridamento, proliferação e maturação ou remodelamento** (STASHAK, THEORET, 2009; HUSSNI et al., 2004). A fase inflamatória inicia-se imediatamente após a ocorrência da lesão e se prolonga até 4-5 dias depois. Como parte da fase inflamatória ocorre inicialmente a hemostasia que pode ser considerada uma fase a parte, que se inicia com a liberação de mediadores químicos que vão causar a diminuição do fluxo sanguíneo da região lesionada por vasoconstricção prevenindo a perda sanguínea e de líquidos corporais (ISAAC et al., 2010).

A formação de um tampão hemostático primário é dependente de plaquetas. A trombina, uma proteína com função enzimática presente no plasma e que catalisa a conversão do fibrinogênio em fibrina, induz as plaquetas a liberarem mediadores na área lesada, dentre eles o TGF- β (Fator de Crescimento Transformador beta) e o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular). A ativação destes processos bioquímicos produz fatores quimiotáticos e mediadores vasoativos que auxiliam o

recrutamento das células inflamatórias no reparo da lesão (NETO et al., 2003; HINZ B. et al., 2007).

Após seis horas dá-se início o processo de desbridamento da ferida, onde, além das plaquetas já presentes, são atraídos para o local da lesão monócitos, polimorfonucleares (PMN) como neutrófilos e macrófagos, juntamente com os mastócitos, linfócitos e eosinófilos que vão se integrar ao processo para o controle da infecção (ISAAC et al., 2010). Estas células vão permanecer no local da lesão por cerca de 3-5 dias e serão responsáveis pela limpeza da ferida, fagocitose e degradação do colágeno e elastina. O macrófago, é a célula mais importante no desbridamento; ele permanece do terceiro ao décimo dia, estabiliza a ferida e realiza a limpeza da área lesionada por meio da fagocitose de bactérias e tecido necrosado, direcionando o desenvolvimento do tecido de granulação e preparando a área para a terceira fase de reparação tecidual (NETO et al., 2003; ISAAC et al., 2010).

A fase de proliferação inicia-se 72 horas após a ocorrência da lesão e persiste até o décimo quarto dia. Ela é caracterizada pela substituição da matriz de fibrina provisória pelo tecido de granulação, sendo que é nesta fase que ocorre o literalmente o “fechamento da lesão”, um evento caracterizado por três processos, proliferação dos fibroblastos, angiogênese, reepitelização (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998).

A fibroplasia ou proliferação de fibroblastos é caracterizada pela produção de elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, pelos próprios fibroblastos, que serão responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico da ferida. Os fibroblastos e as células endoteliais são as principais células na fase de proliferação, porém pouco se sabe quais são os sinais que levam ao fim controlado dessa fase (WITTE e BARBUL, 1997). Os fibroblastos irão produzir o colágeno, principal proteína sintetizada durante o processo de cicatrização, responsável pela força e integridade do tecido. O colágeno que irá sustentar uma rede de novos vasos formados (neovascularização) que servirá de apoio e nutrição para o tecido de granulação recém-formado (ISAAC et al., 2010; ROCHA JR. et al., 2006).

Durante a angiogênese, as células endoteliais, induzidas por hipóxia, migram para o local da ferida, proliferando e formando vasos sanguíneos. Esta etapa é essencial para a nutrição e a oxigenação do novo tecido que está sendo formado no leito da ferida (GONÇALVES; PARIZOTTO, 1998; ISAAC et al., 2010). Na sequência, ocorre a contração da ferida, caracterizada pela redução do seu tamanho por

movimento centrípeto da pele. A contração da ferida vai ocorrer entre o quinto e o sexto dia, devido à capacidade de diferenciação dos fibroblastos, que se diferenciam em miofibroblastos por estimulação do TGF- β . Os miofibroblastos possuem microfilamentos citoplasmáticos similares às fibras de actina, que além de realizar a contração da ferida, iniciam a síntese de componentes da matriz extracelular tais como fibronectina e colágeno tipo I e III. Vale ressaltar que por ser um processo que se sobrepõe temporalmente, a contração da ferida vai auxiliar na sua reepitelização (HINZ B. et al., 2007; PAGANELA et al., 2009; BOCHATON-PIALLAT ML. et al., 2016).

No processo de reepitelização ocorre a migração de queratinócitos do leito da ferida e dos anexos epiteliais. Fatores de crescimento como TGF- α (Fator de Crescimento Transformador alfa) e EGF (Fator de Crescimento Epitelial) podem ser os prováveis responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio e a proliferação epitelial que se inicia por estimulação mitogênica e quimiotática dos queratinócitos por estes mesmos fatores de crescimento citados (ISAAC et al., 2010).

A fase de maturação ou remodelamento é a fase mais longa do processo de cicatrização e pode durar meses ou até anos. É caracterizada por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanos e colágeno. O tecido de granulação retrocede e vai sendo substituído pelo colágeno, que sofre remodelamento com a modificação das suas fibras, que se tornam mais compactas e densas. O colágeno, juntamente com outros elementos extracelulares comprimem mecanicamente as paredes dos capilares sanguíneos recém-formados, diminuindo o número de fibroblastos ativos e a formação de novos vasos. Ocorre a orientação definitiva das fibras de colágeno formando uma cicatriz com maior força de tensão devido ao cruzamento de diferentes padrões das fibras de colágeno (STASHAK, THEORET, 2009).

Os principais mediadores envolvidos nesta fase são TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IL-1 (Interleucina I), PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) e TGF- β , produzidos pelos fibroblastos, além dos mediadores produzidos pelas células epiteliais, como EGF (Fator de Crescimento Epidérmico) e TGF- β (ISAAC et al., 2010). A regulação de todo processo de cicatrização e mais especificamente da deposição de matriz extracelular que deve equilibrada, ocorre de forma parácrina e autócrina, mediado por células inflamatórias e do tecido conjuntivo, que liberam citocinas e fatores de crescimento, influenciando na produção de

colágeno e metaloproteinases. Esta regulação é importante em condições fisiológicas ou patológicas, tanto no começo do processo de reparo, onde a matriz extracelular precisará ser sintetizada rapidamente, quanto no final, onde deverá ser maturada e remodelada e portanto, necessária para a manutenção das funções normais de todos os tecidos (ECKES et al., 2000).

2.4 Biocelulose

Devido a características das lesões que normalmente ocorrem nos equinos que comumente a leva a cicatrização por segunda intenção, a maioria dos tratamentos é realizado utilizando-se curativos. São inúmeras as opções de curativos existentes na atualidade e, embora haja essa variedade, a função de todos eles se resume em prevenir a desidratação do tecido pois leva à morte celular, acelerar a angiogênese, estimular a epitelização e a formação do tecido de granulação, facilitar a remoção de tecido necrótico e fibrina, servir como barreira protetora contra microrganismos, promover a diminuição da dor, evitar a perda excessiva de líquidos e evitar traumas entre as trocas. Todos estes fatores podem causar um retrocesso indesejável no processo da cicatrização da ferida (FRANCO; GONÇALVES, 2008).

Assim, diversas substâncias têm sido testadas para este fim, sendo os curativos substitutos da pele produzidos com bionanotecnologia um novo recurso terapêutico que pode auxiliar no reparo de feridas cutâneas em animais. E neste conceito de bionanotecnologia, a biocelulose ou celulose bacteriana se destaca. Entre as diversas aplicações da membrana de CB, alguns exemplos seriam em regeneração tecidual como o Biofill da empresa brasileira Bionext (W. K. CZAJA et al., 2007) nos biomateriais da norteamericana Xylos (W. K. CZAJA et al., 2006), o implante vascular artificial Basyc, no diafragma para fones de ouvido da multinacional japonesa Sony, na utilização como substrato para OLEDs, como base para compósitos para inserção de inúmeros elementos (DONINI et al., 2010) e mais recentemente como *bolus* na medicina radioativa (CHIOZZINI G. C. et al., 2020).

A biocelulose tem sido intensamente estudada e avaliada como material de reparação tecidual e diferentes variações da biocelulose têm sido aplicadas com sucesso na cicatrização da pele comprovando sua qualidade (BARUD et al., 2008; LINA et al., 2011; FORESTI et al., 2017). Como biomaterial de reparação tecidual, ela se destaca pelas propriedades de biocompatibilidade, maleabilidade, elasticidade,

transparência, capacidade de manter o ambiente da ferida úmido e absorver os exsudatos inflamatórios (BARUD et al., 2008).

A biocelulose é um biopolímero natural, sintetizado por bactérias gram-negativas do gênero *Gluconacetobacter* sp., composta em grande parte de água (98-99%) apresentando propriedades únicas como alta adsorção de líquidos, elevada pureza química, biocompatibilidade, biodegradabilidade, elevada resistência mecânica além de poder ser esterilizada sem ocorrer qualquer alteração em sua estrutura e propriedades, características de um curativo ideal (WU et al., 2014; MANEERUNG et al., 2008). Vários microrganismos possuem a capacidade de produzir celulose bacteriana, no entanto, as bactérias *Gluconacetobacter xylinus* destacam-se devido à sua capacidade de produzir celulose em quantidades comerciais (PILEHVAR-SOLTANAHMADI et al., 2018).

