

# Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo

*Microscopic evaluation, histochemical study and analysis of tensiometric properties of the Nile Tilapia skin*

*Evaluación microscópica, estudio inmunohistoquímico y análisis de propiedades tensiométricas de la piel de tilapia del Nilo*

Ana Paula Negreiros Nunes Alves, Maria Elisa Quezado Lima Verde, Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior, Paulo Goberlânio de Barros Silva, Victor Pinheiro Feitosa, Edmar Maciel Lima Júnior, Marcelo José Borges de Miranda, Manoel Odorico de Moraes Filho

## RESUMO

**Objetivo:** Caracterizar a pele de tilápia do Nilo, uma possível fonte de biomaterial para enxertia, a partir de suas características físicas (resistência à tração), histomorfológicas e da tipificação da composição do colágeno. **Métodos:** Amostras de pele de tilápia do Nilo foram utilizadas e, para os testes de tração (utilizando a máquina de ensaios universais Instron®), as peles foram submetidas à imersão em soluções de glicerol em crescente concentração. Parte das amostras foi fixada em formol neutro a 10%, processada e corada com o uso da hematoxilina e da eosina, para confecção de lâminas e posterior análise histológica e histoquímica. Todas as etapas foram reproduzidas também em pele humana, doada de cirurgias plásticas, para efeito comparativo. **Resultados:** A morfologia da pele da tilápia mostrou-se semelhante à da pele humana, com derme profunda formada por espessas fibras colágenas organizadas, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical. A pele de tilápia também apresentou maior composição por colágeno tipo I em relação à pele humana ( $p=0,015$ ). Nos testes de tração, a carga média suportada pela pele de tilápia foi de  $43,9 \pm 26,2$  N, enquanto a extensão à tração teve valores médios de  $4,4 \pm 1,045$  cm. **Conclusão:** A pele de tilápia possui características microscópicas semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e elevada resistência e extensão à tração em quebra, o que suporta sua possível aplicação como biomaterial. A derme desta pele é composta por feixes organizados de fibras de colágeno denso, predominantemente do tipo I, o que traz considerável importância para seu uso clínico.

**DESCRITORES:** Materiais Biocompatíveis. Colágeno. Tilápia.

## ABSTRACT

**Objective:** To characterize the Nile tilapia skin, a possible source of biomaterial for grafting, from their physical (tensile strength) and histomorphological characteristics, and from collagen classification. **Methods:** Samples of Nile tilapia skin were used and, for microtensile tests (by Instron® universal testing machine), were subjected to immersion in glycerol solutions of increasing concentration. Part of the samples was fixed in neutral formalin 10%, processed and prepared using routine staining with hematoxylin and eosin into tissue slides, for further histological and histochemical analysis. All steps were also played in human skin, donated by plastic surgeries, for comparative effects. **Results:** The morphology of Nile tilapia skin presented similarities with human skin, showing the deep dermis formed by thick organized collagen fibers, on parallel/horizontal and transversal/vertical arrangement. The tilapia skin also presented a larger composition of type I collagen, compared with human skin ( $p=0.015$ ). On traction tests, the load average supported by tilapia skin was  $43.9 \pm 26.2$  N, while the traction extensile had mean values of  $4.44 \pm 1.045$  cm. **Conclusion:** The tilapia skin has microscopic characteristics, similar to the morphological structure of human skin, and high resistance and tensile extension at break, which supports its possible application as biomaterial. The dermis of this skin is composed by organized bundles of dense collagen fibers, predominantly type I ones, which brings considerable importance for its clinical use.

**KEYWORDS:** Biocompatible Materials. Collagen. Tilapia.

## RESUMEN

**Objetivo:** Caracterizar la piel de tilapia del Nilo, una posible fuente de biomateriales para injertos, a partir de sus características físicas (resistencia a la tracción), histomorfológico y composición de colágeno. **Métodos:** Se utilizaron muestras de piel de tilapia del Nilo para ensayos de tracción (utilizando la máquina universal de ensayos Instron®), las pieles fueron remojadas en glicerol en creciente aumento de la concentración. Parte de las muestras se fijó en 10% de formalina neutra, procesada y se tiñó con hematoxilina y eosina, para la fabricación de cortes y el análisis histológico e inmunohistoquímico subsiguiente. Todos los pasos también se produjeron en la piel humana, donada de cirugía plástica, para efectos comparativos. **Resultados:** La morfología de la piel de tilapia era similar a la de la piel humana, con dermis profunda formados por fibra de colágeno gruesas colocadas en disposición paralela / horizontal y lateral / vertical. La piel de tilapia también tenía una composición más alta de colágeno tipo I en relación a la piel humana ( $p=0,015$ ). Los ensayos de tracción en la carga media por la piel tilapia fue  $43,9 \pm 26,2$  N, mientras que la extensión a la tracción tenía valores promedio de  $4,4 \pm 1,045$  cm. **Conclusión:** La piel de tilapia tiene características microscópicas similares a estructura morfológica de la piel humana y de alta resistencia a la tracción y la extensión a la rotura, que apoya su posible aplicación como biomaterial. La dermis de esta piel está compuesta por haces organizados por fibras de colágeno densas, predominantemente de tipo I, que aporta una considerable importancia para el uso clínico.

**PALABRAS CLAVE:** Materiales Biocompatibles. Colágeno. Tilapia.

## INTRODUÇÃO

A queimadura é uma das maiores agressões que o nosso organismo pode sofrer. Ela varia desde uma simples insolação, queimadura de primeiro grau, até a destruição total da pele (epiderme e derme) e dos tecidos adjacentes, como nas queimaduras de terceiro grau, causadas pelo choque elétrico. A maioria da população atingida pelas queimaduras é de baixa renda e 97% não tem nenhum plano de saúde<sup>1</sup>.

