

BIOCOMPATIBILIDADE DA MEMBRANA DE COLÁGENO EXTRAÍDO DE PELE DE TILÁPIA

(Biocompatibility of collagen membrane extracted from tilapia skin)

Sophia Martins da SILVA¹; Maria das Candeias Santos SILVA²; Renata Pereira da SILVA¹;
Carlos Roberto Koscky PAIER³; Manoel Odorico de MORAES FILHO³; Edmar
Maciel LIMA JUNIOR⁴; Felipe Augusto Rocha RODRIGUES^{2*}

¹Universidade Federal do Ceará (UFC) Av. da Universidade, 2853, Benfica, Fortaleza/CE. CEP: 60.020-181;

²Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE), Campus Jaguaribe/CE; ³Dpto de Fisiologia e Farmacologia da UFC; ⁴Instituto de Apoio ao Queimado.

*E-mail: felipe.rocha@ifce.edu.br

RESUMO

Os dispositivos médicos a base de colágeno apresentam custo elevado e exclui a população dos benefícios auferidos. O colágeno de peixe tem sido estudado extensivamente como um biomaterial na regeneração de tecidos. Reconhecendo o grande valor da pele de tilápia-do-Nilo e o seu uso nas mais diversas áreas da medicina regenerativa, acredita-se que, isoladamente, o colágeno extraído e purificado pode ser empregado como uma alternativa terapêutica. Logo, é imprescindível garantir a integridade e segurança do colágeno de tilápia, prevenindo reações adversas no organismo. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a biocompatibilidade da membrana de colágeno extraído da pele da tilápia utilizando os modelos *in vitro* e *in vivo*. Para tanto, as membranas de colágeno previamente preparadas e esterilizadas foram submetidas ao ensaio de citotoxicidade pelo método do MTT utilizando células L-929 (fibroblasto murino). Os extratos foram testados na concentração única de 100%. No ensaio *in vivo*, foram utilizados ratos Wistar que após analgesiados e anestesiados receberam uma peça de membrana de colágeno de pele de tilápia no plano subcutâneo em comparação com membrana colagenosa comercial (controle) e o grupo *sham* (controle salina). Os dados quantitativos foram calculados no programa GraphPad Prism[®]. O grupo experimental é atóxico e foi aprovado pela normativa ISO 10993-5:2009, demonstrando crescimento celular acima de 70%. Os parâmetros sanguíneos (plaquetas, hemácias, leucócitos e hemoglobina) demonstram baixo potencial inflamatório comparado ao produto comercial. Demais análises histológicas em andamento elucidarão a característica biológica ímpar dos coprodutos da tilápia na sinalização biomolecular.

Palavras-chaves: Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, colágeno, biocompatibilidade.

ABSTRACT

*Collagen-based medical devices have a high cost and exclude the population from the benefits received. Fish collagen has been extensively studied as a biomaterial in tissue regeneration. Recognizing the great value of Nile tilapia skin and its use in the most diverse areas of regenerative medicine, it is believed that, alone, the extracted and purified collagen can be used as a therapeutic alternative. Therefore, it is essential to guarantee the integrity and safety of tilapia collagen, preventing adverse reactions in the body. Thus, this work aimed to evaluate the biocompatibility of the collagen membrane extracted from tilapia skin using *in vitro* and *in vivo* models. To this end, previously prepared and sterilized collagen membranes were subjected to cytotoxicity testing by the MTT method using L-929 cells (murine fibroblasts). The extracts were tested at a single concentration of 100%. In the *in vivo* test, Wistar rats were used, which after analgesia and anesthesia received a piece of tilapia skin collagen membrane in the subcutaneous plane in comparison with a commercial collagenous membrane (control) and the sham group (saline control). Quantitative data were calculated using the GraphPad Prism[®] program. The experimental group is non-toxic and was approved by ISO 10993-5:2009, demonstrating cell growth above 70%. Blood parameters (platelets, red blood cells, leukocytes, and hemoglobin) demonstrate low inflammatory potential compared to the commercial product. Further histological analyses in progress will elucidate the unique biological characteristic of tilapia co-products in biomolecular signaling.*

Keyword: Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, collagen, biocompatibility.

Recebido: jan./2022.

Publicado: jun./2024.

INTRODUÇÃO

O colágeno tipo I é a principal proteína estrutural na matriz extracelular de tecidos animais. Atualmente, a principal fonte de colágeno médico é o tecido conjuntivo de mamíferos, pelo qual possui fonte limitada, alto custo, risco potencial de transmissão de zoonoses e restrições religiosas em algumas populações (YAMADA *et al.*, 2014). Nesse sentido, A pele de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta-se como matéria-prima utilizada em novos dispositivos empregados nas mais diversas áreas clínicas (cirurgias plásticas, ginecológicas, veterinárias, odontológicas, entre outros) (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017 e 2019; MONTE *et al.*, 2022; RODRÍGUEZ *et al.*, 2020). Acredita-se que o colágeno extraído e purificado da tilápia, isoladamente, é um insumo valioso, que pode ser empregado no desenvolvimento de novos biomateriais úteis à medicina regenerativa (GOMES, 2021).