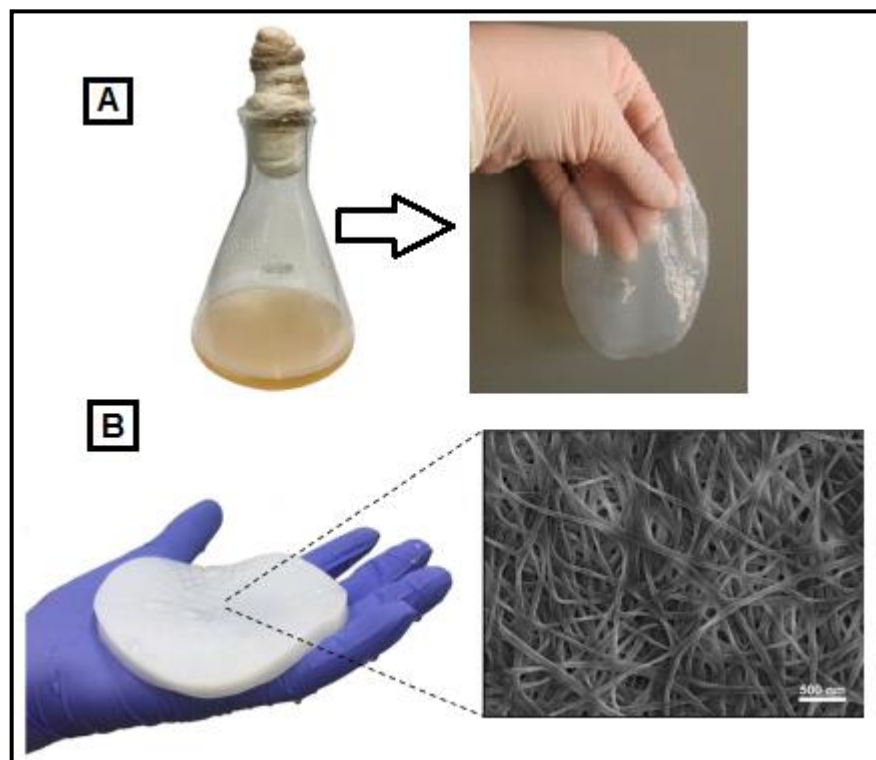
Durante a biossíntese, essas bactérias são capazes de sintetizar celulose na forma de membranas na interface ar/líquido em meio de cultura estático (**Figura 3-A**). Estas membranas apresentam estruturas altamente porosas constituídas por uma rede 3D microfibrilar aleatória de cadeias de celulose alinhadas em paralelo (**Figura 3-B**) com alta permeabilidade a fluidos, sendo favorável para adesão e proliferação de células (PICHETH et al., 2017).

A biocelulose sob forma de membranas têm sido comercializadas atualmente como uma opção de curativo ideal para feridas (**Figura 4**), com alta biocompatibilidade *in vivo*, promovendo uma cicatrização mais eficiente do que outros produtos utilizados para este fim, sendo utilizadas em feridas e queimaduras, proporcionando um ambiente úmido na região, favorecendo a cicatrização e diminuindo a dor nestes pacientes (HELENIUS et al., 2006, ULLAH et al., 2016; PICHETH et al., 2017).

A partir das membranas de biocelulose surgiu uma nova possibilidade terapêutica para o tratamento de feridas como queimaduras, úlceras crônicas, lesões de pele e outras lesões com leito irregular, o hidrogel à base de biocelulose (**Figura 5**). Este atua protegendo os tecidos formados ao redor e sobre o leito da ferida. Sua produção é realizada à partir do processo de desfibrilação das membranas biocelulose que origina uma dispersão de nanofibras que são incorporadas ao hidrogel (GUPTA et al, 2016; CARBINATTO et al., 2018; PICOLOTTO et al., 2019). O hidrogel à base de biocelulose é uma rede de polímeros configuráveis em três dimensões com

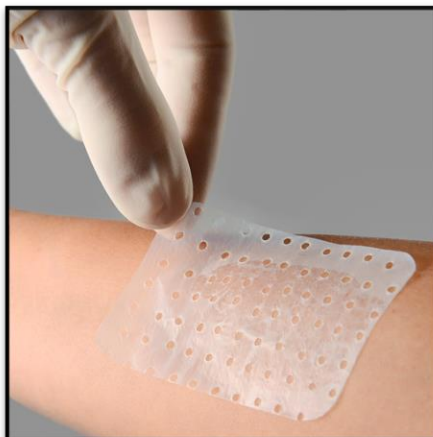
capacidade de absorver grandes quantidades de água, soluções salinas e fisiológicas em comparação com materiais absorventes gerais. O hidrogel à base de biocelulose apresenta excelente propriedade hidrofílica, juntamente com sua alta taxa de inchamento e biocompatibilidade, promovendo seu amplo uso em biomedicina, engenharia de tecidos e administração de medicamentos. Outras características do hidrogel é a estabilidade em longo prazo, a facilidade de modificação bioquímica das estruturas formadas e a incorporação de vários produtos para combinar as características mais importantes de cada um (MATRICARDI et al., 2013; YADOLLAHI et al., 2015).

Figura 3. A) Cultivo da biocelulose em meio estático, interface ar/líquido e membrana de biocelulose sob sua forma natural, com 4 dias de cultivo. B) Fotoetromicrografia com vista superior da rede microfibrilar da membrana de CB em sua forma natural.



Fonte: Adaptado de BARUD, H. G. O. et al., 2021.

Figura 4. Membrana de biocelulose porosa utilizada como biocurativo em sua forma comercial, produzida pela empresa Nexfill.



Fonte: <http://gseven.com.br/biotecnologia/>

Figura 5. Hidrogel à base de biocelulose a 1% aplicado sobre o leito irregular de uma ferida epitelial experimental realizada na região lombar de um equino.



2.5 Colágeno

No processo de cicatrização o colágeno é fundamental, sendo o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. Ele é a proteína mais comum e abundante no reino animal, e corresponde a 30% do total de proteína no corpo humano. Nos tecidos normais, os colágenos fornecem força, integridade e estrutura. Existem cerca de 20 tipos de colágenos, mas os mais importantes são os tipos I, II, III, IV e V. O colágeno tipo I é o mais frequente, sendo sintetizado pelos fibroblastos, e está predominantemente em ossos e tendões. O tipo III é mais comumente

encontrado em tecidos moles, como vasos sanguíneos, derme e fáscia (CAMPOS et al., 2007).

A pele saudável e íntegra contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20 % de colágeno tipo III. Por outro lado, o tecido de granulação expressa 30 a 40 % de colágeno do tipo III, sendo este considerado colágeno imaturo (CAMPOS et al., 2007; ISSAC et al., 2010).

Durante o período inicial da cicatrização, existe um aumento da quantidade de colágeno tipo III, que é um tipo de colágeno mais fino e de orientação paralela à pele daí sua importância na cicatrização da ferida cirúrgica (DIEGELMANN, 2000). A degradação do colágeno se inicia precocemente e é muito ativa durante o processo inflamatório, sendo fundamental para reorganização da nova matriz. Esta degradação ocorre em ambiente extracelular e é mediada por metaloproteinasas e colagenases séricas específicas (elastase, catepsina C e proteinase neutra) que são enzimas que quebram ligações peptídicas do colágeno. A atividade das colagenases é controlada por citocinas liberadas principalmente por células inflamatórias, endoteliais, fibroblastos e queratinócitos (CAMPOS et al., 2007). A formação da matriz extracelular é resultante de um balanço entre a deposição da nova matriz (síntese) e degradação do colágeno da matriz antiga, que se estrutura em uma rede densa e dinâmica resultante da sua constante deposição e reabsorção (DIEGELMANN, 2000; BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

Na fase de remodelação ocorre aumento da degradação do colágeno tipo III e aumento da produção do colágeno tipo I. Sendo assim, o colágeno tipo III vai sendo substituído pelo colágeno tipo I. Este processo demora semanas a meses. Em cerca de um ano ou mais, a proporção de colágeno I e III atinge proporção semelhante a inicial, antes da lesão, porém nunca atingirá 100% de sua resistência fisiológica (ISSAC et al., 2010). Portanto, a liberação de citocinas e fatores de crescimento por células inflamatórias influenciam a síntese de colágeno e metaloproteinasas, sendo importante o estudo da modulação destes fatores que vão realizar a regulação necessária tanto no começo do processo de reparo da ferida, agindo na síntese da matriz extracelular, quanto no final da cicatrização, remodelando a ferida.

2.6 Citocinas

A Interleucina IV (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, uma glicoproteína secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos, hepatócitos e da glia, sendo TNF- α e IL-1 potentes indutores. Após lesão, concentrações plasmáticas de IL-6 são detectáveis em 60 minutos, com pico entre 4 e 6 horas, podendo persistir por 10 dias. É considerado o marcador mais relevante do grau de lesão tecidual durante um procedimento cirúrgico. Ela promove maturação e ativação de neutrófilos, maturação de macrófagos e diferenciação/manutenção de linfócitos-T citotóxicos e células natural killer. Contudo, também exerce propriedades anti-inflamatórias durante a lesão, por liberar receptores solúveis de TNF (Fator de Necrose tumoral) (SPAAS et al., 2016). A Interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória, um polipeptídeo não glicosilado sintetizado por leucócitos e por células não hematopoiéticas. A IL-10 desenvolve um papel regulatório controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Inibe principalmente TNF- α , IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados (LIN et al., 2000).

O Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) é e uma citocina primordialmente pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T. Manifesta-se principalmente em macrófagos e monócitos no gânglio da raiz dorsal, estimulando a proliferação de linfócitos-T, fibroblastos e células natural-killer. Após procedimento cirúrgico, trauma ou durante as infecções, o TNF- α é um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória. Embora sua meia-vida plasmática seja de apenas 20 minutos, e suficiente para provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas importantes e ativar distalmente outras citocinas (DESMOULIERE et al., 1993). A angiogênese é estimulada pelo TNF- α , e é caracterizada pela migração de células endoteliais e formação de capilares, essencial para a cicatrização adequada. Outras ações do TNF- α consistem em: ativar a coagulação, estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão, PGE2 (fator ativador de plaquetas), glicocorticoides e eicosanoides, e influenciar a apoptose celular (LIN et al., 2000).

O Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- β) é um fator de crescimento produzido por plaquetas e macrófagos que inibe a produção de IL-1, IL-2, IL-6 e TNF- α . O TGF- β , que estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e a

transformarem-se em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida. Durante a fase aguda da inflamação, ele inibe a diferenciação de queratinócitos e durante a fase de reepitelização, o TGF- β estimula a migração dos queratinócitos pela matriz de fibronectina neoformada (TEXTOR, CLARK, WALKER et al., 2017). No geral, fatores de crescimento atuam em vários processos fisiológicos, ressaltando no processo de cicatrização, promovendo a proliferação do tecido dérmico com consequente reepitelização a partir da substituição das estruturas desordenadas do colágeno tipo III e elastina por moléculas mais resistentes e estruturadas (VIEIRA et al., 2018).

São poucas as pesquisas avaliando a resposta terapêutica utilizando técnicas com alta especificidade e sensibilidade como a qPCR (Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real), e que avaliaram o perfil de expressão gênica do colágeno e mediadores inflamatórios específicos envolvidos no processo de cicatrização de feridas. A maioria dos resultados utilizando técnicas altamente sensíveis foram obtidos a partir de estudos realizados com culturas de células, e pesquisas *in vivo* sobre o monitoramento da síntese do colágeno são limitadas, bem como de citocinas inflamatórias específicas como interleucina 6 (IL-6) e 10 (IL-10), fator de crescimento transformador β (TGF- β), fator de necrose tumoral α (TNF- α). O estudo da expressão de genes específicos *in vivo*, em diferentes fases da cicatrização da pele, pode fornecer informações valiosas sobre parte desse complexo processo (SPAAS et al., 2016).