Nas lesões de 2º e de 3º graus, com grande superfície corporal (SCQ) atingida, o tratamento é feito por uma equipe interdisciplinar. O paciente fica internado em um centro de tratamento de queimados. O tratamento clínico inclui reposição hídrica adequada, através de uma veia de grande calibre, controle da diurese (por meio de sonda vesical), suporte enteral (via sonda nasogástrica ou enteral), para evitar a hemorragia digestiva e a translocação bacteriana, boa analgesia horária e, em alguns casos, antibioticoterapia. O tratamento cirúrgico vai desde os curativos, passando pela escarotomia e pela fasciotomia, pelos desbridamentos, pelas amputações, pelos enxertos, pelos retalhos fasciocutâneos, até os retalhos livres<sup>2</sup>.

Em nosso país, em todos os centros de tratamento de queimados da rede pública, temos a seguinte conduta, em relação aos curativos: nas queimaduras de segundo grau, é realizado diariamente o banho com clorexidine a 2% e o curativo é feito com o antimicrobiano tópico sulfadiazina de prata a 1%, até a completa reparação da lesão (2º grau superficial em torno de 12 dias e profundo entre 21 e 25 dias); nas lesões de terceiro grau, é realizado o desbridamento do tecido necrótico em várias etapas (desbridamento sequencial), feito o curativo com sulfadiazina de prata a 1%, até a preparação do leito da ferida para a enxertia.

Na rede privada, em nosso país, este cenário se modifica e, dependendo do tipo de convênio ou das condições financeiras do paciente, são usados curativos biossintéticos e peles artificiais, todos importados e de elevado custo. Na Europa e nos Estados Unidos da América, são utilizadas, nestas lesões de 2º e de 3º graus, peles homólogas (pelos inúmeros bancos de pele), peles heterólogas, curativos biossintéticos e derme artificial, para melhor sobrevida e boa recuperação funcional. Infelizmente, em um país com as dimensões do Brasil, temos apenas em funcionamento dois bancos de pele, sendo um em São Paulo (Hospital das Clínicas) e o outro em Porto Alegre (Santa Casa de Misericórdia), uma vez que o único banco do Nordeste, localizado em Recife (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira – IMIP), encontra-se desativado<sup>3</sup>.

Estamos muito distantes de ter o substituto cutâneo temporário ideal. Alguns curativos heterólogos já foram testados e usados em nosso país, porém abandonados ao longo do tempo, seja pelo elevado custo de importação, como a pele porcina, ou pela falta de estudos científicos, como a pele de rã ou pela transmissão de doenças animais, que todos podem causar, a não ser quando a pele é irradiada, aumentando os custos<sup>4</sup>.

Tecidos biológicos de origem animal, como a pele de porco, a pele de rã, o pericárdio bovino e a camada submucosa de intesti-

no de porco, têm sido utilizados em curativos oclusivos biológicos (heteroenxertos), nas lesões por queimaduras<sup>5-9</sup>.

Entretanto, para a liberação e a utilização desses materiais, eles devem ser submetidos a rigorosos protocolos, para a identificação da sua real contribuição, eficácia e biocompatibilidade<sup>10</sup>.

A pele da tilápia do Nilo surge como um possível subproduto, com aplicabilidade clínica de novos biomateriais utilizáveis para a bioengenharia. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), pertencente à família dos ciclídeos, é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais. No Ceará, a piscicultura da tilápia encontra-se difundida em diversos reservatórios, nas principais bacias hidrográficas do Estado, sendo o açude Castanhão, localizado nos municípios de Jaguaribara, Alto Santo, Jaguaribe e Jaguaretama, seu principal produtor. A pele deste peixe é um produto nobre e de alta qualidade, pois possui resistência peculiar, couro<sup>11</sup>. Entretanto, não existem estudos que evidenciem sua resistência como pele não submetida ao curtimento.

Estudos histológicos da pele da tilápia demonstraram uma epiderme revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, seguido de extensas camadas de colágeno<sup>12</sup>. O colágeno configura-se como um dos principais componentes dos biomateriais, devido à sua característica de orientar e de definir a maioria dos tecidos<sup>13</sup>, além de possibilitar biodegradabilidade e biocompatibilidade, que favorecem a sua aplicação<sup>14</sup>. Desta forma, o detalhamento da quantidade e o tipo de colágeno presente configuram-se como formas de caracterização de biomateriais.

A literatura reporta poucos trabalhos em que a pele de tilápia foi submetida ao processo de curtimento para confecção de luvas e de vestimentas. Testes mecânicos de tracionamento são descritos, conferindo o aproveitamento deste material, apesar da sua delgada espessura para este fim<sup>11</sup>. No entanto, ainda não existem trabalhos publicados sobre a possibilidade de utilização desta pele como biomaterial, para recobrimento de feridas na pele humana por queimadura.

Dessa forma, esse estudo objetivou a caracterização da pele de tilápia do Nilo, a partir de suas características histomorfológicas, tipificação do colágeno e características físicas (resistência à tração). O método de processamento, de descontaminação e de esterilização da pele da tilápia e sua aplicação em queimaduras e feridas foi registrado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) com o número BR1020150214359.

## MÉTODO

Amostras de pele de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (n=7) foram obtidas através da piscicultura do Castanhão (Jaguaribara-CE). Os peixes são cultivados em tanque de rede, com peso entre 800 e 1000 g. Eles foram insensibilizados por choque térmico (caixas isotérmicas com gelo moído e água [1:1]), para, em seguida, realizar-se a sangria. As peles foram removidas com uma turquesa (ferramenta) e submetidas à lavagem com água corrente, para remoção de qualquer resquício de sangue e de outras impurezas. Posteriormente,

foram colocadas em solução fisiológica NaCl a 0,9% estéril (previamente resfriada a 4°C) para a limpeza final. As peles para os testes de microtração foram submetidas a um processo de esterilização, que consta de duas etapas de imersão em clorexidina por 30 minutos e três etapas de imersão no glicerol (50%, 75%, 100%). As peles utilizadas para análise histológica e histoquímica foram armazenadas em solução de formol tamponado a 10%.

