UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO E BIOVIDRO F18® NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS NÃO CONTAMINADAS EM RATOS WISTAR

BRUNA MARTINS DA SILVA

Botucatu - SP
Dezembro de 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO E BIOVIDRO F18® NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS NÃO CONTAMINADAS EM RATOS WISTAR

BRUNA MARTINS DA SILVA

Defesa de Tese apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos

Botucatu - SP
Dezembro de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Bruna Martins da.
Avaliação da associação do gel de colágeno e Biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas em ratos Wistar / Bruna Martins da Silva. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Ivan Felimino Charas dos Santos
Capes: 50501070

1. Ângiogenese. 2. Pele - Ferimentos e lesões. 3. Cicatrização. 4. Cicatriz.

Palavras-chave: Ângiogenese; Biovidro; Pele; Tecido cicatricial; Trauma.

Nome do autor: Bruna Martins da Silva.

Título: Avaliação da associação do gel de colágeno e Biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas em ratos Wistar

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos
Orientador
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP

_____

Profª. Titular Sheila Canevese Rahal
Membro
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP

_____

Profª. Titular Noeme Sousa Rocha
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, SP

_____

Prof. Associado Sandro de Vargas Schons
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Rolim Moura, RO.

_____

Profª. Adjunta Sara Lucena de Amorin
Membro
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Rondônia (UNIR), Rolim Moura, RO.

Data da defesa: 20 dezembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (Unesp), em especial a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Botucatu, pela estrutura; e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal por todos os auxílios prestados. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código do Financiamento 001 com o número do processo 88882.433334/2019-01.

Agradeço, primeiramente, aos animais que foram a fonte dos resultados obtidos, a eles, o meu mais profundo respeito e gratidão.

Agradeço a Deus e aos meus familiares, em especial minha mãe Silvana Regina de Lima, meus irmãos Matheus Martins da Silva, Gabriel Lima Rios e minha avó Irani Zanelato de Lima, por todo carinho e afeto.

Serei eternamente grata ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos, a todo apoio, suporte, conselhos, dedicação e amizade que tem comigo. Agradeço, principalmente, à oportunidade que me ofereceu durante toda a minha trajetória: desde a residência, mestrado e no doutorado. Faltam-me palavras para expressar o tamanho da minha gratidão. Muito obrigada por tudo que fez por mim e por todos os seus orientados.

À Marina Trevelin de Souza e à empresa VETRA®, pelo fornecimento do biovidro F18® e o gel de colágeno utilizados no estudo, além de toda ajuda e suporte.

À Profª. Claudia Helena Pellizzon, Instituto de Biociências de Botucatu (IBB), Unesp, Botucatu, pela parceria na realização das análises histológicas e imunoistoquímicas. Agradeço por sua paciência, dedicação e ensinamentos durante as análises.

À Profa. Vânia Maria de Vasconcelos Machado e a Profa. Maria Jaqueline Mamprim, FMVZ, Unesp, Botucatu, e ao Serviço de Diagnóstico por Imagem, por dispor o equipamento de Tomografia para o estudo. Ao técnico Heraldo André Catalan Rosa pelas realizações das tomografias. À doutoranda Jeana Pereira Pereira da Silva pelos ensinamentos durante as análises tomográficas.

Ao Prof. Alcides Lopes Leão, do departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, Unesp, Botucatu, por ceder o equipamento para a realização dos estudos tensiométricos, e ao doutorando Ivan Moroz, por toda ajuda e auxílio nas realizações da tensiometria.

À Profª. Cláudia Valéria Seullner Brandão, por ceder o biotério da FMVZ, Unesp, Botucatu, para a realização do estudo; à Profª. Alessandra Melchert por nos conceder os materiais necessários para a manutenção dos animais no biotério.

As alunas da graduação e iniciação científica Paula Mancuso e Leticia Pereira Albuquerque, e mestre Marina Frazatti Galina, pela proatividade, contribuição e disposição em ajudar sempre para a execução do projeto.

Agradeço à Profª. Miriam Tsunemi, Departamento de Bioestatística, IBB, Unesp, Botucatu, por todo apoio na realização das análises estatísticas.

Aos meus amigos, agradeço imensamente, além da ajuda na parte prática do projeto, pela amizade, carinho e companheirismo. Sem vocês seria ainda mais difícil a realização deste projeto, em especial: Maria Gabriela Picelli de Azevedo, Márcio Rossato, Bárbara Sardela Ferro e David Castro e Caio Doiche.

Ao meu grande amigo José Ivaldo Siqueira Silva Júnior, por toda sua ajuda, fundamental para a realização deste trabalho, e pelos momentos de muitas risadas e carinho, pelos conselhos e todo apoio.

SUMÁRIO

RESUMO viii
ABSTRACT ix
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 2
2 REVISÃO DA LITERATURA 5
2.1. Cicatrização 5
2.2. Biomateriais 7
2.3. Vidro bioativo 8
2.3.1. Vidro bioativo F18® 10
CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO 1 20
CAPÍTULO 3 – TRABALHO CIENTÍFICO 2 38
ANEXO 1. Certificado da CEUA (FMVZ, Unesp, Botucatu). 53

SILVA, B. M. Avaliação da associação do gel de colágeno e Biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas em ratos Wistar. Botucatu, 2022. 64p. Defesa da Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Grandes Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

RESUMO: O biovidro F18® é um biomaterial cerâmico, o qual possui propriedades anti-biofime, angiogênica, vasodilatadora e osteocondutora. Objetiva-se com o presente estudo realizar avaliações clínica, termográfica, tensiométrica, morfométrica, histológica e imunoistoquímica de feridas cutâneas de ratos Wistar convencional tratadas com biovidro F18®. Foram utilizados 112 ratos Wistar convencional, machos adultos e hígidos. Após a anestesia geral, em cada animal foi efetuada uma ferida de 3 cm de diâmetro ne região dorsal. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 28 animais, de acordo com o tratamento: G1 - solução salina (0,9%); G2 - pomada cicatrizante; G3 - gel de colágeno; G4 – mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno. A avaliação clínica incluiu a mensuração da massa corpórea, temperatura corpórea e a avaliação macroscópica da ferida. A avaliação da temperatura superficial das feridas cutâneas foi realizada pela tomografia infravermelha, e a tensiometria foi avaliada pela força de tensão e deformidade máxima. Para realização da avaliação histológica e imunoistoquímica, eutanásias foram realizadas após indução anestésica, e biópsias excisionais foram realizadas em torno da lesão. O tecido de granulação apresentou variações significativas ao longo dos momentos e entre os grupos. A temperatura superficial das feridas tratadas com a solução salina (0,9%) apresentou aumento significativo ao longo dos momentos e entre os grupos. Os valores das áreas e contração das feridas dos demonstraram redução e aumento significativo, respectivamente, ao longo dos momentos. Foi identificado aumento significativo no número de células totais e aumento significativo para colágeno tipo I na ferida tratado com biovidro F18®. Concluiu-se que o biovidro F18® demonstrou efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas, destacando sua ação na indução de maior perfusão sanguínea, aumento da força de tensão, diminuição da área da ferida e aumento da taxa de oclusão, e diminuição da quantidade de células de reação inflamatória e estimulo na produção de colágeno tipo I.

Palavras-chave: angiogênese, biovidro, tecido cicatricial, pele, trauma.

SILVA, B. M. Evaluation of the association of collagen gel and Bioglass F18® in the healing of uncontaminated skin wounds in Wistar rats. Botucatu, 2022. 64p. Defesa da Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Grandes Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

ABSTRACT: The F18® bioglass is a ceramic biomaterial, which has anti-biofilm, angiogenic, vasodilator and osteoconductive properties. The aim of this study is to carry out clinical, thermographic, tensiometric, morphometric, histological and immunohistochemical evaluations of skin wounds in conventional Wistar rats treated with F18® bioglass. 112 conventional Wistar rats, adult and healthy males, were used. After general anesthesia, a wound measuring 3 cm in diameter was made on the dorsal region in each animal. The rats were randomly divided into four groups of 28 animals, according to the treatment: G1 - saline solution (0.9%); G2 - healing ointment; G3 - collagen gel; G4 – mixture of F18® bioglass powder and collagen gel. Clinical evaluation included measurement of body mass, body temperature and macroscopic evaluation of the wound. The evaluation of the superficial temperature of the cutaneous wounds was performed by infrared tomography, and the tensiometry was evaluated by the tension force and maximum deformity. To carry out the histological and immunohistochemical evaluation, euthanasia was performed after anesthetic induction, and excisional biopsies were performed around the lesion. Granulation tissue showed significant variations over time and between groups. The surface temperature of the wounds treated with saline solution (0.9%) showed a significant increase over time and between groups. The values of the areas and contraction of the wounds showed a significant reduction and increase, respectively, over time. A significant increase in the number of total cells and a significant increase in type I collagen was identified in the wound treated with F18® bioglass. It was concluded that the F18® bioglass demonstrated beneficial effects in the healing of cutaneous wounds, highlighting its action in inducing greater blood perfusion, increasing the tension force, decreasing the wound area and increasing the occlusion rate, and decreasing the amount of inflammatory reaction cells and stimulation of type I collagen production.

Keywords: angiogenesis, bioglass, scar tissue, skin, trauma.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cicatrização é um processo dinâmico de eventos moleculares e bioquímicos que engloba três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação ou maturação, e para que esse processo ocorra existe a necessidade de estímulos associados ao trauma ou lesão tecidual (OLIVEIRA e DIAS, 2012; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

O vidro bioativo é um material sintético que tem como base a sílica, é amplamente utilizado para fins biomédicos, visto que possui efeitos osteoindutores, anti-inflamatórios, angiogênicos e bactericidas, suas propriedades biológicas estão associadas com a liberação de cálcio, sódio, silício e fosfato, quando ele é reabsorvido pelo organismo (RIVADENEIRA et al., 2013; VARGAS et al., 2013; SOUZA et al., 2017a; BENETTI et al., 2020).

O vidro bioativo F18® é um biovidro com propriedades cicatrizantes que incluem indução de angiogênese e vasodilatação, bactericida (SOUZA et al., 2017a; SOUZA et al., 2017b; SOUZA et al., 2017c; OISHI et al., 2019; ARAÚJO LOPES et al., 2020; MARQUES et al., 2020; PASSOS et al., 2021). Este possui diferentes apresentações tais como os *scaffolds*, pós e fibras (SOUZA et al., 2017a; SOUZA et al., 2017b; SOUZA et al., 2017c; PASSOS et al., 2021).

Paralelamente, também, demonstrou propriedades associadas à osteogênese (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; PITALUGA et al., 2018). Contudo, se desconhece, até o momento, estudos sobre o uso do biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas, conferindo o ineditismo do estudo. Por outro lado, o uso de biomateriais nos diferentes protocolos terapêuticos é de extrema importância devido à ausência de efeitos colaterais e de descarte de resíduos, favorecendo, desse modo, a sustentabilidade ambiental.

Nesse contexto, objetiva-se avaliar os efeitos do biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas induzidas cirurgicamente, utilizando o rato Wistar convencional como modelo experimental de curta duração. A hipótese é que o vidro bioativo F18® tenha efeitos benéficos no processo de cicatrização de feridas cutâneas. A relevância clínico-cirúrgica foi

associada com o possível uso do biovidro F18® na cicatrização de feridas de cães e gatos, tendo como base os resultados do presente estudo.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cicatrização

A cicatrização é um processo sistêmico, complexo e dinâmico, que consiste em uma cascata organizada de eventos celulares, bioquímicos e moleculares, os quais interagem entre si, para que ocorra a formação de tecido cicatricial após o trauma (OLIVEIRA e DIAS, 2012; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

O processo classifica-se em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação (OLIVEIRA e DIAS, 2012; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019). Entretanto, para que o processo se inicie deve ocorrer lesão tecidual e trauma vascular com o extravasamento dos elementos sanguíneos (OLIVEIRA e DIAS, 2012; RODRIGUES et al., 2019). O contato desses elementos com as substâncias da matriz extracelular, e a liberação dos mediadores vasoativos, induz a vasoconstrição imediata, e posterior migração plaquetária para a lesão e hemostasia (GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

A presença das plaquetas induz a liberação de fatores de crescimento, citocinas inflamatórias (pró e anti-inflamatórias), elementos da matriz extracelular e a formação do coágulo, que irá proteger a ferida dos agentes externos e perda de sangue e fluídos para o meio extravascular (GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; YANEZ et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

A fase inflamatória, que dura entre 24 e 72 horas, é caracterizada pelos eventos de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, com consequente migração celular e de mediadores inflamatórios para à lesão. Nessa fase, também, ocorre a produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (SU et al., 2015; SINGH et al., 2017).

As células predominantes nesta fase são derivadas da resposta imune *“in nata”* que incluem os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos derivados dos monócitos, que são responsáveis pela fagocitose de bactérias, de corpos estranhos e de fragmentos celulares, como também de outras substâncias que possam atrasar a cicatrização (VELNAR et al., 2009; GONZALEZ et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019). Essas células preparam a

ferida para a fase proliferativa devido à alta concentração de mediadores bioquímicos e de fatores de crescimento (OLIVEIRA e DIAS, 2012; GONZALEZ et al., 2016). Os macrófagos liberam a colagenase e participam na liberação de citocinas inflamatórias [interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (FNT-α), Interferon gama (IFN-Y)], fator de crescimento de fibroblastos 2 (FCF2) e transformador beta (FCT-β) (HE e MARNEROS, 2013; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019). Por sua vez, os fatores de crescimento coordenam a formação do tecido de granulação, angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular, dando início a fase proliferativa (YANEZ et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

A fase proliferativa inicia-se entre o quarto e quinto dia após o estímulo traumático, podendo perdurar por até 15 dias. Ela é caracterizada por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e fibroplasia (OLIVEIRA e DIAS, 2012; GONZALEZ et al., 2016).

Na epitelização ocorre a migração das células epiteliais da margem para o centro da ferida (SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019). Durante a angiogênese, os componentes da matriz extracelular são organizados de forma que ocorra a migração de células endoteliais e formação de novos capilares, por meio do estímulo presencial do FNT-α e do fator de crescimento endotelial vascular (FCEV), e pela baixa tensão de oxigênio (SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

A neovascularização é responsável pelo início da formação do tecido de granulação, sendo este composto por células endoteliais e fibroblastos que produzem a fibronectina e o colágeno (HE e MARNEROS, 2013; SINGH et al., 2017). A fibroplasia ocorre por meio da ativação dos fibroblastos pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), levando à indução da contração da ferida, dando início a fase remodelativa (SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

A fase de remodelação ou de maturação finaliza o processo cicatricial (OLIVEIRA e DIAS, 2012; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019). Esta fase pode prolongar-se por até 12 meses, e nela ocorre a degradação do colágeno tipo III (fino), presente em maior quantidade no tecido de granulação, para dar origem ao colágeno tipo I (espesso); reorganização das fibras colágenas e regressão endotelial (VELNAR et al., 2009;

SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019). Doze meses após a lesão, é identificada a presença de colágeno menos organizado em relação à pele integra, e a diminuição da quantidade dos fibroblastos e tecido conjuntivo (SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

2.2. Biomateriais

Os biomateriais são todas as substâncias naturais ou sintéticas consideradas biocompativeis, e que podem ser utilizadas para tratar e/ou substituir totalmente ou parcialmente tecidos vivos (Di CIO e GAUTROT, 2016; MIR et al, 2018).

A biocompatibilidade é um processo de extrema importância quando se faz o uso de biomateriais, visto que a existência da interação entre o biomaterial e o tecido circundante faz com que esses materiais não sejam rejeitados pelo organismo sob a forma de inflamação, reação alérgica ou mutagênicas ou reação de citotoxicidade (TZEKAO et al., 2007; MIR et al, 2018). Desse modo, a engenharia de tecidos tem desenvolvido materiais híbridos contendo substâncias bioativas e células que promovem uma estrutura de suporte inicial para a organização celular, e que se agrupam em um tecido funcional (NAVARRO, 2008; Di CIO e GAUTROT, 2016).

De acordo com a resposta tecidual que os biomateriais induzem nos tecidos, são classificados em: biomateriais biologicamente inertes e os absorvíveis (TZEKAO et al., 2007; MIR et al, 2018). Os biomateriais biologicamente inertes (ex. alumina, zircônia e platina), quando implantados no organismo, podem ser envolvidos por tecido fibroso não aderente, ou formar ligações interfaciais com o tecido vivo circundante (ex. vidros bioativos) (TZEKAO et al., 2007; MIR et al, 2018). Os biomateriais absorvíveis (ex. materiais à base de polidioxanona) são degradados pelos fluidos corporais e/ou digeridos pelas células, criando produtos que são facilmente eliminados pelo organismo (NAVARRO, 2008; MIR et al, 2018).

A primeira geração de biomateriais implantáveis foi desenvolvida na década de 1960, com o intuito de ser usado na substituição tecidual, com o mínimo de citotoxicidade (HENCH e POLAK, 2002). Contudo, o aumento das taxas de rejeição aos biomateriais e toxicidade de seus subprodutos durante a sua degradação induziu estudos de substâncias biocerâmicas (HENCH e

POLAK, 2002; HENCH, 2006). Os materiais vitrocerâmicos ou produtos biocerâmicos, são produzidos a partir da cristalização controlada do vidro (ZHANG et al., 2010; SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011; JONES, 2013; HUANG, 2017). Esses produtos garantem melhor resposta biológica na interface produto-tecido (HENCH e POLAK, 2002; HENCH, 2006; RAHAMAN e tal., 2011), e assim é usado na regeneração de diferentes tipos de tecidos e no tratamento de neoplasia em pacientes humanos (JO et al. 2009; QUINTERO et al. 2009; KULKARNI et al., 2015; SHANKHWAR et al., 2016; NASERI et al., 2017).