3 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o uso tópico do hidrogel à base de biocelulose a 1% em feridas experimentais realizadas na região lombar de equinos. Os resultados obtidos a partir da avaliação macroscópica, histológica e molecular de biópsias de feridas foram utilizados para verificar a interferência do hidrogel à base de biocelulose a 1% na cicatrização de feridas cutâneas lombares em equinos, testando a hipótese de que o hidrogel favorece o processo cicatricial nesta espécie.

4 JUSTIFICATIVA

A ausência de estudos prévios *in vivo* na espécie equina com o uso do hidrogel à base de biocelulose a 1% no tratamento de feridas, com dados clínicos, histopatológico, bem como os padrões de expressão gênica determinados RT-qPCR de fatores que interferem diretamente na cicatrização, justificaram a realização desta pesquisa.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA), UNESP, Araçatuba –SP. Aprovação no Comitê de Ética – FOA nº 00131-2018.

5.1 Caracterização dos animais e obtenção do hidrogel

O hidrogel a base de biocelulose a 1% utilizado nesta pesquisa foi gentilmente fornecido pela Seven® Indústria de Produtos Biotecnológicos LTDA. Foram utilizados quatro equinos, SRD, adultos e hígidos. Os animais permaneceram em baias e foram submetidos a um período de adaptação (15 dias) com regime alimentar padronizado: ração comercial¹ (1,5 % do peso corpóreo), feno de *Coast cross* e água *ad libitum*. Para a determinação da higidez dos animais, estes foram submetidos a exames clínico e laboratoriais. No período de adaptação, os animais foram vermifugados com Ivermectina² na dose de 1,5 mg para cada 100 Kg de peso, via oral.

Antes do procedimento cirúrgico, foi realizado jejum hídrico e alimentar de seis e 12 horas, respectivamente. A tricotomia do local a ser trabalhado foi realizada 12 horas antes do procedimento cirúrgico, diminuindo a possibilidade de uma infecção associada a danos aos folículos pilosos.

5.2 Realização das feridas

Após a contenção em tronco apropriado, os animais receberam cloridrato de xilazina³ (0,5 mg.kg⁻¹) pela via intravenosa. Após a antisepsia local com solução de álcool iodado a 5% e posterior aplicação de anestesia infiltrativa com o uso de cloridrato de lidocaína⁴ a 2% sem vasoconstritor, ao redor do local a ser incisado. As feridas foram confeccionadas com o auxílio de um bisturi com lâmina número 24 e um molde de material esterilizável quadrangular com 4 cm² para a remoção do fragmento de pele.

¹Pro Equi 13 – Guabi – Orlandia – SP.

²Padock gel – Ceva Santé Animale – Paulínia – SP.

³Sedomin – Laboratórios König S.A. – Santana do Parnaíba – SP.

⁴Cloridrato de Lidocaína 2% - Hipolabor Farmacêutica – Sabará - MG

Os animais foram escolhidos aleatoriamente para as avaliações macro e microscópicas, sendo que, em dois animais, as avaliações macroscópicas foram realizadas no antímero direito e as microscópicas no esquerdo. Nos outros animais vice-versa. As feridas craniais formaram o grupo tratado com hidrogel à base de BIOCELULOSE a 1% (GT) e as feridas caudais formaram o grupo controle (GC).

A região lombar previamente tricotomizada foi assepticamente preparada usando iodopolividona solução tópica⁵ à 1% e álcool⁶ 70%. Quatro feridas cirúrgicas foram realizadas em cada animal: duas na região lombar direita e duas na esquerda, uma cranial e outra caudal, distanciadas 10 cm uma da outra. A profundidade da excisão incluiu pele e tecido subcutâneo. Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam fenilbutazona⁷ (2,2 mg.kg⁻¹, por via intravenosa) a cada 24 horas durante 3 dias para controlar edema e dor.

5.3 Avaliação das feridas

Durante todo o período experimental, os animais foram avaliados diariamente com aferição das frequências cardíaca e respiratória, coloração das mucosas aparentes, temperatura retal, motilidade intestinal, tempo de preenchimento capilar, atitude e apetite. O tratamento das feridas cirúrgicas teve início 12 horas após a incisão cirúrgica e ocorreu diariamente até a completa cicatrização. Todas as feridas foram tratadas com solução fisiológica estéril a 0,9%⁸. Ato contínuo, as feridas craniais receberam também uma fina camada do hidrogel à base de biocelulose a 1%⁹, em quantidade suficiente para cobrir todo o leito da ferida.

A avaliação macroscópica foi realizada no dia da cirurgia, 12 horas após a confecção das feridas e nos dias 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, com a observação subjetiva das alterações presentes (hemorragia local, presença de coágulos, crostas, tecido de granulação, epitelização e presença de exsudato), e objetiva, com documentação fotográfica, cálculo da área da ferida e taxa de contração da mesma.

⁵ Riodeine – Rioquímica Indústria Farmacêutica – São José do Rio Preto - SP

⁶ Álcool BM Ciclo Hospitalar – Ciclo Farma Indústria Química – Serrana - SP

⁷ Fenilbutazona OF – Ourofina Saúde Animal – Cravinhos - SP

⁸ Cloreto de sódio a 0,9% - Laboratório Sanobiol – Pouso Alegre - MG

⁹ Nexfill® Hydrogel - Seven Indústria de Produtos Biotecnológicos Ltda - Ibiaporã, PR

A avaliação macroscópica foi realizada no dia da cirurgia, 12 horas após a confecção das feridas e nos dias 3, 7, 14 e 21 dias de pós-operatório, com a observação subjetiva das alterações presentes (hemorragia local, presença de coágulos, crostas, tecido de granulação, epitelização e presença de exsudato), e objetiva, com documentação fotográfica, cálculo da área da ferida e taxa de contração da mesma. A mensuração da área da ferida foi realizada por meio do Software Image J (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA). A taxa de contração da ferida foi calculada pela equação proposta por Ramsey et al. (1995): taxa de contração(%)= $100 \times (F0-FA) / F0$, onde F0 representa a área original da ferida, logo após a sua confecção e FA representa a área da ferida nos dias 3, 7, 14 e 21 das avaliações, expressa sempre em porcentagem.

Para a avaliação histopatológica do processo de cicatrização foram realizadas biópsias abordando a borda da ferida e tecido sadio adjacente com o auxílio de um “*punch*” de 6 mm de diâmetro, nos dias 3, 7, 14 e 21 após o procedimento cirúrgico. As amostras foram processadas de forma rotineira para inclusão em parafina e realização de cortes transversais de 6 µm.

Os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina-eosina e então analisados à microscopia de luz, objetivando avaliar comparativamente a evolução do processo cicatricial, especialmente no concernente à reação inflamatória provocada e à cicatrização obtida com os tratamentos utilizados. A classificação foi realizada de acordo com o predomínio dos parâmetros nos campos observados com objetiva de 40X em microscópio de luz, Nikon Eclipse E100. Na avaliação microscópica, foram avaliados a inflamação (PMN - polimorfonucleares e Mono - mononucleares), a proliferação celular (Fibroblastos e Neovasos - neovascularização) e a deposição e remodelação da matriz extracelular (MEC), de acordo com o *score* ilustrado no **Quadro 1**.

Quadro 1. Parâmetros e "scores" atribuídos para a avaliação histológica das feridas induzidas experimentalmente em equinos.

"SCORE"	INFLAMAÇÃO		PROLIFERAÇÃO		MEC COLAGENOSA	
	PMN	Mono	Fibroblastos	Neovasos	Deposição	Remodelação
0	Raros/ Ausente	Raros/ Ausente	Raros/ Ausente	Raros/ Ausente	Raros/ Ausente	Raros/ Ausente
1	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta	Discreta
2	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada	Moderada
3	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Acentuada	Acentuada

Fonte: Elaborado pelo Autor

5.4 Avaliação molecular

Foram realizadas análises de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR) para determinação do perfil da expressão gênica dos colágenos tipos I e III e das citocinas IL-6, IL-10, TGF- β e TNF- α .

Imediatamente após a colheita, as amostras foram acondicionadas em tubos RNase e DNase free (Axygen Scientific Inc, Union City, CA, USA) e armazenadas a -80°C, para posterior isolamento do RNA. Após a homogeneização de aproximadamente 30 mg de tecido com o homogeneizador de tecido (Ultra Stirrer, modelo ultra 80-I, Biotech, São Carlos, SP, Brasil), o RNA total de cada amostra foi extraído utilizando-se o kit comercial mirVana™ miRNA Isolation, de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA).

A concentração de RNA foi verificada no espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA). O RNA de cada amostra foi tratado com DNase conforme o protocolo DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) para remoção de DNA genômico. Em seguida, a síntese de cDNA foi realizada conforme o protocolo M-MLV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA), utilizando-se a quantidade de 2000 ng de RNA para cada amostra.

A expressão gênica foi mensurada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) utilizando um marcador SYBR™ Green, em um termociclador de PCR em tempo real Stratagene® MX3005P qPCR System (Agilent Technologies

Inc., Santa Clara, CA, USA). O mix de PCR foi feito com 0,5 µL (10 µM) de cada primer do gene alvo, 1 µL de cada amostra, 18 µL de SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, Massachusetts, USA) para uma reação de 20 µL de volume final.

Os ciclos consistiram de um período de 15 minutos a 95°C para ativação enzimática, seguida de 40 ciclos de temperatura a 95°C por 15 segundos e 60°C por 33 segundos, para amplificação dos produtos, com tomada de fluorescência ao final de cada ciclo; a corrida foi finalizada com uma curva de dissociação iniciando em 95°C por 15 segundos, depois a temperatura foi abaixada a 65°C, elevando-se novamente a 95°C, variando 1°C a cada 30 segundos, momento em que a fluorescência foi obtida.

Para obtenção de seis pontos na curva padrão, foram realizadas diluições seriadas (1:1, 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625) a partir de 2000 ng de RNA, em duplicata. Os valores da quantidade relativa obtidos foram utilizados no cálculo da quantificação relativa da expressão gênica (QR), utilizando a seguinte fórmula: $QR = \frac{\text{Quantidade relativa do gene alvo}}{\text{Quantidade relativa gene housekeeping}}$.