Adicionalmente, amostras de pele humana de descarte, oriundas de cirurgias estéticas, foram armazenadas em solução de formol tamponado a 10% para análise histológica e histoquímica. Paralelamente, outras amostras foram submetidas aos testes de microtração e passaram pelas mesmas etapas de esterilização que a pele da tilápia. Destaca-se, ainda, que estas peles humanas foram utilizadas apenas em laboratório, não sendo realizada nenhuma intervenção terapêutica nas mesmas.

### Análise Histológica

Após o período de fixação, as amostras foram analisadas macroscopicamente e clivadas para remoção de tecidos muscular e adiposo excedentes. Em seguida, os fragmentos foram processados em processador automático de tecidos (Lupe®), incluídos em parafina fundida a 58°C e seccionados em micrótomo semiautomático Leica®, com cortes de 4 µm de espessura. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina<sup>15</sup> e analisadas com o auxílio de microscópio óptico.

### Análise Histoquímica

Cortes de 3µm foram dispostos em lâminas de vidro e desparafinizadas em estufa a 60°C por 3h, seguidos de três banhos de xilol (5 minutos cada). Após reidratação em série decrescente de álcool, as lâminas foram incubadas em solução de picrossirius red (ScyTek®) por 30 minutos e lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contracorados com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan®. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Leica® modelo DM 2000), o que permite visualizar o colágeno tipo I (maduro), com coloração vermelho-alaranjada, e o colágeno tipo III (imaturado), com cor verde.

Para quantificação dos diferentes tipos de colágeno, seis campos em um aumento de 200x foram fotografados com uso de câmera DFC 295, acoplada ao Microscópio Leica® DM 2000. As fotomicrografias foram avaliadas pelo software de análise de imagem Image J® (RSB), após calibração das imagens pelo comando Color Thershold (Image > Adjust > Color Thersold) na função RGB, para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92).

Depois da calibração, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e foi mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (Analyse > Analyse Particles). Após a polarização de luz, o mesmo protocolo foi realizado, ajustando-se as cores na função RGB para Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32).

Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary), e foi mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo-avermelhado (correspondente ao colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela marcação amarelo-avermelhada. A área verde-esbranquiçada, relativa ao colágeno tipo III, foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e o percentual marcado unicamente pela cor amarelo-avermelhada<sup>16</sup>.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio do teste t de Student [nível de significância: 5%, dados paramétricos descritos na forma: média ± erro-padrão da média (EPM)].

### Testes de Tração

Os ensaios de tração foram realizados no equipamento Instron® 3345 com célula de carga de 50N, no módulo de tração, utilizando-se garras de ação mecânica em cunha (Figura 1).

Todas as amostras (pele de tilápia e humana) foram reidratadas com solução fisiológica NaCl 0,9% (3 lavagens de 5 minutos) e cortadas, obtendo-se 26 corpos de prova de formato retangular, medindo 10,0 x 2,0 cm, sendo 17 da pele da tilápia e nove de pele humana. Em seguida, foram realizados cortes adicionais, a fim de proporcionar-lhes uma conformação de ampulheta, cujo centro



Figura 1 - Corpo de prova de pele de tilápia montado em Single Column Universal Testing Systems for Capacity Testing up to 5 kN Instron® 3345, no módulo de tração.

apresentava 1,0 cm de largura (Figura 2). No momento do teste, a espessura de cada corpo de prova foi aferida, referente à região do centro da ampulheta, utilizando-se um paquímetro digital Mitutoyo®.

Em cada ensaio, um corpo de prova foi posicionado entre as garras e, com o uso do *software* Bluehill 2®, foram mensuradas a carga máxima observada (N), a deformação à tração em máximo de carga (%), a carga em quebra (N) e o esforço à tração em quebra (N/mm<sup>2</sup>), além da extensão à tração em máximo de carga (cm). Todos os ensaios foram realizados com uma velocidade de deslocamento de 5 mm/min.



Figura 2 - Corpo de prova para o ensaio de tracionamento medindo 10,0 x 2,0 cm (altura x largura) mostrando região central em forma de ampulheta com 1,0 cm de largura.

## RESULTADOS

### Análise Histológica

#### Pele de tilápia

A análise microscópica da pele de tilápia demonstrou a epiderme revestida por epitélio pavimentoso estratificado constituído, em diversos trechos, por poucas camadas celulares. As células basais apresentavam morfologia colunar e as espinhosas, poligonais com núcleos ovais. Foram observadas células mucosas dispersas (Figura 3A).

A derme superficial era composta por tecido conjuntivo frouxo, permeado por vasos sanguíneos de calibres variados, com fibras colágenas paralelas e finas, além de melanóforos subepiteliais e melanofagos dispersos (Figura 3A). Na derme profunda, observaram-se espessas fibras colágenas organizadas, compactadas, em disposição paralela/horizontal e transversal/vertical, perpendiculares à superfície da pele (Figura 3B).

Acúmulos de adipócitos típicos e feixes nervosos foram evidenciados na hipoderme (Figura 3C).

#### Pele humana

Fragmentos de pele humana foram analisados sob microscopia ótica, que revelou um revestimento de epitélio pavimentoso estratificado hiperortoparaqueratinizado, com trechos de atrofia, sob o qual se visualizava tecido conjuntivo fibroso, com aumentada atividade colagênica, células inflamatórias mononucleares dispersas e vasos sanguíneos, por vezes, dilatados (Figura 3D).

