



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

FRANCISCO FÁBIO PEREIRA DE SOUZA

**BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
DERIVADOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

SOBRAL

2018

FRANCISCO FÁBIO PEREIRA DE SOUZA

BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
DERIVADOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva.

SOBRAL
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S238b Souza, Francisco Fábio Pereira de.

Biocompatibilidade e biodegradação de Colágeno, Nanoqueratina e Bioapatita derivados da indústria avícola / Francisco Fábio Pereira de Souza. – 2018.
73 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva.

1. Colágeno. 2. Nanoqueratina. 3. Bioapatita. 4. Resíduos avícolas. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO FÁBIO PEREIRA DE SOUZA

BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
DERIVADOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Macromoléculas.

Aprovado em 08 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva (Examinador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Iracema Matos de Melo (Examinadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva (Examinador)
Faculdade Ieducare (FIED)

A Deus.

Aos meus pais, Maria Expedita e
Felizardo Pereira, dedico.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva, por todos os momentos de partilha e aprendizado, e ainda por seu exemplo de dedicação, competência e excelência profissional que o fazem um grande professor e admirável pessoa.

Ao Prof. Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho e ao doutorando Fábio Lima Cavalcante da EMPRAPA-CNPAT pelo desenvolvimento do material e parceria científica com o Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. José Roberto Viana Silva, Dr^a. Iracema Matos de Melo e Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva pelo tempo dispensado e pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas do Grupo de Estudos em Morfologia, especialmente aos alunos de iniciação científica Sarah Basílio, Juliana Dantas, Lana Araújo, Mateus Esmeraldo, Maria Lúcia, Andressa e Bernadete, e aos mestrandos Jesus Pérez e Janaína Gomes, pelo apoio fundamental à todas as etapas da pesquisa, aprendizado e convívio harmonioso.

Aos colegas da turma de mestrado, pela amizade, aprendizado, momentos de partilha e descontração.

À minha família por todo o apoio. Especialmente à minha mãe Maria Expedita, agricultora, exemplo de força, humildade, generosidade e fé, que mesmo com todas as dificuldades não mediu esforços para nos proporcionar uma vida digna e honesta; ao meu pai Felizardo Pereira, agricultor e pedreiro, exemplo de integridade, garra, humildade e sabedoria, que, assim como minha mãe, sempre fez e faz o melhor pelos seus filhos, netos e sobrinhos; e à minha avó, Dona Cesarina, que tem me ensinado a importância da paciência, da empatia, do saber ouvir e da gratidão.

“Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.”

Aldo Novak

RESUMO

O aproveitamento de subprodutos avícolas para a produção de biomateriais desperta o interesse biotecnológico para a produção de enxertos naturais, biomiméticos, biocompatíveis e bioreabsorvíveis para a aplicação no reparo tecidual. O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vivo* a biocompatibilidade e biodegradação de colágeno, nanoqueratina e bioapatita oriundos de subprodutos avícolas, por meio da quantificação de respostas biológicas inflamatórias locais e de reparo. Camundongos Swiss com 6 semanas de nascidos (n=45) receberam individualmente dois enxertos em tecido subcutâneo, um correspondente ao material-teste, colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2) ou bioapatita avícola (G3), e o outro ao controle positivo, colágeno comercial (G4) ou osso mineralizado comercial (G5). Análise histopatológica descritiva e semi-quantitativa nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas permitiram determinação de resposta inflamatória, de reparo e integridade dos materiais. Análise estatística intergrupos dos dados não-paramétricos (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) considerou diferenças significativas se $p < 0,05$. G1 apresentou maior intensidade de neutrófilos, macrófagos e neovascularização em 1 semana, linfócitos em 1 e 3 semanas e tecido conjuntivo em todas as semanas e menor presença do enxerto em todas as semanas. G2 apresentou maior intensidade de neutrófilos, linfócitos e macrófagos em 1 semana e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em 9 semanas e menor presença do enxerto em todas as semanas. G3 apresentou maior intensidade de neutrófilos em 1 semana e macrófagos em 1 e 3 semanas e menor presença do enxerto em 1 semana. Conclui-se que todos os materiais apresentaram biocompatibilidade, compatível com a redução da inflamação e aumento do reparo, e biodegradação, total (colágeno e nanoqueratina) ou parcial (bioapatita) durante o experimento. Baseado nas características biológicas observadas, os materiais a base de colágeno e nanoqueratina exibem potencial de desenvolvimento biotecnológico como agentes hemostáticos para o tratamento de pequenos defeitos ósseos, enquanto a bioapatita exibe potencial como enxerto ósseo para o tratamento de perdas ósseas de pequenas a moderadas.

Palavras-chave: Colágeno. Nanoqueratina. Bioapatita. Resíduos avícolas.

ABSTRACT

The use of by-products of the poultry industry for development of biomaterials arouse biotechnology interest to the natural, biomimetic, biocompatible and bioreabsorbable graft production for application in tissue repair. The aim of this study was to evaluate *in vivo* the biocompatibility and biodegradation of collagen, nanokeratin and bioapatite from poultry byproducts through the quantification of local inflammatory and repair biological responses. Forty-five Swiss mice with 6 weeks of birth received individually two grafts in subcutaneous tissue, one corresponding to the test material, poultry collagen (G1), nanoqueratina poultry (G2) or poultry bioapatite (G3), and the other to the positive control, commercial collagen (G4) or commercial mineralized bone (G5). Descriptive and semi-quantitative histopathological analysis in experimental times of 1, 3 and 9 weeks allowed the determination of inflammatory response, repair and graft integrity. Intergroups statistical analysis of non parametrical data (Kruskal-Wallis test and Dunn post-test) considered significant differences if $p < 0.05$. G1 exhibited upper intensity of neutrophils, macrophages and neovascularization at 1 week, lymphocytes at 1 and 3 weeks and connective tissue in every week and lower presence of graft in every week. G2 exhibited upper intensity of neutrophils, lymphocytes and macrophages at 1 week and foreign-body giant multinuclear cells at 9 weeks and lower presence of graft in every week. G3 exhibited upper intensity of neutrophils at 1 week and macrophages at 1 and 3 weeks and lower presence of graft at 1 week. In conclusion, all materials presented biocompatibility verified by reduction in inflammation and increase of repair and total (collagen and nanokeratin) or partial (bioapatite) biodegradation throughout the experiment. Based on their biological characteristics, collagen and nanokeratin-based materials exhibit potential for biotechnological development as hemostatic agents for the treatment of small bone defects, while bioapatite exhibits potential as a bone graft for the treatment of bone loss from small to moderate.

Key words: Collagen. Keratin. Bioapatite. Poultry waste.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura hierárquica da matriz óssea 24
- Figura 2** – Representação das fases aguda e crônica da reação de corpo estranho tecidual e seus componentes 27
- Figura 3** – Materiais disponíveis para caracterização biológica *in vivo*. Fotografias do Grupo 1 Colágeno (100%) (**A**), Grupo 2 - Nanoqueratina (100%) (**B**) e Grupo 3 - Bioapatita (100%) (**C**). Eletromicrografias de varredura do colágeno (**D**), nanoqueratina (**E**) e bioapatita (**F**) 32
- Figura 4** – Preparo dos materiais-teste e seus respectivos controles 34
- Figura 5** – Criação de bolsas subdérmicas bilaterais em região tronco-dorsal para enxertia de material-teste (**A**- Lado esquerdo) e controle (**B**- Lado direito) em mesmo animal. A área relativa ocupada por cada material enxertado (quadrado tracejado) corresponde a 10mm² 36
- Figura 6** – Delineamento experimental *in vivo* 37
- Figura 7** – Etapas do processamento das necrópsias e análise histopatológica 38
- Figura 8** – Representação esquemática por sobreposição da fotocaptura de 5 campos contíguos não superpostos em cada lâmina histológica para avaliação das respostas biológicas locais ao enxerto em tecido subcutâneo de camundongos 39
- Figura 9** – Quadro representativo dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais inflamatórios, reparativos e de biodegradação após implantação dos enxertos em tecido subcutâneo de camundongos 40
- Figura 10** – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de colágeno/Grupo 1 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 4 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **P**: pele, **M**: músculo, **E**: enxerto. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm 43
- Figura 11** – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de colágeno/Grupo 1 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 4 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (*) ou linfocítico (**), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (►), vasos sanguíneos (→), fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (**C**) e enxerto (**E**). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm 44
- Figura 12** – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de queratina/Grupo 2 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 5 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **P**: pele, **M**:

músculo, **E**: enxerto. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm 46