A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (Primer) que foram utilizados para avaliação da expressão gênica, foram desenhados e escolhidos no Primer3 (v. 0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), com base da sequência equina disponível. O software UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>) foi utilizado para a correção dos primers previamente selecionados. Como controle endógeno (*housekeeping*), foi utilizado o gene GAPDH (gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). Os oligonucleotídeos F (*Foward*) e R (*Reverse*) utilizados estão demonstrados no **Quadro 2**.

Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (Primer) que foram utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-qPCR.

Gene alvo	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
GAPDH-equus	GGCAAGTTCCATGGCACAGT	CACAACATATTCAGCACCAGCAT
COL1A2-equus	CTCGCTCACCCACCTTCTCTC	CAGTTCTTGGCTGGGATGTT
COL3A2-equus	AAGGCTGAAGGAAACAGCAA	TGTCCACACCGAATTCTTGA
TGF- β 1-equus	AGTTAAGCGTGGAGCAGCAT	CTGGAAGTGAACCCGTTGAT
TNF- α -equus	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	GAGACAGCTAAGCGGCTGAT
IL-10-equus	CAAGCCTTGTCGGAGATGAT	CTCACTCGGAGGGTCTTCAG
IL-6-equus	CCTGGGAGAAGATGAAACCA	TCTGCCAGTACCTCCTTGCT

Fonte: Elaborado pelo Autor

5.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa GraphPad Prism® (Version 8.0 - GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). A análise descritiva das variáveis foi apresentada por meio da média aritmética, mediana, desvio padrão e erro padrão. Todos os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados relacionados à área e taxa de contração da ferida foram submetidos à análise de variância em parcelas subdivididas com medidas repetidas no tempo, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas de médias. As medianas dos escores atribuídos na avaliação histopatológica foram analisados pelo Teste de Dunn. Os dados relacionados à expressão gênica relativa de colágenos tipo I e III e citocinas inflamatórias foram submetidos à análise de variância em parcelas subdivididas com medidas repetidas no tempo, seguido do teste de Tukey para comparações múltiplas de médias.

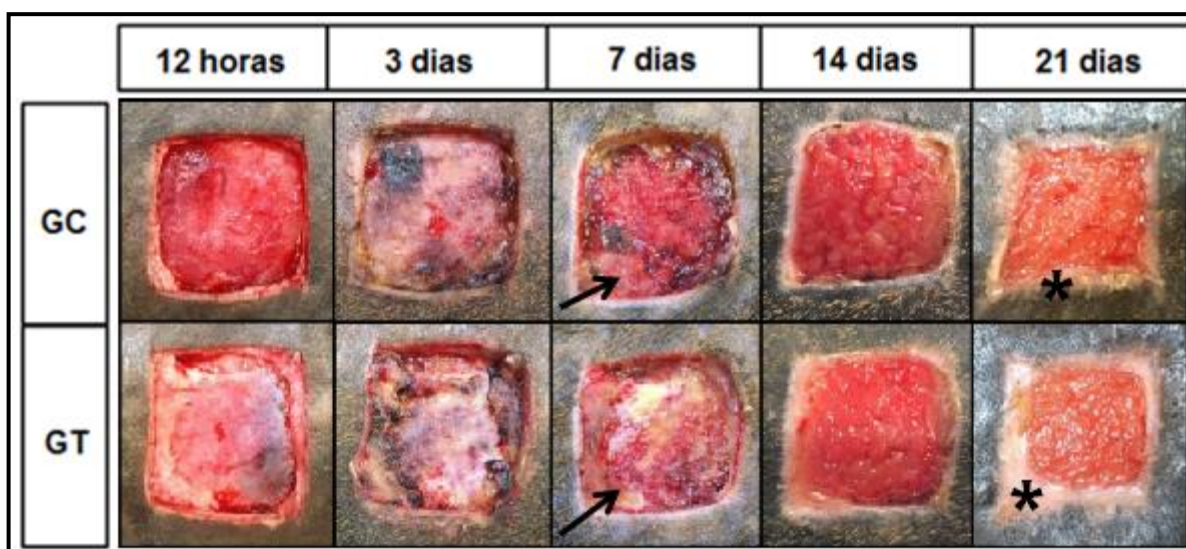
6 RESULTADOS

Neste estudo, nenhuma alteração no exame clínico dos animais foi observada durante todo o período experimental.

6.1 Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica das feridas observaram-se durante os primeiros sete dias, sangramento, coágulos, exsudato e crostas, em todas as feridas de ambos os grupos, sendo mais evidentes no grupo controle (**Figura 6**). Na Figura 2, o tecido de granulação foi notado a partir do 7º dia de avaliação (setas) e com maior evidência no 14º dia em todas as feridas. Na avaliação com 14 dias também já havia contração da ferida com observação do início da formação da borda de epitelização em todas as feridas. Na avaliação com 21 dias as feridas não estavam completamente cicatrizadas, mas a epitelização era evidente em ambos os grupos (*) (**Figura 6**).

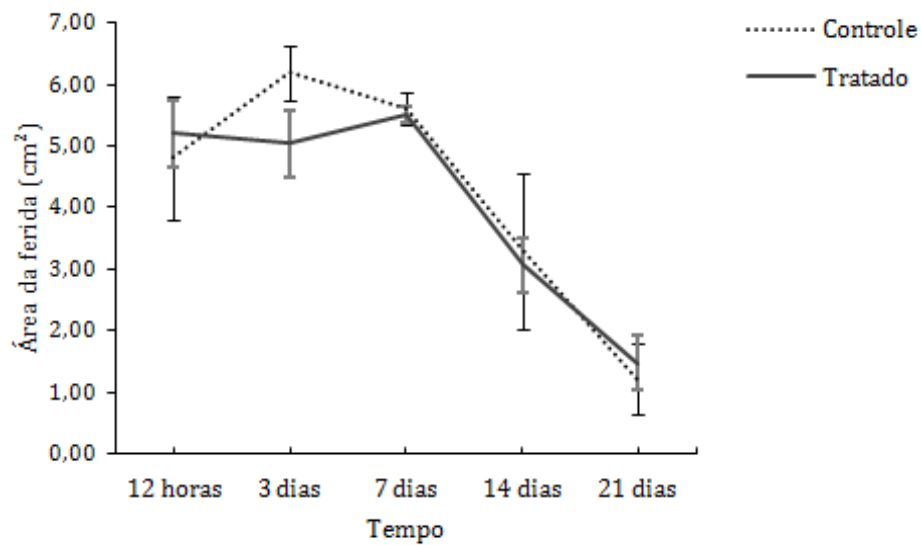
Figura 6. Imagens fotográficas das feridas dos grupos controle e tratado, de acordo com os dias de avaliação: 12 horas após o procedimento cirúrgico; aos 3, 7, 14 e 21 dias pós-operatórios.



As médias das áreas e taxas de contração das feridas estão ilustradas respectivamente nos gráficos da **Figura 7** e **8**. Ambas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em nenhum dos tempos analisados (3, 7, 14 e 21 dias). Constatou-se em que na avaliação com três dias, um aumento numérico desta área no GC em relação ao GT. A partir do 7º dia, as áreas foram semelhantes

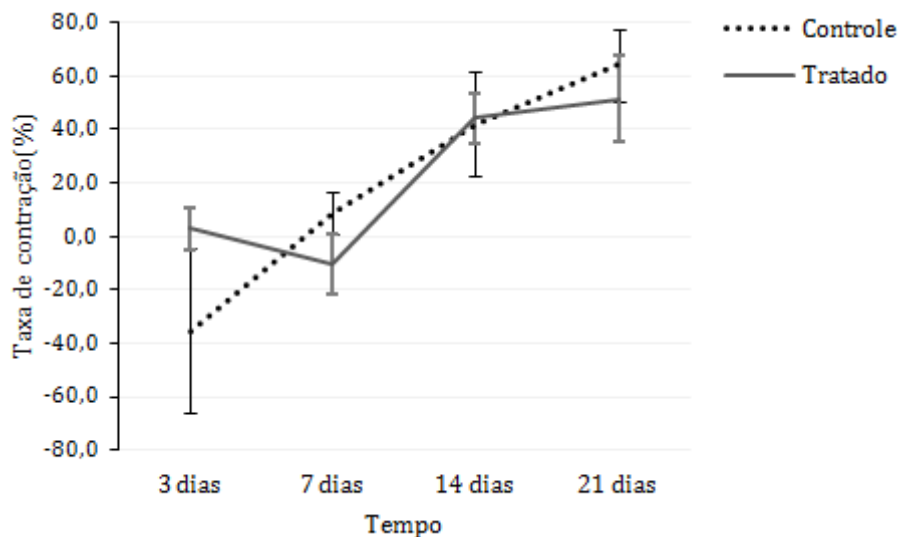
entre os grupos e apresentaram diminuição gradativa até o 21º dia de avaliação em ambos os grupos (**Figura 8**).

Figura 7. Médias e desvios padrão das áreas das feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel à base de biocelulose a 1% (GT) após 12 horas, 3, 7, 14 e 21 dias de observação pós-operatórios, sem diferença significativa entre os grupos nos tempo avaliados.



A taxa de contração da ferida foi estimada pela determinação da área não fechada da ferida em função do tempo (**Figura 5**). Embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos, no dia 7, a média da taxa de contração é percentualmente menor no GT comparada com o GC, ficando muito próximas no dia 14 e novamente no dia 21 menor no GT.

Figura 8. Médias e desvios padrão das taxas de contração das feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% (GT) após 3, 7, 14 e 21 dias de observação pós-operatórios, sem diferença significativa entre os grupos nos tempo avaliados.



6.2 Avaliação histopatológica

As medianas dos *scores* observados na análise microscópica com relação aos polimorfonucleares, monócitos, fibroblastos, neovascularização, deposição de colágeno e remodelação de colágeno estão apresentados nas **Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6**, respectivamente.

As medianas dos *scores* dos polimorfonucleares apresentaram diferenças significativas entre os grupos no dia 14 e no dia 21, com *scores* mais elevados no GC em relação ao GT (**Tabela 1**).