2.3. Vidro bioativo ou biovidro

Pesquisas relacionados com o biovidro, ou vidro bioativo, surgiram a partir do desenvolvimento de material com composição química semelhante ao osso (hidroxiapatita de cálcio), e considerado um material que forma ligações químicas com tecidos vivos, e desse modo, é utilizado para fins biomédicos (VARGAS et al., 2013; BENETTI et al., 2020). O biovidro deve seguir quatro pré-requisitos: biocompatibilidade; biofuncionalidade, que está associada à ação do sistema imunológico sobre o material sem que ocorra perda da sua estrutura química, física e biológica; capacidade de ser esterilizado; e a manufatura, que é a capacidade de poder ser produzido e moldado conforme desejado (BOCCACCINI e GOUGH, 2007; SOUZA, 2017a).

Durante a sua degradação pelo organismo, ocorre a liberação de cálcio, sódio, silício e de fosfato, garantindo efeitos benéficos na regeneração de tecidos ósseos (BOCCACCINI e GOUGH, 2007). Entretanto, diversos autores descreveram o biovidro como uma substância com propriedades mecânicas, osteoindutoras, angiogênicas, anti-inflamatórias e antibacterianas (ALLAN et al., 2001; RECTENWALD et al., 2002; THOMAS et al., 2005; HENCH, 2006; BOCCACCINI e GOUGH, 2007; RIVADENEIRA et al., 2013; VARGAS et al., 2013; MOURA et al., 2017; SOUZA et al., 2017a; BENETTI et al., 2020). Segundo Hoppe et al. (2011), Zhao et al. (2018), Zhu et al. (2020) e Zheng et al. (2021), o biovidro induz a estimulação direta em células-alvo (ex. células-tronco, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais). Outra propriedade desse produto é a modulação celular por meio do estímulo às células imunes na produção de moléculas de sinalização (ex. citocinas inflamatórias e fatores de crescimento)

(ANDERSON et al., 2008; FRANZ et al., 2011; ZETAO et al., 2018; WILLIAMS, 2019; SADOWSKA e GINEBRA, 2020; ZHENG et al., 2021).

Wilson et al. (1981) identificaram a imobilidade da interface material-tecido utilizando o vidro bioativo Bioglass 45S5®, bem como demonstraram a sua capacidade de ligação aos tecidos moles.

A partir da composição do Bioglass 45S5®, diversos estudos foram iniciados para o desenvolvimento de novos biovidros, inclusive para a cicatrização de feridas crônicas (ex. úlceras) (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011; SOUZA, 2016). Ross et al. (2003) utilizaram tubos de silicone revestidos com o biovidro Bioglass 45S5® e implantaram no tecido subcutâneo de ratos. Foi observado que os tubos que não revestidos com o biovidro foram envolvidos por uma cápsula fibrosa, ao passo que os tubos revestidos com o material aderiram ao tecido vizinho, apresentando neovascularização e proliferação de fibroblastos.

No estudo realizado por Day (2005) foi identificado a capacidade do biovidro estimular a secreção de fatores de crescimento angiogênicos de células estromais humanas, e subsequente angiogênese. Lin et al. (2012) relataram processo de cicatrização mais rápida (16 dias) em feridas cutâneas de ratos saudáveis e diabéticos, por meio de uso de pomada com partículas de vidro bioativo 45S5.

Para elucidar os mecanismos pelos quais o vidro bioativo atua na cicatrização de feridas, Li et al. (2016), identificara, *in vitro*, que os extratos de íons do Bioglass 45S5® preveniram a morte de células endoteliais da veia umbilical humana, após a hipóxia dose-dependente. Esse fenômeno foi associado à modulação dos hemicanais de conexina, considerado benéficas para a vascularização, na expressão de fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento de fibroblastos (LI et al., 2016). No mesmo estudo, ocorreu à redução da inflamação nos estágios iniciais da cicatrização, e a estimulação da angiogênese durante a fase proliferativa (LI et al., 2016).

Entretanto, diversos vidros bioativos desenvolvidos ainda apresentam propriedades mecânicas frágeis e alta tendência à cristalização, impedindo o processo de manipulação (SOUZA et al., 2017a).

2.3.1. Vidro bioativo ou biovidro F18®

Segundo Souza et al. (2017a), o biovidro F18® é um biomaterial a base de dióxido de silício (SiO_2), dióxido de sódio (Na_2O), dióxido de potássio (K_2O), óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO) e pentóxido de fósforo (P_2O_5) - SiO_2–Na_2O–K_2O–CaO–MgO–P_2O_5. Esse biovidro possui elevada bioatividade e reatividade, além de baixa resistência química, conferindo características para a confecção de fibras, pós e *scaffolds*. Paralelamente, possui atividade anti-biofime e bactericida elevada, quer em tecido ósseo ou na pele; além de possuir ação angiogênica e vasodilatadora (SOUZA et al., 2017b; OISHI et al., 2019; ARAÚJO LOPES et al., 2020; MARQUES et al., 2020; PASSOS et al., 2021).

Estudos prévios demonstraram a biocompatibilidade, *in vitro* e *in vivo,* do biovidro F18® e sua capacidade em estimular a formação de tecido ósseo (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; PITALUGA et al., 2018; ARAÚJO LOPES et al., 2020), dessensibilização de dentina (REIS et al., 2021) e remineralização de esmalte (RASTELLI et al., 2018). Gabbai-Armelin et al. (2015) avaliaram a biocompatibilidade *in vivo* das fibras do biovidro F18®, por meio de implantação subcutânea em ratos Wistar, e os resultados demostraram efeitos benéficos na espessura e qualidade da cápsula fibrosa e qualidade da interface tecido-biovidro. Os autores, também, identificaram ausência de rejeição do material e bioabsorção após 60 dias de implantação.

No contexto do sistema articular, Souza et al. (2017c) identificaram que a incorporação do biovidro F18® em polímeros elastoméricos regeneradores de cartilagem à base de poli (glicerol sebacato) dobrou a resistência à tração; adequou a degradabilidade do polímero, evitando a citotoxidade dos subprodutos de sua degradação; e melhorou a bioatividade do *scaffold*.

Em relação ao uso do biovidro F18® na regeneração de tecidos moles, Souza et al. (2017a) realizaram um estudo piloto em ratos Wistar submetidos a queimaduras de terceiro grau, e as fibras do biovidro foram implantadas na região acometida. Sete dias após a implantação, foi observada uma cicatrização mais rápida e ausência de necrose nos animais tratados com o biovidro. O exame histológico, demonstrou maior presença de fibroblastos, queratinócitos e tecido conjuntivo, quando comparada com o grupo não submetido ao tratamento com o biovidro F18®. No mesmo estudo, os autores observaram maior

intensidade do fator de crescimento endotelial (VEGF) nas feridas tratadas como biovidro, pelo exame imunoistoquímico.

Entretanto, até o momento, estudos relacionados com o uso do biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas estão ausentes na literatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, I.; NEWMAN, H.; WILSON, M. Antibacterial Activity of Particulate Bioglass® Against Supra and Subgingival Bacteria. **Biomaterials**, v.22, n.15, p.1683-1687, 2001.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, p. 86-100, 2008.

ARAÚJO LOPES, J. M.; BENETTI, F.; REZENDE, G. C., SOUZA, M. T.; CONTI, L. C.; ERVOLINO, E.; JACINTO, R. C.; ZANOTTO, E. D.; CINTRA, L. T. A. Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. **International Endodontic Journal**, v.53, n. 11, p. 1494–1505, 2020.

BENETTI, F.; BUENO, C. R. E.; REIS-PRADO, A. H. D.; SOUZA, M. T.; GOTO, J.; CAMARGO, J. M. P. D.; CINTRA, L. T. A. Biocompatibilidade, biomineralização e maturação do colágeno pelos materiais RTR®, Bioglass® e DM Bone®. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 31, p. 477-484, 2020.

BOCCACCINI, A. R.; GOUGH, J. E. Tissue engineering using ceramics and polymers**. New York. CRC Press**, ed. 2, 2007.

DAY, R. M. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis *in vitro*. **Tissue Engineering**, v. 11, p. 768-777, 2005.

DI CIO, S.; GAUTROT, J. E. Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype. **Acta Biomaterialia**, v. 30, p. 26-48, 2016.

FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMON, J. C. Respostas imunes a implantes - uma revisão das implicações para o design de biomateriais imunomoduladores. **Biomaterials**, v.32, p. 6692-6709, 2011.

GABBAI-ARMELIN, P. R.; SOUZA, M. T.; KIDO, H. W.; TIM, C. R.; BOSSINI, P. S.; MAGRI, A. M. P.; FERNANDES, K. R.; PASTOR, F. A. C.; ZANOTTO, E. D.; PARIZOTTO, N. A.; PEITL, O.; RENNO, A. C. M. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 26, p. 1 – 13, 2015.

GONZALEZ; A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.91, n.5, p. 614-620, 2016.

HE, L.; MARNEROS, A. G. Macrophages are essential for the early wound healing response and the formation of a fibrovascular scar. **American Journal of Pathology**, v. 182, p. 2407–2417, 2013.

HENCH, L L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v.295, p. 1014–1017, 2002.

HENCH, L.L. The Story of Bioglass. **Journal of Material Science: Materials in Medicine**, v. 17, p. 467-978, 2006.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N.S.; BOCCACCINI, A. R. Uma revisão da resposta biológica aos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos e vitrocerâmicas. **Biomateriais**, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 2011.

HUANG, J. Design and Development of Ceramics and Glasses. **Biology and Engineering of Stem Cell Niches**, p. 315-329, 2017.

JO, J. H.; LEE, E. J.; SHIN, D. S.; KIM, H. E.; KIM, H. W.; KOH, Y. H.; JANG, J. H. In vitro / *in vivo* biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly (ε-caprolactone) composite materials. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.91, n.1, p. 213-220, 2009.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta Biomaterials**, v.9, p.4457–86, 2013.

KULKARNI, M.; MAZARE, A.; GONGADZE, E.; PERUTKOVA, Š.; KRALJ-IGLIČ, V.; MILOŠEV, I.; SCHMUKI, P.; IGLIČ, A.; MOZETIČ, M. Titanium nanostructures for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 26, n. 6, p. e062002, 2015.

LI, H.; HE, J.; YU, H.; GREEN, C. R.; CHANG, J. Bioglass promotes wound healing by affecting gap junction connexin 43 mediated endothelial cell behavior. **Biomaterials**, v.84, p. 64-75, 2016.

MOURA, D.; SOUZA, M.T.; LIVERANI, L.; RELLA, G.; LUZ, G.M.; MANO, J.F.; Development of a bioactive glass-polymer composite for wound healing applications. **Materials Science and Engineering**, v. 76, p. 224-232, 2017.

MIR, M.; ALI, M. N.; BARAKULLA, A.; GULZAR, A.; ARSHAD, M.; FATIMA, S.; ASAD, M. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. **Progress in Biomaterials**, v.7, p. 1-21, 2018.

NASERI, S.; LEPRY, W.C.; NAZHAT, S.N. Bioactive glasses in wound healing: hope or hype? **Journal of Materials Chemistry**, v. 5, n. 31, p. 6167-6174, 2017.

MARQUES, D. M.; OLIVEIRA, V. C.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; ISSA, J. P. M.; WATANABE, E. Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. **Biofouling**, v. 36, n. 2, p. 234–244, 2020.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização de feridas: Fases e fatores de influência. **Acta Veterinária Brasílica**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

OISHI, J. C.; SOUZA, M. T.; MARTINELLI, A.; BUZINARI, T. C.; ZANOTTO, E. D., RODRIGUES, G. J. Influence of a melt derived bioactive glass (F18) over endothelial cells nitric oxide production. **Materials Letters: X**, v. 10, p. e100071, 2021.

PASSOS, T. F.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; DE SOUZA, C. W. O. Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against *Staphylococcus aureus*. **Materials Science & Engineering: Materials For Biological Applications**, v. 118, p.e 111475, 2021.

PITALUGA, H.; SOUZA, L. T.; ZANOTTO, D.; ROMERO, E. S.; HATTON, P. V. Electrospun F18 Bioactive Glass/PCL-Poly (ε-caprolactone)-Membrane for Guided Tissue Regeneration. **Materials**, v. 11, n. 3, p. e400, 2018.

QUINTERO, F.; POU, J.; COMESAÑA, R.; LUSQUIÑOS, F.; RIVEIRO, A.; MANN, A. B.; JONES, J. R. Laser spinning of bioactive glass nanofibers. **Advanced Functional Materials**, v.19, n.19, p. 3084-3090, 2009.

RAHAMAN, M. N.; DAY, D. E.; BAL, B. S.; FU, Q.; JUNG, S. B.; BONEWALD, L. F.; TOMSIA, A. P. Bioactive glass in tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v.7, v.6, p. 2355-2373, 2011.

RASTELLI; A. N. S.; BARROS, A. C. P.; SOUZA, M. T.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. Remineralization of early caries lesion by application of different materials. **Dental Materials**, v.34, n. 1, e41, 2018.

RECTENWALD, J. E.; MINTER, R. M; ROSENBERG, J. J.; GAINES, G. C; LEE, S., MOLDAWER, L. L. Bioglass® attenuates a proinflammatory response in mouse peritoneal endotoxicosis. **Shock**, v. 17, n. 2, p. 135-138, 2002.

RIVADENEIRA, J.; AUDISIO, M. C.; BOCCACCINI, A. R.; GORUSTOVICH, A. A. In Vitro Antistaphylococcal effects of a novel 45S5 Bioglass/Agar-Gelatin Biocomposite Films. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 02, p. 604-612, 2013.

REIS, B. O.; PRAKKI, A.; STAVROULLAKIS, A. T.; SOUZA, M. T.; SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D.; BRISO, A. L. F., CINTRA, L.; SANTOS, P. Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses. **Journal Of Dentistry**, v.111, p. e103719, 2021.

ROSS, E. A.; BATICH, C. D.; CLAPP, W. L.; SALLUSTIO, J. E.; LEE, N. C. Tissue adhesion to bioactive glass-coated silicone tubing in a rat model of peritoneal dialysis catheters and catheter tunnels. **Kidney international,** v.63, v.2, p. 702-708, 2003.

SADOWSKA, J. M.; GINEBRA, M. P. Inflammation and biomaterials: role of the immune response in bone regeneration by inorganic scaffolds. **Journal of Materials Chemistry**, v.8, n. 41, p. 9404-9427, 2020.

SHANKHWAR, N.; KUMAR, M.; MANDAL, B .B.; ROBI, P.S.; SRINIVASAN, A. Electrospun polyvinyl alcohol-polyvinyl pyrrolidone nanofibrous membranes for interactive wound dressing application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v.27, n.3, p.247-262, 2016.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. **Surgery**, v.39, n.5, p.473-480, 2017.

SIQUEIRA, R .L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: Histórico de uma Vitrocerâmica Brasileira de Elevada Bioatividade, **Química Nova**, v. 34, n. 07, p. 1231-1241, 2011.

SOUZA, M. T.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; BOCCACCINI, A. R. Novel double-layered conduit containing highly bioactive glass fibers for potential nerve guide application. **International Journal of Applied Glass Science**, v. 7, n. 2, p. 183-194, 2016.

SOUZA, M. T.; RENNO, A. C. M.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications. **Translational Materials Research**, v.4, n.1, 2017a.

SOUZA, M. T.; L.A. CAMPANINI, C.R.; CHINAGLIA, O.; PEITL, E.D.; ZANOTTO, C. W. O. Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. **International Journal Antimicrobiotic Agents**, v. 50, p.730–733, 2017b.

SOUZA, M. T.; TANSAZ, S.; ZANOTTO, E. D.; BOCCACCINI, A. R. Bioactive Glass Fiber-Reinforced PGS Matrix Composites for Cartilage Regeneration. **Materials**, v.10, n.1, p. e 83, 2017c.

SU, Y.; RICHMOND, A. Chemokine Regulation of Neutrophil Infiltration of Skin **Wounds Advance Wound Care**, v.4, p.631–640, 2015.

THOMAS, M. V.; PULEO, D. A.; AL-SABBAGH, M. Bioactive Glass Three Decades On. **Journal of Long-Term Effects of Medical Implants**, v.16, n.6, p. 585-597, 2005.

TZEKAO, C.; JYHDING, S.; MIN, Y.; HSU, T. C.; CHOU, M. Y.; HUANG, T. H. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **European Journal of Orthodontics,** v. 29, p.198-203, 2007.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **Journal of International Medicine Research**, v.37, p. e1528, 2009.

VARGAS, G. E.; HARO DURAND, L. A.; CADENA, V.; ROMERO, M.; MESONES, R. V.; MACKOVIC, M.; SPALLEK, S.; SPIECKE, E.; BOCCACCINI, A. R.; GORUSTOVICH, A. A. Effect of nano-sized bioactive glass particles on the angiogenic properties of collagen based composites. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.24, p.1261–1269, 2013.

WILLIAMS, D. F. Challenges with the development of biomaterials for sustainable tissue engineering. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 127, 2019.