Figura 13 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de queratina/Grupo 2 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 5 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (*) ou linfocítico (**), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (▶), vasos sanguíneos (→) e fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (**C**) e enxerto (**E**). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm 47

Figura 14 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de bioapatita/Grupo 3 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 6 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **P**: pele, **M**: músculo, **E**: enxerto. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm 49

Figura 15 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de bioapatita/Grupo 3 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 6 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (*) ou linfocítico (**), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (▶), vasos sanguíneos (→) e fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (**C**) e enxerto (**E**). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 200µm 50

Figura 16 – Análise quantitativa dos critérios de inflamação Neutrófilos (A) e Linfócitos (B), para todos os grupos (G1 a G5) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto 52

Figura 17 – Análise quantitativa dos critérios de inflamação Macrófagos (A) e Células gigantes (B), para todos os grupos (G1 a G5) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto 54

Figura 18 – Análise quantitativa dos critérios de reparo Neovascularização (A) e Tecido conjuntivo (B), para todos os grupos (G1 a G5) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto 56

Figura 19 – Análise quantitativa do critério de biodegradação Presença do material, para todos os grupos (G1 a G5) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos e distribuição do colágeno	20
Tabela 2 – Distribuição da queratina	23
Tabela 3 - Grupos experimentais e controles, tempos experimentais e número de espécimes usados no estudo de caracterização biológica <i>in vivo</i> (n=45)	36
Tabela 4: Análise semiquantitativa da presença de neutrófilos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	51
Tabela 5: Análise semiquantitativa da presença de linfócitos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	52
Tabela 6: Análise semiquantitativa da presença de macrófagos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	53
Tabela 7: Análise semiquantitativa da presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	53
Tabela 8: Análise semiquantitativa da presença de neovascularização em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	54
Tabela 9: Análise semiquantitativa da presença de tecido conjuntivo em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	55
Tabela 10: Análise semiquantitativa da presença de material enxertado em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
EUA	Estados Unidos da América
RTG	Regeneração Tecidual Guiado
ROG	Regeneração Ósseo Guiado
IL	Interleucina
TNF- α .	Fator de Necrose Tumoral alfa
CEUA	Comitê de Ética e Uso Animal
CNPAT	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
DRX	Difração de Raio X
TGA	Análise Termogravimétrica
EDS	Espectroscopia de Energia Dispersiva
UV-VIS	Espectroscopia de Absorção
ISO	<i>International Standard Organization</i>
BIOCEN	Biotério Central
UFC	Universidade Federal do Ceará
pH	Potencial hidrogeniônico
HE	Hematoxilina-Eosina
ANOVA	Análise de Variância

LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
®	Marca Registrada
%	Porcentagem
Ca ²⁺	Cálcio
P	Fósforo
Str ²⁺	Elemento químico Estrôncio
Ba ²⁺	Elemento químico Bário
Pb ²⁺	Chumbo
Cd ²⁺	Elemento químico Cádmi
BO ₄ ³⁻	Fórmula molecular do Perborato
PO ₄ ³⁻	Fosfato
OH	Hidroxila
nm	Nanômetro
µm	Micrômetro
mm ²	Milímetros elevado ao quadrado
mL	Mililitros
mg	Miligramas
Kg	Kilogramas
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros elevado ao quadrado
°C	Graus Celsius
p<0,05	Probabilidade de erro menor que 5%

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Indústria avícola	16
2.2 Utilização de biomateriais no reparo tecidual	17
2.2.1 Biomateriais à base de Colágeno	20
2.2.2 Biomateriais à base Queratina	21
2.2.3 Biomateriais à base de Apatitas	23
2.2.4. Caracterização biológica <i>in vivo</i>	25
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo Geral	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Aspectos éticos	31
4.2. Obtenção e processamento do material-teste: Colágeno, Nanoqueratina e Bioapatita 31	
4.3. Preparo dos materiais para enxertia	33
4.4. Delineamento experimental <i>in vivo</i>	35
4.5. Processamento histológico e análise histopatológica	38
4.6. Análise estatística	41
5. RESULTADOS	42
5.1.1. Análise descritiva	42
5.1.2. Colágeno	42
5.1.3. Nanoqueratina	45
5.1.4. Biopatita	48
5.1.5. Análise quantitativa da interação material/tecido	51
6. DISCUSSÃO	56
REFERÊNCIAS	63
ANEXO I	69
ANEXO II	70
ANEXO III	71

1. INTRODUÇÃO

O setor avícola brasileiro tem crescido ao longo dos últimos anos e vem ganhando destaque no cenário econômico mundial. Em 2017, o Brasil se configura como o segundo maior produtor e o maior exportador mundial de carne de frango (ABPA, 2017). A qualidade e a sanidade envolvidas na produção nacional também vem conquistando cada vez mais o mercado internacional, mostrando o dinamismo neste setor. Em função disto, é de fundamental importância a busca por novas tecnologias e processos capazes de modernizar ainda mais a cadeia produtiva (CAVALCANTE, 2017).

O aproveitamento e agregação de valor aos resíduos com potencial econômico estão entre as principais práticas que fundamentam o uso racional dos recursos naturais (CAVALCANTE, 2017). O setor avícola, no final da cadeia de produção e processamento da carne de frango, gera uma grande variedade de resíduos (OVIEDO-RONDÓN, 2008), muitos dos quais são fontes de proteínas e minerais com grande potencial para utilização como insumos na produção de biomateriais (CAVALCANTE, 2017). Pesquisas recentes corroboram esse potencial e geram produtos a base de queratina de penas de frango (WANG *et al.*, 2017a, CAVALCANTE, *et al.*, 2017), colágeno de pele de frango e biapatita de ossos de frango (CAVALCANTE *et al.*, 2017), bem como hidroxiapatita a partir de cascas de ovo (OVIEDO-RONDÓN, 2008), dentre outros.

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial também aumenta a preocupação com doenças traumáticas, degenerativas e crônicas que atingem o sistema músculo-esquelético (CASTRO-SILVA *et al.*, 2009). Por consequência, a demanda por materiais capazes de auxiliar, reparar ou substituir tecidos injuriados também está em ascensão, o que resulta em maiores investimentos no desenvolvimento de biomateriais (BITTENCOURT *et al.*, 2014). Diante disso, a utilização de biomateriais em tratamentos envolvendo a reabilitação ou regeneração de estruturas, tecidos ou órgãos injuriados, também tem aumentado nas últimas décadas (BITTENCOURT *et al.*, 2014).

A eficácia e eficiência de um biomaterial estão diretamente relacionadas com suas características físicas, químicas e biológicas. Dessa forma, inerente ao aumento do uso desses materiais, também tem aumentado a necessidade de estudos mais aprofundados sobre suas propriedades visando o desenvolvimento de biomateriais eficazes. Para que sua utilização no reparo de tecido ósseo não ofereça riscos ao hospedeiro, o biomaterial tem que apresentar três características importantes: biocompatibilidade, alta

ostecondutividade e bioatividade (WANG *et al.*, 2017a; GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Esta última está relacionada com a capacidade do biomaterial interagir intimamente (bioadesão), por meio de ligações químicas, com o tecido biológico e estimular uma resposta adequada do mesmo (SINHORET; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013; GUASTALDI; APARECIDA, 2010; COLEMAN; NICHOLSON; AWOSANYA *et al.*, 2007).

Apesar do uso de colágeno e de hidroxiapatita como biomateriais já ser amplamente estudado, o processo de isolamento e obtenção desses biomateriais de fontes até então não pesquisadas, pode influenciar em suas características físico-químicas e biológicas finais, sendo, portanto, necessária a realização de testes que possibilitem a avaliação de tais características. Por outro lado, a nanoqueratina ainda precisa ser melhor estudada para seu uso como biomaterial, dado o seu potencial para aplicações no reparo tecidual e cicatrização de feridas (KONOP *et al.*, 2017; SARAVANAN *et al.*, 2013; XING *et al.*, 2011; AMBROSIO, 2006; CHU, LIU, 2008). Os testes pré-clínicos de caracterização biológica são etapas fundamentais que antecedem a liberação de um biomaterial para testes clínicos e posterior comercialização. Para aplicação clínica de um biomaterial, em especial aquele que exija contato direto com o corpo, o mesmo tem que atender aos seguintes pré-requisitos: deve ser não citotóxico, não imunogênico, não irritante e biocompatível (WANG *et al.*, 2017a).