No 3º e no 7º dia de avaliação, o processo inflamatório apresentou-se acentuado (*score* 3) com a presença de polimorfonucleares, predomínio de neutrófilos e de eosinófilos em todas as feridas experimentais, porém não apresentando diferença significativa entre os grupos. À partir do 7º dia de avaliação, houve uma redução na presença de infiltrados de polimorfonucleares (*score* 2,5), diminuindo a intensidade progressivamente com o decorrer do tempo, para intensidade moderada com 14 dias e intensidade discreta com 21 dias de avaliação, em ambos os grupos, porém mais evidente no GC, apresentando diferença significativa, sugerindo a fase

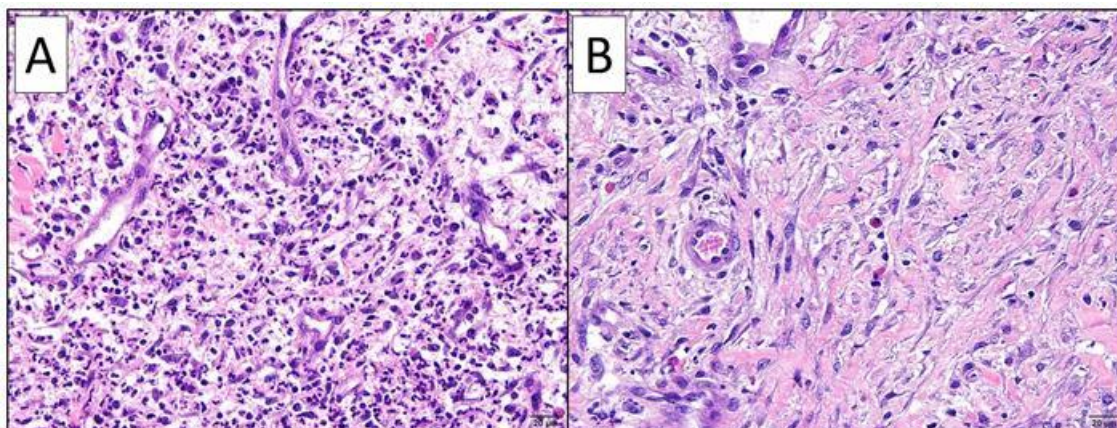
inflamatória mais duradoura nas feridas que não receberam o hidrogel à base de biocelulose à 1%, como ilustrado na **Figura 9**.

Tabela 1. Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín-Máx) de polimorfonucleares nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% aos 3, 7, 14 e 21 dias de observação.

Grupo	Dias de avaliação							
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx
Controle	3 Aa	3 - 3	2,5 Aa	2 - 3	2 Aa	2 - 2	1,5 Aa	1 - 2
Tratado	3 Aa	0 - 3	2,5 Aab	1 - 3	1 Bb	1 - 1	1 Bb	0 - 1

^{Aa} medianas seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Figura 9. Fotomicrografias das biópsias das feridas do GC (A) e GT (B) realizadas com 14 dias de pós-operatório. Coloração HE, objetiva de 40x. Nota-se a presença de infiltrado de polimorfonucleares mais intenso no GC (A).



Com relação aos monócitos, observou-se diferenças significativas entre os grupos controle e tratado na avaliação com 14 dias, com valores mais elevados no GC. (**Tabela 2**).

Tabela 2. Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín-Máx) de monócitos nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% aos 3, 7, 14 e 21 dias de observação.

Grupo	Dias de avaliação							
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx
Controle	2 Aa	2 – 2	2 Aab	2 - 3	3 Ab	3 – 3	2 Aab	2 – 3
Tratado	2 Aac	1 – 2	3 Aa	2 - 3	2 Bac	2 - 3	2 Ac	1 - 2

^{Aa} medianas seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

As medianas dos *scores* de fibroblastos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e tratado (**Tabela 3**). No dia 7 observou-se o início do processo proliferativo, com deposição de fibroblastos (*score* 1,5 no GC e 2 no GT), com aumento da intensidade no dia 14 e máxima intensidade no dia 21, em ambos os grupos.

Tabela 3. Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín-Máx) de fibroblastos nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% aos 3, 7, 14 e 21 dias de observação.

Grupo	Dias de avaliação							
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx
Controle	0	0 – 1	1,5	1 - 2	2,5	2 – 3	3	3 – 3
Tratado	0,5	0 – 1	2	2 - 2	3	3 - 3	3	3 – 3

^{Aa} medianas seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

Embora sem diferença estatística entre os grupos, foi possível observar que as feridas tratadas com hidrogel de celulose bacteriana a 1%, apresentam neovascularização mais precoce no 3^o dia de avaliação e com valores mais elevados quando comparadas às feridas que não receberam o tratamento (**Tabela 4**).

Tabela 4. Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín-Máx) de neovascularização nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% aos 3, 7, 14 e 21 dias de observação.

Grupo	Dias de avaliação							
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx
Controle	0,5	0 – 2	2	1 - 2	2,5	2 – 3	1,5	1 – 3
Tratado	1,5	1 – 2	2	2 - 3	2	2 - 2	1,5	1 – 3

^{Aa} medianas seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

A deposição do colágeno é evidente a partir do 3º dia de avaliação e com intensidade máxima com 21 dias (**Tabela 5**). Não foi constatada diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos de observação, embora o GT apresentou score mais elevado no dia 7, sugerindo deposição de colágeno mais precoce em relação ao GC.

Tabela 5. Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín-Máx) de deposição de colágeno nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% aos 3, 7, 14 e 21 dias de observação.

Grupo	Dias de avaliação							
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx
Controle	1	0 – 1	2	1 - 3	3	2 – 3	3	3 – 3
Tratado	1	1 – 2	3	2 - 3	3	3 - 3	3	3 – 3

^{Aa} medianas seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

A remodelação do colágeno é evidente a partir do 7º dia de avaliação e com intensidade máxima com 21 dias, sem apresentar diferença significativa entre os grupos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Mediana (Md) e valores mínimo e máximo (Mín-Máx) de remodelação de colágeno nas feridas de equinos dos grupos controle (GC) e tratado com hidrogel a base de biocelulose a 1% aos 3, 7, 14 e 21 dias de observação.

Grupo	Dias de avaliação							
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias	
	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx	Md	Mín-Máx
Controle	0	0 – 0	1	0 - 1	2	1 – 2	3	3 – 3
Tratado	0	0 – 0	1	1 - 1	2	2 - 3	3	3 – 3

^{Aa} medianas seguidas de letras diferentes, maiúscula na coluna e minúscula na linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

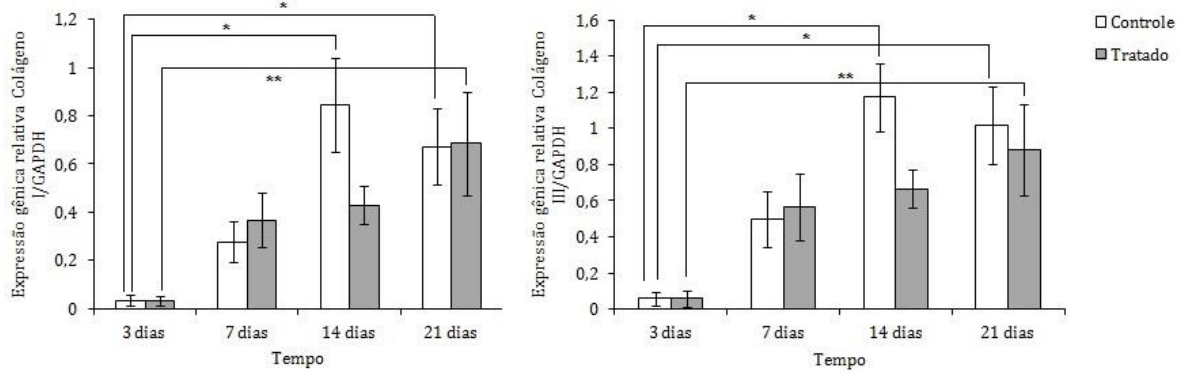
6.3 Avaliação molecular

Os valores médios e erro padrão da expressão gênica dos colágenos tipos I e III estão representados na **Figura 10**. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tanto para o colágeno tipo I como para o colágeno tipo III.

Ambos os tipos de colágeno estiveram expressos de maneira semelhante nos grupos estudados em todos os momentos avaliados, quando comparamos GC e GT, não sendo verificada diferença significativa na expressão gênica dos colágenos tipos I e III nas feridas que receberam o tratamento com o hidrogel à base de biocelulose a 1% ou não. No 3º dia de avaliação ambos os tipos de colágeno já estavam expressos tanto nas feridas do grupo controle, como nas feridas tratadas, e ao longo do tempo, observou-se um aumento progressivo na média dos valores da expressão gênica de ambos os colágenos.

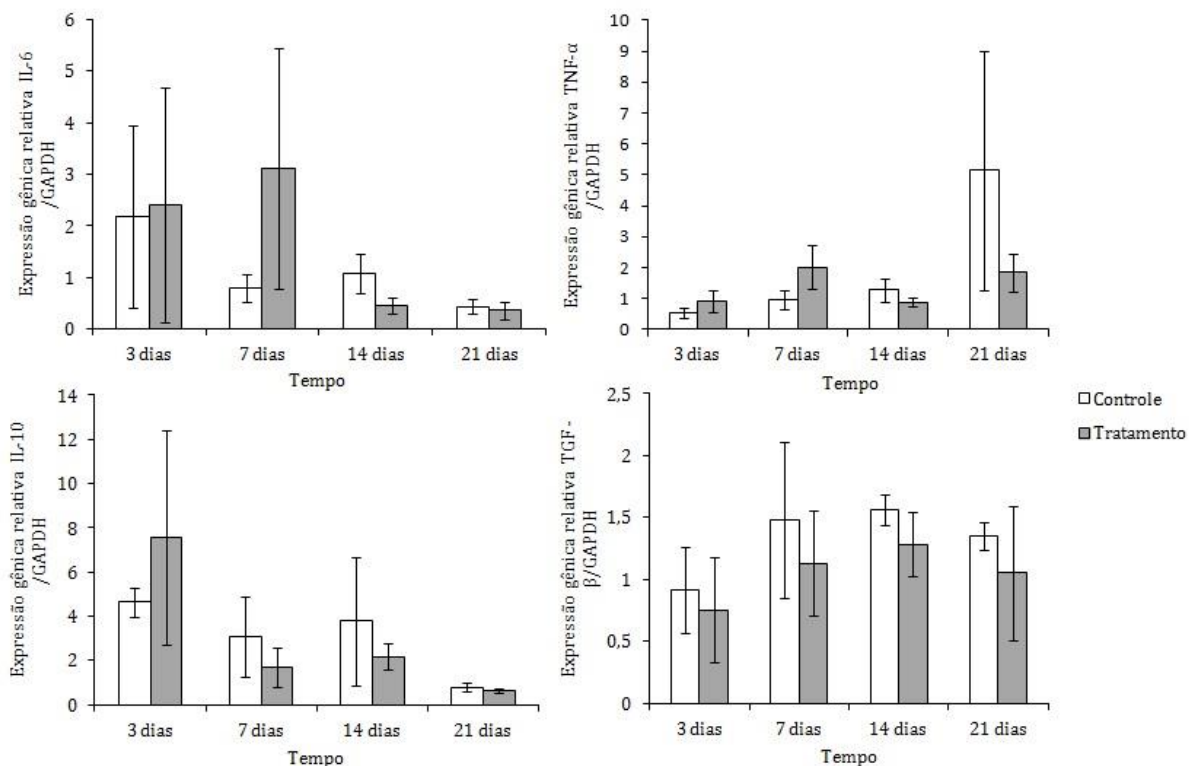
Na comparação realizada entre os tempos avaliados dentro de cada grupo estudado (GC e GT), foram observadas diferenças significativas no decorrer dos tempos de avaliação semelhantes para colágeno tipo I e colágeno tipo III (**Figura 10**). No GC houve diferença na comparação com 3 dias de avaliação entre 14 e 21 dias (*). Já no GT esta diferença significativa na expressão gênica de ambos os colágenos foi observada somente na comparação entre 3 e 21 dias (**).