WILSON, J.; PIGOTT, G.H.; SCHOEN F.J.; HENCH, L.L. Toxicologia e biocompatibilidade de biovidros. **Journal of Biomedical Materials Research**., v.15, p. 805-817, 1981.

YANEZ, D. A.; LACHER, R. K.; VIDYARTHI, A.; COLEGIO, O. R. The role of macrophages in skin homeostasis**. Pflugers Arch**, v.469, p.455–463, 2017.

ZETAO, Y. X.; CHEN, S. H.; MENGCHAO, S.; GUANQI, L.; ZHUOFAN, C.; JIANG, C.; CHENGTIE, W. Immunomodulatory effects of mesoporous silica nanoparticles on osteogenesis: from nanoimmunotoxicity to nanoimmunotherapy. **Applied Materials Today**, v.10, p.184-193, 2018.

ZHANG, D.; LEPPÄRANTA, O.; MUNUKKA, E.; YLÄNEN, H.; VILJANEN, M. K.; EEROLA, E.; HUPA, M.; HUPA, L. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 93, n. 2, p. 475-483, 2010.

ZHAO, W.; XIE, W.; ZHANG, W.; FU, X.; GAO, W.; LEI, B.; CHEN, X. 3D printing nanoscale bioactive glass scaffolds enhance osteoblast migration and extramembranous osteogenesis through stimulating immunomodulation. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, 2018.

ZHENG, K.; NIU, W.; LEI, B.; BOCCACCINI, A. R. Vidros bioativos imunomoduladores para regeneração tecidual. **Acta Biomaterialia**, v.133, p.168-186, 2021.

ZHU, Y.; MA, Z.; KONG, L.; HE, Y.; CHAN, H.F.; LI, H. Modulation of macrophages by bioactive glass/sodium alginate hydrogel is crucial in skin regeneration enhancement. **Biomaterials,** v.256, 2020.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO 1

Artigo científico a ser enviado para Research in Veterinary Science (https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623070?generatepdf=true). Contudo, o trabalho científico será traduzido para a língua inglesa para submissão. O corpo do texto foi formatado de acordo com as normas de submissão da revista, com exceção das figuras e legendas que foram inseridas no texto.

Avaliação clínica, termográfica e tensiométrica de feridas cutâneas de ratos Wistar tratadas com gel de colágeno associado ao Biovidro F18®

Resumo

O biovidro F18® é um biomaterial que possui propriedades anti-biofime; angiogênica, vasodilatadora e osteocondutora. Objetiva-se com o estudo avaliar os efeitos da associação do gel de colágeno com o biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas de ratos Wistar convencional, por meio das avaliações clínica, termográfica e tensiométrica. Foram utilizados 112 ratos Wistar convencional hígidos, machos adultos. Após a anestesia geral, em cada animal foi efetuada uma ferida de 3 cm de diâmetro na região dorsal. Os ratos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 28 animais, de acordo com o tratamento: G1 - solução salina (0,9%); G2 - pomada cicatrizante (Alantoína: 3 g; óxido de zinco: 3 g); G3 - gel de colágeno; G4 – mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno. A avaliação clínica incluiu a mensuração da massa corpórea, temperatura corpórea (TC) e a avaliação macroscópica da ferida. A avaliação da temperatura superficial das feridas foi realizada pela tomografia infravermelha, a na avaliação tensiométrica foi avaliada a força de tensão e deformidade máxima. As feridas tratadas com solução salina (0,9%) e pomada cicatrizante apresentaram redução significativa da intensidade da crosta ao longo dos momentos. O tecido de granulação apresentou variações significativas entre e intragrupos. A temperatura superficial das feridas tratadas com a solução salina (0,9%) apresentou aumento significativo ao longo dos momentos e entre os grupos. Concluiu-se que o gel de colágeno associado ao biovidro F18® possui efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas que inclui indução de maior perfusão sanguínea devido ao aumento da temperatura superficial do leito da ferida, e aumento da força de tensão.

Palavras chaves: biocerâmica**,** biomaterial, biocompatibilidade, epitelização, pele.

Introdução

As feridas cutâneas de diferentes etiologias são as afecções de maior incidência na rotina clínico-cirúrgica de pequenos animais (DEVRIENDT & ROOSTER, 2017; RISSELADA, 2017). O uso de produtos que garantam menor tempo de cicatrização e tecido cicatricial mais resistente são constantemente pesquisados nas áreas afins, os quais devem ser economicamente viáveis, com efeitos colaterais mínimos e ausência de resíduos contaminantes ao meio ambiente (OLIVEIRA & DIAS 2012; MACIEL et al., 2020; GUSHIKEN et al.; 2021).

Os biovidros são substâncias sintéticas biologicamente inertes, que formam ligações interfaciais com o tecido vivo circundante, determinando uma estrutura de suporte inicial para a organização celular ou estímulo celular no processo de cicatrização, e como resultado da sua degradação, ocorre a liberação de cálcio, sódio, silício e de fosfato, que garantem efeitos benéficos na regeneração tecidual (BOCCACCINI & GOUGH, 2007; KULKARNI et al., 2015; Di CIO e GAUTROT, 2016; SHANKHWAR et al., 2016;MIR et al, 2018; BENETTI et al., 2020). Outras propriedades dos biovidros incluem a osteoindução, angiogênese, ação anti-inflamatória e antibacteriana, modulação celular, entre outras (FRANZ e al., 2011; MOURA et al., 2017; SOUZA et al., 2017a; ZETAO et al., 2018; ZHAO et al., 2018; BENETTI et al., 2020; SADOWSKA e GINEBRA, 2020; ZHU et al., 2020; ZHENG et al., 2021). Entre os diversos biovidros, o biovidro F18® demonstrou ter biocompatibilidade e biofuncionalidade, além da capacidade de ser produzido em diferentes formas (fibras, pós e *scaffolds*) (SOUZA, 2017a).

O biovidro F18® é um biomaterial constituído por dióxido de silício (SiO_2), dióxido de sódio (Na_2O), dióxido de potássio (K_2O), óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO) e pentóxido de fósforo (P_2O_5), e garante cristalização controlada durante tratamentos térmicos prolongados ou repetitivos, diferentemente de outros biovidros (SOUZA et al., 2017a). O biovidro F18® possui atividade anti-biofime, bem como ação angiogênica, vasodilatadora e osteocondutora (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; SOUZA et al., 2017b; PITALUGA et al., 2018; OISHI et al., 2019; ARAÚJO LOPES et al., 2020; ARAÚJO LOPES et al., 2020; MARQUES et al., 2020; PASSOS et al., 2021). Pesquisas relativas ao uso do biovidro F18® em lesões cutâneas são escassas na literatura (SOUZA et al., 2017a). Estudo piloto realizado por Souza et al. (2017a), com feridas por queimaduras em ratos, demonstrou efeitos benéficos do biovidro F18®, que incluíram cicatrização em menor tempo; estímulo na produção de fibroblastos e queratinócitos e tecido conjuntivo; e aumento do fator de crescimento endotelial (VEGF).

Nesse contexto, objetiva-se com o estudo avaliar os efeitos do gel de colágeno associado ao biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas de ratos Wistar convencional, por meio das avaliações clínica, termográfica e tensiométrica. A hipótese é que o biovidro F18® demonstre efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas.

Material e métodos

Animais e ambiente de experimentação

A metodologia do presente estudo foi analisada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu, São Paulo (SP) (CEUA – n°0074/2021).

O estudo foi realizado entre os meses de agosto e setembro, na cidade de Botucatu, São Paulo (Coordenadas geográficas: Latitude: 22°53′08″ S; Longitude: 48°26′42″ O; Altitude do nível do mar: 837 metros).

O tamanho amostral foi estimado utilizando a função “power.t.test” do pacote “*stats*”, utilizando o *software* R no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (Version 1.0.143 – © 2009-2016, RStudio, Inc.). Foi estabelecido poder e nível de significância para teste de hipótese de duas amostras e bicaudal respectivamente de 0,80 e 0,05, e de acordo com o maior tamanho amostral apresentado pela análise, levando em conta os limites estabelecidos, estimou-se que o tamanho da amostra seria de quatro grupos de 28 animais. Assim, foram utilizados 112 *Rattus novergicus* (ratos Wistar), convencional, machos hígidos, com idade entre oito a 10 semanas, com massa corpórea

entre 365 e 370 g, provenientes do Biotério Central da Unesp, Botucatu. Estes foram previamente submetidos a vermifugação com ivermectina (1%), e diluição de 0,1 mL diluída em 100 mL de água potável, fornecido em bebedouro coletivo, a cada sete dias, durante 14 dias (LIMA et al., 2019).

A ambientalização de 10 dias foi realizada no biotério da FMVZ, Unesp, Botucatu (SP) e, neste período os animais permaneceram em grupos de quatro ratos em caixas plásticas de polisulfona (dimensões: 497 mm de comprimento, 341 mm de largura e 265 mm de altura). Após a ambientalização, os ratos foram alocados individualmente em caixas de polisulfona (dimensões: 385 mm de comprimento, 251 mm de largura e 240 mm de altura) com papeis sulfite amassados como enriquecimento ambiental. As caixas foram higienizadas com água e sabão neutro a cada 48 horas. O local experimental manteve-se climatizado, com controle de temperatura (23 ± 2º C) e umidade variando entre 40 e 60%, e ciclos de 12 horas claro/escuro, durante todo o período do estudo. Na fase de ambientalização e experimental, os ratos receberam água filtrada e ração comercial específica para ratos *ad libitum*.

Indução das feridas cutâneas

Para a realização das feridas cutâneas, os animais foram submetidos à pré-medicação anestésica prévia com sulfato de morfina (2 mg/kg, SC) e submetidos à anestesia com associação de xilazina 2% (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina 1% (75 mg/kg), por via intraperitoneal. A região dorsal entre a atlanto-occipital e a base da cauda, foi submetida à epilação, e em seguida, desinfectada com clorexidina alcoólica (0,5%).

Todos os animais foram submetidos à confecção cirúrgica de feridas de 3 cm de diâmetro, com auxílio de um *punch* metálico estéril, no terço médio entre a distância da região atlanto-occipital e base da cauda. A pele e a gordura subcutânea foram removidas com auxílio de tesoura Metzembaum e pinça anatômica estéreis, preservando a fáscia muscular.

Para o controle da dor pós-operatória foi administrado o cloridrato de tramadol (10 mg/kg, SC) a cada 12 horas, durante 48 horas. As feridas permaneceram sem curativo, e os animais sem colar elisabetano. Durante todo o período de estudo, não foi administrado antibiótico ou anti-inflamatório.

Procedimento experimental

Os ratos foram divididos aleatoriamente, usando o programa Randomizer® (versão 2021), em quatro grupos de 28 animais, de acordo com o tratamento: G1 - solução salina (0,9%); G2 - pomada cicatrizante (alantoína: 3 g; óxido de zinco: 3 g); G3 - gel de colágeno; G4 – mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno. Os tratamentos iniciaram imediatamente à confecção das feridas, e teve duração de 21 dias.

Previamente aos tratamentos, as feridas foram limpas superficialmente, por meio de gaze estéril umedecida em solução salina (0,9%) sem a remoção da crosta. A solução salina (0,9%) (0,1 mL) (G1) e 0,1 g da pomada cicatrizante (G2) foram aplicadas a cada 24 horas, utilizando uma seringa de 1 mL e espátula estéril, respectivamente. O gel de colágeno (2 mL) (G3) e a uma mistura de 200 mg de pó de biovidro F18® e 2 mL de gel de colágeno (proporção de 1:10) (G4), foram aplicadas utilizando seringas de 3 mL estéreis, a cada 72 horas (SOUZA et al., 2017a) (Figura 1). A ingestão de alimento e água foi avaliada a cada 24 horas, por meio da quantidade de ração e água fornecidas no dia anterior

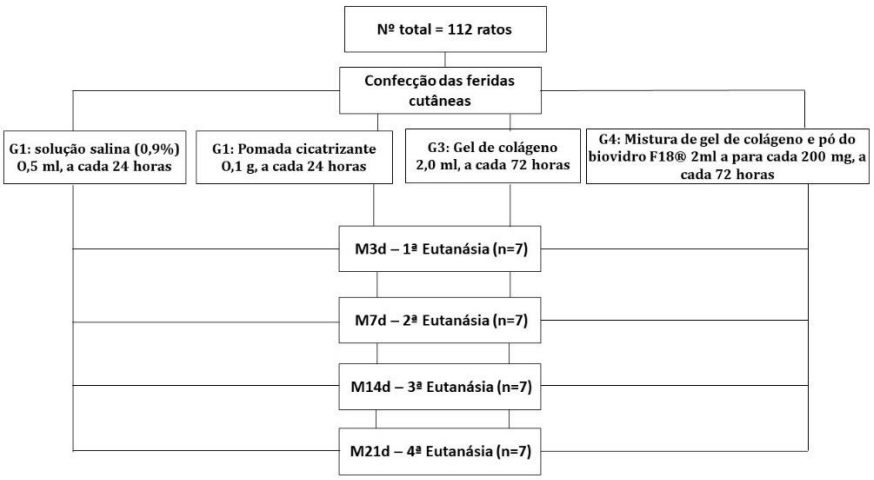

Figura 1. Modelo esquemático do procedimento experimental. Legenda: G1 – Grupo 1; G2 – Grupo 2, G3 – Grupo 3, G4 – Grupo 4; M3d – três dias após o início dos tratamentos; M7d - sete dias após o início dos tratamentos; M14d - 14 dias após o início dos tratamentos; M21d - 21 dias após o início dos tratamentos.

Aquisição do gel de colágeno e o pó do vidro bioativo F18®

O gel de colágeno e o biovidro na F18® na forma de pó, foram disponibilizados pelo Laboratório de Materiais Vítreos, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (SP).

O gel de colágeno (Figura 2A) foi produzido por meio da mistura de glicerina e água com colágeno (1:5), com proporção em volume de glicerina e água de 4:3. A composição do biovidro F18® incluiu os seguintes compostos: SiO_2-Na_2O-K_2O-MgO-CaO-P_2O_5 (patente BR10 INPI 20130209619). A preparação do biovidro na forma de pó foi de acordo com Souza et al. (2017a), utilizando uma granulometria de 49 μm de diâmetro (Figura 2B). As mudanças do pH ao longo do tempo foram verificadas usando solução salina tampão fosfato com relação peso/volume de 50 mg/mL (SOUZA et al., 2017a).

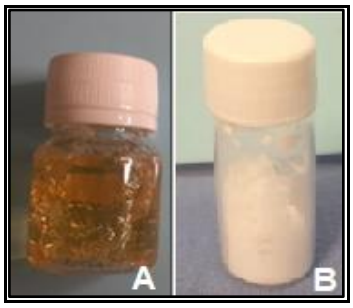

Figura 2. Gel de colágeno (A) e biovidro F18® em forma de pó.

Avaliação clínica

As variáveis clínicas avaliadas incluíram a mensuração da massa corpórea (MC), aferição da temperatura corpórea (TC) e a avaliação macroscópica da ferida.

Para a mensuração da MC foi utilizada uma balança digital de bancada com divisão entre 2,0 g e 6,0 kg (Toledo Prix3 FIT®).

A TC aferida na região da carúncula lacrimal direita, por meio da termografia infravermelha (Figura 3). A avaliação termográfica foi realizada no biotério experimental (FMVZ, Unesp, Botucatu), com o mesmo padrão de temperatura e umidade, ausência de janelas e iluminação com lâmpada de led. Para a aferição da temperatura superficial da região da carúncula lacrimal, os ratos foram retirados da caixa, e colocados dentro de um recipiente de plástico (20 x 20 cm), durante 20 minutos, com o objetivo de ambientalização. As aferições foram realizadas no mesmo horário (07:00 horas), e pelo mesmo avaliador com experiência em exames termográficos. Para tal, os animais foram contidos fisicamente, e numa distância de 1 metro da carúncula lacrimal (ângulo de 90º), foram realizadas duas imagens com recurso do foco automático da câmera de termografia infravermelha (FLIR Model E4®), com sistema óptico padrão. Para calibrar a câmera com a temperatura de refletividade, as imagens foram realizadas com a emissividade de 0,97. Apenas a melhor imagem nítida foi usada para a aferição da temperatura superficial da região. Utilizou-se *software* específico (Flir Systems® v.1.2 software) para análise das imagens termográficas, calculando-se a temperatura máxima e média dentro de uma área retangular traçada ao redor do olho, incluindo o globo ocular, e aproximadamente 1 cm ao redor das pálpebras.

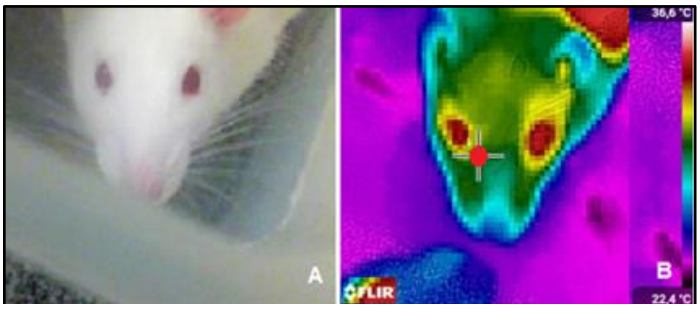

Figura 3. Imagem digitalizada da região da do crânio do rato Wistar (A), e a respectiva imagem termográfica, ilustrando a região da carúncula lacrimal direita (ponto vermelho) submetida à aferição da temperatura superficial usada como TC por meio da termografia infravermelha (FLIR Model E4®)

As variáveis MC e TC foram analisadas nos seguintes momentos: 10 minutos antes da indução anestésica e confecção das feridas (M_0), três dias (M_{3d}), sete dias (M_{7d}), 14 dias (M_{14d}) e 21 dias (M_{21d}) após a indução das feridas.