Os dispositivos médicos devem ser biocompatíveis, biodegradáveis e suas taxas de degradação devem coadunar com a taxa de crescimento e repovoamento celular dos tecidos a serem regenerados (DE SOUZA *et al.*, 2021). Vários estudos demonstram que as membranas de colágeno apresentam maior estabilidade quando utilizadas em produtos biomédicos (membrana hemostática, curativos para regeneração da pele e nanofibras para regeneração óssea) (YAMADA *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2017). Para uso clínico são necessários testes que garantam que a membrana de colágeno de alta hidrólise oriunda da pele de tilápia possua ausência de rejeição e baixo potencial inflamatório (MOSMANN, 1983; ISO, 2009).

Os órgãos de regulamentação recomendam e garantem a segurança de dispositivos biomédicos por meio dos testes em modelos *in vitro* utilizando células de fibroblastos murino, seguindo a normativa da *International Organization for Standardization* (ISO) 10993-5:2009. Por conseguinte, os modelos *in vitro* não conseguem, ainda, imitar todo o ambiente biológico do processo. Estes modelos são projetados para responder a questões específicas que envolvem um ou dois tipos de células em resposta a alguns estímulos, daí a importância e a necessidade de usar de um modelo animal para conseguir imitar o ambiente do processo de cicatrização na pele humana. Portanto, o colágeno isolado da pele de tilápia tem potencial como insumo médico, farmacêutico e biotecnológico, mas sua segurança deve ser previamente avaliada aos estudos clínicos. Dessa forma, o objetivo principal deste estudo é avaliar a biocompatibilidade da membrana de colágeno de pele de tilápia em modelos *in vitro* e *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

Todas as etapas do processo de obtenção, extração e purificação da membrana de colágeno da pele de tilápia estão descritas na Fig. 01 à seguir.

Obtenção da pele de tilápia e limpeza inicial

As peles de tilápia são retiradas mecanicamente dos peixes na piscicultura, lavadas em água corrente, armazenadas em recipientes plásticos estéreis e em gelo. As peles armazenadas são transportadas ao laboratório (sala limpa), onde são raspadas para retirada de restos de músculos, lavadas em soro fisiológico estéril e congeladas para armazenamento até o uso.

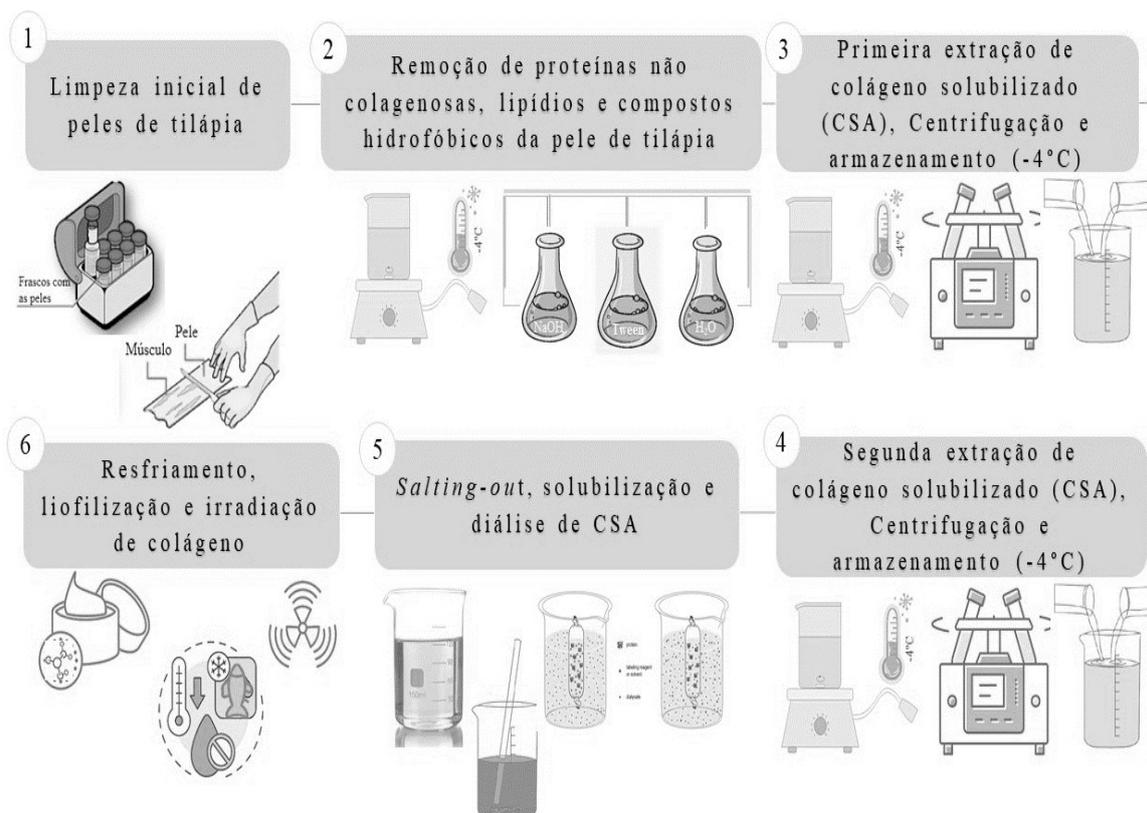


Figura 01: Etapas do processo de purificação da membrana de colágeno extraído da pele de tilápia.