Na derme superficial e na profunda, havia tecido conjuntivo fibroso denso não modelado, com as fibras colágenas dispostas em diferentes direções (Figura 3E).

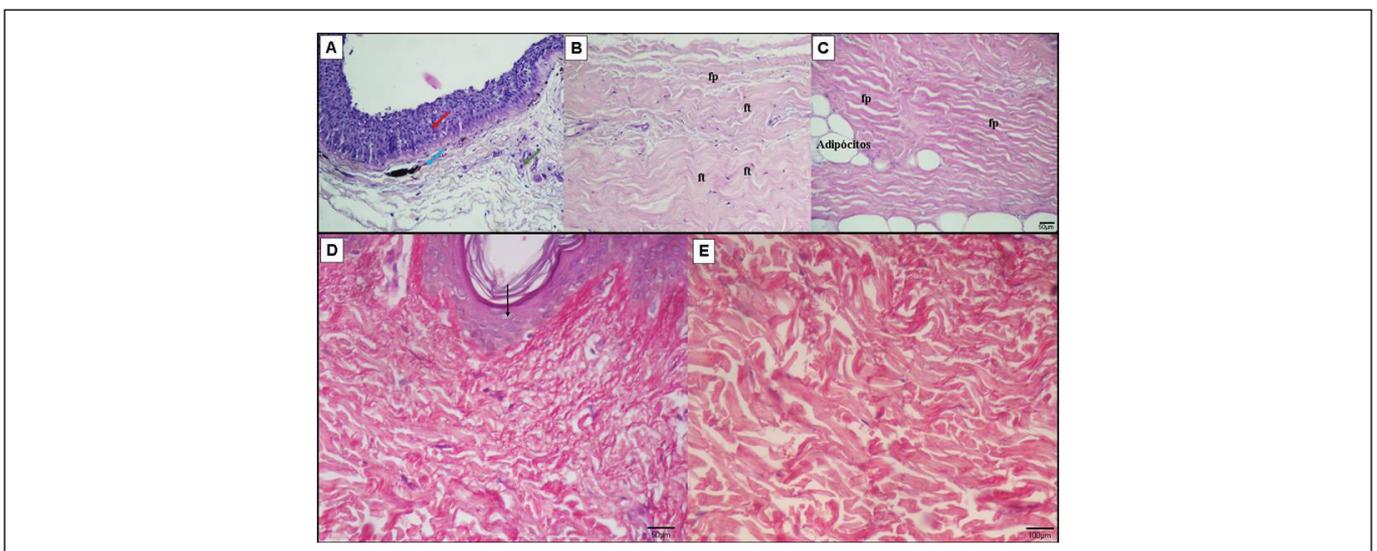


Figura 3 - Fotomicrografia de pele de tilápia (A, B e C) e pele humana (D e E). A. Epiderme (seta vermelha) e derme superficial (seta verde) com melanóforos subepiteliais (seta azul) (HE, 100x); B. Derme profunda mostrando fibras colágenas transversais (ft) (HE, 200x); C. Fibras colágenas paralelas (fp) na derme profunda e trecho de hipoderme com depósitos de adipócitos (HE, 400x); D. Epitélio pavimentoso estratificado hiperorceratinizado sob o qual há córion fibroso denso (seta preta) (HE, 200x); E. Região de derme profunda de pele humana exibindo fibras colágenas em diferentes direções (HE, 400x).

### Análise Histoquímica

Foi considerado, para esta análise, o colágeno da derme profunda da pele da tilápia, visto que, na derme superficial, o tecido conjuntivo era disposto frouxamente com poucas fibras colágenas. Como na pele humana não foi visualizada esta diferença, pois tanto a derme superficial como a profunda apresentavam tecido conjuntivo fibroso denso, o colágeno analisado pertencia às duas regiões.

Os fragmentos avaliados da pele da tilápia e da humana revelaram extensa área preenchida por colágeno, representando  $91,6 \pm 1,1\%$  (média  $\pm$  EPM) e  $71,3 \pm 2,6\%$  (média  $\pm$  EPM), respectivamente ( $p < 0,001$ ) (Figura 4A). A análise quantitativa do colágeno demonstrou que, na pele de tilápia, houve maior percentual de área preenchida por colágeno tipo I (maduro) (área marcada em laranja/vermelho) [ $52,2 \pm 3,0\%$  (média  $\pm$  EPM)], do que o observado na pele humana, na qual a área ocupada por este tipo de colágeno foi  $39,2 \pm 2,4\%$  (média  $\pm$  EPM), revelando diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,015$ ) (Figuras 4B e 5). Por outro lado, o percentual de colágeno tipo III (imaturo) (área marcada em amarelo/verde) mostrou-se significativamente superior na pele humana [ $60,8 \pm 2,4\%$  (média  $\pm$  EPM)] em relação à pele da tilápia [ $47,8 \pm 3,0\%$  (média  $\pm$  EPM)] ( $p = 0,015$ ) (Figuras 4C e 5).

A razão entre a quantidade de colágeno tipo I:III mostrou-se significativamente aumentada na tilápia [ $1,12 \pm 0,15$  (média  $\pm$  EPM)], em relação ao encontrado na pele humana [ $0,65 \pm 0,06$  (média  $\pm$  EPM)] ( $p = 0,029$ ) (Figura 4D).

### Testes de Tração

#### Pele da tilápia

A ruptura de todos os corpos de prova da pele de tilápia ocorreu na região do centro da ampulheta, onde a espessura variou de 0,66 a 0,96 mm.