A avaliação macroscópica foi realizada pelo mesmo avaliador e no mesmo horário (07:30 horas). As feridas foram avaliadas macroscopicamente pela presença ou ausência de crosta, tecido de granulação e contaminação ou infecção.

Para a realização da análise estatística, as variáveis crosta e tecido de granulação foram classificadas com um escore semiquantitativo, de acordo com a sua intensidade em: ausente (grau 1), leve (grau 2), moderada (grau 3) e intensa (grau 4). A contaminação ou infecção foi classificada com ausente (grau 1) e presente (grau 2). A avaliações foram realizadas nos momentos: M_{3d}, M_{7d}, M_{14d} e M_{21d}.

Avaliação termográfica infravermelha da ferida cutânea

A avaliação da temperatura superficial das feridas cutâneas seguiu a mesma metodologia da avaliação termográfica infravermelha da região da carúncula lacrimal direita. Entretanto, os ratos contidos fisicamente em decúbito ventral, e as imagens

termográficas realizadas a uma distância de 1 metro e perpendicularmente à área da ferida (Figura 4).

As avaliações realizadas nos momentos: 15 minutos após à indução das feridas (M_{15min}), M_{3d}, M_{7d}, M_{14d} e M_{21d}. As aferições foram realizadas no mesmo horário (08:00 horas), e pelo mesmo avaliador com experiência em exames termográficos.

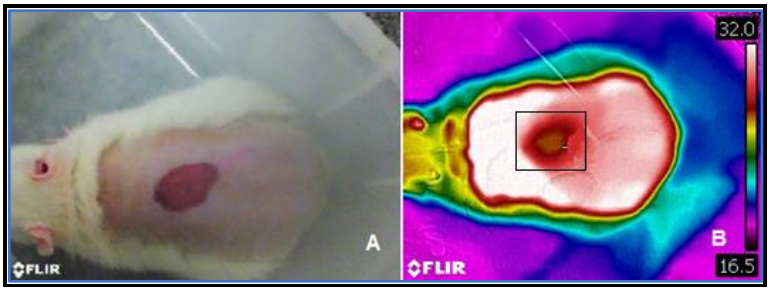

Figura 4. Imagem digitalizada da região dorsal da ferida cutânea no rato Wistar (A), e a respectiva imagem termográfica ilustrando a ferida submetida à aferição da temperatura superficial (retângulo preto) pela termografia infravermelha (FLIR® Model E4)

Avaliação tensiométrica

Cada grupo foi dividido aleatoriamente, usando o programa Randomizer® (versão 2021), em quatro subgrupos de sete ratos, e submetidos à eutanásia com tiopental sódico (120 mg/kg) por via intraperitoneal (HORN et al. 2013), nos seguintes momentos: M_{3d}, M_{7d}, M_{14d} e M_{21d}. Após às eutanásias, foram realizadas biopsias excisionais das feridas, com margem de 3 cm de pele íntegra em torno da lesão, e profundidade até a fáscia muscular. Em seguida, para a avaliação da força tensil máxima ou força de ruptura (FTM) e da deformidade máxima (DM), foram confeccionados espécimes contendo a ferida, e pelo menos 2 cm de tecido hígido em cada extremidade (Figura 5A).

As amostras foram fixadas numa máquina de teste mecânico universal (EMiC®) por meio de prensas, e com distância de 1,0 cm de cada lado da extremidade da amostra, deixando uma área livre de 1,0 cm da ferida. O ensaio mecânico foi realizado no sentido vertical, onde a porção inferior do equipamento era imóvel e a porção superior móvel (Figura 5B). Foi utilizada uma velocidade de tração constante de 20 mm/segundo e célula de carga na faixa de 1 a 50 N com uma resolução de leitura 0,01 N, e os valores da FTM e DM foram avaliados no *software* especifico (Mtest®). As avaliações tensiométricas foram realizadas por um profissional experiente em testes mecânicos para biomateriais, e nos seguintes momentos: M_{3d}, M_{7d} e M_{14d}.

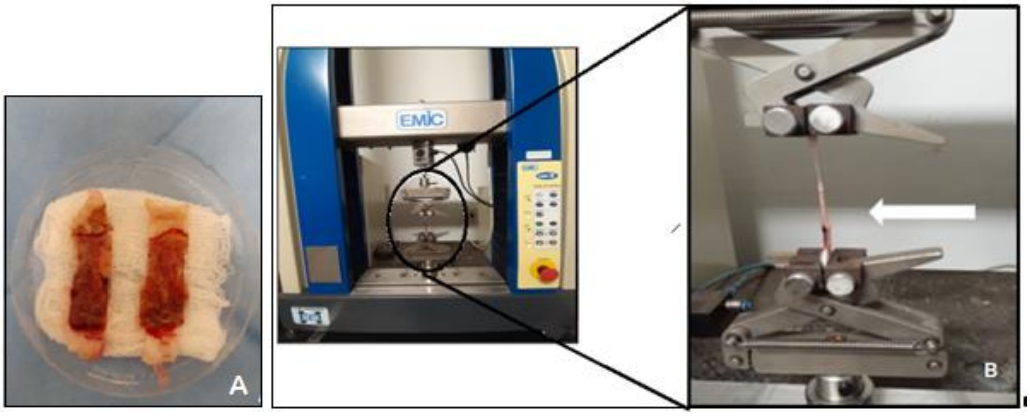

Figura 5. Imagem ilustrando a espécime da ferida para a avaliação tensiométrica fixada na máquina de teste mecânico universal (EMiC®) (seta branca) por meio de prensas, e com distância de 1,0 cm de cada lado da extremidade da amostra, deixando uma área livre de 1,0 cm da ferida .

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *software* R (Version 4.2.0 (2022-04-22). A normalidade das variáveis registradas em cada momento e grupo foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk e, também, por meio dos boxplot. Para todas as análises foi considerada diferença significativa quando o *p*-valor foi menor que 0,05.

Para comparação entre os grupos em cada momento, e para comparação de momentos por grupo utilizou-se a análise de variância para amostras independentes (ANOVA One way) para dados normais, e teste de Kruskal-Wallis (função “kruskal” do pacote “car”) para variáveis fora das condições da normalidade. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Para comparação da massa corpórea no momento de indução entre os momentos da eutanásia para cada grupo utilizou-se teste de Friedmann (pacote "PMCMRplus"). Diferenças consideradas significativas com $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação clínica geral

Não foi identificada redução da ingestão de alimentos e água, diarreia ou óbitos, e nem variação significativa com relação a MC e TC (Tabela 1 e 2).

Avaliação macroscópica

Variável pus: não foram identificadas diferenças significativas em relação à presença ou ausência de pus (Tabela 3).

Variável crosta: as feridas tratadas com solução salina (0,9%) e com a pomada cicatrizante apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) da intensidade da crosta entre os momentos: M_{3d} vs M_{21d} e M_{7d} vs M_{21d} (Tabela 3). Na avaliação intergrupo, as feridas tratadas com a solução salina (0,9%) demonstraram intensidade de crosta significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação as feridas tratadas com o gel de colágeno) e com a sua mistura com o pó do biovidro F18®, em todos momentos, exceto 21 dias após o início do tratamento (Tabela 3).

Variável tecido de granulação: foi identificado aumento significativo ($p < 0,05$) (ausente → moderado) nas feridas tratadas com a pomada cicatrizante, entre M_{3d} vs M_{14d}, M_{3d} vs M_{21d}, M_{7d} vs M_{14d} e M_{7d} vs M_{21d}. As feridas tratadas com o gel de colágeno demonstraram diminuição significativa ($p < 0,05$) (intenso → leve ou ausente), entre M_{3d} e os demais momentos avaliados (Tabela 3). No grupo tratado com a mistura do gel de colágeno e o pó do biovidro F18®, foi identificado aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) (ausente → moderado) entre os momentos M_{3d} vs M_{7d}, e diminuição significativa ($p < 0,05$) (moderado → ausente) entre M_{7d} vs M_{21d} (Tabela 3). Na avaliação intergrupo, as feridas cutâneas tratadas com solução salina (0,9%) e com gel de colágeno apresentaram intensidade de tecido de granulação significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação as feridas tratadas com a pomada cicatrizante e a mistura de gel de colágeno e biovidro F18®, três dias após início dos tratamentos. As feridas tratadas com solução salina (0,9%). Após sete dias de avaliação, as lesões tratadas com solução salina (0,9%) e mistura do gel de colágeno e biovidro F18® apresentaram intensidade de tecido de granulação significativamente maiores ($p < 0,05$) que as lesões tratadas com a pomada cicatrizante (Tabela 3). Finalizando, as feridas cutâneas tratadas com solução salina (0,9%) e pomada cicatrizante apresentaram intensidade do tecido de granulação estatisticamente maiores ($p < 0,05$) (leve ou moderado) em relação aos grupos tratados com o gel de colágeno e sua mistura com biovidro F18®, que não demonstraram tecido de granulação (Tabela 3). A evolução do processo cicatricial etá apresentada na tabela 4.

Avaliação termográfica infravermelha e tensiométrica das feridas cutâneas

Em relação aos valores da temperatura superficial do leito das feridas cutâneas, aferidas pela termografia infravermelha, foi identificado aumento significativo ($p < 0,05$) nas feridas tratadas com a solução salina (0,9%) entre os momentos: M_{3d} vs M_{7d} (Tabela 5). Na avaliação intergrupos, foi identificado que três dias após início dos tratamentos, as temperaturas foram significativamente menores ($p < 0,05$) nas feridas tratadas com a solução salina (0,9%) quando comparadas com os demais grupos (Tabela 5). Na avaliação tensiométrica não foram identificadas variações significativas na avaliação inter e intragrupo referente à FTM e a DM (Tabela 6).

Tabela 1. Média (Média) e desvio-padrão (DP) da massa corpórea (MC) (gramas) de ratos Wistar com as feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: 10 minutos antes da indução anestésica e confecção das feridas (M0), três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Grupos	M_0 (Média ± DP)	M_{3d} (Média ± DP)	M_{7d} (Média ± DP)	M_{14d} (Média ± DP)	M_{21d} (Média ± DP)
G1	$410{,}30 \pm 52{,}15^{Aa}$	$408{,}57 \pm 41{,}99^{Aa}$	$405{,}57 \pm 68{,}00^{Aa}$	$425{,}29 \pm 48{,}52^{Aa}$	$435{,}29 \pm 41{,}50^{Aa}$
G2	$409{,}36 \pm 41{,}84^{Aa}$	$374{,}00 \pm 32{,}29^{Aa}$	$361{,}71 \pm 19{,}56^{Aa}$	$381{,}57 \pm 37{,}03^{Aa}$	$411{,}29 \pm 31{,}73^{Aa}$
G3	$397{,}54 \pm 41{,}35^{Aa}$	$399{,}14 \pm 31{,}93^{Aa}$	$429{,}71 \pm 29{,}73^{Aa}$	$391{,}38 \pm 32{,}23^{Aa}$	$397{,}33 \pm 26{,}14^{Aa}$
G4	$367{,}96 \pm 37{,}41^{Aa}$	$368{,}43 \pm 43{,}95^{Aa}$	$361{,}86 \pm 21{,}41^{Aa}$	$373{,}14 \pm 40{,}189^{Aa}$	$380{,}86 \pm 34{,}41^{Aa}$

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna foram significativamente diferentes pelo teste de ANOVA ($p < 0{,}05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha a foram significativamente diferentes pelo teste ANOVA ($p < 0{,}05$).

Tabela 2. Média (Média) e desvio-padrão (DP) dos valores da temperatura corporal (TC) (º C), aferida na região da carúncula lacrimal direita, por meio da termografia infravermelha, de ratos Wistar com as feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: 10 minutos antes da indução anestésica e confecção das feridas (M0), três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Grupos	M_0 (Média ± DP)	M_{3d} (Média ± DP)	M_{7d} (Média ± DP)	M_{14d} (Média ± DP)	M_{21d} (Média ± DP)
G1	$33{,}54 \pm 0{,}81^{Aa}$	$33{,}30 \pm 0{,}95^{Aa}$	$33{,}16 \pm 0{,}36^{Aa}$	$33{,}16 \pm 0{,}36^{Aa}$	$33{,}54 \pm 0{,}81^{Aa}$
G2	$33{,}54 \pm 0{,}54^{Aa}$	$32{,}81 \pm 0{,}61^{Aa}$	$32{,}91 \pm 1{,}21^{Aa}$	$32{,}64 \pm 1{,}35^{Aa}$	$33{,}54 \pm 0{,}54^{Aa}$
G3	$33{,}91 \pm 1{,}42^{Aa}$	$29{,}44 \pm 1{,}30^{Aa}$	$28{,}51 \pm 1{,}26^{Aa}$	$28{,}59 \pm 1{,}26^{Aa}$	$33{,}92 \pm 1{,}42^{Aa}$
G4	$33{,}57 \pm 0{,}80^{Aa}$	$34{,}09 \pm 0{,}99^{Aa}$	$34{,}20 \pm 0{,}78^{Aa}$	$33{,}20 \pm 0{,}43^{Aa}$	$33{,}57 \pm 0{,}80^{Aa}$

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna foram significativamente diferentes pelo teste de ANOVA ($p < 0{,}05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha a foram significativamente diferentes pelo teste ANOVA ($p < 0{,}05$).

Tabela 3. Variáveis macroscópicas (crosta, tecido de granulação e pus) das feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína, gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Variáveis/Grupos	M_{3d}	M_{7d}	M_{14d}	M_{21d}
Crosta				
G1	3^{ABa}	3^{Aa}	2^{ABab}	1^{Ab}
G2	4^{Aa}	4^{Aa}	3^{Bab}	2^{Ab}
G3	2^{Ba}	1^{Ba}	1^{Aa}	1^{Aa}
G4	3^{ABa}	3^{Aa}	1^{Ab}	1^{Ab}
Tecido de granulação				
G1	3^{Aa}	3^{Aa}	2^{Aa}	2^{ABa}
G2	1^{Ba}	1^{Ba}	3^{Ab}	3^{Aab}
G3	4^{Aa}	2^{ABb}	2^{Ab}	2^{Bb}
G4	1^{Bb}	3^{Aa}	2^{Aab}	1^{Bb}
Pus				
G1	2^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}
G2	2^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}
G3	2^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}
G4	1^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}	1^{Aa}

Classificações seguidas por diferentes letras maiúsculas na mesma coluna foram significativamente diferentes pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma linha foram significativamente diferentes pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).
Classificação das variáveis crosta e tecido de granulação: ausente (grau 1), leve (grau 2), moderada (grau 3) e intensa (grau 4). Classificação da variável pus: ausente e presente.

Tabela 4. Figura 6. Evolução cicatricial macroscópica das feridas ao longo do período do estudo.

Detalhes das imagens digitalizadas: Altura = 1600 pixels; Largura = 1200 pixels; Resolução horizontal e vertical = 96 dpi; Intensidade de bits = 24) (Sony®, modelo Cyber-shot DSC-WX50, resolução de 16,2 megapixels, imagem formato JPEG®). Legenda: G1 – feridas tratadas com solução salina (0,9%); G2 – feridas tratadas com pomada cicatrizante; G3 – feridas tratadas com gel de colágeno; G4 – feridas tratadas a mistura do gel de colágeno e pó de biovidro F18®; M_{15min} - 15 minutos após confecção das feridas; M_{3d} - três dias após início dos tratamentos; M_{7d} - sete dias após início dos tratamentos; M_{14d} – 14 dias após início dos tratamentos; M_{21d} - 21 dias após início dos tratamentos.