Extração e purificação do colágeno da pele de tilápia

O protocolo segue as etapas de extração, refinamento e alta purificação do colágeno pela preparação de uma biomembrana de camada única. As peles de tilápia limpas, não tratadas quimicamente e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongeladas e pesadas até um total de 40g de massa úmida. As peças foram cortadas em pedaços retangulares menores ($\cong 0,5 \times 1,0\text{cm}^2$) e submetidas ao método de extração de colágeno adaptado de Nalinanon *et al.* (2010). Todo o processo de extração é executado dentro de um shaker refrigerado a $11\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou em refrigerador/câmara fria entre 4 a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas as soluções são preparadas com água ultrapura ($18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) esterilizada por filtração em membrana de $0,22\mu\text{m}$. Antes do uso, todas as soluções são resfriadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Na primeira etapa do processo são retiradas as proteínas não colagenosas, lipídios e compostos hidrofóbicos das peles de tilápia. As peles previamente picotadas em pedaços menores são incubadas em solução básica de Hidróxido de Sódio (NaOH) $0,1\text{mol/L}$ (m/v) com trocas sucessivas de volume, totalizando 6h de tratamento. Em seguida, foram realizadas lavagens com água ultrapura gelada ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) em agitação. Posteriormente, os fragmentos de pele foram incubados em solução de Tween-20 $0,05\%$ (v/v) com trocas sucessivas de volume, totalizando 4h de tratamento. Foram realizadas mais lavagens em quatro volumes de água ultrapura.

Na segunda etapa é realizada duas extrações de colágeno solubilizado por ácido acético $0,5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (CSA). Na primeira extração os fragmentos de pele são incubados em solução de ácido acético (m/v) por 24 a 36 horas. Em seguida, a solução foi distribuída em

tubos especiais para centrifugação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi diluído em solução de ácido acético e filtrado a vácuo. Os melanóforos restantes, que não foram separados durante a centrifugação, são retidos e separados nesta filtração. O sobrenadante é reservado a 4 °C e o precipitado gelatinoso é incubado novamente em ácido acético por 24 a 36 horas, seguido de uma segunda centrifugação. Após a centrifugação, o precipitado gelatinoso foi descartado e o sobrenadante, também foi filtrado a vácuo.

Na etapa de precipitação salina (*salting-out*) de CSA, ambos os sobrenadantes foram misturados e incubados para um tampão final 2,6mol/L (m/v) pela adição de Cloreto de Sódio (NaCl) e Tris Base com Ácido Clorídrico (TRIS-HCl) pH 7.5. Em seguida, esse volume foi centrifugado novamente. O precipitado é removido do tubo após centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (sólido amorfo branco) foi submetido à próxima etapa do processo de extração.

Na terceira etapa, o CSA (sólido amorfo branco) foi submetido a solubilização em solução ácida para o preparo da camada membranosa. O precipitado foi dissolvido em solução com ácido acético (m/v). Em seguida, o CSA foi ressolubilizado em sucessivos volumes contra solução ácida fraca (ácido acético) por diálise, contra membrana de limite de peso molecular de 14kDa por 48 horas com trocas sucessivas de volume. Em seguida, a diálise do CSA é ressolubilizado contra água ultrapura entre 5 a 10 volumes com trocas a cada 24 horas. Posteriormente, o CSA gelificado é transferido para uma bandeja metálica estéril, coberto com papel alumínio, armazenado e congelado a 80 °C.

Liofilização e esterilização da membrana de colágeno da pele de tilápia

A liofilização consiste na desidratação do biomaterial por meio da passagem do estado sólido para o gasoso (sublimação), a temperaturas muito baixas e sem a presença de oxigênio. Os fatores físico-químicos desse processo são essenciais para a preservação das características do colágeno obtido. Assim, o gel dialisado obtido na fase anterior e armazenado no -80 °C por 16 horas, foi liofilizado em aparelho Liotop 108 (Liobrás, São Carlos/SP). Ao final dessa etapa, foi formada uma esponja de colágeno. Posteriormente, o material foi recolhido e levado para uma câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe B2) onde foi esterilizado utilizando radiação ultravioleta por um período de 24 horas.

Ensaio de citotoxicidade da membrana de colágeno oriunda de pele de tilápia

Manutenção da linhagem celular

As células foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe B2) e mantidas em incubadora de CO₂ a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ (PANASONIC, modelo MOC-18ACL). A linhagem L-929 derivada de fibroblasto murino foi cultivada em garrafas de cultura de células de 20cm² com volume de 5mL em meio DMEM (Gibco), com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Para a manutenção das células, o meio foi retirado e a garrafa lavada com PBS estéril; em seguida, foi adicionado tripsina-EDTA a 0,5% (Gibco) diluída 1x em solução tampão (PBS), a fim de desaderir as células. A ação da tripsina foi inibida pela adição de meio com SFB. Parte das células foi removida da garrafa e o volume preenchido com meio completo.