Para a análise de carga máxima (N), a qual avalia a carga que a pele suporta sem ocorrer quebra, obtiveram-se o valor maior de 94,013 N e o menor de 15,763 N. A média deste parâmetro ficou em  $43,967 \pm 26,248$  N (média  $\pm$  EPM). Com relação à avaliação da extensão à tração em máximo de carga medida em centímetros (cm), a pele da tilápia suportou uma deformação que variou entre 6,45 a 2,74 centímetros (média =  $4,442 \pm 1,045$  cm), sem sofrer quebra.

O teste de deformação à tração em máxima carga (%) resultou em valores de 62,775% (máximo), de 25,908% (mínimo) e média de  $42,529 \pm 10,342\%$ .

A prova de carga em quebra (N) demonstrou ampla variação, visto que os resultados da pele da tilápia oscilaram de um valor máximo de 68,394 N até um mínimo de 4,828 N (média =  $22,727 \pm 15,673$  N).

Os valores de esforço à tração em quebra (N/mm<sup>2</sup>) resultaram em um máximo de 22,393 N/mm<sup>2</sup> e mínimo de 0,704 N/mm<sup>2</sup> (média =  $4,964 \pm 5,236$  N/mm<sup>2</sup>) (Tabela 1).

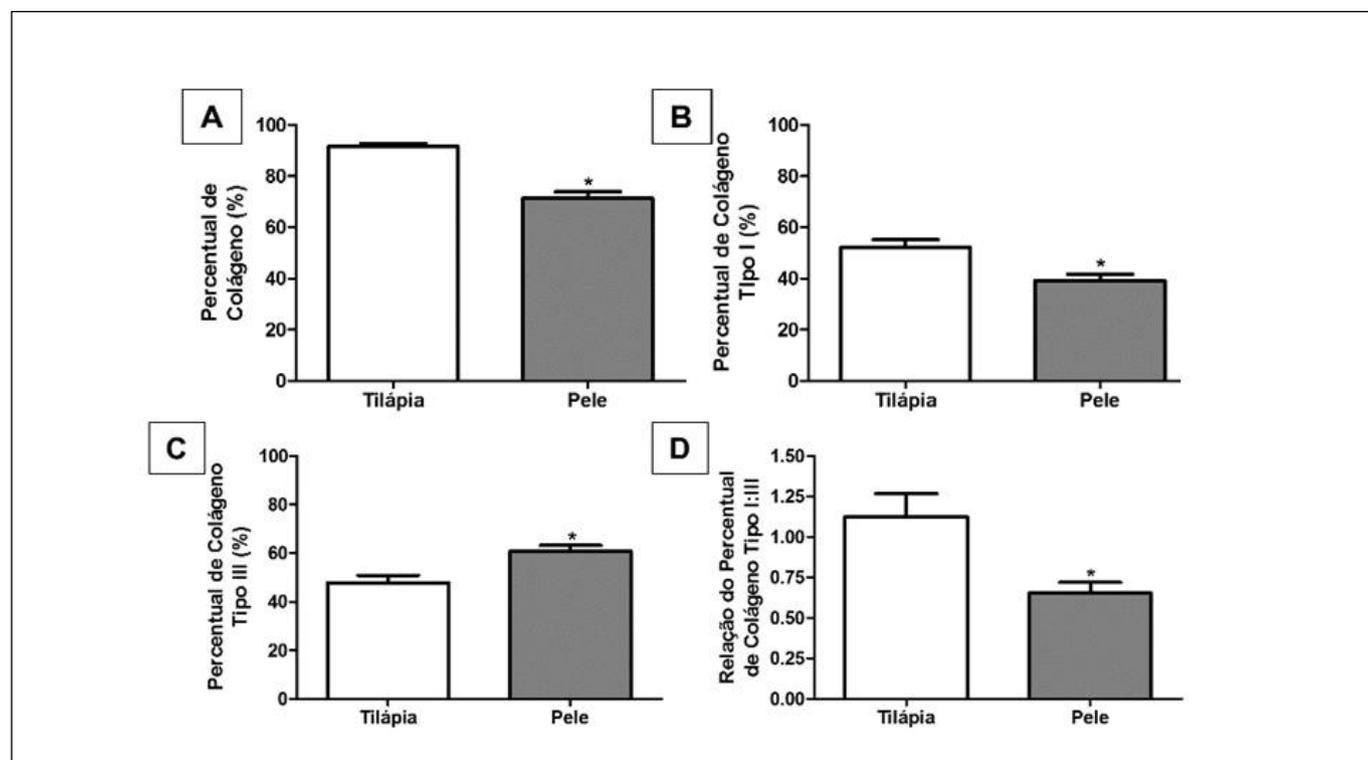


Figura 4 - Avaliação do percentual da área preenchida por colágeno e os diferentes tipos de colágeno (I e III) em tecido conjuntivo de tilápia e humano. \* $p < 0,05$ , teste t de Student (média  $\pm$  EPM).