Tabela 4. Média (Média) e desvio-padrão (DP) dos valores da temperatura superficial do leito da ferida cutânea (º C), aferida por meio da termografia infravermelha, de ratos com as feridas tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: 15 minutos (M15min), três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Grupos	M_{15min} (Média ± DP)	M_{3d} (Média ± DP)	M_{7d} (Média ± DP)	M_{14d} (Média ± DP)	M_{21d} (Média ± DP)
G1	$30,51 \pm 0,31^{Aa}$	$30,66 \pm 0,36^{Aa}$	$33,10 \pm 0,69^{Ab}$	$32,00 \pm 0,10^{Aab}$	$32,00 \pm 0,14^{Aab}$
G2	$33,24 \pm 0,24^{Aa}$	$33,47 \pm 0,17^{Ba}$	$32,07 \pm 0,17^{Aa}$	$32,56 \pm 0,56^{Aa}$	$32,94 \pm 0,79^{Aa}$
G3	$33,11 \pm 0,41^{Aa}$	$33,38 \pm 0,46^{Ba}$	$29,10 \pm 0,12^{Aa}$	$28,61 \pm 0,12^{Aa}$	$28,23 \pm 0,25^{Aa}$
G4	$33,57 \pm 0,80^{Aa}$	$34,40 \pm 0,66^{Ba}$	$34,11 \pm 0,11^{Aa}$	$34,60 \pm 0,12^{Aa}$	$33,07 \pm 0,14^{Aa}$

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna foram significativamente diferentes pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha a foram significativamente diferentes pelo teste ANOVA ($p < 0,05$

Tabela 6. Média (Média) e desvio-padrão (DP) da força tensil máxima (FTM) e deformação máxima (DM) de feridas cutâneas de ratos Wistar, tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Grupos/Variáveis/	M_{3d} (Média ± DP)	M_{7d} (Média ± DP)	M_{14d} (Média ± DP)
FTM (N)			
G1	$0,29 \pm 0,21^{Aa}$	$0,22 \pm 0,19^{Aa}$	$0,19 \pm 0,15^{Aa}$
G2	$0,17 \pm 0,14^{Aa}$	$0,10 \pm 0,09^{Aa}$	$0,17 \pm 0,08^{Aa}$
G3	$0,19 \pm 0,18^{Aa}$	$0,22 \pm 0,24^{Aa}$	$0,17 \pm 0,11^{Aa}$
G4	$0,12 \pm 0,14^{Aa}$	$0,17 \pm 0,09^{Aa}$	$0,50 \pm 0,14^{Aa}$
DM (mm)			
G1	$23,93 \pm 18,66^{Aa}$	$23,19 \pm 21,66^{Aa}$	$38,40 \pm 31,90^{Aa}$
G2	$20,66 \pm 14,56^{Aa}$	$22,30 \pm 18,41^{Aa}$	$24,69 \pm 17,19^{Aa}$
G3	$31,81 \pm 22,32^{Aa}$	$46,80 \pm 18,08^{Aa}$	$27,68 \pm 16,14^{Aa}$
G4	$33,85 \pm 25,23^{Aa}$	$32,01 \pm 26,15^{Aa}$	$16,70 \pm 21,87^{Aa}$

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna foram significativamente diferentes pelo teste de ANOVA ($p < 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha a foram significativamente diferentes pelo teste ANOVA ($p < 0,05$).

Discussão

O estudo teve por objetivo avaliar a ação cicatrizante do gel de colágeno associado ao vidro bioativo F18® em feridas cutâneas não contaminadas e induzidas cirurgicamente em ratos Wistar, visto que estudos com relação ao uso desse biovidro em feridas cutâneas são escassos na literatura (SOUZA et al., 2017a). De acordo com os autores do presente estudo, até o momento, não se tem conhecimento de estudos relacionados com o uso do biovidro F18® em feridas cutâneas não contaminadas, comprovando o ineditismo do presente estudo. Contudo, Souza et al. (2017b), Souza et al. (2017c), Oishi et al. (2019), Araújo Lopes et al. (2020), Marques et al. (2020), Passos et al. (2021), demonstraram a ação anti-biofime, bactericida, angiogênica e vasodilatadora do biovidro F18®. Paralelamente, a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo*, e capacidade em estimular a formação de tecido ósseo e regeneração articular foram comprovados em diversos estudo (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; PITALUGA et al., 2018; ARAÚJO LOPES et al., 2020).

Estudos utilizando biovidros à base de hidroxiapatita ou cálcio na cicatrização de feridas, foram realizados por diferentes autores, e foi identificado indução e proliferação mais rápidas do tecido conjuntivo em feridas de origem diabética em ratos (MAJEED & AL NAIMI, 2012); e o cálcio foi associado com a estimulação da captação dos fibroblastos e, consequentemente, induzindo a contratura do tecido colagenoso em feridas cutâneas de camundongos (KAWAI et al., 2011). Em estudo piloto realizado por Souza et al. (20017a), com ratos Wistar submetidos a lesão cutânea do tipo queimaduras de terceiro grau e tratadas com o biovidro F18®, foi evidenciado tudo que precisa para uma reparação tecidual mais rápida e com maior produção de fibroblastos, queratinócitos e tecido conjuntivo; e aumento do VEGF.

A hipótese inicial foi alcançada, visto que as feridas tratadas com o biovidro F18® demonstraram valores maiores da sua temperatura superficial, significando presença de vasodilatação induzida pelo biovidro F18®; e aumento na resistência à ruptura, atingindo valores maiores em relação aos demais grupos.

A evidência que o biovidro F18® poderia agir de forma benéfica na cicatrização de feridas cutâneas foi associada à sua composição (SiO_2–Na_2O–K_2O–MgO–CaO–P_2O_5); alta reatividade tecidual; e melhora da biointeração, estimulando a proliferação celular e a regeneração tecidual de tecidos duros e moles (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; SOUZA et al., 2017a). A biocompatibilidade o biovidro F18® foi avaliada *in vivo* por meio de implantação subcutânea em ratos, e posterior avaliação durante 60 dias (GABBAI-ARMELIN et al., 2015). Histologicamente, o biovidro F18® demonstrou efeitos benéficos teciduais, com relação a espessura e qualidade da cápsula, e qualidade da interface biovidro-tecido; e não foi identificada reação de rejeição, sendo que o material degradado foi bioabsorvido (GABBAI-ARMELIN et al., 2015).

No presente estudo, não foi criado nenhum grupo experimental que seria usado somente o pó do bioativo F18® nas feridas, visto que devido à sua composição química ocorre sensação de ardência durante o contato entre o biovidro e a mucosa (SOUZA et al., 2017a).

A escolha da epilação para a remoção dos pêlos foi devido a indução mínima de lesão cutânea quando comparada ao uso de aparelhos laminados (GARROS & ARRUDA, 2006). As feridas permaneceram sem curativo, e os animais sem colar elisabetano, para evitar possível condição de estresse e, consequente, liberação de cortisol. A interferência negativa do cortisol na cicatrização está associada com a persistência da fase inflamatória, visto que o cortisol induz a vasoconstrição periférica, prejudicando a perfusão dos tecidos; diminui a ação leucocitária e a produção de colágeno; e inibe a produção de

queratinócitos, prejudicando a epitelização das bordas da ferida (GUO & DIPIETRO, 2010).

A mistura do gel de colágeno e pó biovidro F18® demonstrou ser de fácil aplicação e evitou o desperdício, sendo associado ao seu aspecto viscoso, ao contrário da pomada cicatrizante, que foi de difícil aplicação devido ao seu aspecto pastoso, e causando maior estresse aos animais quando tratados.

A ausência de variação significativa da massa corpórea diferiu com estudo relacionado com a avaliação da cicatrização em feridas cutâneas não contaminadas em ratos Wistar (MACIEL et al., 2020). Segundo Finnerty et al. (2013), o estresse do procedimento cirúrgico é caracterizado por um processo catabólico transitório que induzem a diminuição de massa corpórea.

A temperatura corporal aferida pela termografia infravermelha na carúncula lacrimal, não demonstrou variação significativa, e foi associado com a ausência de infecção das feridas (ROTH et al., 2006). A aferição da temperatura corporal na região da carúncula lacrimal, por meio da termografia infravermelha, foi associada com a concentração elevada de capilares na região, que são controladas pelo sistema nervoso autônomo na dissipação de calor corporal (YARNELL et al., 2013). Esse método de aferição garante uma avaliação sem contato com o animal, diminuindo a probabilidade de indução de estresse (ZANGHI, 2016). Zanghi (2016) correlacionou a temperatura da região da carúncula lacrimal e da orelha, por meio da termografia infravermelha, com a temperatura retal, como método de referência e alternativa para aferição da TC. O autor identificou que a temperatura superficial da carúncula lacrimal, aferida pela termografia infravermelha, teve uma correlação positiva com a temperatura aferida por via retal.

No início do tratamento, foi identificado presença de pus em todos os grupos excetuando o grupo tratado com a mistura do gel de colágeno e o biovidro F18®, e após três dias de tratamento não foi identificado quaisquer sinais de contaminação. Essa contaminação inicial foi associada com a proliferação da microbiota cutânea, anteriormente em simbiose. Salientou-se que o biovidro F18® possui ação bactericida, associada à ao aumento do pH local, alteração da pressão osmótica e forças eletrostáticas (SOUZA et al., 2017a; SOUZA et al., 2017b; ARAÚJO LOPES et al., 2020; MARQUES et al., 2020; PASSOS et al., 2021).

As feridas tratadas com a solução salina (0,9%) demonstraram intensidade de crosta significativamente maiores em relação as feridas tratadas com o gel de colágeno e sua mistura com o pó do biovidro F18®, em todos momentos, exceto 21 dias após o início do tratamento. Para além da crosta ser formada por restos celulares, ela garante proteção à ferida, e foi postulada que o processo de fibroplasia pode ser estimulado pela presença da crosta (GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019).

A ausência de tecido de granulação no grupo tratado com a mistura do gel de colágeno e o biovidro F18®, identificada 21 dias após os tratamentos, foi relacionada com as propriedades cicatrizantes do biovidro F18®, que inclui o aumento dos fatores de crescimento responsáveis pela proliferação celular e vasodilatação (SOUZA et al., 2017a; OISHI et al., 2019). Esse fato determinou um efeito benéfico do biovidro F18® na cicatrização das feridas cutâneas.

A avaliação da temperatura superficial do leito da ferida tem por objetivo identificar alterações vasculares e respostas inflamatórias, visto que temperaturas elevadas podem significar presença de vasodilatação e maior perfusão sanguínea (FITZGERALD & BERENTSONSHAW, 2012; GUIMARÃES et al., 2020), podendo ser uma alternativa para o laser Doppler. No presente estudo, os valores significativamente menores da temperatura superficial do leito das feridas tratadas com a solução salina (0,9%) quando comparadas com os demais grupos, três dias após a indução

das feridas, indicou a menor perfusão sanguínea nas feridas. Salientou-se que esse período correspondeu com a fase inflamatória, que é caracterizada pela vasodilatação e maior perfusão sanguínea (OLIVEIRA e DIAS, 201; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; RODRIGUES et al., 2019). Entretanto, as feridas tratadas com a mistura do gel de colágeno e o biovidro F18®, demonstraram valores maiores de sua temperatura superficial, porém, sem diferença significativa, provavelmente devido ao estimulo na liberação de óxido nítrico (NO) (vasodilatador endógeno) induzido pelo biovidro F18® (OISHI et al., 2019). Diferentemente, Gillette et al. (2001), avaliaram a perfusão sanguínea de feridas não contaminadas em cães submetidas ao tratamento com biomaterial cerâmico, por meio do laser Doppler, e não identificaram diferenças significativas entre as perfusões sanguíneas do grupo experimental e controle, três e cinco dias após a indução das feridas.

A ausência de variação significativa com relação à tensiometria foi coerente com a literatura (GILLETTE et al., 2001). Embora nenhuma diferença significativa tenha sido identificada nos valores da força de tensão e deformidade máxima, ocorreu um aumento na resistência à ruptura nas feridas tratadas com o biovidro F18®, atingindo valores maiores em relação aos demais grupos, e uma diminuição na deformidade máxima. A autora acredita que a mistura do gel de colágeno e o pó do biovidro F18®, pode influenciar de forma benéfica no aumento da força de tensão.

Conclusões

De acordo com a metodologia usada no presente estudo, conclui-se que o biovidro F18® possui efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar, que inclui indução de maior perfusão sanguínea devido ao aumento da temperatura superficial do leito da ferida, e aumento da força de tensão.

Referências bibliográficas

ARAÚJO LOPES, J. M.; BENETTI, F.; REZENDE, G. C., SOUZA, M. T.; CONTI, L. C.; ERVOLINO, E.; JACINTO, R. C.; ZANOTTO, E. D.; CINTRA, L. T. A. Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. International Endodontic Journal, v.53, n. 11, p. 1494–1505, 2020.

BENETTI, F.; BUENO, C. R. E.; REIS-PRADO, A. H. D.; SOUZA, M. T.; GOTO, J.; CAMARGO, J. M. P. D.; CINTRA, L. T. A. Biocompatibilidade, biomineralização e maturação do colágeno pelos materiais RTR®, Bioglass® e DM Bone®. Revista Brasileira de Odontologia, v. 31, p. 477-484, 2020.

BOCCACCINI, A. R.; GOUGH, J. E. Tissue engineering using ceramics and polymers. New York. CRC Press, ed. 2, 2007.

DEVRIENDT, N.; ROOSTER, H. Initial management of traumatic wounds. Veterinary Clinical North American Small Animal Practice, v.47, p. 1123-1134, 2017.

DI CIO, S.; GAUTROT, J. E. Cell sensing of physical properties at the nanoscale: Mechanisms and control of cell adhesion and phenotype. Acta biomaterialia, v. 30, p. 26-48, 2016.

FINNERTY, C. C.; MABVUURE, N. T.; ALI, A.; KOZAR, R. A.; HERNDON, D. N. The surgically induced stress response. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, v. 37, n. 5, p. 21S - 29S, 2013.

FITZGERALD, A.; BERENTSON-SHAW, J. Termografia como ferramenta de triagem e diagnóstico: uma revisão sistemática. New Zealand Medical Journal, v.125, n.1351, p.80-91, 2012.

FRANZ, S.; RAMMELT, S.; SCHARNWEBER, D.; SIMON, J. C. Respostas imunes a implantes - uma revisão das implicações para o design de biomateriais imunomoduladores. Biomaterials, v.32, p. 6692-709, 2011.

GABBAI-ARMELIN, P. R.; SOUZA, M. T.; KIDO, H. W.; TIM, C. R.; BOSSINI, P. S.; MAGRI, A. M. P.; FERNANDES, K. R.; PASTOR, F. A. C.; ZANOTTO, E. D.; PARIZOTTO, N. A.; PEITL, O.; RENNO, A. C. M. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 26, p. 1 – 13, 2015.

GARROS, I. C.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21, p. 133 – 139, 2006.

GILLETTE, R. L.; SWAIM, S. F.; SARTIN, E. A.; BRADLEY, D. M.; COOLMAN, S. L. Effects of a bioactive glass on healing of closed skin wounds in dogs. American Journal of Veterinary Research, v.62, n.7, p. 1149–1153, 2001.

GONZALEZ; A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.91, n.5, p. 614-620, 2016.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. Journal of Dental Research, v. 89, n. 3, p. 219 - 229, 2010.

GUIMARÃES, C. M. D. S.; BALBINOT, L. F.; BRIOSCHI, M. L. Infrared images in the evaluation of the diabetic foot. Surgical & Cosmetic Dermatology, v.10, n.2, p.116-20, 2018.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N.S.; BOCCACCINI, A. R. Uma revisão da resposta biológica aos produtos de dissolução iônica de vidros bioativos e vitrocerâmicas. Biomateriais, v. 32, n.11, p. 2757-2774, 2011.

KAWAI, K.; LARSON, B. J.; ISHISE, H.; CARRE, A. L.; NISHIMOTO, S.; LONGAKER, M. Calcium-based nanoparticles accelerate skin wound healing. PLoS ONE, v.6, n.11, p. e27106, 2011.

KULKARNI, M.; MAZARE, A.; GONGADZE, E.; PERUTKOVA, Š.; KRALJ-IGLIČ, V.; MILOŠEV, I.; SCHMUKI, P.; IGLIČ, A.; MOZETIČ, M. Titanium nanostructures for biomedical applications. Nanotechnology, v. 26, n. 6, p. 062002, 2015.

MACIEL, D. M. A. D.; RAHAL, S. C.; SANTOS, I. F. C.; ALVES, C. E. F.; SAMPAIO, A. B. A.; NAGAI, L. R.; CAMARGO, B. W. D. F.; SALEWSKI, G. C. Healing of Skin Wounds in Rats: Influence of Low-Level Laser Therapy, Alone or Combined with Natural Products. Acta Scientiae Veterinariae, v.48, p. e1729, 2020.

MAJEED, A. A.; NAIMI, R. A. Role of hydroxyapatite in healing of experimentally induced cutaneous wound in rabbits. Al-Anbar Journal of Veterinary Science, v.5, n.1, p. 74–81, 2012.

MARQUES, D. M.; OLIVEIRA, V. D. C.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; ISSA, J. P. M.; WATANABE, E. Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. Biofouling, v.36, n.2, p.234-244, 2020.

MIR, M.; ALI, M. N.; BARAKULLA, A.; GULZAR, A.; ARSHAD, M.; FATIMA, S.; ASAD, M. Synthetic polymeric biomaterials for wound healing: a review. Progress in Biomaterials, v.7, p. 1-21, 2018.

MOURA, D.; SOUZA, M.T.; LIVERANI, L.; RELLA, G.; LUZ, G.M.; MANO, J.F.; Development of a bioactive glass-polymer composite for wound healing applications. Materials Science and Engineering, v. 76, p. 224-232, 2017.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização De Feridas: Fases e fatores de Influência. Acta Veterinaria Brasilica, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

OISHI, J. C.; SOUZA, M. T.; MARTINELLI, A.; BUZINARI, T. C.; ZANOTTO, E. D., RODRIGUES, G. J. Influence of a melt derived bioactive glass (F18) over endothelial cells nitric oxide production. Materials Letters: X, v. 10, p. e100071, 2021.

PASSOS, T. F.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; DE SOUZA, C. W. O. Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against Staphylococcus aureus. Materials Science & Engineering: Materials For Biological Applications, v. 118, p. e111475, 2021.

PITALUGA, H.; SOUZA, L. T.; ZANOTTO, D.; ROMERO, E. S.; HATTON, P. V. Electrospun F18 Bioactive Glass/PCL-Poly (ε-caprolactone)-Membrane for Guided Tissue Regeneration. Materials, v. 11, n. 3, p. e400, 2018.

RISSELADA, M. Perforating cervical, thoracic, and abdominal wounds. Veterinary Clinical North American Small Animal Practice, v.47, p. 1135-1148, 2017.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S. W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. Neurology Clinics, v. 24, n. 3, p. 421 – 439, 2006.