Avaliação da Toxicidade Celular *in vitro* pelo método do MTT

O teste do MTT é um método colorimétrico que avalia de forma quantitativa a atividade mitocondrial através da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983). Seguindo a Normativa ISO 10993-5:2009, a linhagem L-929 foi plaqueada na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél/mL em multiplacas de 96 poços. Em seguida, as peças $3 \times 2 \text{ cm}^2$ de cada amostra foram incubadas em contato com 3 mL de meio de cultura DMEM para obtenção dos meios ou extratos (amostras testes). Tanto a placa quanto os extratos foram incubados por 24 horas em estufa a 37°C com 5% CO_2 . Após 24 horas, o meio das células foi removido e adicionados 100 μL do extrato previamente preparado (amostra teste), e, em seguida, as placas foram incubadas novamente por 24 horas.

Todas as amostras foram observadas e analisadas ao microscópio invertido após 24 horas de contato com o extrato obtido dos biomateriais. Ao término deste tempo, as mesmas foram centrifugadas a 1500rpm por 15 minutos e o sobrenadante retirado. Em cada poço foram adicionados 50 μL de solução de MTT (1mg/mL), diluído em meio DMEM sem vermelho fenol (Gibco), e as placas foram reincubadas por 3h. Após o período de incubação, as placas foram novamente centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos e o sobrenadante retirado. Em seguida, foram adicionados em cada poço 100 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar o formazan. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) no comprimento de onda de 570nm (Fig. 02).

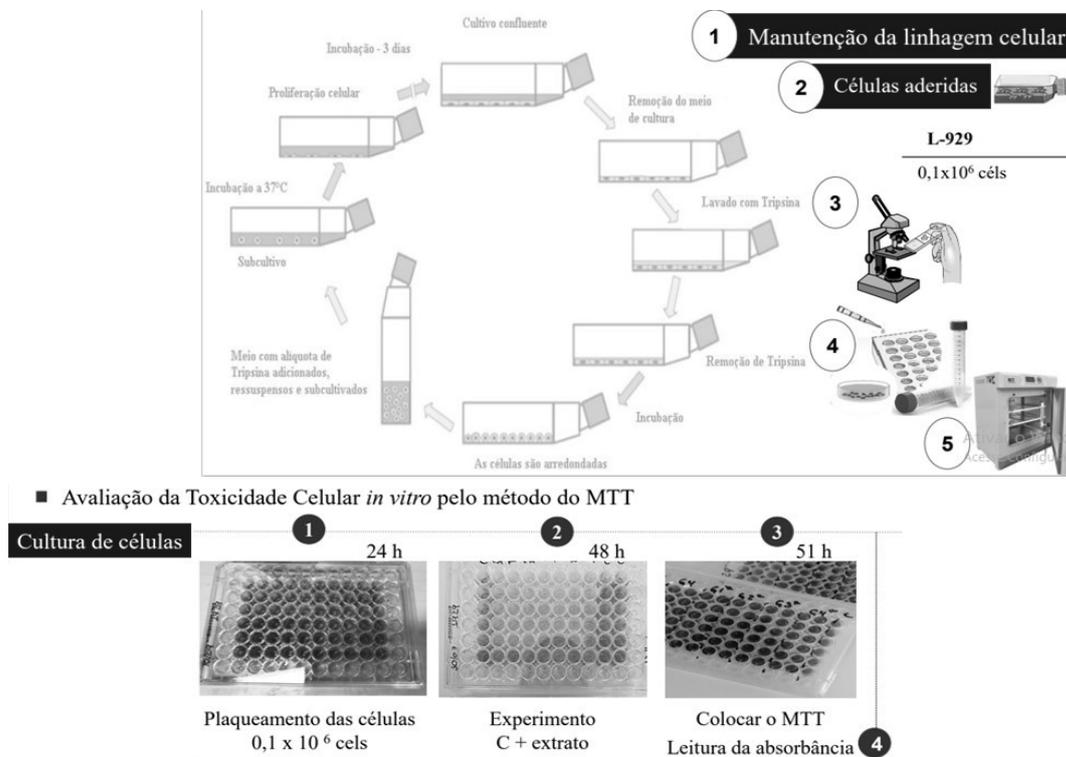


Figura 02: Etapas da citotoxicidade celular pelo método do MTT.

Foram realizadas 3 repetições técnicas, calculadas as médias e comparadas pelo teste de ANOVA de um fator com pós- teste de bonferroni (nível de significância de 5%). Para a

análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0. Os valores das absorvâncias resultantes dos testes do extrato em concentração única (100%) foram transformados em porcentagem de inibição e comparados ao controle negativo (células incubadas com meio de cultura DMEM).

Análise de efetividade da membrana de colágeno oriunda da pele de tilápia em modelos cirúrgicos de implante subcutâneo

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do NPDM/UFC sob o registro F19_2022 e o protocolo 19030522-0. Foram utilizados 128 ratos machos heterogêneos da linhagem Wistar, com idade aproximada de 60 dias e massa corpórea entre 250 e 350 gramas, provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da Universidade Federal do Ceará (Fig. 03).