Diante disso, o presente trabalho objetivou avaliar a biocompatibilidade de colágeno, bioapatita e nanoqueratina provenientes de subprodutos da indústria avícola com potencial para uso na engenharia de tecidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Indústria avícola

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), no ano de 2017 o Brasil produziu 12,900 milhões de toneladas de carne de frango, das quais 66% se destinaram ao mercado interno e os demais 34% à exportação, sendo considerado o segundo maior produtor de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA). Dados da ABPA mostram que o Brasil é desde 2016 o maior exportador mundial de carne de frango, com 4,384 milhões de toneladas exportadas superando as 3,015 milhões de toneladas dos EUA, com crescimento anual das exportações de 1,86% entre os anos de 2015 e 2016 (ABPA, 2017).

Tais números colocam o país em posição de destaque internacional e mostram o quanto desenvolvida é a capacidade produtiva do setor. Frente a números animadores, o setor conta também com as pressões da sociedade para planejar e desenvolver suas atividades de forma sustentável e equilibrada, capaz de atender as exigências legais e mercadológicas mundialmente estabelecidas. Em função disto, se faz necessário o correto manejo dos resíduos gerados pelas atividades do setor avícola, bem como, o desenvolvimento de processos tecnológicos capazes de agregar valor a esses resíduos, de forma a fortalecer a cadeia produtiva e gerar novas possibilidades de emprego e renda (OVIDO-RONDÓN, 2008). Dentre os resíduos sólidos produzidos, podem se destacar os de natureza sólida, como penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles e ossos. Tais resíduos apresentam-se como importantes fontes de proteínas, lipídeos e minerais, tendo em função disto grande potencial para a produção de biomateriais, dentre os quais pode-se destacar a queratina, o colágeno, o ácido hialurônico, o fibrinogênio e a bioapatita, que são largamente estudados (WANG *et al.*, 2017a; OVIDO-RONDÓN, 2008).

O correto manejo dos resíduos sólidos gerados pela produção industrial se faz necessário como forma de garantia dos recursos naturais e preservação do meio ambiente. As indústrias que fazem o correto manejo dos resíduos que produzem, causando o mínimo de impacto sócio-ambiental possível, recebem um selo que as caracterizam como indústrias verdes (CARIOCA; BARROS; COELHO, 2014). A busca por alternativas sustentáveis é um caminho promissor para o desenvolvimento sustentável na área de Biotecnologia (CARIOCA; BARROS; COELHO, 2014), como por exemplo fazer o

aproveitamento de resíduos sólidos da indústria avícola para o desenvolvimento de biomateriais para fins biotecnológicos.

2.2 Utilização de biomateriais no reparo tecidual

Entende-se por biomaterial uma substância ou uma mistura de substâncias, de origem natural ou sintética, utilizada em contato com os sistemas biológicos com o objetivo de promover o reparo ou substituição de defeitos estruturais de órgãos ou tecidos injuriados, ou ainda auxiliar nas atividades fisiológicas dos mesmos (GALLER et al., 2011; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Os biomateriais podem ser classificados, de acordo com sua origem, em: biológicos/naturais ou sintéticos. Os biomateriais de origem natural são obtidos a partir de organismos ou parte deles e podem ser classificados em: autógenos (mesmo doador e receptor), alógenos (doador e receptor são diferentes, porém de mesma espécie) ou xenógenos (doador e receptor são de espécies diferentes) (SINHORET; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). Os biomateriais de origem sintética, também chamados de aloplásticos, são aqueles desenvolvidos em laboratórios e podem ser constituídos de metal ou ligas, de cerâmica ou vidros, de polímeros ou ainda serem um compósito, que é uma mistura de diferentes biomateriais (SINHORET; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013). Além disso, podem-se classificar ainda os biomateriais de acordo com a resposta induzida ao tecido biológico em: bioinertes, bioabsorvíveis e bioativos (SINHORET; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

O desenvolvimento de novos biomateriais com potencial aplicação no reparo tecidual têm sido alvo de muitos pesquisadores na área de Medicina Regenerativa. Para a bioengenharia de tecidos, o uso de biomateriais como enxertos para promover o reparo de tecidos injuriados requer minimamente a associação destes com células-tronco mesenquimais e fatores de crescimento, tendo o biomaterial a função de atuar como um arcabouço capaz de suportar a adesão e proliferação celular, condição necessária para o reparo tecidual (JUANG BOGY, 2005). Além da aplicabilidade como enxerto, diversos procedimentos médicos e odontológicos requerem o uso de biomateriais, seja como agentes hemostático em procedimentos cirúrgicos, seja como membranas para Regeneração Tecidual Guiada (RTG) (GERZSON *et al.*, 2016).

A utilização de um biomaterial como arcabouço para adesão e proliferação celular é suma importância para o reparo tecidual. Um biomaterial com características favoráveis ao reparo tecidual fornece um microambiente tridimensional que facilita a interação célula-material, a adesão e proliferação celular, a deposição de matriz extracelular, o transporte de nutrientes, a excreção de metabólitos e a interação de fatores de crescimento, proliferação e diferenciação celular (LANGER; TIRRELL, 2004). A interação célula/biomaterial é um passo essencial para o reparo tecidual e ocorre por intermédio de proteínas que facilitam a adesão celular à superfície do biomaterial (SARAVANAN *et al.*, 2013).

A biocompatibilidade é uma característica primordial que um biomaterial deve apresentar para ser utilizado no reparo de tecidos injuriados. Para ser considerado biocompatível, um biomaterial não pode causar efeitos indesejáveis aos tecidos do hospedeiro, levando à morte celular (GALLER *et al.*, 2011). Por isso, para que um biomaterial chegue a aplicação clínica, é exigido que o mesmo apresente características físico-químicas e biológicas favoráveis. Dentre as características biológicas destacam-se a biocompatibilidade e a bioatividade (NYSKA *et al.*, 2014; LIU; CAO, 2010). Os biomateriais à base de colágeno e hidroxiapatita, por exemplo, apresentam boa biocompatibilidade e possuem potencial aplicação no reparo de tecido ósseo, pois estimulam uma boa resposta tecidual (CHISSOV *et al.*, 2008; HELARYM *et al.*, 2015; CASTRO-SILVA; ZAMBUZZI; GRANJEIRO, 2009) levando à expressão das seguintes propriedades: osteocondução, osteoindução e osteopromoção. A osteocondução refere-se ao crescimento ósseo sobre a superfície do biomaterial, a osteoindução refere-se à indução de células-tronco mesenquimais para a diferenciação osteogênica e a osteopromoção relaciona-se ao favorecimento da proliferação seletiva de células osteoprogenitoras, em um determinado defeito ósseo, por meio do impedimento do desenvolvimento de tecido conjuntivo naquele local (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; TAGA *et al.*, 2008).

Os biomateriais de origem natural, principalmente os autógenos, por possuírem características físico-químicas e biológicas similares ou iguais às do tecido de origem, são considerados o padrão-ouro para uso como enxerto no reparo tecidual, porém, a coleta de material autógeno torna-se desvantajosa uma vez que causa grande morbidade do sítio doador (CASTRO-SILVA *et al.*, 2009). Diante disso, o uso de biomateriais de origem sintética apresenta-se mais vantajoso, pois não depende de coleta de materiais autógenos ou do uso de materiais alógenos provenientes de um banco de tecidos; há redução de

tempo clínico no tratamento; e esses biomateriais possuem composição e propriedades físico-químicas bem conhecidas e alta disponibilidade (ROGERS; GREENE, 2012; AITASALO; PELTOLA, 2007).

Uma alternativa emergente na substituição de materiais autógenos em aplicações terapêuticas é o uso de materiais de origem xenógena, pois seu uso reduz a taxa de morbidade e não depende da coleta de material autógeno (CASTRO-SILVA *et al.*, 2009). Muitos materiais xenógenos possuem propriedades físico-químicas e biológicas semelhantes aos autógenos e, por isso, normalmente apresentam biocompatibilidade (CASTRO-SILVA; LIMA; GRANJEIRO, 2013). Diante disso, a pesquisa na área de biomateriais tem aumentado nos últimos anos e busca o desenvolvimento de alternativas terapêuticas para o reparo tecidual (BITTENCOURT *et al.*, 2014).