Figura 10. Médias e erro padrão para a expressão relativa dos genes colágenos tipos I e tipo III aos 3, 7, 14 e 21 dias de avaliação pós-operatório nos grupos controle e tratado com hidrogel de biocelulose a 1%. Não diferiram entre si nos grupos, pelo teste de Tukey. (*) Indica que diferiram entre os momentos avaliados dentro do GC e (**) entre GT.



Não foi observada diferença significativa entre GC e GT em nenhum dos momentos avaliados para a expressão gênica das citocinas envolvidas no processo de cicatrização que foram selecionadas para análise, IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β (Figura 11).

Figura 11. Médias e erro padrão para a expressão gênica relativa de IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β em amostras de biópsia tecidual de feridas do grupo controle e tratadas previamente com hidrogel à base biocelulose a 1%. Não diferiram entre si nos grupos, pelo teste de Tukey.



7 DISCUSSÃO

Na medicina humana, o hidrogel a base de biocelulose a 1% é uma nova possibilidade terapêutica no tratamento de feridas, pois oferece vantagens ao ser utilizado como biocurativo devido às propriedades da biocelulose, como elasticidade, natureza não alérgica, biocompatibilidade, além de se adaptar bem às feridas com leito irregular mantendo contato com a ferida em toda sua extensão (GUPTA et al., 2016). Estas características despertam o interesse para o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de validar a sua utilização na medicina veterinária, especialmente para a espécie equina que é predisposta a problemas de cicatrização.

Após a aplicação do hidrogel a base de biocelulose a 1% nas feridas, o mesmo sofreu um ressecamento natural formando uma película fina e resistente que se aderiu às bordas saudáveis da ferida conferindo à mesma uma cobertura protetora. Já no leito da ferida, esta película formada pelo ressecamento do hidrogel atuou como um andaime ou “*scaffold*” na engenharia de tecidos, facilitando o preenchimento da ferida pelo tecido de granulação recém-formado (PICHETH et al., 2017).

Além disso, essa camada fina e resistente formada pelo hidrogel a base de biocelulose a 1% foi capaz de impedir a desidratação da ferida, mantendo a mesma úmida, um fator benéfico à cicatrização, pois os exsudatos de feridas agudas contêm fatores de crescimento e outras substâncias nutritivas que vão estimular a reparação tecidual, (KATZ et al., 1991, SWAMINATHAN et al., 2019). Os achados da avaliação clínica nos permitem afirmar que as feridas que receberam o hidrogel a base de biocelulose a 1% apresentaram aspecto cicatricial superior quando comparadas com as feridas do GC, com um tecido de granulação mais uniforme, liso e sem granulação exuberante. Acredita-se também que o hidrogel possua características hemostáticas, fato observado nas feridas tratadas, que apresentaram menor sangramento durante os curativos, corroborando os achados de PANDEY et al. (2017) que relatam o efeito anti-hemorrágico do hidrogel de biocelulose em feridas provocadas por queimadura em pele de ratos.

O aumento inicial da área da ferida ocorre devido à retração das bordas da lesão por ação das linhas de força, conhecidas como “Linhas de Langer”, determinadas pelos sistemas fibrilares da pele, principalmente das fibras elásticas. Na confecção de feridas quadrangulares, a pele foi incisada em ambos os sentidos,

longitudinal e transversal, determinando o aumento da área, devido à distensão provocada pela incisão transversal às “Linhas de Langer” (ALGOWER, 1977; COELHO et al., 1999).

Neste estudo, as feridas do GC apresentaram aumento da área no 3º dia de avaliação, corroborando com os trabalhos de COELHO et al. (1999), MARTINS et al. (2013) e LUCAS et al. (2017), que relataram o aumento das áreas das feridas cutâneas na fase inicial do processo cicatricial da pele de cavalos. Por outro lado, nosso dado discorda do estudo com uso tópico de hidrogel em feridas de ratos, em que se observou aumento das áreas das feridas em todos os grupos experimentais (PANDEY et al, 2017), que pode ser justificado pelo tipo de musculatura presente no subcutâneo destes animais que está ausente nos cavalos.

A partir do 7º dia de avaliação até o 21º dia, as feridas de ambos os grupos se comportaram de modo semelhante, apresentando progressiva diminuição da área, com valores semelhantes. Segundo MADDEN et al. (1991), a diminuição da área da lesão a partir do 7º dia ocorre devido ao mecanismo de contração que tem início neste período e juntamente com a epitelização caracteriza a cicatrização por segunda intenção. Os polimorfonucleares são as primeiras células a chegarem ao local da ferida logo após a lesão, atingindo nível máximo após 48 horas e são responsáveis pela remoção de tecidos necrosados e bactérias, além da liberação de fatores quimiotáticos recrutando macrófagos. Os valores de polimorfonucleares mais elevados no GC nos dias 14 e 21 de avaliação sugerem uma reação inflamatória prolongada neste grupo. Vale ressaltar que ambos os grupos (GC e GT) tiveram de maneira controlada a ação anti-inflamatória promovida pela utilização em todos os animais da fenilbutazona, um anti-inflamatório não-esteroidal.

O número de células mononucleares tende a aumentar durante o período de cicatrização, havendo a substituição dos polimorfonucleares pelo infiltrado mononuclear (WILMINK et al., 1999). Nesta pesquisa foi observado tal situação, com diferença significativa entre grupos tratados ou não com hidrogel a base de biocelulose a 1% na avaliação com 14 dias, com maiores concentrações no GC. Com valores mais elevados de células inflamatórias, tanto de polimorfonucleares como de monócitos no GC em todos os períodos experimentais, sugere-se que o hidrogel a base de biocelulose a 1% teve uma ação anti-inflamatória nas feridas tratadas.

Em equinos, nas feridas com cicatrização por segunda intenção, é vantajoso o uso de substâncias capazes de acelerar o processo de cicatrização e que também possam reduzir a formação do tecido de granulação em excesso, ocasionado principalmente porque nesta espécie, a produção de fibroblastos continua mesmo após o completo preenchimento da ferida (WILMINK e WEEREN, 2004). Em feridas de equinos tratadas com PRP (Plasma Rico em Plaquetas) notou-se que o fechamento microscópico da ferida pode estar relacionado com a rápida formação de tecido de granulação e conseqüentemente com a proliferação de fibroblastos e o grupo que recebeu PRP apresentou também melhor organização dos feixes de fibras colágenas. No entanto estes fatores não devem ser analisados isoladamente já que não necessariamente refletem a qualidade do tecido cicatricial (SOUZA M. V. et al., 2014). Com o melhor aspecto cicatricial observado macroscopicamente nas feridas tratadas com o hidrogel a base de biocelulose a 1%, cogitou-se a possibilidade do mesmo atuar na modulação da produção de fibroblastos, principalmente na fase de proliferação celular, impedindo a formação de tecido de granulação em excesso. No entanto, os dados relacionando à proliferação de fibroblastos neste estudo não sustentam esta afirmação, visto que os valores dos *scores* destas células apresentaram-se muito próximos entre ambos os grupos, sem apresentar diferença significativa (**Tabela 3**). Mas uma possível explicação para este resultado pode estar relacionada ao reduzido número de animais utilizados na presente pesquisa.

Com relação à neovascularização, apesar de não serem constatadas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado, observou-se valores mais elevados das medianas do GT, que podem indicar um início precoce da neovascularização nas feridas tratadas com hidrogel à base de biocelulose a 1%, um resultado relevante, já que uma maior vascularização local pode propiciar um aumento na concentração de citocinas associadas à cicatrização no local da lesão. A síntese de colágeno inicia-se cerca de quatro dias após a ocorrência da lesão, sendo mais significativa a partir do 7º dia (SCHULTZ et al., 2005). Apesar de não haver diferença significativa, o resultado sugere que as feridas que receberam o hidrogel a base de biocelulose a 1% apresentaram deposição precoce do colágeno.

Os polimorfonucleares como neutrófilos e os macrófagos secretam mediadores pró-inflamatórios que aumentam a produção de metaloproteinases, que degradam a matriz extracelular, prejudicando a migração celular, reduzindo a proliferação de

fibroblastos e diminuindo a síntese colagênica (MASSON et al, 2013). Devido à menor concentração do infiltrado de polimorfonucleares em estágios mais avançados da cicatrização (14 e 21 dias), nas feridas tratadas com hidrogel a base de biocelulose a 1% acredita-se haver uma ação menos evidente dos mediadores pró-inflamatórios e de metaloproteinasas, justificando a deposição precoce de colágeno nestas feridas. A fim de se investigar melhor a base molecular envolvida na deposição de colágeno, realizou-se a avaliação da expressão gênica dos principais tipos de colágeno envolvidos na cicatrização (colágeno tipo I e tipo III) e mediadores inflamatórios, como citocinas e fatores de crescimento, associadas a este processo. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre GC e GT na avaliação da expressão gênica de ambos os colágenos em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 10**), ressalta-se um aumento progressivo na média da expressão gênica relativa destes, corroborando os estudos de SOUZA M. V. et al. (2014) na avaliação da expressão gênica dos colágenos tipo I e tipo III em feridas de equinos tratadas com Plasma Rico em Plaquetas. Estes resultados não permitem imputar ao hidrogel a base de biocelulose a 1%, a indução à expressão gênica de colágeno nas fases inflamatória e proliferativa da cicatrização da pele. Esta tendência de aumento progressivo temporal dos valores médios da expressão gênica observada nos colágenos tipo I e III com relação as fases de cicatrização em ambos os grupos estudados também discordam com os resultados de outros estudos em que se observou uma elevação dos valores médios da expressão do colágeno tipo I e diminuição dos valores médios do colágeno tipo III com o decorrer do tempo (SCHWARTZ et al., 2002).