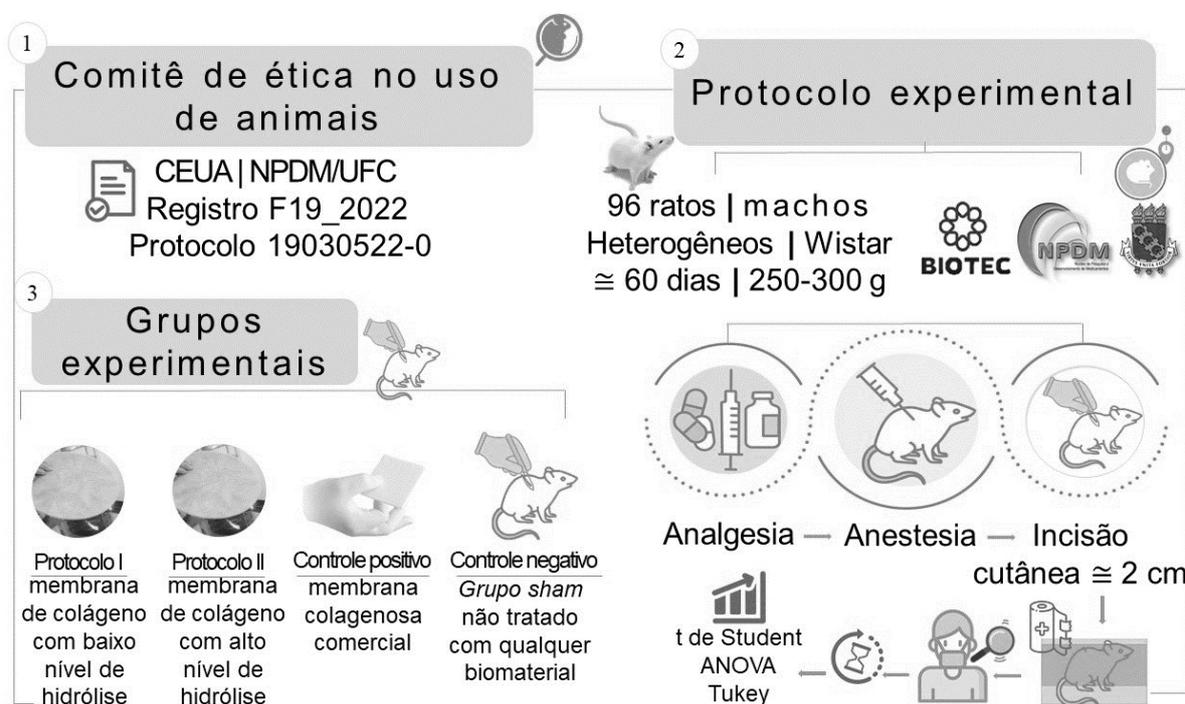


Figura 03: Protocolo experimental da efetividade da membrana de colágeno da pele de tilápia em modelos cirúrgicos de implante subcutâneo.

Os animais foram submetidos à analgesia e anestesia antes de receberem uma incisão cutânea linear de aproximadamente 2cm. Em seguida, uma peça de membrana de colágeno de pele de tilápia foi inserida no plano subcutâneo. Foi inserida uma peça, obtidos do Protocolo de membrana de colágeno com alto nível de hidrólise. Também foram avaliados o grupo que recebeu uma membrana colagenosa comercial (controle) e o grupo *sham* (controle salina), não tratado com qualquer biomaterial. Foi realizado um curativo e os animais foram observados duas vezes ao dia, durante os primeiros 3 dias, e posteriormente em outros intervalos de tempo.

Análise Estatística

As variáveis quantitativas, contínuas e discretas foram verificadas pelo teste de normalidade da distribuição. Para a estatística descritiva foram calculados a média e o desvio

padrão. As comparações entre três ou mais grupos foram feitas pela análise de variância para um fator de classificação (*one-way* ANOVA), associada ao teste de comparações múltiplas de Tukey para verificar diferenças entre os grupos aos pares de um fator com pós-teste de Bonferroni (nível de significância de 5%). Em todas as análises foi estabelecido o nível de significância em 0,05 (5%). O software GraphPad Prism® versão 5.00 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, California, USA, 2007) foi utilizado tanto para a realização dos procedimentos estatísticos como para a elaboração dos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A normativa ISO 10993-5: 2009 estabelece o teste de citotoxicidade de dispositivos médicos para análise da biocompatibilidade celular. Neste ensaio foi analisada a viabilidade de crescimento das células como avaliação citotóxica quantitativa. Os dados foram expressos em média±EPM (Erro Padrão da Média) dos percentuais da triplicata do grupo teste (membrana de colágeno de baixo nível de hidrólise) e controle negativo (células incubadas em meio de cultura DMEM) após 24 horas de contato celular. O controle negativo apresentou a viabilidade de 100%±1,39 e o extrato do colágeno apresentou potencial de crescimento celular acima do controle (110,9% ±1,73).