O aumento da expectativa de vida bem como o aumento da população mundial tende a aumentar a necessidade de materiais que possibilitem a realibitação ou substituição de órgãos injuriados (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2015). Um biomaterial adequado para o reparo tecidual eficiente deve ser biodegradável e bioativo se aproximando das características da matriz extracelular e sendo capaz de estimular a adesão, proliferação e diferenciação celular para a formação de novos tecidos (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2015).

O aproveitamento de subprodutos da indústria avícola para o desenvolvimento de biomateriais representa uma alternativa promissora na área de Biotecnologia. Subprodutos como penas, carcaças, peles e tendões constituem uma matéria-prima ainda pouco explorada, barata e de alta disponibilidade. Importantes fontes de proteínas, lipídeos e minerais, tais subprodutos podem ser aproveitados como insumos biotecnológicos para o desenvolvimento de biomateriais à base de colágeno (CAVALCANTE *et al.*, 2017), queratina (WANG *et al.*, 2017a; KAMARUDIN *et al.*, 2017) e biopatita (SUPOVÁ; MARTYNKOVÁ; UCHARDA, 2011). No entanto, até que esteja disponível para aplicação clínica, um biomaterial passa por uma série de etapas que vão desde à sua obtenção aos estudos de caracterização física, química e biológica. A caracterização da biocompatibilidade *in vivo* é uma etapa essencial para o desenvolvimento de biomateriais para aplicação clínica (WANG *et al.*, 2017b).

2.2.1 Biomateriais à base de Colágeno

O colágeno é considerado a proteína mais abundante em humanos e mamíferos e que, além do seu papel majoritário atuando como proteína estrutural, exerce também variadas funções nos sistemas biológicos auxiliando nas funções exercidas por vários órgãos e tecidos nos quais se faz presente (CAVALCANTE *et al.*, 2015). A estrutura básica do colágeno apresenta três cadeias polipeptídicas dispostas paralelamente em forma de fibras (KUCCHARZ, 1993). De acordo com o local onde se encontra e com a sua estrutura tridimensional, o colágeno pode apresentar diferentes características. Atualmente já se conhece 29 tipos de colágeno, estando alencado na **Tabela 1** os principais tipos e algumas de suas características.

Tabela 1 – Tipos e distribuição do colágeno.

Tipo	Classe	Distribuição nos tecidos
I	Formadores de fibrilas	Tipo mais abundante encontrado na pele, osso, ligamento, tendão, fibrocartilagem e córnea
II	Formadores de fibrilas	Cartilagem hialina e elástica, disco intervertebral e humor vítreo
III	Formadores de fibrilas	Prevalente nos vasos sanguíneos, pele e intestino
IV	Formadores de redes	Lâminas basais e cápsulas do cristalino
V	Formadores de fibrilas	Associado com colágeno tipo I no osso, membrana da placenta e córnea

Fonte: Adaptado de Fratzl (2008).

O colágeno do tipo I é considerado o mais abundante nos animais estando presente principalmente na pele, ossos e tendões. Formado por 3 longas cadeias polipeptídicas do tipo α , sendo duas idênticas ($\alpha 1$) e uma distinta ($\alpha 2$), cada uma contendo mais de 1000 aminoácidos, o colágeno tipo I pode ser encontrado em grande quantidade na matriz extracelular na forma de fibrilas e é capaz de suportar a adesão e proliferação celular (FRIESS, 1998). No ambiente *in vivo*, o colágeno fornece força e resistência ao tecido conjuntivo, funciona como um ligante natural para células e possui papel fundamental na regulação do reparo tecidual (HELARY *et al.*, 2014; FRIESS, 1998).

Diferentemente da maioria dos polímeros sintéticos, formados por cadeias polipeptídicas com tamanho e sequência de aminoácidos variáveis, o colágeno é uma proteína que apresenta cadeias polipeptídicas com sequência de aminoácidos, estrutura e

tamanho específicos (FRIESS, 1998). Além disso, o colágeno tipo I apresenta uma sequência de aminoácidos que se assemelha entre as diversas espécies, característica que pode estar relacionada com a biocompatibilidade natural dessa proteína, como observado por Helary *et al.* (2014) que avaliaram a biocompatibilidade *in vitro* de matrizes de colágeno extraído de tendões da cauda de camundongos utilizando uma cultura de fibroblastos e observaram que as mesmas apresentaram citocompatibilidade. Tais características fazem do colágeno um polímero favorável para aplicações biomédicas, sendo o tipo I o mais utilizado como biomaterial (FRIESS, 1998).

Por meio de técnicas específicas, é possível fazer a extração de colágeno do seu local de origem e reconstruí-lo *in vitro* para uso como biomaterial, como feito por Cavalcante *et al.* (2015), que obtiveram colágeno a partir de peles e tendões de pés de frango. A extração do colágeno a partir de subprodutos animais inclui uma etapa de descclularização, que quando não realizada de forma eficiente, pode torná-lo imunogênico (KEANE *et al.*, 2012). Portanto, embora se saiba que o colágeno seja naturalmente biocompatível, o desenvolvimento de novos biomateriais à base dessa proteína têm que obrigatoriamente passar por uma etapa de caracterização biológica, tendo em vista que o processo de extração e obtenção podem alterar as suas características finais e influenciar na reposta tecidual.

2.2.2 Biomateriais à base Queratina

Assim como o colágeno, a queratina é uma proteína encontrada em grande quantidade em mamíferos. Juntas, são consideradas os biopolímeros mais importantes no reino animal. Formados por células especializadas denominadas queratinócitos e presentes no epitélio, os materiais queratinosos desempenham variadas funções e podem ser encontrados em diversas espécies animais na forma de lã, penas, escamas, unhas, chifres, bicos etc. (WANG *et al.*, 2016a) (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Distribuição de α e β -queratinas

α-queratinas	Lã, pêlos, penas, unhas, chifres, cascos e estrato córneo
β-queratinas	Penas, bicos e garras de aves, garras de répteis e escamas
α e β-queratinas	Epiderme de répteis, escamas de Pangolin

Fonte: Adaptado de Cavalcante *et al.* 2017.

De acordo com o tipo de estrutura secundária que apresenta, a queratina pode ser classificada em α -queratina, formadas por α -hélice, ou β -queratina, formadas por folhas- β -pregueadas. Ambas são constituídas por cerca de 21 aminoácidos, sendo o sulfurado cisteína o componente majoritário, possibilitando a existência de um grande número de ligações dissulfeto intra e intermoleculares conferindo à queratina propriedades como resistência mecânica e pouca solubilidade em um grande número de solventes (GUZMAN *et al.*, 2011; LODISH., 2000).

Características únicas da queratina, como biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade, abundância natural e capacidade de formar uma matriz tridimensional adequada à infiltração, adesão e proliferação celular, têm estimulado estudos e uso dessa proteína como biomaterial visando sua aplicação na cura de lesões e hemostasia (WANG *et al.*, 2016a; LUO *et al.*, 2016). Muitos estudos em reparo tecidual envolvendo o uso de queratina focam no uso da queratina capilar, porém pode-se obtê-la de outras fontes incluindo penas de aves, uma matéria-prima ainda pouco explorada (WANG *et al.*, 2017a).

As penas de aves têm como um de seus constituintes majoritário a queratina. O isolamento de queratina a partir de penas de frango para utilização na cicatrização de lesões apresenta maiores vantagens em relação ao uso da queratina capilar (WANG *et al.*, 2017a), que pode ter sua qualidade comprometida devido a procedimentos capilares frequentes, como o uso de tintura. Além disso, a indústria avícola gera, anualmente, bilhões de toneladas de penas de frango (KORNIŁŁOWICZ-KOWALSKA *et al.*, 2011) que normalmente são descartadas, mas que podem ser utilizadas como potencial fonte para a extração de queratina. Dessa forma, a utilização da queratina proveniente de penas de frango para aplicações biomédicas tem se tornado potencialmente atrativa (WANG *et al.*, 2016b). Além do efeito da queratina oriunda de penas na cicatrização de feridas, é necessário também avaliar a biocompatibilidade *in vivo* dessa proteína quando se intenciona o desenvolvimento de biomateriais para aplicação no reparo tecidual (WANG *et al.*, 2017b).

O desenvolvimento de biomateriais à base de nanoqueratina pode ser mais vantajoso do que o uso da queratina normal. Na forma de nanopartículas, a queratina tem sua superfície de contato ampliada, o que pode melhorar a interação célula/biomaterial levando ao recrutamento celular e acelerando o reparo tecidual (SARAVANAN *et al.*, 2013).