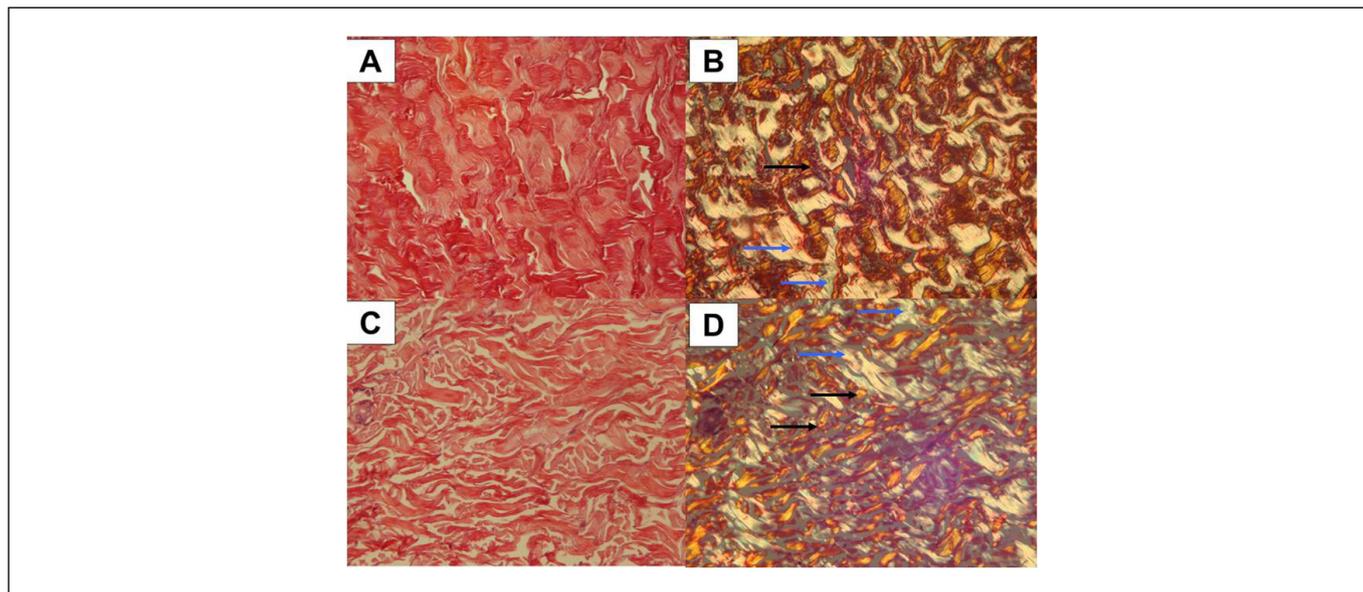


Figura 5 - Perfil de colágeno da pele de tilápia (A e B) e pele humana (C e D) sem (A e C) e com (B e D) polarização de luz (Picrosirius Red, 400x), mostrando a distribuição de colágeno tipo I (amarelo-avermelhado) e tipo III (verde-esbranquiçado). Seta preta: colágeno tipo I. Seta azul: colágeno tipo III.

TABELA 1  
Características das queimaduras em crianças internadas no CTQ do HMUE, Ananindeua, PA, nos anos de 2011 a 2014.

	Máximo de Carga (N)	Deformação (%)	Carga em Quebra (N)	Esforço (N/mm <sup>2</sup> )	Extensão à tração em quebra (cm)
	64,004	54,161	22,393	22,393	6,14
	20,481	43,227	9,000	9,000	2,74
	37,469	32,592	22,441	5,929	3,59
	38,712	39,317	19,501	5,153	4,26
	16,428	30,975	6,082	0,704	3,52
	22,506	41,342	20,615	2,386	4,2
	29,080	53,517	21,066	2,847	5,51
	15,763	31,567	7,478	1,011	3,28
	18,189	40,85	13,363	1,407	4,5
	27,074	48,467	20,120	3,183	4,92
	28,184	39,583	11,93	1,326	4,14
	59,216	62,775	37,804	4,248	6,45
	94,013	32,500	32,627	3,794	3,62
	83,192	39,150	33,488	4,186	4,01
	59,300	54,884	35,24	6,407	5,58
	89,291	52,192	68,394	9,633	5,25
	44,539	25,908	4,828	0,791	3,81
Máximo	94,013	62,775	68,394	22,393	6,45
Mínimo	15,763	25,908	4,828	0,704	2,74
Média	43,967	42,529	22,727	4,964	4,442*
Coefficiente de Variação	688,961	106,974	245,652	27,423	1,093
Desvio Padrão	26,248	10,342	15,673	5,236	1,045

TABELA 2  
Valores dos testes de resistência à tração em pele humana realizados no equipamento Instron® 3345 Single Column Universal Testing Systems for Capacity Testing up to 5 kN.

	Máximo de Carga (N)	Deformação (%)	Carga em Quebra (N)	Esforço (N/mm <sup>2</sup> )	Extensão à tração em quebra (cm)
Máximo	494,511	79,025	475,184	60,921	8,3
Mínimo	9,530	15,475	4,727	1,292	1,79
Média	209,219	42,410	146,216	17,667	4,615*
Desvio Padrão	185,183	25,220	194,553	24,785	2,574

### Pele humana

Nove amostras de pele humana foram submetidas à avaliação de propriedades físicas através de testes de tração. Os mesmos parâmetros foram avaliados, e os dados obtidos estão resumidos no quadro acima (Tabela 2).

A extensão à tração em quebra medida em centímetros apresentou média de 4,615 cm, valor semelhante ao encontrado na análise da pele da tilápia.

### DISCUSSÃO

Sobre a análise histológica, os achados do presente estudo foram semelhantes aos encontrados previamente na literatura, em que foi descrito que a pele da tilápia é composta por epiderme representada por epitélio pavimentoso estratificado, com células basais cúbicas ou cilíndricas de núcleo oval e com a possível presença de células mucosas<sup>11</sup>. A derme, por sua vez, é constituída por tecido conjuntivo frouxo (superficial) e denso (profundo). Na camada mais externa da derme profunda, já foram mostradas, também, fibras colágenas horizontais e verticais (perpendiculares à superfície da pele), e na interna, fibras horizontais compactadas e espessas, corroborando os nossos achados<sup>12</sup>. Estudos prévios também evidenciaram, como nesta pesquisa, melanóforos em derme superficial<sup>11</sup>.