Os grupos apresentaram diferenças estatisticamente significativas na concentração testada (dose única, 100%). Os resultados demonstraram viabilidade celular e aprovação da membrana de colágeno de baixo nível de hidrólise como um biomaterial atóxico, segundo o protocolo da ISO 10993-5:2009 em relação à proliferação celular (acima de 70%) (Fig. 04).

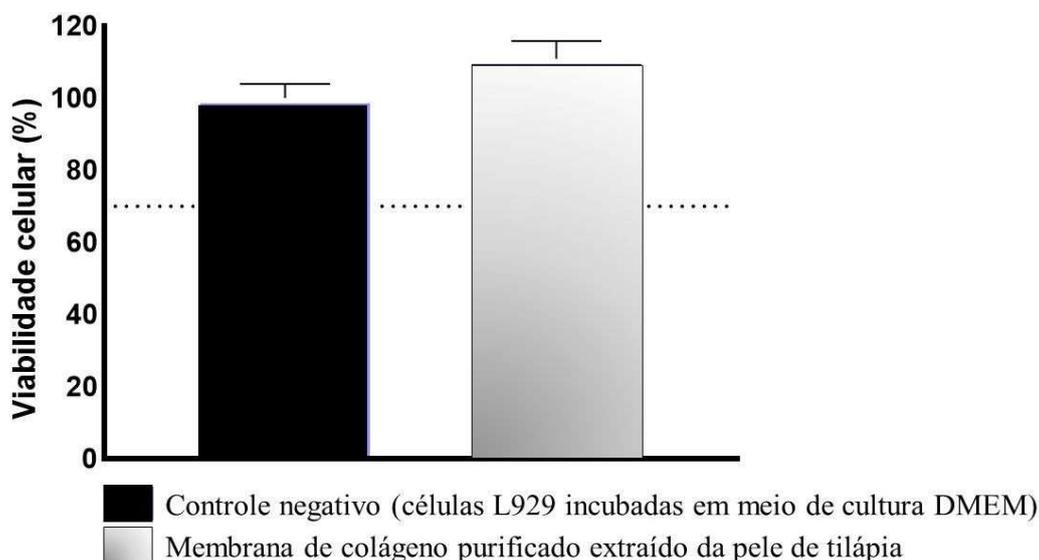


Figura 04: Viabilidade celular da membrana de colágeno purificado, extraído da pele de tilápia.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é uma etapa inicial e imprescindível, pois garante que o organismo que recetor da implantação de dispositivos médicos não sofra reações adversas (MOSMANN, 1983). Nesse estudo, o uso de células de mamíferos (fibroblasto murino) atendeu aos requisitos do grau de cultura de tecidos e adequados ao uso da normativa da ISO 10993-5:2009. Quando em contato com células de fibroblasto, foi possível verificar a

excelente atividade biológica da membrana de colágeno purificado; pois, quanto mais similar as condições biológicas forem ao uso clínico, melhor são as possibilidades de determinar o perfil toxicológico do biomaterial (GREENHALGH *et al.*, 2005). A linhagem utilizada são células residentes nos tecidos e responsável pela produção de colágeno.

Nos estudos de Lima-Júnior *et al.* (2017 e 2019) com a pele de tilápia liofilizada, foi demonstrado uma excelente cicatrização tecidual em lesões de queimaduras tanto em testes pré-clínicos e clínicos. Corroborando com nossos estudos, a excelente oclusão ao leito das feridas e rápido processo cicatricial são advindos da riqueza de colágeno presente na derme do peixe (ALVES *et al.*, 2018). A ação inflamatória é potencializada com o uso de biomateriais a base de colágeno, sendo inúmeras as vantagens associadas, a citar: o período de cicatrização curto, neovascularização e a organização das células da pele na formação do tecido cicatrizado (PARK *et al.*, 2017). A atoxicidade da membrana de colágeno extraída e purificada da pele de tilápia demonstra perspectivas promissoras para uso na medicina regenerativa.

Após os resultados da atoxicidade da membrana de colágeno de baixa hidrólise nos ensaios *in vitro*, o biomaterial foi inserido no subcutâneo de ratos Wistar para avaliação do perfil inflamatório sob aprovação no Comitê de Ética Animal. Os resultados prévios do hemograma nos parâmetros plaquetas, hemácias, leucócitos e hemoglobina demonstraram serem não inferiores aos valores de referência (LIMA, 2018) (Fig. 5).