2.2.3 Biomateriais à base de Apatitas

O termo “apatita” pode ser aplicado a todos os compostos com fórmula geral $A_{10}(BO_4)6Z_2$ (ou $M_5(XO_4)3X$), onde A é geralmente um cátion metálico divalente (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} ou Cd^{2+}), BO_4^{3-} um ânion trivalente com B geralmente sendo um metal (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} ou MnO_4^{3-}) e X um ânion monovalente (F-, Cl-, OH- ou Br-) (IBUKI, 2014). O nome específico de cada apatita depende dos elementos ou radicais A, B e X, por exemplo, a hidroxiapatita é uma apatita com estrutura cristalina contendo A como Cálcio, B como Fósforo (PO_4^{3-}) e X é o radical hidroxila (OH-) e fórmula molecular $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ (DENG *et al.*, 2013).

As apatitas biológicas ou bioapatita constiuem o principal componente inorgânico de ossos e dentes (LIU *et al.*, 2013). Do ponto de vista químico, as bioapatitas são derivadas das hidroxiapatitas, apresentando substituição de íons de carbonato por íons de fósforo e hidroxilas em comparação a estrutura original da hidroxiapatita, e ao contrário desta, são consideradas cálcio deficientes (LIU *et al.*, 2013; DENG *et al.*, 2013). A baixa proporção de Cálcio/Fostato, o tamanho menor dos cristais e grande quantidade de substituição de carbonato, características típicas das bioapatitas, aumentam a solubilidade das moléculas de apatitas e influenciam positivamente na sua biocompatibilidade (DENG *et al.*, 2013). Este conjunto de características é responsável por atribuir às apatitas biológicas um maior grau de semelhança com a fase mineral do osso humano (IBUKI, 2014). A porção inorgânica do osso é constituída de cristais de hidroxiapatita alinhados paralelamente ao longo do eixo das microfibrilas, sendo resultante do processo de biomineralização das fibrilas de colágeno (PASTERIS; WOPENKA, 2008). A **Figura 1** apresenta a estrutura hierárquica da matriz óssea.

A similaridade química com a porção inorgânica dos tecidos calcificados confere às hidroxiapatitas boa biocompatibilidade e propriedades como osseocondução e bioatividade, não produzindo repostas indesejáveis quando em contato com sistemas biológicos (CHISSOV *et al.*, 2008; ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). Além de características biológicas, as hidroxiapatitas também apresentam características físico-químicas adequadas ao reparo de tecidos mineralizados e, por conta disso, têm sido bastante estudadas nos últimos anos visando o desenvolvimento de biomateriais para aplicação no reparo de tecido ósseo (GRENHO *et al.*, 2015).

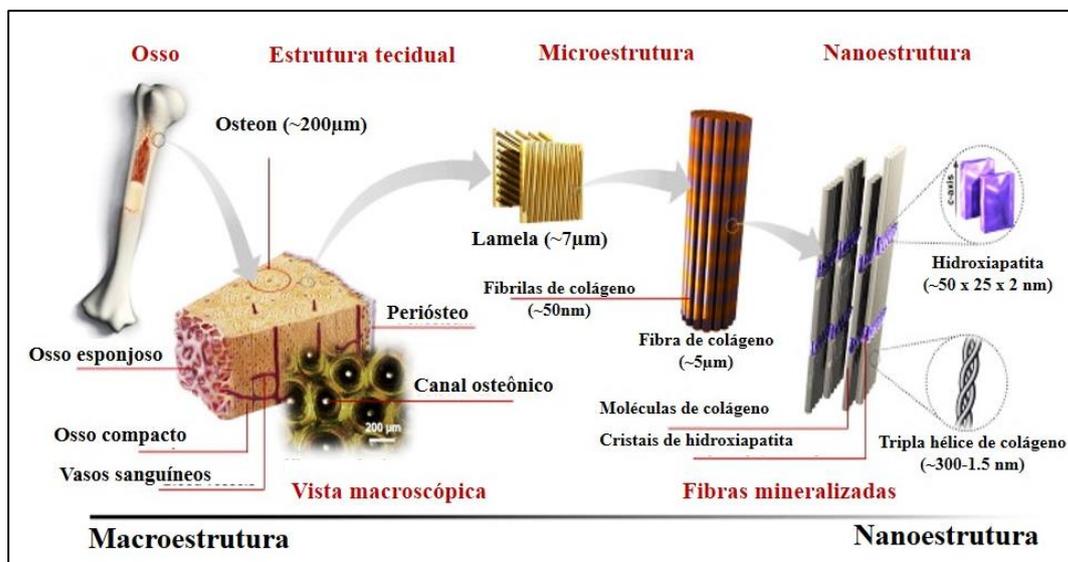


Figura 1 – Estrutura hierárquica da matriz óssea. Fonte: Adaptado de Shadat- Shojai *et al.*, (2013).

A obtenção de hidroxiapatita pode ser feita basicamente de duas formas: síntese em laboratório ou extração a partir de ossos de animais, como o frango (CAVALCANTE *et al.*, 2017). O isolamento de bioapatita a partir de osso xenógeno apresenta algumas vantagens em relação aos demais, sendo a similaridade morfológica, estrutural e química com o osso humano uma das mais citadas. É importante também considerar o fato de que ossos xenógenos são uma matéria prima barata e largamente disponível (ŠUPOVÁ, 2014).

Materiais biocerâmicos à base de hidroxiapatita sozinha ou em associação a silicone apresentaram-se biocompatíveis e bioabsorvíveis quando avaliados *in vivo*, em um modelo de subcutâneo de camundongos, num período de três meses (CHISSOV *et al.*, 2008). No mesmo estudo também foi avaliado *in vivo* o potencial desses materiais biocerâmicos na substituição de defeitos ósseo de tamanho crítico utilizando um modelo de fenestração em ratos Wistar, onde foram observados em três semanas a formação de tecido ósseo esponjoso e em sete semanas focos de formação de tecido ósseo (CHISSOV *et al.*, 2008). Danesh *et al.* (2010) avaliaram a biocompatibilidade de hidroxiapatita sintética, utilizando um modelo de enxertia em subcutâneo de camundongos, em 15, 30 e 60 dias, e observaram que o biomaterial apresentou-se biocompatível e ainda estimulou respostas teciduais satisfatórias, com presença local de nódulos de calcificação.

Ainda, sugere-se que biomateriais cerâmicos ideais para utilização no reparo ósseo, além de características químicas, devem apresentar minimamente certa porosidade

(GRENHO *et al.*, 2015). A presença de poros na superfície do biomaterial facilita a adesão, proliferação e crescimento celular, pois permite a difusão de nutrientes e metabólitos, a produção de matriz extracelular e neovascularização (GRENHO *et al.*, 2015; TRIPATHI; BASU, 2012).

2.2.4. Caracterização biológica *in vivo*

A aplicação clínica de um biomaterial exige que o mesmo apresente características físicas, químicas e biológicas satisfatórias. A caracterização biológica de um biomaterial consiste em testes que podem ser realizados *in vivo* e/ou *in vitro*, que objetivam conhecer um padrão de respostas teciduais ou celulares desencadeadas pelo biomaterial quando em contato com sistemas biológicos (WANG *et al.*, 2017b).

Testes *in vivo* de bioprodutos para a finalidade de reparo ósseo usando as metodologias de enxertia ectópica ou em subcutâneo são amplamente utilizados na literatura e conferem base científica a este estudo temático ainda inédito, pela diversidade de reações biológicas que tangem a avaliação de processos inflamatórios e de reparo, alvo de nossas análises, que não estariam contemplados em testes isolados de monocamada de apenas uma linhagem celular *in vitro* (BITTENCOURT, R. C. *et al.*, 2014; SENA, L. A. *et al.*, 2014; GIORNO, B. *et al.*, 2014; JARDELINO, C. *et al.*, 2012; LOMELINO, R. O. *et al.*, 2012; LIMA, C. J. *et al.*, 2011; PAULO, A. O. *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que através de testes *in vivo* com animais obtêm-se resultados que melhor representam situações clínicas (SCHMALZ, G.; ARENHOLT-BINDSLEV, D., 2009).

A caracterização biológica *in vivo* de dispositivos médicos implantáveis ou biomateriais segue a normatização internacional ISO 10993-6 (ISO, 2007), que avalia a presença, a extensão e o tipo de infiltrado inflamatório, bem como os fenômenos de reparo, incluindo fibrose e angiogênese.