SADOWSKA, J. M.; GINEBRA, M. P. Inflammation and biomaterials: role of the immune response in bone regeneration by inorganic scaffolds. Journal of Materials Chemistry, v.8, n. 41, p. 9404-9427, 2020.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. Surgery, v.39, n.5, p.473-480, 2017.

SOUZA, M. T.; RENNO, A. C. M.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D. New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications. Translational Materials Research, v.4, n.1, 2017a.

SOUZA, M. T.; L.A. CAMPANINI, C.R.; CHINAGLIA, O.; PEITL, E.D.; ZANOTTO, C. W. O. Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. International Journal Antimicrobiotic Agents, v. 50, p.730–733, 2017b.

SOUZA, M. T.; TANSAZ, S.; ZANOTTO, E. D.; BOCCACCINI, A. R. Bioactive Glass Fiber-Reinforced PGS Matrix Composites for Cartilage Regeneration. Materials, v.10, n.1, p. e 83, 2017c.

YARNELL, K.; HALL, C.; BILLETT, E. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. Physiology Behavior, v. 118, p. 32 – 39, 2013.

ZANGHI, B. M. Eye and ear temperature using infrared thermography are related to rectal temperature in dogs at rest or with exercise. Frontiers of Veterinary Science, v. 3, p. 111, 2016.

ZHAO, W.; XIE, W.; ZHANG, W.; FU, X.; GAO, W.; LEI, B.; CHEN, X. 3D printing nanoscale bioactive glass scaffolds enhance osteoblast migration and extramembranous osteogenesis through stimulating immunomodulation. Advanced Healthcare Materials, v. 7, 2018.

ZETAO, Y. X.; CHEN, S. H.; MENGCHAO, S.; GUANQI, L.; ZHUOFAN, C.; JIANG, C.; CHENGTIE, W. Immunomodulatory effects of mesoporous silica nanoparticles on osteogenesis: from nanoimmunotoxicity to nanoimmunotherapy. Applied Materials Today, v.10, p.184-193, 2018.

ZHENG, K.; NIU, W.; LEI, B.; BOCCACCINI, A.R. Vidros bioativos imunomoduladores para regeneração tecidual. Acta Biomaterialia, v.133, p.168-186, 2021.

ZHU, Y.; MA, Z.; KONG, L.; HE, Y.; CHAN, H.F.; LI, H. Modulation of macrophages by bioactive glass/sodium alginate hydrogel is crucial in skin regeneration enhancement. Biomaterials, v.256, 2020.

CAPÍTULO 3

TRABALHO CIENTÍFICO 2

Artigo científico a ser enviado para Pesquisa Veterinária (https:// http:// http://www.pvb.com.br/portal/normas). Contudo, o trabalho científico será traduzido para a língua inglesa para submissão. O corpo do texto foi formatado de acordo com as normas de submissão da revista, com exceção das figuras e legendas que foram inseridas no texto.

AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA, HISTOLÓGICA E IMUNOFENOTIPAGEM DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM ASSOCIAÇÃO DO GEL DE COLÁGENO E BIOVIDRO F18®

Resumo: O biovidro F18®, biomaterial cerâmico de elevada bioatividade e reatividade, atividade anti-biofime, bactericida, angiogênica e vasodilatadora. Até o momento, estudos relacionados com o uso do biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas estão ausentes na literatura. Nesse contexto, objetiva-se realizar uma avaliação morfométrica, histológica e imunoistoquímica de feridas cutâneas de ratos tratadas com gel de colágeno associado ao biovidro F18®. Foram utilizados 112 ratos Wistar convencional, machos hígidos, adultos e massa corpórea entre 365 e 370 g. Feridas de 3 cm de diâmetro foram realizadas no dorso dos ratos sob anestesia. Foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 28 animais: G1 –solução salina 0,9%; G2 - pomada cicatrizante; G3 - gel de colágeno; G4 –mistura do pó de biovidro F18 e gel de colágeno. Cada grupo foi dividido aleatoriamente em quatro grupos de sete ratos, e submetidos a avaliação morfométrica, histológica e imunoistoquímica. As eutanásias foram realizadas após indução anestésica, e biópsias excisionais foram realizadas em torno da lesão. Os valores das áreas e contração das feridas dos demonstraram uma diminuição e, em seguida, aumento significativo, respectivamente, ao longo dos momentos. Foi identificado um aumento significativo no número de células totais e aumento significativo para colágeno tipo I na ferida tratado com biovidro F18®. Concluiu-se que o biovidro F18® demonstrou efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas, destacando sua ação em diminuir a área da ferida e aumentar a taxa de oclusão, diminuir a quantidade de células de reação inflamatória e estimular a produção de colágeno tipo I.

Palavra- Chaves: cicatrização, pele, reparação tecidual**,** trauma, vidro bioativo.

Introdução

A descoberta dos vidros bioativos ou biovidros foi um grande avanço para a área de biomateriais, devido a sua capacidade de promover ligações químicas com os tecidos vivos (HENCH,2006). Tais materiais são capazes de ativar várias respostas biológicas, proporcionando outros benefícios além de apenas a regeneração óssea. Além disso, os vidros bioativos possuem propriedades bactericidas que os tornam importantes na área de regeneração tecidual ou da biomedicina (ZHANG et al., 2010; MOURA et al., 2017), sendo uma tecnologia promissora com um grande potencial de aplicação em pacientes humanos e na Medicina Veterinária (OBATA et al., 2022).

Os biovidros podem ser fabricados de forma que sejam compatíveis com diferentes tipos de tecidos, por meio da seleção dos seus componentes, sendo que os vidros à base de silicato de sódio e de cálcio são compatíveis com o tecido ósseo (SIQUEIRA E ZANOTTO, 2011; HUANG, 2017). Recentemente, o uso dos biovidros expandiu-se para regeneração de tecidos moles e úlceras cutâneas; lesões de pele causada por doenças crônicas, como a diabetes; e na regeneração tecidual em tratamentos pós-operatórios de neoplasias em pacientes humanos (SOUZA et al., 2017a; WHEN et al., 2021). Em relação à cicatrização, os biovidros possuem ação angiogênica, alta permeabilidade aos fluidos corporais, fácil manuseio e formato flexível (DAY 2005; JO et al., 2009; QUINTERO et al., 2009; ZHENG et al., 2021). Contudo, segundo Siqueira e Zanotto (2011), diversos biovidros apresentam propriedades mecânicas frágeis e alta tendência à cristalização, impedindo o processo de manipulação de diversas formas.

O biovidro F18®, é um biomaterial cerâmico à base de dióxido de silício (SiO2), dióxido de sódio (Na2O), dióxido de potássio (K2O), óxido de magnésio (MgO), óxido de cálcio (CaO) e pentóxido

de fósforo (P2O5) (SiO_2–Na_2O–K_2O–CaO–MgO–P_2O_5, conferindo trabalhabilidade de amplo espectro sem cristalização (SOUZA et al., 2017a). Segundo os mesmos autores, esse biovidro permite solucionar algumas dificuldades identificadas em outros vidros bioativos, que inclui a cristalização incontrolável durante tratamentos térmicos prolongados ou repetições (Souza et al., 2017a). O biovidro F18® possui elevada bioatividade e reatividade, além de baixa resistência química., conferindo características para a confecção de fibras, pós e *scaffolds* (SOUZA et al., 2017a), e possui atividade anti-biofime e bactericida elevada, quer em tecido ósseo ou na pele; e ação angiogênica e vasodilatadora (SOUZA et al., 2017b; OISHI et al., 2019; ARAÚJO LOPES et al., 2020; MARQUES et al., 2020; PASSOS et al., 2021). Estudos prévios demonstraram a biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* do biovidro F18®, bem como sua capacidade em estimular a formação de tecido ósseo (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; PITALUGA et al., 2018; ARAÚJO LOPES et al., 2020). No contexto do sistema articular, Souza et al. (2017d), identificaram que a incorporação do biovidro F18® em polímeros elastoméricos regeneradores de cartilagem à base de poli (glicerol sebacato) dobrou a resistência à tração; adequou a degradabilidade do polímero, evitando a citotoxidade dos subprodutos de sua degradação.

Em relação ao uso do biovidro F18® na regeneração de tecidos moles, Souza et al. (2017a), realizaram um estudo piloto em ratos Wistar submetidos a queimaduras de terceiro grau. Os autores implantaram as fibras do biovidro na região acometida, e sete dias após foi observada uma cicatrização mais rápida e ausência de necrose nos animais tratados com o biovidro. No mesmo estudo, também foi identificada, pelo exame histológico e imunoistoquímico, maior presença de fibroblastos, queratinócitos e tecido conjuntivo; e maior intensidade do fator de crescimento endotelial (VEGF) (SOUZA et al., 2017a). Entretanto, até o momento, estudos relacionados com o uso do biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas não contaminadas estão ausentes na literatura. Nesse contexto, objetiva-se com o presente estudo realizar uma avaliação morfométrica, histológica e imunoistoquímica de feridas cutâneas tratadas com gel de colágeno associado ao biovidro F18®, utilizando o rato Wistar "*in vivo*" como modelo experimental de curta duração. A hipótese é que o biovidro F18® misturado com o gel de colágeno induza efeitos benéficos na cicatrização. A relevância clínico-cirúrgica está associada com uso dos resultados do presente estudo como base para o uso na cicatrização de feridas de cães e gatos, acelerando a cicatrização e formando um tecido cicatricial mais resistente.

Material e Métodos

Animais

O estudo foi submetido e logo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (Unesp), campus de Botucatu, São Paulo (SP) (Atestado nº 0074/2021).

Após a realização do Poder de Teste (função "power.t.test" do pacote "stats"), utilizando o software R no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (Version 1.0.143 – © 2009-2016, RStudio, Inc.), foi determinado a amostra experimental de quatro grupos de 28 animais, totalizando 112 ratos. Os ratos Wistar convencional (*Rattus novergicus*) machos hígidos, com idade entre oito e 10 semanas e massa corpórea entre 365 e 370 g, provenientes do Biotério Central da Unesp, Botucatu, SP, foram encaminhados ao biotério da FMVZ, Unesp, Botucatu, SP, para aclimatização ao ambiente experimental, por um período de 14 dias. Nesse período foi realizada a vermifugação com ivermectina (1%) (0,1mL diluída em 100mL de água potável em bebedouro individual), a cada sete dias, durante duas semanas, sendo que os ratos permaneceram em gaiolas coletivas. Após a aclimatização, os ratos foram separados aleatoriamente, e colocados em caixas de acrílico (49 x 34 x 16 cm) com enriquecimento ambiental por meio de folhas sulfite amassadas. As caixas foram limpas a cada 48 horas, e o ambiente manteve-se com umidade e temperatura controlada e constante (temperatura de 22 ± 1 ^{o}C e umidade entre 30 e 40%), e o ciclo de luz e escuro de 12 horas. Durante todo o período do estudo, os ratos receberam água e ração comercial para ratos *ad libitum*.

Modelo Experimental

O delineamento do modelo experimental foi apresentado na figura 1. Todos os ratos foram submetidos à pré-medicação anestésica com sulfato de morfina (2 mg/kg, SC) e anestesia com associação de xilazina (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina (75 mg/kg), por via intraperitoneal. Seguido à anestesia, os animais tiveram a região dorsal epilados, e a região foi submetida à antissepsia com clorexidina 0,5%.

Para a realização das feridas cutâneas no terço médio entre a região atlanto-occipital e base da cauda, foi utilizado um *punch* circular de 3 cm de diâmetro, e finalizando com auxílio de uma pinça e tesoura Metzembaum. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado seguindo os padrões de assepsia e pelo mesmo operador e horário pré-determinado fixo.

Os 112 ratos foram divididos aleatoriamente, usando o programa Randomizer® (versão 2021), em quatro grupos de 28 animais: G1 – feridas tratadas com solução salina 0,9% (0,1 mL); G2 - feridas tratadas com pomada cicatrizante a base de alantoína (3 g) e óxido de zinco (3 g) (0,1 g); G3 - feridas tratadas com gel de colágeno (2 mL – previamente padronizado); G4 – feridas tratadas com mistura do pó de biovidro F18 e gel de colágeno (200 mg de pó de biovidro F18® e 2 mL de gel de colágeno- proporção de 1:10) (SOUZA et al. 2017a). As feridas dos grupos G1 e G2 foram tratadas a cada 24 horas e os demais grupos a cada 72 horas (SOUZA et al. 2017a). O tratamento iniciou-se após o término da confecção das feridas e teve duração de 21 dias. A limpeza das feridas com gaze umedecida em solução salina (0,9%) foi realizada antes da aplicação dos produtos, porém, sem remoção das crostas, de modo a não afetar o processo de cicatrização.

A analgesia pós-operatória foi realizada com cloridrato de tramadol (10 mg/kg, via subcutânea), a cada 12 horas, durante 48 horas. Para que não ocorresse interferência no processo de cicatrização, as feridas permaneceram sem curativo, e os animais sem colar elisabetano, e não foi administrado antibiótico ou anti-inflamatório.

Cada grupo foi dividido aleatoriamente em quatro grupos de sete ratos, e submetidos a avaliação morfométrica (área, contração e profundidade das feridas), histológica e imunoistoquímica, nos seguintes momentos: três dias (M1), sete dias (M2), 14 dias (M3) e 21 dias (M4) após a confecção das feridas (TZIOTZIOS et al., 2012). As eutanásias com tiopental sódico (120 mg/kg), por via intraperitoneal, foram realizadas após indução anestésica, utilizando o protocolo acima citado. As biópsias excisionais das lesões cutâneas foram realizadas com margem de no mínimo 2 cm de pele íntegra em torno da lesão, e em profundidade até à fáscia muscular.

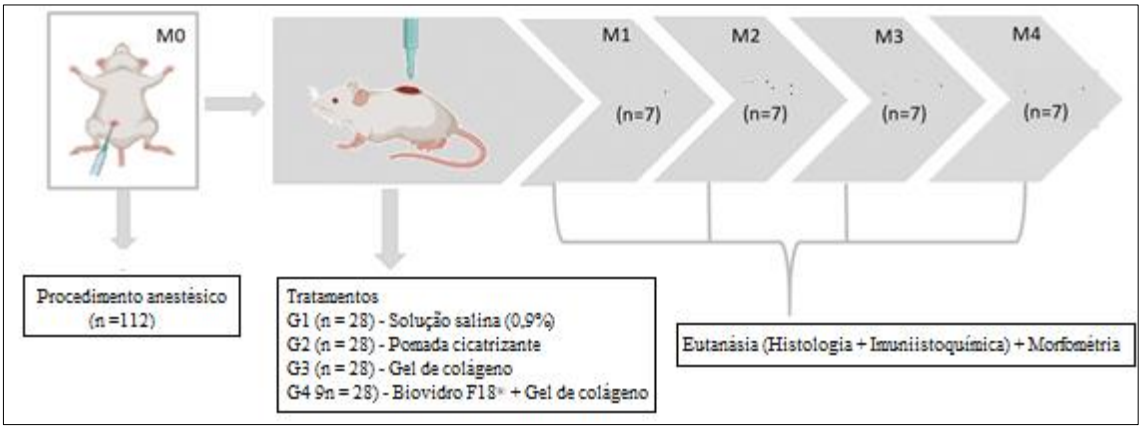

Figura 1: Desenho esquemático do delineamento do modelo experimental. Legenda: G1 – feridas tratadas com solução salina 0,9%; G2 - feridas tratadas com pomada cicatrizante; G3 - feridas tratadas com gel de colágeno; G4 – feridas tratadas com mistura do pó de biovidro F18 e gel de colágeno; M0 – momento do procedimento anestésico; M1 - três dias após indução das feridas; M2 - sete dias após indução das feridas; M3 - 14 dias após indução das feridas; M4 - 21 dias (M4) após a indução das feridas.

O gel de colágeno e o biovidro em pó F18® foram fornecidos pelo Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV) da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil. O gel de colágeno foi fabricado por meio da combinação de glicerina e água com colágeno (1:5), e em seguida na proporção de 4:3 para obtenção do produto final. A composição do biovidro F18® incluiu os seguintes compostos: SiO_2-Na_2O-K_2O-MgO-CaO-P_2O_5 (patente BR10 INPI 20130209619). Sua preparação na forma de pó foi de acordo com a metodologia usada por Souza et al, (2017a), sendo que o tamanho da partícula foi de 49 µm. A variação do pH ao longo do tempo foi verificada por meio de solução salina tamponada com fosfato com relação peso/volume de 50 mg/mL (SOUZA et al., 2017a).

Avaliação morfométrica

Para a avaliação morfométrica, todos os animais foram anestesiados e tiveram as suas feridas fotografadas por câmera digital (Sony®, modelo Cyber-shot DSC-WX50, resolução de 16,2 megapixels, imagem formato JPEG®). Para a iluminação durante a confecção das imagens digitais foi

utilizada um anel de luz led. A câmera foi fixada perpendicularmente as feridas, por meio de um suporte específico, com o objetivo de reduzir as distorções produzidas pela inclinação da câmera, numa altura padrão de 25 cm das feridas. Fita métrica (100 cm de comprimento e 1 mm de precisão) foi colocada ao lado do animal com a finalidade de servir de referência métrica para o cálculo das áreas. O software Image J® (National Institutes of Health, NIH) foi usado para mensurar a área das feridas, e o grau de contração foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Porcentagem de contração} = \frac{(\text{área inicial} - \text{área do dia da mensuração})}{\text{área inicial}} \times 100\%$$

As mensurações das profundidades foram realizadas por meio de exames tomográficos após a eutanásia, utilizando o tomógrafo helicoidal modelo SCT 7800 de 1 canal (Shimadzu®, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), com os fatores de exposição de 120 kV e 80 mA. Para tal, os ratos foram fixados na calha de espuma em decúbito ventral (Figura 2), e foram obtidas secções transversais com 2 mm de espessura e de incremento (FOV 10 cm).