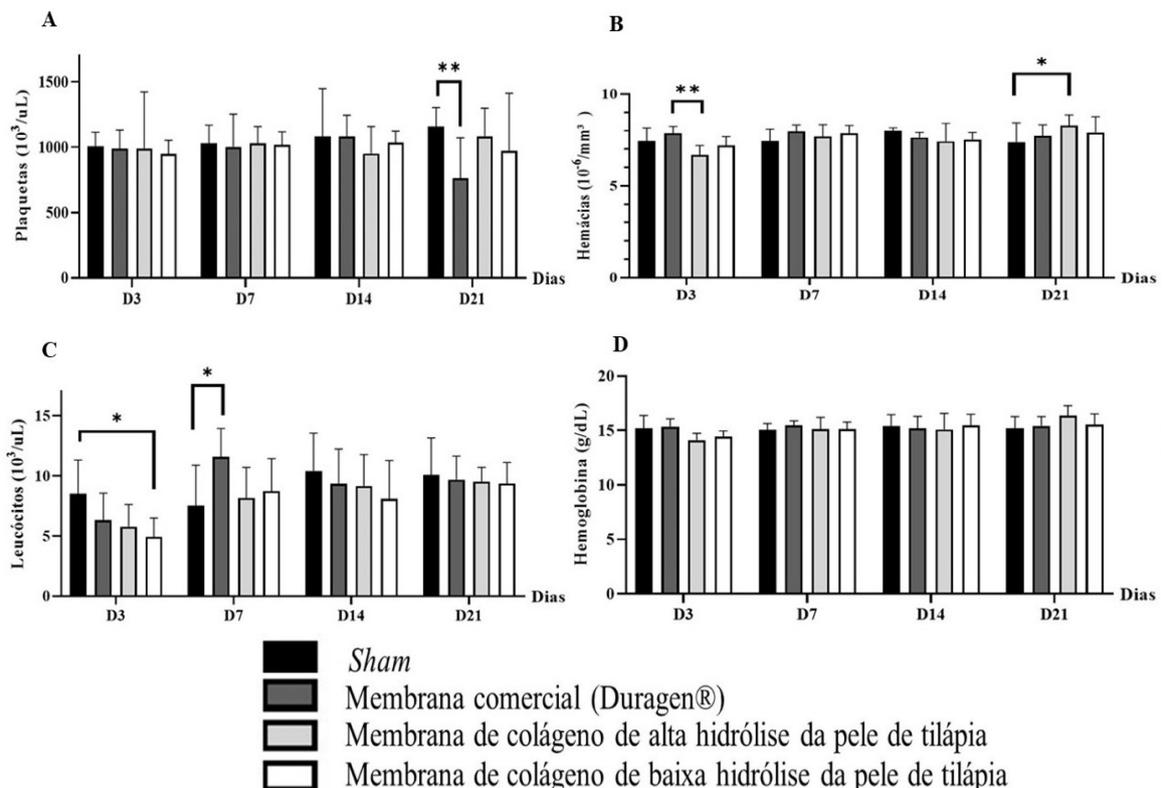


Figura 05: Parâmetros bioquímicos sanguíneos (plaquetas, hemácias, leucócitos e hemoglobina) em ratos Wistar submetidos aos protocolos experimentais em diferentes dias (D3, D7, D14 e D21).

Obs.: Dados em M±DP, teste Two-way ANOVA e post-hoc de Tukey. (*) = níveis de significância ($p < 0.05$).

Recebido: jan./2022.

Publicado: jun./2024.

Foi observado que não houve inflamação aguda exacerbada, pois, o tratamento com o biomaterial não parece ter causado alterações significativas sob os diferentes tempos testados (3, 7, 14 e 21 dias). Os resultados evidenciaram que há diferença estatística no *Sham* e membrana de colágeno alta hidrólise (D3) e *Sham* e Duragem (D7) nos leucócitos e nas plaquetas (D21). Nas hemácias (D3 e D21) houve diferença entre o Duragen e a membrana de alta hidrólise.

Esses resultados prévios reforçam a normalidade da função hematológica dos animais durante o experimento, pois, estão diretamente relacionados com a resposta imunológica e a capacidade de coagulação sanguínea (BARROSO, 2017). As hemácias $10^6/l$ (7,21 - 7,77) e os níveis de hemoglobina g/dl (13,74 - 14,82) apresentaram uma variação; mas, permaneceram dentro da faixa de referência (LIMA, 2018). A contagem de leucócitos ($10^3/l$) (referência 6,41 a 8,47) e a quantidade de plaquetas ($10^3/l$) (referência 107,4 a 121,5), também observou-se níveis normais.

Possivelmente, não houve sinal de inflamação aguda exacerbada ou coagulação sanguínea em todos os protocolos testados. O biomaterial experimental (membrana de colágeno de menor nível de hidrólise) não ocasionou quaisquer alterações significantes nos parâmetros sanguíneos dos ratos, mantendo o perfil inflamatório satisfatório para cada grupo experimental. Logo, corrobora com os testes *in vitro*, demonstrando atoxicidade, baixo imunogenicidade, segurança e biocompatibilidade *in vivo*. Em todos os coprodutos oriundos da pele de tilápia é observada essa ação biológica de potencializar o processo inflamatório (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017 e 2019). Demais estudos elucidarão essa característica ímpar presente na pele de tilápia.

CONCLUSÕES

Os ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a membrana de colágeno purificado da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*) é atóxico, eficaz e seguro, seguindo a normativa da ISO 10993:5. Os resultados preliminares sugerem que o biomaterial apresenta biocompatibilidade em ratos Wistar. As análises complementares em andamento, incluindo as análises histológicas, bioquímicas, microbiológicas e de microscopia eletrônica de varredura fornecerão informações adicionais para uma compreensão mais completa do processo inflamatório. Dessa forma, esse ensaio caracteriza-se como um grande avanço para o desenvolvimento de coprodutos a base de colágeno oriundo da pele de tilápia para diversas aplicabilidades na medicina regenerativa.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com o Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) e financiado pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP).