A família do colágeno é composta por mais de 20 tipos geneticamente diferentes, sendo os mais frequentemente encontrados na derme os tipos I, II, III, IV VI, VII. O colágeno tipo I forma fibras espessas, mecanicamente estáveis e responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. O colágeno tipo III forma fibrilas, geralmente presentes logo abaixo da membrana basal, e participa da fixação da epiderme à derme. O colágeno tipo I é o mais comum, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens, enquanto o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos<sup>17,18</sup>.

A diferenciação entre os tipos de colágeno configura-se como um exercício difícil, sendo uma das técnicas mais executáveis a coloração histoquímica de Picrossirius Red, seguida da técnica de polarização da luz, realizada neste estudo, a qual confere diferenciação entre colágenos I e III, sendo essa a justificativa para a análise mais específica desses dois tipos<sup>19</sup>.

A maioria dos biomateriais, como pericárdio de porco, apresenta grande quantidade de colágeno tipo I (47%)<sup>20</sup>, do mesmo modo que a pele de tilápia (57%, no presente estudo). Sugere-se que este tipo de colágeno possua grande quantidade de grupos reativos, como aminas, ácidos carboxílicos e hidroxilas alcoólicas, que possibilitam alterações químicas do tecido, principalmente através de reações de reticulação e hidrólise seletiva<sup>21</sup>, aumentando sua adaptação aos outros tecidos.

A estrutura do colágeno tipo I é caracterizada por um tripeptídeo, no qual há, frequentemente, glicina, prolina e hidroxiprolina. Apesar de a composição por aminoácidos variar de acordo com as espécies, em geral, animais marinhos contêm menor quantidade de hidroxiprolina compondo o colágeno tipo I, o que está diretamente relacionado com a temperatura de degradação dessa estrutura. A temperatura corporal dos mamíferos é, nesse caso, superior à temperatura de degradação do colágeno, o que, por conseguinte, limita seu uso na medicina regenerativa; no entanto, o colágeno tipo I de peixes tropicais, como a tilápia, possui uma temperatura de degradação superior, comparada aos outros peixes. Estudos mostram que, nesse aspecto, o colágeno tipo I derivado da tilápia possui um grande potencial de uso clínico, podendo ser comparado, inclusive, aos materiais em utilização, derivados de mamíferos. O colágeno obtido da pele da tilápia é, ainda, uma opção mais rentável e estável, comparada à obtenção através das escamas<sup>22</sup>.

Os feixes de colágeno denso da pele da tilápia são dispostos, predominantemente, de forma paralela e transversal, diferindo da organização da derme humana, em que se encontram fibras com aumentada atividade colagênica em direções diversas. Esses aspectos poderiam contribuir para o entendimento da alta capacidade da pele humana em resistir a grandes cargas, no entanto, esta diferença no arranjo das fibras colágenas não parece interferir no parâmetro da elasticidade da pele da tilápia, visto que os valores encontrados em ambas as peles no teste de extensão à tração, medida em centímetros, apresentaram médias semelhantes (média tilápia = 4,442 cm; média humana = 4,615 cm). Esta característica possibilitaria satisfatória manipulação da pele do peixe nas manobras de recobrimento e sutura, por exemplo.

Os ensaios de resistência à tração se prestam para se verificar qual a tensão máxima que as membranas suportam até que ocorra

sua ruptura, ou seja, para avaliar a capacidade da pele em absorver as cargas impostas, sendo essas informações essenciais para sua possível utilização como matrizes na área de regeneração tecidual, onde estão sujeitas à carga.

Em relação aos valores encontrados nos testes de tração, poucas são as pesquisas reportadas na literatura que apresentam metodologia semelhante à deste estudo. Em avaliação prévia com peritônio de paca, um possível biomaterial de uso clínico, armazenadas em glicerol 98%, em períodos de até 30 dias, evidenciaram-se valores médios de carga máxima (16 N) e esforço a tração (2,8 N/mm<sup>2</sup>), inferiores ao encontrado para a pele de tilápia em teste, entretanto, com valores de deformação ligeiramente superiores (49%)<sup>23</sup>.

Quando comparados com a pele de tilápia submetida ao curtimento, os valores encontrados na literatura são em média superiores, como esperado, em que a pele curtida apresenta valores de carga máxima de 112 N, esforço à tração de 10,87 N/mm<sup>2</sup> e deformação de 75%<sup>24</sup>.

## CONCLUSÃO

É possível a utilização da pele da tilápia como promissor biomaterial na medicina regenerativa. As suas características microscópicas, semelhantes à estrutura morfológica da pele humana e elevada resistência e extensão à tração em quebra possibilitam esta aplicação. A derme desta pele é composta por feixes de colágeno compactados, longos e organizados, predominantemente do tipo I, de considerável importância para seu uso clínico. No entanto, novos estudos são necessários, particularmente em animais, para validação da pele da tilápia como curativo biológico temporário em queimaduras.