Dependendo da resposta tecidual observada e de sua intensidade, é possível classificar um biomaterial como citotóxico ou biocompatível. Biomateriais não compatíveis ou tóxicos, quando em contato com o tecido, podem desencadear a necrose do tecido circunjacente (WANG *et al.*, 2017b, ONUKI *et al.*, 2008). A necrose pode ser explicada pela morte de neutrófilos ou macrófagos com consequente liberação de

citocinas, enzimas e radicais livres que causam o dano tecidual irreversível (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2004).

Um biomaterial considerado biocompatível não provoca danos às células do hospedeiro ou os provocam numa porcentagem aceitável (GALLER *et al.*, 2011). Adicionalmente, pode-se avaliar também a bioatividade do biomaterial. Um biomaterial bioativo é aquele que, além de apresentar boa biocompatibilidade, é capaz de estimular respostas biológicas pela interação célula-biomaterial e auxiliar no reparo de estruturas injuriadas (ONUKE *et al.*, 2008).

A caracterização biológica de um biomaterial implantado em tecidos deve ser realizada por um patologista toxicológico que avaliará a sua biocompatibilidade e eficácia (NYSKA *et al.*, 2014) e envolve a avaliação de citotoxicidade, irritação, respostas alérgicas, inflamação e toxicidade crônica e sistêmica (KATTI *et al.*, 2002).

A implantação de um biomaterial em tecido subcutâneo é seguida de uma resposta inflamatória local (FOURNIER *et al.*, 2003), caracterizada pela migração de células inflamatórias da corrente sanguínea (diapedese) para o local do implante. De uma forma geral, a resposta celular associada à inflamação, se dá em três fases principais: recrutamento celular, com conseqüente formação do infiltrado inflamatório, ligação a substratos proteicos e ativação (ANDERSSON *et al.*, 2007).

O processo inflamatório pode ser dividido em dois estágios: fase aguda e fase crônica (**Figura 2**). A fase aguda do processo inflamatório é caracterizada pela vasodilatação, início da infiltração de leucócitos e aumento da viscosidade sanguínea e sua duração varia de algumas horas à dias (NYSKA *et al.*, 2013). Nesta fase, no caso da implantação de um biomaterial, proteínas oriundas do tecido circunjacente e proteínas sanguíneas se aderem à superfície do biomaterial formando uma forte e adesiva camada proteica que impede que as células do infiltrado inflamatório tenham contato direto com o mesmo (FOURNIER *et al.*, 2003). O infiltrado inflamatório é constituído principalmente de neutrófilos, embora também possa ser detectada a presença de monócitos, macrófagos ativados e linfócitos (FOURNIER *et al.*, 2003).

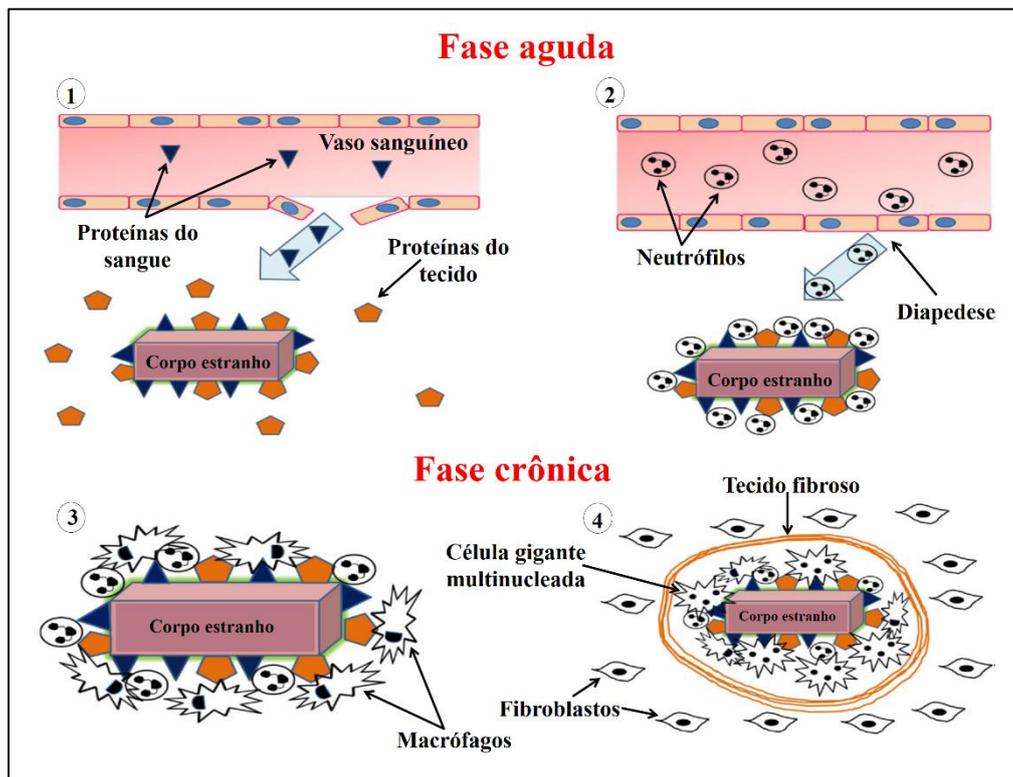


Figura 2: Representação das fases aguda e crônica da reação de corpo estranho tecidual e seus componentes. Fonte: Adaptado de NYSKA *et al.*, 2014.

A fase crônica do processo inflamatório é mais tardia em relação a fase aguda sendo caracterizada pela proliferação de macrófagos e fibroblastos no tecido injuriado (FOURNIER *et al.*, 2003). Nesta fase é possível ser detectada também a presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho, que originam-se da fusão de macrófagos (NYSKA *et al.*, 2014; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2004), e a deposição de colágeno e proteoglicanos, produzido por fibroblastos, no entorno do corpo estranho formando uma cápsula que o separa dos restante do tecido (WYNN, 2008). À essa deposição de colágeno dá-se o nome de fibrose, que surge quando a taxa de formação de colágeno, em resposta à presença do corpo estranho, excede a sua degradação (WYNN, 2008). A fibrose é considerada uma resposta reparativa normal do tecido, portanto não pode ser considerada indicativa da presença de biomateriais não-biocompatíveis (WYNN, 2008; ONUKI *et al.*, 2008).

Os neutrófilos constituem a maior população de células de defesa presente no sangue, possuem atividade fagocítica e participam, principalmente, da resposta inflamatória aguda, sendo observados em maior quantidade em períodos experimentais

curtos (FOURNIER *et al.*, 2003; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2004). O recrutamento das células inflamatórias observadas na fase aguda da inflamação, ocorre por meio da ação de mediadores pró-inflamatórios, as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), produzidos por monócitos, macrófagos ativados, fibroblastos e células endoteliais e podem intensificar o processo inflamatório (FOURNIER *et al.*, 2003). Os monócitos constituem a segunda maior população de células de defesa presente no sangue. Quando fora dos vasos sanguíneos e habitando os tecidos são chamados de macrófagos e também desempenham papel fagocítico, agindo sozinho ou associados na forma de células gigantes multinucleadas, ajudando na eliminação de agentes estranhos e, embora possam estar presentes na resposta inflamatória aguda, eles estão relacionados principalmente com a resposta inflamatória crônica (NYSKA *et al.*, 2013; FOURNIER *et al.*, 2003; LUCAS *et al.* 2010; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2004). A presença de reação de corpo estranho no tecido circunjacente ao biomaterial ocorre quando há interação com o sistema imune do hospedeiro levando à inflamação e consequente formação de células gigantes do tipo corpo estranho, bem como macrófagos (VEISEH *et al.*, 2015; ANDERSON; RODRIGUEZ *et al.*, 2008). Quando um material implantado permanece muito tempo em contato com o tecido e há um constante estímulo à inflamação, pode ocorrer a formação de um granuloma, que é caracterizado pelo acúmulo de linfócitos e macrófagos ativados, grande quantidade de células gigantes multinucleadas, presença de edema e dor (NYSKA *et al.*, 2013; FOURNIER *et al.*, 2003).

Algumas características favoráveis ao desenvolvimento de novos biomateriais naturais devem considerar se não há geração de reação inflamatória significativa a longo prazo, são reabsorvíveis, são de fácil preparo e esterilização e têm longa validade (MIDDLETON; TIPTON, 2000). A biocompatibilidade de um biomaterial está relacionada com as características do próprio material (fatores intrínsecos) ou com a reação do sistema imune do hospedeiro (fatores extrínsecos). (FOURNIER *et al.*, 2003). Compõem os fatores intrínsecos: morfologia, tamanho, porosidade, composição, esterilidade, tempo de implantação, degradação, química e rugosidade da superfície do biomaterial (FOURNIER *et al.*, 2003). Já os fatores extrínsecos estão relacionados à espécie e genética do hospedeiro, microambiente e local de implantação (FOURNIER *et al.*, 2003).