A reconstrução das imagens foi realizada pela Reformatação Multi-planar (MPR) e, em seguida, foi utilizado o software específico (RadiAnt DICOM Viewe® Medixant, Poznan, Polônia) para mensurar a profundidade da lesão, pelo diâmetro dorsoventral obtido no corte transversal. A mensuração da profundidade foi calcula pela diferença entre a distância da região intercostal até a região íntegra da pele e a distância região intercostal até a região do defeito cutâneo (Figura 3A e 3B).

Figura 2: Imagem digitalizada do rato eutanasiado e fixado na calha de espuma em decúbito ventral durante a realização do exame tomográfico (Shimadzu®, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão).

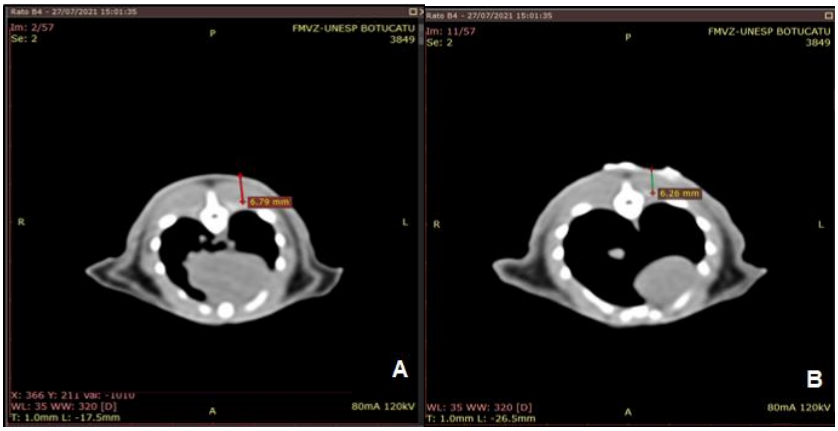

Figura 3: Imagem tomográfica de secções transversais (2 mm de espessura e incremento FOV 10 cm) da região da ferida cutânea. A. Distância da região intercostal até a região íntegra da pele (seta vermelha). B. distância região intercostal até a região do defeito cutâneo (seta verde).

Avaliação histológica e imunoistoquímica

Os espécimes destinados para o exame histológico foram colocados em frascos de formaldeído 10% tamponado por 24 horas, e posteriormente, mantidos em álcool 70% até a inclusão em parafina. Cortes de 5 µm foram obtidos dos espécimes, e os fragmentos foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (HE) para avaliação geral do tecido.

Foram observadas 15 fotomicrografias de cada espécime, utilizou-se o microscópio ótico (Zeiss®, Axio Lab A 1, Alemanha), com objetiva 40x, no sistema de análise de imagens CellSens Standard (Olympus®, EUA), sendo cinco áreas na borda da ferida. A mensuração da camada da epiderme também foi realizada pelo *software* acima citado. Foi realizada a quantificação do número total de células de reação inflamatória presentes nas áreas, por meio da contagem de área marcada, totalizando uma área de 100,000 μm^2/lâmina, utilizando o programa analisador de imagem (AVSoftBioView Spectra®).

Para a avaliação imunoistoquímica, foi realizada a fixação e inclusão das amostras em *paraplast*, em lâminas de 5 µm de espessura. Para tal, utilizou-se os anticorpos colágeno tipo I (1/100 µm) e colágeno tipo III (1/100 µL). As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica por pressão (20psi/125° C) e a reação imunoistoquímica foi realizada com *kit* de polímeros, e foram analisadas as mesmas regiões do exame histológico. Foram analisadas cinco fotomicrografias de cada amostra sob aumento de 400 vezes na região da borda da ferida. A área que apresentou imunomarcação foi quantificada, totalizando uma área de 100,000 μm^2/lâmina. As fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de software de captura de imagens e as medições foram feitas por meio do software AVSoftBioView®.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R (Version 4.2.0 (2022-04-22). Para comparação entre os grupos, em cada momento avaliado, empregou-se a análise de variância para amostras independentes (ANOVA One way) para dados normais, e teste de Kruskal-Wallis (função "kruskal" do pacote "agricolae") e, também, por meio dos *boxplot*, para variáveis fora das condições da normalidade, diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Resultados

Os valores das áreas das feridas demonstraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no grupo tratado com a pomada cicatrizante, entre os momentos: M3d vs M14d; M3d vs M21d, M7d vs M14d; M7d vs M21d; no grupo tratado com gel de colágeno: M3d vs M14d; M3d vs M21d; M7d vs M21d; e nas feridas tratadas com a mistura do pó de biovidro F18®, entre M3d e demais momentos, e entre M7d vs M14d (Tabela 1). Paralelamente, foi identificada variação significativa ($p < 0,05$) entre grupos por momento avaliado: M7d: G2 > G1 e G2 > G3; M14d e M21d: G2 > G1, G3 e G4 (Tabela 1).

Os valores das contrações das feridas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) somente na avaliação intergrupos: M7d: G1 > G2, G3 > G2 e G4 > G2; M21d: G1 > G2 e G4 > G2 (Tabela 1). Em relação as profundidades das feridas, foi identificado valores estatisticamente maiores ($p < 0,05$) no grupo tratado com solução salina (0,9%) quando comparado com o grupo tratado com a pomada cicatrizante, sete dias após a indução das feridas (Tabela 1).

No exame histológico foi identificado um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células totais de reação inflamatória no grupo tratado com solução de salina (0,9%) quando comparado com as feridas tratadas com a mistura do pó de biovidro F18® e o gel de colágeno, sete dias após o início dos tratamentos (Tabela 2). Não foram observadas variações significativas com relação à espessura da epiderme (Tabela 2). As fotomicrografias da avaliação histológica foram apresentadas nas figuras 4A e 4B.

Na análise imunoistoquímica foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na área marcada para colágeno tipo I na região da borda da ferida do grupo tratado com a mistura do biovidro F18® e gel de colágeno quando comparado com o grupo tratado com solução de salina 0,9%, 14 dias após início dos tratamentos (Tabela 3). As fotomicrografias da avaliação imunoistoquímica para marcação do anticorpo colágeno I foram apresentadas nas figuras 5A e 5B.

Tabela 1. Média (Média) e desvio-padrão (DP) da área, contração e profundidade das feridas cutâneas de ratos Wistar, tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: 15 minutos (M15min), três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Grupos/Variáveis/	M0 (Média ± DP)	M1 (Média ± DP)	M2 (Média ± DP)	M3 (Média ± DP)	M4 (Média ± DP)
Área (cm^2)					
G1	11,21 ± 0,96^{Aa}	11,58 ± 1,57^{Aa}	9,38 ± 0,30^{Aa}	3,34 ± 0,85^{Aa}	2,05 ± 0,63^{Aa}
G2	12,21 ± 1,98^{Aa}	11,73 ± 1,02^{Aa}	13,57 ± 1,30^{Ba}	7,14 ± 1,92^{Bb}	4,23 ± 1,32^{Bb}
G3	10,09 ± 1,52^{Aa}	14,83 ± 1,22^{Aa}	9,63 ± 1,08^{ABb}	3,70 ± 0,64^{Ab}	1,69 ± 0,53^{Ab}
G4	13,31 ± 1,73^{Aa}	10,63 ± 1,46^{Aa}	7,52 ± 1,07^{Aab}	2,71 ± 1,72^{Abc}	1,25 ± 0,73^{Ac}
Contração (%)					
G1	0,00^{Aa*}	22,31 ± 9,97^{Aa}	16,20 ± 9,23^{Aa}	70,12 ± 7,29^{Aa}	81,61 ± 5,83^{Aa}
G2	0,00^{Aa*}	2,22 ± 7,05^{Aa}	-14,034 ± 7,50^{Ba}	40,33 ± 5,08^{Aa}	64,40 ± 5,95^{Ba}
G3	0,00^{Aa*}	-14,11 ± 5,69^{Aa}	22,23 ± 9,03^{Aa}	62,69 ± 9,62^{Aa}	75,05 ± 6,39^{ABa}
G4	0,00^{Aa*}	-11,56 ± 8,79^{Aa}	27,55 ± 3,19^{Aa}	71,63 ± 7,33^{Aa}	86,85 ± 5,78^{Aa}
Profundidade (mm)					
G1	-	1,58 ± 0,18^{Aa}	2,00 ± 0,11^{Aa}	NM	NM
G2	-	2,02 ± 0,26^{Aa}	0,78 ± 0,56^{Ba}	NM	NM
G3	-	1,67 ± 0,28^{Aa}	1,07 ± 0,66^{ABa}	NM	NM
G4	-	1,94 ± 0,95^{Aa}	1,50 ± 0,82^{ABa}	NM	NM

*NM – Não mensurável.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna foram significamente diferentes pelo teste de ANOVA (p <0,05). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha a foram significamente diferentes pelo teste ANOVA (p <0,05).

Tabela 2 - Mediana (Med) e amplitude [primeiro (Q1) e Terceiro quartil (Q3)] do número de células de reação inflamatórias totais (μm^2) e espessura (µm) das feridas cutâneas de ratos Wistar, tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: 15 minutos (M15min), três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Variáveis	M1 Med (Q1-Q3)	M2 Med (Q1-Q3)	M3 Med (Q1-Q3)	M4 Med (Q1-Q3)
Células Totais (μm^2)				
G1	2840,11 (2135,70 - 5074,62)	4737,96 (1302,86 - 7107,05)[A]	3064,35 (2565,0 - 5826,8)	2447,92 (2025,32 - 3788,16)
G2	1858,51 (856,30 - 3349,87)	3212,68 (2057,31 -5405,83)[AB]	3117,72 (1655,51 - 6051,83)	4033,69 (3,648,81 - 644,49)
G3	952,12 (570,78 - 1451,2)	3148,16 (1984,22 - 3951,95)[AB]	3043,85(1465,37 - 5565,61)	1561,53 (1391,23 - 1974,07)
G4	1728,17 (973,66 - 1865,87)	1877,19(1341,6 - 2369,49)[B]	2651,4 (1893,52 - 4593,39)	1730,48 (1174,15 - 3583,13)
Espessura da Epiderme (µm)				
G1	52,84 (43,94 – 62,64)	53,76 (38,91 - 91,89)	70,07 (45,45 - 89,45)	76925(64,466 - 99,274)
G2	56,61 (47,29 - 71,79)	106,32 (84,19 -121,14)	123,96 (100,88 - 136,89)	109,604 (90,659 - 54,15)
G3	74,95 (55,20 - 107,16)	41,60 (37,09 - 61,84)	81,05 (55,20 - 138,40)	140,83(102,95 -177,39)
G4	68,008 (58,04 - 99,25)	95,36 (76,88 - 146,90)	93,87 (55,43 - 134,19)	114,94 (63,95 - 161,76)

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos) pelo teste de ANOVA (p <0,05).

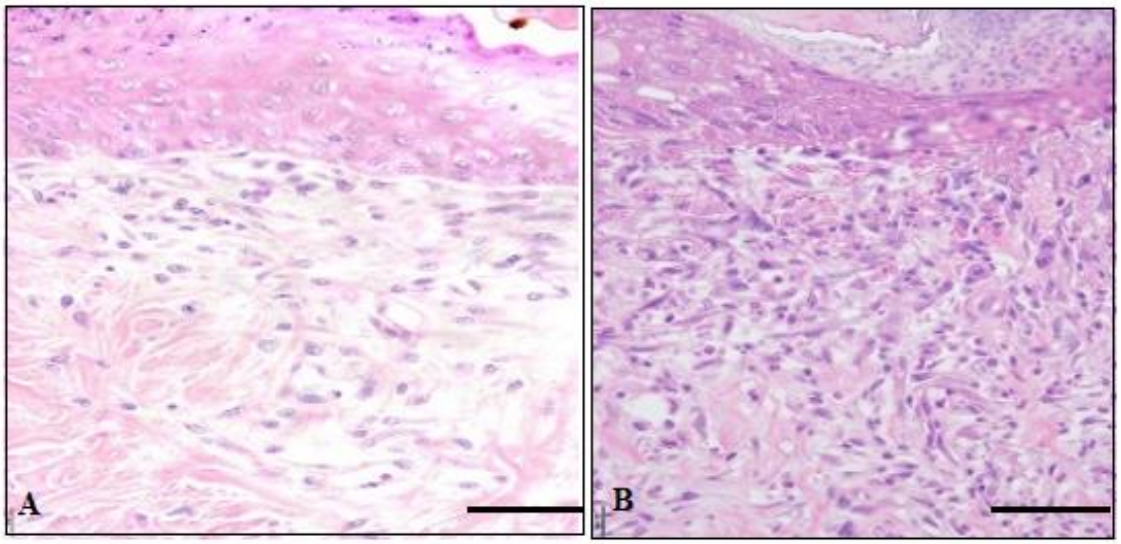

Figura 4: Fotomicrografias da região da borda da ferida cutânea em área de 100,000 μm^2/lâmina. A – Feridas tratadas com solução salina (0,9%), e feridas tratadas com mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (B), sete dias após o início dos tratamentos. Observa-se maior quantidade de número total de células de reação inflamatória no grupo tratado com solução de salina (0,9%) (A) em relação as feridas tratadas com mistura do pó de biovidro F18® e o gel de colágeno, e ausência de variações significativas com relação à espessura da epiderme (H.E - barra da escala = 20 μm)

Tabela 3 - Mediana (Med) e amplitude [primeiro (Q1) e Terceiro quartil (Q3)] da marcação imunoistoquímica dos anticorpos colágeno tipo I e colágeno tipo III, das feridas cutâneas de ratos Wistar, tratadas com solução salina (0,9%) (G1), pomada cicatrizante de Alantoína (G2), gel de colágeno (G3) e mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (G4), e mensurados nos momentos: 15 minutos (M15min), três dias (M3d), sete dias (M7d), 14 dias (M14d) e 21 dias (M21d) após a indução das feridas.

Imunoistoquímica	M1 Med (Q1-Q3)	M2 Med (Q1-Q3)	M3 Med (Q1-Q3)	M4 Med (Q1-Q3)
Colágeno I (μm^2)				
G1	77,60 (38,80 - 116,40))	222,9 (47,98 - 722,97)	1095,39 (410,21-1452,31)[A]	1644,94 (1546,47 -1743,41)
G2	1121,62 (977,87 - 1445,16)	653,87(174,86 - 2475,30)	2324,84 (1441,88-2849,05) [AB]	1707,26 (853,60 - 2087,57)
G3	4192, 68 (3213,18 -6059,35	733,59 (325,66-2663,30	1790,72 (339,87-3496,11)[AB]	2502,54 (1846,89 - 3865,54
G4	3845,9 (2,086,97 - 5359,68)	882,81(341,26-2863,73)	2772,85 (812,67-7129,15)[B]	1561,43 (260,95 - 2909,47)
Colágeno III (μm^2)			)	
G1	1169,58 (896,20 - 2741,44)	2547,79 (1362,93 - 3455,90)	3059,03 (1775,32 - 3467,10)	2607,91 (241,57 - 1023,18)
G2	1616,17 (1288,90 - 2001,95)	690,39 (541,42 - 2536,30)	1935,44 (765,26 - 3021,85)	1641,77 (1234,20- 442,73)
G3	2786,45 (1997,76 - 3430,14)	1438,71 (592,96 - 2693,16)	1787,79 (1347,67-2399,51)	1882,24 (767,87 - 520,42)
G4	1352,84 (903,40 - 1716,64)	2225,14 (872,112-3,496,540)	606,230(405,210-1,128,380)	2795,71 (1379,22 - 4047,36)

Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferenças entre os grupos) pelo teste de ANOVA (p <0,05).