## REFERÊNCIAS

1. Lima Júnior EM. Rotina de atendimento ao queimado. Fortaleza: Gráfica LCR; 2009.
2. Crisóstomo MR, Serra MCVF, Gomes RD. Epidemiologia das queimaduras. In: Lima Júnior EM, Serra MC, eds. Tratado de queimaduras. São Paulo: Atheneu; 2004. p.31-5.
3. Lima Júnior EM, Novaes FN, Piccolo NS, Serra MCVF. Tratado de queimaduras no paciente agudo. São Paulo: Atheneu; 2008.
4. Bolgiani A, Lima Júnior EM, Serra MCVF. Queimaduras - Conductas Clínicas y Quirúrgicas. Rio de Janeiro: Atheneu; 2013.
5. Kua EH, Goh CQ, Ting Y, Chua A, Song C. Comparing the use of glycerol preserved and cryopreserved allogenic skin for the treatment of severe burns: differences in clinical outcomes and in vitro tissue viability. Cell Tissue Bank. 2012;13(2):269-79.
6. Haslam IS, Roubos EV, Mangoni ML, Yoshizato K, Vaudry H, Kloepper JE, et al. From frog integument to human skin: dermatological perspectives from frog skin biology. Biol Rev Camb Philos Soc. 2014;89(3):618-55.
7. Leto Barone AA, Mastroianni M, Farkash EA, Mallard C, Albritton A, Torabi R, et al. Genetically modified porcine split-thickness skin grafts as an alternative to allograft for provision of temporary wound coverage: preliminary characterization. Burns. 2015;41(3):565-74.
8. Zaidi AH, Nathan M, Emani S, Baird C, del Nido PJ, Gauvreau K, et al. Preliminary experience with porcine intestinal submucosa (CorMatrix) for valve reconstruction in congenital heart disease: histologic evaluation of explanted valves. J Thorac Cardiovasc Surg. 2014;148(5):2216-4.
9. Gubitosi A, Docimo G, Parmeggiani D, Pirozzi R, Vitiello C, Schettino P, et al. Acellular bovine pericardium dermal matrix in immediate breast reconstruction after Skin Sparing Mastectomy. Int J Surg. 2014;12 Suppl 1:S205-8.
10. Piccolo M, Piccolo N, Daher R, Daher S. Cicatrização e Cicatrizes. In: Lima Júnior EM, Novaes FN, Piccolo N, Serra MCVF. Tratado de Queimaduras no Paciente Agudo. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2009. p.591-607.
11. Franco MLRS, Franco NP, Gasparino E, Dorado DM, Prado M, Vesco APD. Comparação das peles de tilápia do Nilo, pacu e tambaqui: histologia, composição e resistência. Arch Zootec. 2013;62 (237):21-32.
12. Souza MLR, Santos HSL. Análise morfológica da pele da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através da microscopia de luz. Rev Unimar. 1997;19(3):881-8.
13. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. Pediatr Res. 2008;63(5):492-6.
14. MacNeil S. Biomaterials for tissue engineering of skin. Mater Today (Kidlington). 2008;11(5):26-35.
15. Hirth DA, Singer AJ, Clark RA, McClain SA. Histopathologic staining of low temperature cutaneous burns: comparing biomarkers of epithelial and vascular injury reveals utility of HMGB1 and hematoxylin phloxine saffron. Wound Repair Regen. 2012;20(6):918-27.
16. Andrade TA, Iyer A, Das PK, Foss NT, Garcia SB, Coutinho-Netto J, et al. The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in mice. Braz J Med Biol Res. 2011;44(10):1036-47.
17. Coudroy R, Jamet A, Peñuelas O, Thille AW. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative therapy? Intensive Care Med. 2015;41(6):1159-60.
18. Barascuk N, Vassiliadis E, Larsen L, Wang J, Zheng Q, Xing R, et al. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen--A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. Clin Biochem. 2011;44(10-11):900-6.
19. Modak N, Tamgadge S, Tamgadge A, Bhalerao S. Comparative Study of Clinical Staging of Oral Submucous Fibrosis with Qualitative Analysis of Collagen Fibers Under Polarized Microscopy. Iran J Pathol. 2015;10(2):111-9.
20. Vilela ASB. Matriz extracelular de pericárdio fibroso porcino [Tese de doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2006.
21. Buchaim RL, Rosso MPO, Andreo JC, Buchaim DV, Okamoto R, Rodrigues AC, et al. A New Anionic Bovine Tendon as Scaffold for the Repair of Bone Defects: A Morphological, Histomorphometric and Immunohistochemical Study. Br J Med Med Res. 2015;10(8):1-11.
22. Yamamoto K, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, Ikeda T, Yamada S, Hayashi Y. The characterization of fish (Tilapia) collagen sponge as a biomaterial. Int J Polym Sci. 2015;2015.
23. Camargo AD, Camargo PC, Leal LM, Garcia Filho SP, Martins LL, Shimano AC, et al. Propriedades tensiométricas do peritônio da paca (*Cuniculus paca*) a fresco e conservado em glicerina 98%. Pesq Vet Bras. 2014; 34(2):185-91.
24. Hilbig CC, Fockink DH, Maluf MLF, Boscolo WR, Feiden A. Resistência do couro de tilápia e composição centesimal da pele nas operações de ribeira e curtimento. Sci Agrar Paranaensis. 2013;12(4):258-66.

## TITULAÇÃO DOS AUTORES

**Ana Paula Negreiros Nunes Alves** – Professora Doutora do Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

**Maria Elisa Quezado Lima Verde** - Graduanda em Odontologia, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE, Brasil.

**Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior** - Cirurgião dentista, aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, CE, Brasil.

**Paulo Goberlânio de Barros Silva** - Cirurgião dentista, aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, CE, Brasil.

**Victor Pinheiro Feitosa** - Cirurgião dentista, aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Fortaleza, CE, Brasil.

**Edmar Maciel Lima Júnior** - Médico, cirurgião plástico do Centro de Queimados do Instituto Dr. José Frota e Instituto de Apoio ao Queimado, Fortaleza, CE, Brasil.

**Marcelo José Borges de Miranda** - Coordenador Médico do SOS Queimaduras e Feridas, Hospital São Marcos, Recife, PE, Brasil.

**Manoel Odorico de Moraes Filho** - Professor Doutor do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

**Correspondência:** Edmar Maciel Lima Júnior

Rua Visconde de Mauá, 1650 ap. 801 - Aldeota – Fortaleza, CE, Brasil - CEP 60.125-160- E-mail: edmarmaciel@gmail.com

**Artigo recebido:** 2/10/2015 • **Artigo aceito:** 15/12/2015

**Local de realização do trabalho:** Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.