Fatores como a degradação e composição do biomaterial implantado podem influenciar na toxicidade do mesmo. Durante a degradação podem ocorrer alterações nas características físicas e de compabilidade do biomaterial que pode tornar-se tóxico ao tecido com qual está em contato (KATTI *et al.*, 2002). Além disso, a presença de compostos lixiviáveis na composição do biomaterial também podem induzir uma toxicidade ao tecido (KATTI *et al.*, 2002). Ao contrário da toxicidade induzida pela ação de uma droga, que é dose dependente, a resposta tecidual induzida pela implantação de biomaterial é tempo dependente (SCHUH, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivo Geral

Caracterizar as respostas biológicas locais frente ao enxerto de potenciais biomateriais provenientes de subprodutos da indústria avícola para fins de reparo ósseo.

3.1.2. Objetivos Específicos

Avaliar a biocompatibilidade e a biodegradação de colágeno enxertado em tecido subcutâneo de camundongos;

Avaliar a biocompatibilidade e a biodegradação de nanoqueratina enxertada em tecido subcutâneo de camundongos;

Avaliar a biocompatibilidade e a biodegradação de bioapatita enxertado em tecido subcutâneo de camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral sob o protocolo CEUA-UFC nº 04/17 (**ANEXO I**).

4.2. Obtenção e processamento do material-teste: Colágeno, Nanoqueratina e Bioapatita

Os materiais-teste para este estudo foram obtidos de subprodutos da indústria avícola por Cavalcante *et al.* (2017), sendo o colágeno obtido de peles e tendões de pés de frango, a nanoqueratina obtida de penas de frango e a bioapatita obtida de ossos de frango. Todo o processo de obtenção e processamento da matéria-prima para geração dos materiais-teste, bem como a fase preliminar de caracterização físico-química dos materiais-teste, foram realizados no Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPAT/EMBRAPA, Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, CE, Brasil).

A caracterização físico-química dos três materiais incluiu as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para análise da ultraestrutura, Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), para análise da composição orgânica pelos diferentes grupos químicos, Difração de raios-X (DRX) para a identificação e caracterização estrutural de materiais cristalinos (**Figura 3**), Análise Termogravimétrica (TGA), para análise da estabilidade térmica, Espectroscopia de energia dispersivas (EDS) para análise da razão Cálcio/Fosfato (Ca/P), calorimetria exploratória diferencial, tamanho da partícula e potencial zeta, para análise da suspensão coloidal (CAVALCANTE *et al.*, 2017).

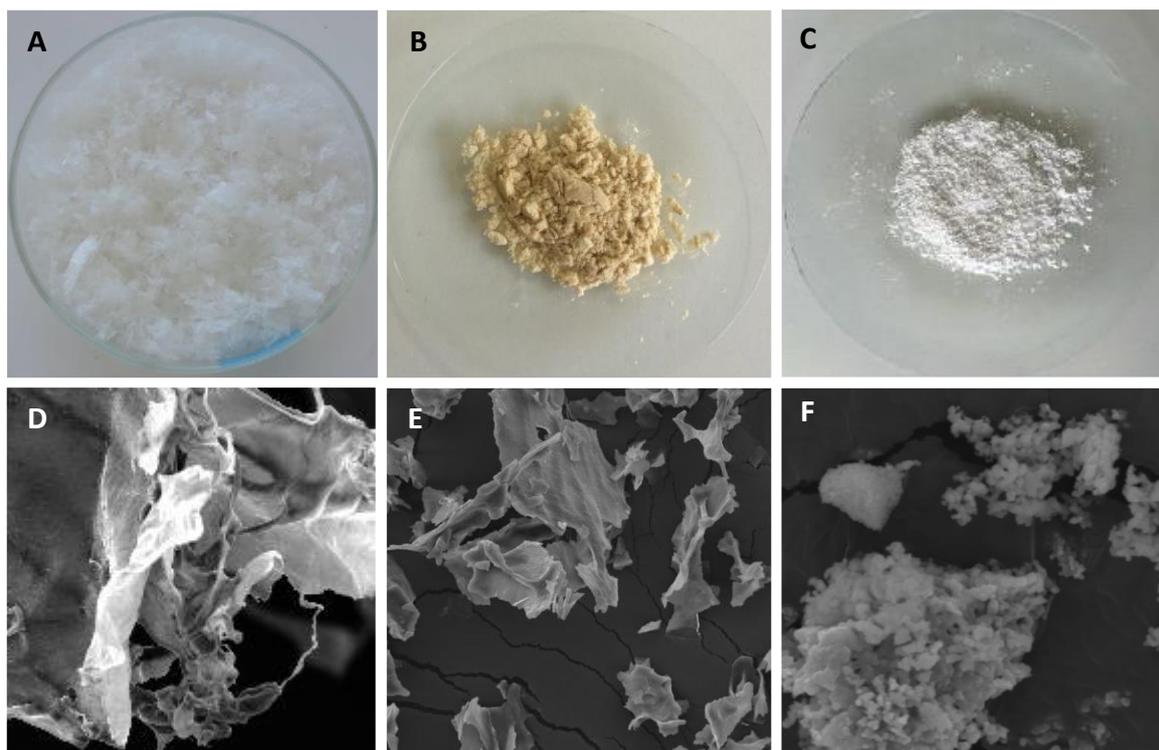


Figura 3 – Materiais disponíveis para caracterização biológica *in vivo*. Fotografias do Grupo 1 Colágeno (100%) (A), Grupo 2 - Nanoqueratina (100%) (B) e Grupo 3 - Bioapatita (100%) (C). Eletromicrografias de varredura do colágeno (D), nanoqueratina (E) e bioapatita (F). Fonte: Adaptado de Cavalcante *et al.* (2017). Imagens autorizadas para reprodução pelos autores.

O colágeno obtido apresentou microestrutura filamentosa irregular típica de colágeno tipo I, e superfície de aspecto limpo, um indicativo da ausência de proteínas não colagenosas e material inorgânico presentes anteriormente nas amostras. Os resultados de FTIR mostraram a presença de bandas comuns a proteínas, a saber: Amida A, Amida I, II e III; e a estrutura em tripla hélice do colágeno manteve-se íntegra. Os resultados para Espectroscopia de Absorção UV-VIS mostrou a ausência do pico 280nm indicando a ausência de proteínas não colagenosas. A temperatura de desnaturação do colágeno foi de 40,5°C e está dentro dos padrões considerados normais para colágeno obtido de peles e tendões de frango (CAVALCANTE *et al.*, 2017).

A nanoqueratina apresentou-se na forma de lâminas de tamanhos variáveis e superfície rugosa com espessura de aproximadamente 200nm. Além disso, apresentou estabilidade em suspensão e partículas com tamanho médio de 167nm e boa dispersão em suspensão. Na análise de FTIR, a nanoqueratina apresentou ampliação de zonas com

configuração beta β e diminuição da banda Amida I que está relacionada com a presença de α -hélice ordenada e corresponde estiramentos simétricos de ligações N-H. Na análise TGA, a nanoqueratina apresentou estabilidade térmica superior a da queratina presente nas penas (CAVALCANTE *et al.*, 2017).

A bioapatita apresentou-se na forma de pó branco, livres de matéria orgânica e com teor de carbonato de 5,02%. Na análise TGA, a bioapatita apresentou perda de massa superior a 2% a partir de 310°C, o que foi atribuído à decomposição de parte do percentual de carbonato observado por FTIR. Os resultados para DRX mostraram que as amostras apresentaram altos índices de cristalinidade e constituição majoritária de Ca e P com razão Ca/P inferior a 1,67 (CAVALCANTE *et al.*, 2017).

O material utilizado como controle positivo tanto para o colágeno quanto para a nanoqueratina foi uma membrana de colágeno bovino (Lumina Coat Double Time[®], Criteria Ltda, São Paulo, SP, Brasil). De acordo com as informações disponibilizadas pelo fabricante na bula do material, a Lumina Coat Double Time[®] é constituída basicamente por dupla camada de fibras de colágeno tipo I entrelaçadas, é biocompatível, osseocondutora e o seu prazo de reabsorção ultrapassa 8 semanas pós-implantação (CRITERIA LTDA, 2018).