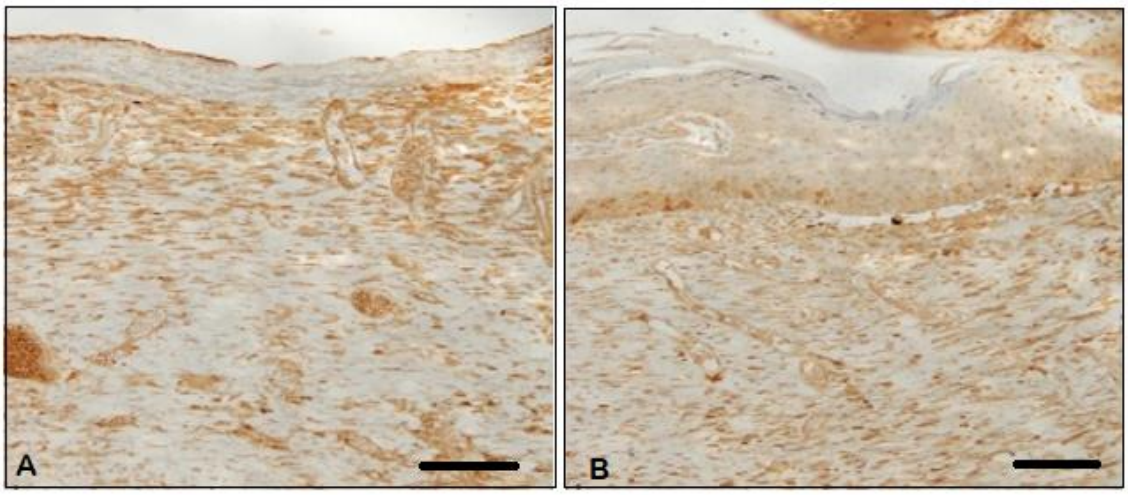

Figura 5: Fotomicrografia de imunomarcação para anticorpo colágeno tipo 1 na região da borda da ferida cutânea em área de 100,000 μm^2/lâmina. A - Feridas tratadas com solução salina (0,9%), e feridas tratadas com mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno (B), 14 dias após o início dos tratamentos. Observa-se aumento significativo para o colágeno tipo I na ferida tratado com a mistura do biovidro F18® e gel de colágeno quando comparado com o a ferida tratada com solução de salina (0,9%), 14 dias após início dos tratamentos (H.E - barra da escala = 50 µm)

Discussão

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do gel de colágeno associado ao biovidro F18® na cicatrização de feridas cutâneas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar, por meio da avaliação morfométrica, histológica e imunoistoquímica, visto que, até o momento, não existe estudo relacionado com o uso desse biovidro na cicatrização de feridas cutâneas. Desse modo, o estudo demonstrou o seu ineditismo. A hipótese foi confirmada visto que o biovidro F18® demonstrou efeitos benéficos na área da ferida e taxa de oclusão, na quantidade de células de reação inflamatória e produção de colágeno tipo I.

O estudo dos efeitos do biovidro F18® em feridas cutâneas é de extrema importância porque pode induzir menor tempo de cicatrização e formação de tecido cicatricial mais resistente. Por outro lado, existe a necessidade de uso de materiais biocompativeis e que induzam efeitos colaterais mínimos ou ausentes. Diversos estudos comprovaram que o biovidro F18® possui elevada bioatividade e reatividade, ação angiogênica e vasodilatadora, pelo estímulo na liberação de óxido nitrito (vasodilatador) (GABBAI-ARMELIN et al., 2015; SOUZA et al., 2016; SOUZA et al., 2017a; OISHI et al., 2019), fatores que podem determinar a eficácia do biovidro no processo de cicatrização. O efeito bactericida do biovidro F18® (SOUZA et al., 2017a; SOUZA et al., 2017b; ARAÚJO LOPES et al., 2020; MARQUES et al., 2020; PASSOS et al., 2021) também tem um papel importante na cicatrização de feridas, visto que feridas contaminadas induzem prolongam o tempo do processo de cicatrização devido à intensa vasodilatação e presença exacerbada de células de reação inflamatória (SU et al., 2015; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; YANEZ et al., 2017)

A cicatrização é um processo dinâmico que envolve cascatas de eventos físicos, químicos e biológicos, pela fase inflamatória, proliferativa e fase de remodelação (GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017). Os momentos avaliados no presente estudo foram de acordo com a literatura (TZIOTZIOS et al., 2012), visto que três dias após à confecção da lesão é possível observar as características da fase inflamatória da cicatrização, que inclui as células de reação inflamatória (GONZALEZ et al., 2016). Os restantes momentos também são considerados significantes para o estudo da cicatrização tecidual da pele, porque englobam o início e final da fase inflamatória e de remodelação (SIMÕES et al., 1996).

Em relações as avaliações morfométricas, foi identificada uma diminuição significativa das áreas das feridas em todos os grupos ao longo dos momentos, excetuando o grupo tratado com a solução salina (0,9%). Entretanto, as feridas tratadas com a mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno apresentaram menores áreas em todos os momentos avaliados, como também, maior contração da ferida. Esse evento, evidenciou que o biovidro F18® foi benéfico na cicatrização das feridas. A cicatrização mais rápida das feridas tratadas com o biovidro foi provavelmente à ação do biovidro F18® na liberação íons silício, cálcio e fósforo sobre a superfície da lesão (SOUZA et al.,

2017a). Segundo Rosa et al. (2020) e Renck, et al. (2022), os íons de cálcio promovem o desbridamento autolítico; e os íons de silício ativam a biossíntese de colágeno, protegendo a ferida contra os radicais livres e glicação do colágeno. Paralelamente, esses íons induzem a angiogênese e aumento da secreção de fatores de crescimento de fibroblastos e endotelial vascular (OBATA et al., 2022), contudo, estes fatores não foram avaliados no presente estudo. Segundo Poologasundarampillai et al. (2014), ZHAO et al. (2015) e OBATA et al. (2022), é difícil determinar a concentração de íons liberados pelos biovidros na superfície da ferida, pois o organismo possui um sistema dinâmico durante a cicatrização, induzindo uma absorção rápida, ou a liberação desses íons pode acontecer de forma lenta.

A mensuração da profundidade das feridas foi realizada por meio de exames tomográficos visto ser mais objetivo em relação ao paquímetro. A pesquisa bibliográfica realizada pela autora não identificou o uso da tomografia computadorizada na avaliação da profundidade de feridas cutâneas, tornando o método inovador e inédito para o campo de pesquisa sobre a cicatrização. Após sete dias da indução das feridas, correspondendo com a fase proliferativa, foi observada maior profundidade nas lesões tratadas com solução salina seguida das tratadas com a mistura do pó mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno, sem variação significativa. Este fato foi associado com os efeitos benéficos do biovidro no controle de produção do tecido de granulação, evitando, assim, a presença de tecido de granulação exacerbado que poderá impedir a oclusão da ferida (SOUZA et a., 2017a).

No presente estudo, foi identificado pelo exame histológico uma diminuição significativa do total de células inflamatórias nas feridas tratadas com a mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno em relação ao grupo tratado com solução salina (0,9%), sete dias após indução das feridas, corroborando com Li et al. (2016). Fisiologicamente, durante este período, espera-se que ocorra uma diminuição do número de células inflamatórias (SU et al., 2015; GONZALEZ et al., 2016; SINGH et al., 2017; YANEZ et al., 2017). Li et al. (2016), identificaram redução significativa do total dessas células em feridas cutâneas de ratos tratadas com o biovidro Bioglass®, e foi associada com a capacidade que os biovidros tem em reduzir a inflamação na fase inicial da cicatrização e, consequentemente, acelerando a transição para a fase proliferativa (LI et al, 2016). Entretanto, 14 dias após a indução das lesões, as feridas tratadas com a mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno demonstraram um aumento significativo do colágeno tipo I, na avaliação imunoistoquímica, quando comparadas com as feridas tratadas com solução salina (0,9%). Ambos os eventos, determinaram a ação benéfica do biovidro F18® no processo de cicatrização, induzindo a formação de um tecido cicatricial mais resistente devido à presença do colágeno tipo I (REINKE e SORG, 2012; GUSHIKEN et al., 2021). Segundo Gilliver et al. (2011), Reinke e Sorg (2012), e Gushiken et al. (2021), o colágeno tipo III está presente em concentrações altas na fase proliferativa, devido o processo de fibroplasia, e posteriormente, na fase de remodelação, ocorre a degradação das fibras colágenas do tipo III e a transformação para o colágeno tipo I, principal fibra colágena da pele, e que apresenta maior resistência à tração mecânica (REINKE e SORG, 2012; GUSHIKEN et al., 2021). No presente estudo, a fase de remodelação correspondeu com o 14º dia após indução das feridas.

Os mediadores responsáveis pela a degradação do colágeno tipo III são as metaloproteinases 1 e 8 (GUSHIKEN et al., 2021), e a síntese de colágeno tipo I ocorre a partir do estímulo de diferentes fatores de crescimento (REINKE e SORG, 2012). Desse modo, postulou-se que o aumento de fibras colágenas tipo I nas feridas tratadas com o biovidro F18® foi associado com a capacidade dos biovidros em ativar a expressão gênica específicos na cicatrização e, assim, estimular fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento de fibroblasto, entre outros; elevando assim a concentração do fibroblasto, e aumento da produção do colágeno tipo III e, consequente, aumento do colágeno tipo I (NASERI et al., 2017; SOUZA et al., 2017a). Estudo realizado por Souza et al. (2017a), demonstrou maior concentração de fibroblastos, queratinócitos, tecido conjuntivo e fator de crescimento endotelial vascular nas queimaduras de terceiro grau de ratos tratadas com o biovidro F18®.

A principal limitação do estudo foi a ausência de avaliação imunoistoquímica para fator de crescimento endotelial vascular e fator de crescimento de fibroblasto-2. Futuros estudos devem ser realizados para determinar o efeito do biovidro F18® sobre os fatores de crescimento acima citados.

Conclusão

Conclui-se que a mistura do pó de biovidro F18® e gel de colágeno demonstra efeitos benéficos na cicatrização de feridas cutâneas, destacando sua ação em diminuir a área da ferida e aumentar a taxa de oclusão, diminuir a quantidade de células de reação inflamatória e estimular a produção de colágeno tipo I.

Referências bibliográficas

ARAÚJO LOPES, J. M.; BENETTI, F.; REZENDE, G. C., SOUZA, M. T.; CONTI, L. C.; ERVOLINO, E.; JACINTO, R. C.; ZANOTTO, E. D.; CINTRA, L. T. A. Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. International Endodontic Journal, v.53, n. 11, p. 1494–1505, 2020.

DAY, R. M, Bioactive Glass Stimulates the Secretion of Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis in Vitro, Tissue Engineering, v, 11, p, 768-777, 2005.

GABBAI-ARMELIN, P. R.; SOUZA, M. T.; KIDO, H. W.; TIM, C. R.; BOSSINI, P. S.; MAGRI, A. M. P.; FERNANDES, K. R.; PASTOR, F. A. C.; ZANOTTO, E. D.; PARIZOTTO, N. A.; PEITL, O.; RENNO, A. C. M. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, v. 26, p. 1 – 13, 2015.

GARROS, I. C.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21, p. 133 – 139, 2006.

GILLIVER, S. C.; EMMERSON, E.; BERNHAGEN, J.; HARDMAN, M. M. I. F: a key player in cutaneous biology and wound healing. Experimental Dermatology, v. 20, p. 1–6, 2011.

GONZALEZ; A. C. O.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. A. P. Wound healing - A literature review. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.91, n.5, p. 614-620, 2016.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. Journal of Dental Research, v. 89, n. 3, p. 219 - 229, 2010.

GUSHIKEN, L. F. S.; BESERRA, F. P.; BASTOS, J. K.; JACKSON, C. J.; PELLIZZON, C. H. Cutaneous wound healing: An update from physiopathology to current therapies. Life, v.11; n.7, p.665, 2021.

HENCH, L. L, The Story of Bioglass, Journal of Material Science: Materials in Medicine, v, 17, p, 467-978, 2006.

HUANG, J, Design and Development of Ceramics and Glasses, *in:* Biology and Engineering of Stem Cell Niches, p, 315-329, 2017.

JO, J. H.; LEE, E, J.; SHIN, D. S.; KIM, H, E.; KIM, H, W.; KOH, Y, H.; JANG, J. H, *In vitro / in vivo* biocompatibility and mechanical properties of bioactive glass nanofiber and poly (ε-caprolactone) composite materials, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v,91, n,1, p, 213-220, 2009.

LI, H.; HE, J.; YU, H.; GREEN, C. R.; CHANG, J. Bioglass promotes wound healing by affecting gap junction connexin 43 mediated endothelial cell behavior. Biomaterials, v.84, p. 64-75, 2016.

MARQUES, D. M.; OLIVEIRA, V. C.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; ISSA, J. P. M.; WATANABE, E. Biomaterials for orthopedics: anti-biofilm activity of a new bioactive glass coating on titanium implants. Biofouling, v. 36, n. 2, p. 234–244, 2020.

NASERI, S.; LEPRY, W. C.; NAZHAT, S. N. Bioactive glasses in wound healing: hope or hype? Journal of Materials Chemistry B, v.5, n.31, p. 6167-6174, 2017.

OBATA, A.; LEE, S.; KASUGA, T. Bioactive glass materials for tissue regeneration. Journal of the Ceramic Society of Japan, v.130, n.8, p.595-604, 2022.

OISHI, J. C.; SOUZA, M. T.; MARTINELLI, A.; BUZINARI, T. C.; ZANOTTO, E. D., RODRIGUES, G. J. Influence of a melt derived bioactive glass (F18) over endothelial cells nitric oxide production. Materials Letters: X, v. 10, p. e100071, 2021.

PASSOS, T. F.; SOUZA, M. T.; ZANOTTO, E. D.; De SOUZA, C. W. O, Bactericidal activity and biofilm inhibition of F18 bioactive glass against Staphylococcus aureus, Materials Science and Engineering: C, v,118, p,111475, 2021.

PITALUGA, H.; SOUZA, L. T.; ZANOTTO, D.; ROMERO, E. S.; HATTON, P. V. Electrospun F18 Bioactive Glass/PCL-Poly (ε-caprolactone)-Membrane for Guided Tissue Regeneration. Materials, v. 11, n. 3, p. e400, 2018.

QUINTERO, F.; POU, J.; COMESAÑA, R.; LUSQUIÑOS, F.; RIVEIRO, A.; MANN, A. B.; JONES, J. R, Laser spinning of bioactive glass nanofibers, Advanced Functional Materials, v,19, n,19, p, 3084-3090, 2009.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound repair and regeneration. European Surgical Research, v. 49, p. 35–43, 2012.

RENCK, K. M.; MAIA, A. P.P.; NOBRE, R.M. Eficácia do silício orgânico no rejuvenescimento facial: Uma revisão de literatura. Aesthetic Orofacial Science, v.3, n.1, p.10-18, 2022.

SINGH, S.; YOUNG, A.; MCNAUGHT, C. E. The physiology of wound healing. Surgery, v.39, n.5, p.473-480, 2017.

ROSA, R.L.; SERBAI, L.; NOVAK, R. S.; DE PAULA, J. D. F. P.; TOLEDO, A. C. O.; CARVALHO, V. V. M.; BOSCARDIN, P. M. D. Development and evaluation of organic silicon nanoparticles. Brazilian Journal of Development, v. 6, n.3, p. 13180-13190, 2020

SIMÕES, M. J.; CABRAL, A. C. V.; BOYACIYAN, K.; KULAY, J. R. I.; SASSO, W. S. Aspectos ultraestruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. Revista Paulista de Medicina, v. 104, nº 3, p. 132 – 135, 1996

SIQUEIRA, R. L.; ZANOTTO, E. D. Biosilicato®: Histórico de uma Vitrocerâmica Brasileira de Elevada Bioatividade", Química Nova, v, 34, n, 07, p, 1231-1241, 2011.

SOUZA, M.T.; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D.; BOCCACCINI, A.R. Novel double-layered conduit containing highly bioactive glass fibers for potential nerve guide application. International Journal of Applied Glass Science, v. 7, n. 2, p. 183-194, 2016.

SOUZA, M. T.; RENNO, A. C. M.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D, New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications, Translational Materials Research, v,4, n,1, 2017a.

SOUZA, M. T.; CAMPANINI, L. A.; CHINAGLIA, O.; PEITL, E.D.; ZANOTTO, C. W. O. Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. International Journal Antimicrobiotic Agents, v. 50, p.730–733, 2017b.

SOUZA, M. T.; CAMPANINI, L. A.; CHINAGLIA, C. R.; PEITL, O.; ZANOTTO, E. D.; SOUZA, C.W.O. Broad-Spectrum Bactericidal Activity of a New Bioactive Grafting Material (F18) Against Clinically Important Bacterial Strains-. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 50, p. 730-733, 2017c.

TZIOTZIOS, C.; PROFYRIS, C.; STERLING, J. Cutaneous scarring: pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics, Journal of the American Academy of Dermatology, v, 66, p, 13–24, 2012.

YANEZ, D. A.; LACHER, R. K.; VIDYARTHI, A.; COLEGIO, O. R. The role of macrophages in skin homeostasis. Pflugers Arch, v.469, p.455–463, 2017.

ZHANG, D.; LEPPÄRANTA, O.; MUNUKKA, E.; YLÄNEN, H.; VILJANEN, M. K.; EEROLA, E.; HUPA, M.; HUPA, L. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses, Journal of Biomedical Materials Research: Part A, v, 93, n, 2, p, 475-483, 2010.

ZHENG, K.; NIU, W.; LEI, B.; BOCCACCINI, A. R. Immunomodulatory bioactive glasses for tissue regeneration, Acta Biomaterialia, v,133, p,168-186, 2021.

ANEXO

ANEXO 1. Certificado da CEUA (FMVZ, Unesp, Botucatu).

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

fmvz - unesp
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Campus de Botucatu

ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO DO VIDRO BIOATIVO F18 NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS NÃO-CONTAMINADAS INDUZIDAS CIRURGICAMENTE EM RATOS WISTAR" **Protocolo CEUA 0074/2021** , a ser conduzido por Bruna Martins da Silva, responsável/orientador Ivan Felismino Charas dos Santos, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	05/07/2021 a 28/11/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	ROEDOR / RATTUS NOVERGICUS / Wistar
Raça	Wistar
Nº de animais machos	112
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	400 grama
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 4 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Biotério Central, Unesp.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 22/06/2021

JOSÉ NICOLAU PRÓSPERO PUOLI FILHO
Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3880-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br