A cicatrização excessiva ocorre quando a síntese da matriz extracelular permanece elevada por mais tempo que o considerado como normal o que resulta em excesso na produção de colágenos e de outros componentes, podendo ocasionar problemas de cicatrização como fibroses e no caso da espécie equina, a formação de tecido de granulação exuberante (LEFEBVRE-LAVOIE et al. 2005, YOUNG & MCNAUGHT, 2011). Com base na informação de que o excesso na produção de colágeno ocasione distúrbios fibroproliferativos, esperava-se observar em nossos resultados, que nas fases que antecedem o início da produção de colágeno (antes do 4º dia após confecção da ferida), houvesse uma maior expressão gênica de colágeno, sobretudo nas feridas tratadas com hidrogel à base de biocelulose a 1%. Na sequência, em momentos mais tardios, houvesse a diminuição da expressão gênica

dos colágenos evitando a formação em excesso de tecido de granulação. No entanto, somente com os dados obtidos neste estudo, não podemos afirmar que hidrogel à base de biocelulose a 1% exerceu um efeito sobre a produção e remodelação do colágeno. Os resultados também sugerem que os níveis de expressão gênica podem não ter uma relação direta com a quantidade de colágeno produzido durante o processo de cicatrização. A cicatrização de feridas consiste em um processo dinâmico impulsionado pela proliferação e diferenciação celular e é mediado por diferentes citocinas, que entre suas diversas funções, também estimulam a proliferação de fibroblastos que irão sintetizar colágeno (SINGER A.J., CLARK R.A., 1999; SCHULTZ et al., 2005).

A IL-6 é um dos principais marcadores pró-inflamatórios após a ocorrência de uma lesão, libera receptores para TNF- α e que está intimamente ligado à maturação de neutrófilos (SPAAS et al., 2016), assim sendo, avaliamos a expressão gênica relativa de citocinas inflamatórias envolvidas na cicatrização. A expressão gênica de IL-6 apresenta-se mais elevada nos membros em relação à região torácica de equinos, sugerindo que a esta elevação pode estar relacionada com uma inadequada cicatrização. Nossos resultados revelaram que não houve diferença significativa na expressão gênica de IL-6 nas feridas tratadas com o hidrogel à base de biocelulose a 1% em nenhum dos tempos avaliados (**Figura 11**). Neste mesmo estudo realizado por J. RGensen E. et al. (2020), simulou-se em feridas torácicas realizadas em cavalos uma resposta inflamatória intensa através de inoculação bacteriana nas feridas e foi detectado um aumento da expressão gênica de TNF- α nos dias 7 e 14, em comparação com a expressão em feridas que não tiveram essa estimulação desta resposta inflamatória. Com os menores *scores* de células polimorfonucleares observadas nas feridas que receberam o hidrogel a base de biocelulose a 1%, supondo um efeito anti-inflamatório do hidrogel, esperava-se uma expressão gênica do TNF- α menos elevada neste grupo, uma vez que o aumento do número de neutrófilos coincide com o aumento nos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias, entre elas o TNF- α (T.A.M. ANDRADE A., et al., 2011). Entretanto, no presente estudo, a expressão gênica de TNF- α nas amostras avaliadas, não revelou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados (**Figura 11**).

A cicatrização quando se encontra na fase proliferativa, é caracterizada pela produção de fatores de crescimento como o TGF- β e citocinas anti-inflamatórias, que

são capazes de induzir a migração e proliferação celular no local da ferida. A IL-10 desenvolve um papel regulatório controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias, inibindo principalmente TNF- α e IL-6 (LIN et al., 2000). Os resultados obtidos em pesquisa ULLM et al. (2020) cujo modelo experimental *in vitro* em matrizes 3D de colágeno, células foram cultivadas sob estímulo de IL-10 o que ocasionou uma desdiferenciação de miofibroblastos, sugerindo uma influência parácrina da IL-10 secretada por macrófagos. Essa desdiferenciação é regulada de forma negativa com a função de evitar cicatrizes hipertróficas e formação de tecido de granulação exuberante. Devido ao papel pleiotrópico da IL-10, avaliou-se sua expressão gênica nas amostras de biópsia tecidual, comparando o GC com o GT, nos diferentes momentos, para verificar se no GT esta possuía uma maior expressão gênica relativa, sob a hipótese de que o hidrogel à base de biocelulose a 1% controlou a formação de tecido de granulação exuberante e também encontrar alguma relação com os resultados da expressão gênica relativa do TNF- α e IL-6. A partir dos resultados desta pesquisa, como não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos avaliados para a expressão gênica relativa de IL-10 (**Figura 11**), não foi possível afirmar que a IL-10 atuou diminuindo a resposta inflamatória ou controlando a formação de tecido de granulação exuberante em feridas tratadas com o hidrogel à base de biocelulose a 1%.

Os fatores de crescimento também são amplamente estudados na cicatrização prejudicada, já que a ativação dos fibroblastos para sintetizar o colágeno é dependente de fatores de crescimento e das próprias condições metabólicas da ferida. Porquanto, investigamos a expressão gênica do TGF- β que no geral favorece a deposição de matriz extracelular (THEORET et al., 2001). Em um estudo realizado em camundongos demonstrou que o TGF- β induz a secreção de colágeno tipo I por fibroblastos (GORDON J.R., GALLI S.J. 1995). No entanto, uma proliferação potencialmente elevada de fibroblastos liberando níveis aumentados de matriz extracelular pode contribuir para fibroplasia observadas nas feridas em geral. Assim, a supressão do TGF- β relaciona-se a redução da formação de tecido de granulação exuberante e melhora no aspecto de feridas em membros de cavalos (SILVEIRA, et.al, 2010). Segundo THEORET et al. (2001), uma expressão significativamente reduzida de TGF- β pode regular substancialmente os processos fibróticos de feridas torácicas.

Os resultados desta pesquisa, não permitem afirmar que o hidrogel à base de biocelulose a 1% interferiu na expressão gênica do TGF- β e conseqüentemente na regulação positiva ou negativa da deposição de matriz extracelular, visto que não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos momentos avaliados (**Figura 11**). No geral, nenhuma diferença significativa foi encontrada nos níveis de expressão gênica das citocinas entre feridas tratadas com o hidrogel à base de biocelulose a 1% e as feridas não tratadas e não foi observado também um padrão de expressão gênica relativa. O hidrogel à base de biocelulose a 1% não induziu respostas inflamatórias locais diferentes entre os animais tratados e não tratados quando avaliamos estes marcadores em específico, no entanto outros mediadores envolvidos na cicatrização de feridas e que não foram analisados nesta pesquisa podem apresentar diferenças significativas.

Identificamos que dentre as limitações deste estudo podemos citar o reduzido número de animais utilizados na pesquisa, que poder ser justificado devido ao elevado custo da manutenção destes animais, bem como dos insumos necessários para análise molecular e a escolha das citocinas selecionadas para a avaliação.

Adicionalmente, estes resultados são de feridas cirúrgicas agudas experimentais, diferindo das feridas rotineiramente encontradas na clínica de equinos. Um modelo experimental com feridas crônicas, contaminadas ou mais profundas poderia fornecer informações clínicas mais relevantes, porém tal modelo inexistente e a inclusão de feridas crônicas de animais atendidos numa rotina introduziria um grande número de variáveis não controladas, justificando a utilização deste modelo.

Os resultados em ensaios quantitativos da PCR revelam apenas a regulação de proteínas no nível transcricional (mRNA) e não a regulação pós-transcricional, a regulação da tradução ou até a degradação da proteína. As análises destes genes no nível da proteína provavelmente trariam informações diferentes. Assim sendo, a combinação da técnica de RT-qPCR a outros métodos de análise, como imunohistoquímica, ELISA ou Western Blot em futuras pesquisas poderá melhorar ainda mais a compreensão dos efeitos do hidrogel à base de biocelulose a 1% na cicatrização da espécie equina.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação do hidrogel à base de biocelulose a 1% foi realizada de forma inédita na literatura veterinária sendo utilizado em feridas experimentais epiteliais realizadas na espécie equina.

E nas condições experimentais deste estudo, conclui-se que o hidrogel à base de biocelulose a 1% foi eficaz na cicatrização epitelial de equinos, pois interferiu a nível macroscópico e microscópico, já que as feridas tratadas apresentaram um tecido cicatricial com aspecto superior além de promover um efeito celular anti-inflamatório, visto que o uso do hidrogel a base de biocelulose a 1% inibiu a migração de neutrófilos PMN na região da ferida.

A nível molecular não se constatou com estes dados interferência do hidrogel a base de biocelulose a 1% no processo cicatricial de feridas experimentais na espécie equina. Mas, assim como na medicina humana, o hidrogel de biocelulose pode ser uma terapêutica promissora na cicatrização de feridas de equinos e continuidade desta pesquisa investigando o seu efeito molecular nas diferentes fases da cicatrização pode auxiliar na compreensão de sua ação no processo de cicatrização de feridas, principalmente feridas de difícil cicatrização, tanto na medicina veterinária como na medicina humana.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, T. A. M. et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 44, n. 10, p. 1036-1047, 2011.

BARUD, H. S et al. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, p. 515, 2008.

BOCHATON-PIALLAT, M.L.; GABBIANI G.; HINZ B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered questions. **F1000 Faculty**. v.5. pii: v.752. Apr 26, 2016.

CAMPOS et al. Cicatrização de feridas. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig**, v. 20, n.1, p.51-58, 2007.

CARBINATTO, F. M.; SÁBIO, R. M.; MENEGUIN, A. B.; CESTARI, S. E.; CRUZ, S. A.; BARUD, H. S. Bacterial cellulose-based hydrogel for wound healing: characterization and in vitro evaluation. **International Journal of Advances in Medical Biotechnology**. v.1, n.2, 2018.

COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. D. F.; TENÓRIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência rural**. v.29, n.2, p.297-303, 1999. ISSN 0103-8478.

DESMOULIERE, A.; GEINOZ, A.; GABBIANI, F.; GABBIANI, G. Transforming growth factor-b1 induces a-smooth muscle actin expression in granulation tissue

myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. **J Cell Biol.** v.122, p.103–111, 1993.