REFERÊNCIAS

ALVES, A.P.N.N.; LIMA-JUNIOR, E.M.; PICCOLO, N.S.; MIRANDA, M.J.B.; LIMA VERDE, E.Q.; FERREIRA JUNIOR, A.E.C.; SILVA, P.G.B.; FEITOSA, V.P.; BANDEIRA, T.J.P.G.; MATHOR, M.B.; MORAES-FILHO, M.O. Study of tensiometric properties, microbiological and collagen content in Nile tilapia skin submitted to different sterilization methods. Springer Science+Business Media B.V., **Part of Springer Nature**, v.19, p.373-382, 2018.

BARROSO, C.G. **Lesões acidentais em equídeos e expressões de ciclooxigenase 2 (COX-2) e toll like receptor 2 (TLR-2) em feridas experimentais tratadas com óleo de coco (cocos nucífera l.) em equinos**, 2017. 82p. (Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, 2017.

DE SOUZA, P.G.; CASTRO, M.S., SILVA, L.P. A Biologia da proliferação fibroblástica: a excessiva deposição extracelular de colágeno durante o reparo de lesões na pele. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p.28989-29010, 2021.

GOMES, J.P. **Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*)**, 2021. 75p. (Dissertação de Mestrado em Farmacologia). Curso de Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

GREENHALGH, C.; RICO-BAUTISTA, E.; LORENTZON, M.; THAUS, A.L.; MORGAN, F.O.; WILLSON, T.A.; ZERVOUDAKIS, P.; METCALF, D.; STREET, I.; NICOLA, N.A.; NASH, A.D.; FABRI, L.J.; NORSTEDT, G.; OHLSSON, C.; FLORES-MORALES, A.; ALEXANDER, W.S.; HILTON, D. SOCS2 regula negativamente a ação do hormônio do crescimento *in vitro* e *in vivo*. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.2, p.397-406, 2005.

ISO 10993-5. International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. **ISO 10993-5**, 2009.

LIMA, F.E.G. **Perfil bioquímico e hematológico de ratos e camundongos do biotério central da Universidade Federal do Ceará**, 2018. 75p. (Dissertação de Mestrado Profissional em Farmacologia Clínica). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

LIMA-JUNIOR, E.M.; PICCOLLO, N.P.; MIRANDA, M.J.B.; RIBEIRO, W.L.C.; ALVES, A.P.N.N.; FERREIRA, G.E.; PARENTE, E.A.; MORAES-FILHO, M.O. Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, Limeira, v.16, n.1, p.10-7, 2017.

LIMA-JÚNIOR, E.M., MORAES FILHO, M.O.D.; ROCHA, M.B.S.; JÚNIOR, F.R.S.; LEONTSINIS, C.M.P.; NASCIMENTO, M.F.A.D. Elaboração, desenvolvimento e instalação do primeiro banco de pele animal no Brasil para o tratamento de queimaduras e feridas. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.34, n.3, p.349-354, 2019.

LIN, H.C.; ADEOLA, M.A.; ROTIMI, E.A.; BONNIE, S.P.; CHANG, Y.W. Antihypertensive properties of tilapia (*Oreochromis spp.*) frame and skin enzymatic protein hydrolysates. **Food & Nutrition Research**, v.61, n.1, p.1391666, 2017.

MONTE, T.M.; LIMA-JUNIOR, E.M.; MORAES-FILHO, M.O.; PAIER, C.R.K.; RODRIGUES, F.A.R.; ALVES, A.P.N.N.; MATHOR, M.B.; RAPOSO-AMARAL, C.E. Reconstrução da Mão Apert com Pele de Tilápia. **Revista de Cirurgia Craniofacial**, v.33, n.6, p.1939, 2022.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1/2, p.55-63, 1983.

NALINANON, S.; NALINANON, S.; BENJAKUL, H.K. Collagens from the skin of arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*) solubilized with the aid of acetic acid and pepsin from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) stomach. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Bangkok, v.2010, n.90, p.1492-1500, 2010.

PARK, O.; GYEONGHUI, Y.; HEEJUNG, J.; HEEJUNG, M. Recent studies on micro-/nano-sized biomaterials for cancer immunotherapy. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v.47, n.1, p.11-18, 2017.

RODRÍGUEZ, A.H.; GYEONGHUI, Y.; HEEJUNG, J.; HEEJUNG, M. Cirurgia de afirmação de gênero de macho para fêmea usando pele de peixe tilápia do Nilo como enxerto biocompatível. **Revista de Ginecologia Minimamente Invasiva**, v.27, n.7, p.1474-1475, 2020.

YAMADA, S.; YAMAMOTO, K.; IKEDA, T.; YANAGIGUCHI, K.; HAYASHI, Y. Potência do colágeno de peixe como um andaime para a medicina regenerativa. **BioMed Research International**, v.2014, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/302932>. Acessado em: 02 abr. 2024.