DIEGELMANN, R. F. Collagen Metabolism. Wounds: Health Management. **Publications Inc**, v.13, n.5, p.177-182, 2000.

DONINI, Í. A. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.

FORESTI, M. L., et al. Applications of bacterial cellulose as precursor of carbon and composites with metal oxide, metal sulfide and metal nanoparticles: A review of recent advances. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p.447.6, 2017.

GERBER, P. A. et al. The top skin-associated genes: a comparative analysis of human and mouse skin transcriptomes. **Biological chemistry**, v. 395, n. 6, p. 577-591, 2014.

GONÇALVES, G.; PARIZOTTO, N. A. Fisiopatologia da reparação cutânea: atuação da fisioterapia. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.3, n.1, p. 5-13, 1998.

GORDON, J. R.; GALLI, S. J. Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells stimulated via the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 6, p. 2027-2037, 1994.

GUPTA A., et al. Characterisation and in vitro antimicrobial activity of biosynthetic silver-loaded bacterial cellulose hydrogels. **J microencapsul.**, v.33, p. 725-34, 2016.

HARMAN, R. M.; THEORET, C.L.; VAN DE WALLE, G.R. The horse for the study of cutaneous wound healing. **Advances in wound care**, v. 0, p.1-19, 2019.

HELENIUS G., et al. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. **J Biomed Mater Res A**. v.76, p.431-438, 2016.

HENDRICKSON, D.; VIRGIN, J. Factors that affect equine wound repair. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 21, n. 1, p. 33-44, 2005. ISSN 0749-0739.

HINZ, B.; PHAN, S. H.; THANNICKAL, V. J.; GALLI, A.; BOCHATON-PIALLAT, M. L.; GABBIANI, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. **Am J Pathol.**, v. 170, n. 6, p.1807-1816, 2007.

HUSSNI, C.A.; GIANINI, C.G.; ALVES, A.L.G.; NICOLETTI, J.L.M.; THOMASSIAN, A.; CROCCI, A.J.; SEQUEIRA, J.L. Cicatrização cutânea por segunda intenção em equinos tratados com vedaprofeno. **Archives of Veterinary Science**. v. 9, n. 1, p. 87-92, 2004.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina (SP)**. v.89, n 3-4, p.125-131, 2010.

KATZ, M. H. et al. Human wound fluid from acute wounds stimulates fibroblast and endothelial cell growth. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 1054-1058, 1991. ISSN 0190-9622.

LEFEBVRE-LAVOIE J.; LUSSIER J.G.; THEORET C.L. Profiling of differentially expressed genes in wound margin biopsies of horses using suppression subtractive hybridization. **Physiol. Genomics**. v. 22, p.157-170, 2005.

LIN E.; CALVANO S. E.; LOWRY S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**. v. 127, p.117-126, 2000.

LINA, F. et al. Bacterial cellulose for skin repair materials. **INTECH Open Access Publisher**, 2011. ISBN 9533073098.

LUCAS, F. A. et al. Copaiba oil in experimental wound healing in horses. **Ciência Rural**, Santa Maria, e20151292, v. 47, n. 4, 2017.

MADDEN, J.; AREM, A.; SABISTON, D. A cicatrização das feridas. Aspectos biológicos e clínicos. In: DABISTON, D. **Tratado de cirurgia**, v. 14, p. 156-158, 1991.

MANEERUNG, T. et al. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n.43, 2008.

SOUZA M.V.; PINTO J.O.; COSTA M.B.M.; ALVES M.S.; SILVA M.O., MARTINHO K.O.; FIETTO L.G. Expressão gênica do colágeno em ferida cutânea de equinos tratada com plasma rico em plaquetas. **Pesq. Vet. Bras**. v.34, n.3, p.233-240, 2014.

MARTINS, E. A. et al. Emprego da membrana de quitosana em feridas cutâneas induzidas experimentalmente em equinos. **Ciência Rural**, v.43, n.10, p.1824-1830, 2013.

MASSON, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo-resina de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) em bactérias de significância clínica em úlceras cutâneas. **Rev. Bras. Pl. Med**, v.15, n. 4 supl I, p. 664-669, 2013.

MATRICARDI P., et al. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev.** v.65, p.1172-1187, 2013.

NETO, J.C.L. **Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos em 2003.** Online. Disponível na internet <<http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf>>. Acesso em: 9 set 2019.

PAGANELA, J.C.; RIBAS, L.M.; SANTOS, C.A.; FEIJÓ, L.S.; NOGUEIRA, C.E.W.; FERNANDES, C.G. Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, p. 13-18, 2009.

PANDEY et al. Microwaved bacterial cellulose-based hydrogel microparticles for the healing of partial thickness burn wounds. **Drug Deliv Transl Res.** n.1, p.89-99. 7 Feb, 2017. doi: 10.1007/s13346-016-0341-8.

PICHETH, G.F.; PIRICH, C.L.; SIERAKOWSKI, M.R.; WOEHL, M.A.; SAKAKIBARA, C.N.; DE SOUZA, C.F., et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **Int J Biol Macromol.** v.104, p. 97-106, 2017.

PICOLOTTO, A.; PERGHER, D.; PEREIRA, G. P.; et al. Bacterial cellulose membrane associated with red propolis as phytomodulator: Improved healing effects in experimental models of diabetes mellitus. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v.112, 2019.

JØRGENSEN, E.; et al. Histologic changes and gene expression patterns in biopsy specimens from bacteria-inoculated and noninoculated excisional body and limb wounds in horses healing by second intention. **American journal of veterinary research**, v. 81, n. 3, p. 276-284, 2020.

ROCHA JR, A. M.; OLIVEIRA, R. G.; FARIAS, R. E.; ANDRADE, L. C. F.; AARESTRUP, F. M. Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade ni processo de reparo tecidual. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.2, p.150-156, 2006.

SÁNCHEZ-CASANOVA, R. E. et al. Prevalence of cutaneous pathological conditions and factors associated with the presence of skin wounds in working equids in tropical regions of Veracruz, Mexico. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 3, p. 555-561, 2014. ISSN 0049-4747.

SCHULTZ, G.S.; LADWIG, G.; WYSOCKI, A. Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. **World Wide Wounds**. 2005. Disponível em <<http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/Extrace-Matric-Acute-Chronic Wounds.html>>. Acesso em: 20 abr. 2020

SPAAS, J. H.; GOMIERO, C.; BROECKX, S. Y.; VAN HECKE, L.; MACCATROZZO, L.; MARTENS, A.; MARTINELLO, T.; PATRUNO, M. Wound-healing markers after

autologous and allogeneic epithelial-like stem cell treatment. **Cytotherapy**. v.18, n.4, p.562–569, 2016.

SENGUPTA, M.; BANERJEE, P.; PAUL, S.; SENGUPTA, J.; GHOSH, M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. **Muller Journal of Medical Sciences and Research**, v.6, p.27-30, 2015.

STASHAK, T. S.; THEORET, C. L. **Equine wound management**. John Wiley & Sons, 2009. ISBN 0813806739.

SWAMINATHAN et al. Thymol enriched bacterial cellulose hydrogel as effective material for third degree burn wound repair. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.122, p. 452–460, 2019.

SCHWARTZ, A.J.; WILSON, D.A.; KEEGAN, K.G. et al. Factors regulating collagen synthesis and degradation during second-intention healing of wounds in the thoracic region and the distal aspect of the forelimb of horses. **Am J Vet Res**. v.63, p.1564-1570, 2002.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med**. v.341, p.341:738–46, 1999.

TEXTOR, J.A.; CLARK, K.C.; WALKER, N.J., et al. Allogeneic stem cells alter gene expression and improve healing of distal limb wounds in horses. **Stem Cells Transl Med**. v.7, p.98-108, 2018.

THEORET C. L.; BARBER S. M.; MOYANA T. N., et al. Expression of transforming growth factor β 1, β 3, and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. **Vet Surg**. v.30, p.269–277, 2001.

THEORET, C. L.; WILMINK, J. M. Aberrant wound healing in the horse: Naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 365-371, 2013.

THEORET, C.L.; OLUTOYE, O.O.; PARNELL, L.K.S.; HICKS, J. Equine exuberant granulation tissue and human keloids: a comparative histopathologic study: equine exuberant granulation tissue and human keloids. **Vet Surg**;v.42. p.783–789. 2013.

ULLM, F. et al. 3D scaffold-based macrophage fibroblast coculture model reveals IL-10 dependence of wound resolution phase. **Advanced biosystems**, v. 4, n. 1, p. 1900220, 2020.

ULLAH, H. et al. Advances in biomedical and pharmaceutical applications of functional bacterial cellulose-based nanocomposites. **Carbohydrate polymers**. v.150, p.330-352, 2016.

VIEIRA, C.P.B.; ARAÚJO, T.M.E. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. **Revista da Escola de Enfermagem USP**. v.52. e03415. 2018.

WILMINK, J. M. et al. Differences in second-intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. **Equine veterinary journal**, v.31, n 1, p.61-67, 1999. ISSN 2042-3306

WILMINK, J.M.; VAN WEEREN, P.R. Differences in wound healing between horses and ponies: application of research results to the clinical approach of equine wounds. **Clin Tech Equine Pract**, v.3, p. 1123-33, 2004.

CZAJA, W. K.; YOUNG, D. J.; KAWECKI, M.; BROWN JR, R. M. **Biomacromolecules**, v.8. n.1. 2007.

CZAJA, W.; KRYSZYNOWICZ, A.; BIELECKI, S.; BROWN JR, R. M. **Biomaterials**. v.27. 2006.

WU, J. et al. **Carbohydrate Polymers**, v.102, p.762.2, 2014.

YADOLLAHI, M. et al. Synthesis and characterization of antibacterial carboxymethyl cellulose/ZnO nanocomposite hydrogels. **Int J Biol Macromol**. v.74, p.136-141, 2015.

YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery**. v.29, p.475-479, 2011.

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Uso do gel de celulose bacteriana em feridas experimentais na espécie equina**", Processo FOA nº 00131-2018, sob responsabilidade de Flavia de Almeida Lucas apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 18 de Maio de 2018.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 20 de Abril de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 20 de Maio de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Use of bacterial cellulose gel in experimental wounds in horses**", Protocol FOA nº 00131-2018, under the supervision of Flavia de Almeida Lucas presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 18, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: April 20, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: May 20, 2020.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br