Já para a bioapatita utilizou-se como controle positivo osso bovino mineralizado com granulação média (600-425 μ m) (Lumina Bone[®], Criteria Ltda, São Paulo, SP, Brasil). De acordo com as informações disponibilizadas pelo fabricante na bula do material, o Lumina Bone[®] é um composto mineral acelular natural derivado da estrutura óssea bovina utilizado pela Medicina e Odontologia como enxerto ósseo em cirurgias que exijam regeneração de tecidos mineralizados. É constituído por uma série de compostos minerais de cálcio e fósforo e predominantemente de hidroxiapatita (95%), sendo biocompatível e bioabsorvível em um prazo de 3 a 8 meses dependendo do metabolismo do paciente (CRITERIA LTDA, 2018).

4.3. Preparo dos materiais para enxertia

O preparo dos materiais (teste e controle) para enxertia foi parcialmente baseado na norma ISO 10993-6 de 2007, que preconiza distintas dimensões segundo a forma de apresentação do produto. Segundo a norma, idealmente para fins de testagem *in vivo* em modelos murinos, materiais na forma de lâminas devem possuir o tamanho de 10-12mm²,

materiais não-sólidos incluindo pós devem ser preparados em tubos cilíndricos de polietileno com 1,5mm de diâmetro e 5mm de comprimento, enquanto materiais na forma de grânulos não têm orientações específicas (ISO, 2007).

Nesse estudo, os materiais-teste a base de colágeno e nanoqueratina se apresentavam na forma de lâminas friáveis enquanto a bioapatita se apresentava na forma de pó denso. O material controle a base de colágeno apresentava forma de lâmina única resistente e o material a base de osso mineralizado tinha forma de grânulos. No intuito de normalizar a quantidade de cada tipo de material a ser enxertado em cada leito cirúrgico, ficou definida a superfície relativa padrão de 10mm^2 para se chegar à quantidade individual de cada produto (**Figura 4**). Em uma folha de papel alumínio foi realizada demarcação de uma área de 10mm^2 e feito o seu preenchimento com cada material-teste, formando uma camada fina e uniforme. Em seguida, os materiais-teste foram pesados, relocados e transportados em microtubos plásticos de 1,5mL (Axygen, Union City, CA, EUA) para esterilização na luz ultravioleta em cabine de segurança biológica (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) durante 30 minutos. Sob a manipulação do operador em ambiente estéril, os tubos foram fechados, suas tampas seladas com Parafilme (Sigma-Aldrich, Darmstadt, HE, Alemanha) e os materiais permaneceram estéreis até o momento da enxertia. O preparo do material controle para colágeno e nanoqueratina baseou-se no recorte do produto na dimensão de 10mm^2 . O preparo do material controle da bioapatita seguiu o mesmo protocolo de dimensão e pesagem dos materiais-teste, esterilização e acondicionamento em microtubos plásticos.

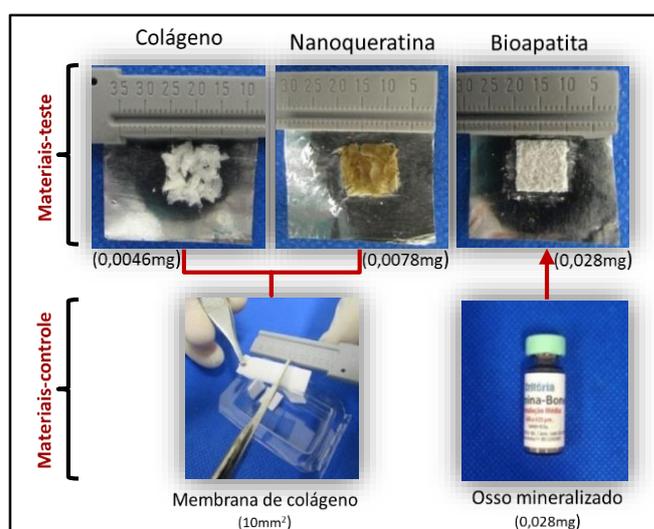


Figura 4 – Preparo dos materiais-teste e seus respectivos controles. Fonte: elaborada pelo autor.

4.4. Delineamento experimental *in vivo*

Para a enxertia realizada em tecido subcutâneo murino, foram utilizados 45 espécimes de camundongos Swiss de ambos os sexos, adultos jovens com 6 semanas de idade e 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN/UFC, Fortaleza, CE, Brasil). Durante todo o período experimental, todos os camundongos estiveram em ambiente laboratorial apropriado, com boas condições de alimentação, ventilação e ciclos de claro/escuro de 12h cada e foram monitorados diariamente pelo pesquisador responsável no Biotério Setorial da Universidade Federal do Ceará (UFC, Sobral, CE, Brasil).

A anestesia geral foi obtida por aplicação intramuscular de solução composta por 100 mg/kg de ketamina (Francotar[®], Virbac, São Paulo, SP, Brasil) e 12 mg/kg de xilazina (Rompum[®], Bayer, Belford Roxo, RJ, Brasil) próxima do músculo reto femoral da pata, mostrando duração de efeito de 40 minutos. Após constatação da imobilidade e frequência respiratória dos animais, os mesmos foram colocados sobre um campo operatório esterilizado e tiveram a região tronco-dorsal tricotomizada com lâmina de bisturi de aço carbono estéril n° 15 (Lamedid-Solidor, Osasco, SP, Brasil) e degermada com gaze embebida em clorexidina alcoólica 0,5% (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

Foram realizadas duas incisões lineares, uma no lado esquerdo e outro no lado direito por animal, com 1cm de extensão cada utilizando-se uma lâmina de bisturi n° 15 nova, seguidas de divulsão delicada do tecido subcutâneo com tesoura romba de Metzemaum (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil) para criação de duas bolsas subdérmicas de 10mm² (**Figura 5**). Cada animal recebeu uma enxertia de grupo teste e controle, conforme demonstra a **Tabela 3**.

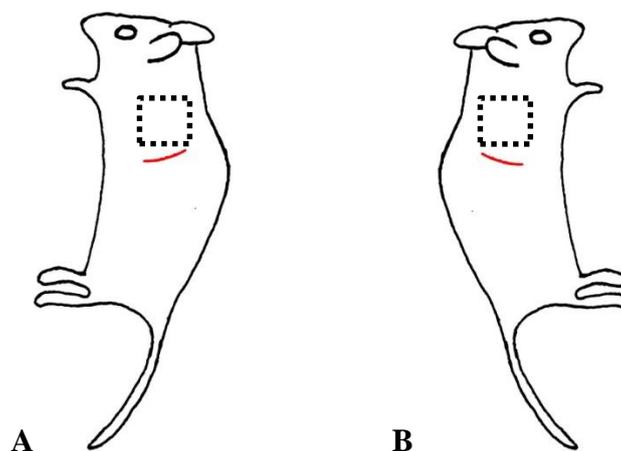


Figura 5 – Criação de bolsas subdérmicas bilaterais em região tronco-dorsal para enxertia de material-teste (**A**- Lado esquerdo) e controle (**B**- Lado direito) em mesmo animal. A área relativa ocupada por cada material enxertado (quadrado tracejado) corresponde a 10mm^2 . Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Grupos experimentais e controles, tempos experimentais e número de espécimes usados no estudo de caracterização biológica *in vivo* (n=45).

Material teste	Material controle (+)	Tempos experimentais	Amostra
Grupo 1 Colágeno de frango (EMBRAPA, CE, Brasil)	Grupo 4 Colágeno bovino (Criteria Ltda®, SP, Brasil)	1, 3 e 9 semanas (5 animais por condição)	15
Grupo 2 Nanoqueratina de frango (EMBRAPA, CE, Brasil)	Grupo 4 Colágeno bovino (Criteria Ltda®, SP, Brasil)	1, 3 e 9 semanas (5 animais por condição)	15
Grupo 3 Bioapatita de frango (EMBRAPA, CE, Brasil)	Grupo 5 Osso mineralizado (Lumina-Bone®, SP, Brasil)	1, 3 e 9 semanas (5 animais por condição)	15

Fonte: elaborada pelo autor.

Os Grupos 1, 2, 3 e 5 foram enxertados com auxílio de microtubos plásticos de 1,5mL nos quais os mesmos estavam previamente estocados, sendo então perfurados na porção cônica e realizada vibração manual sutil para facilitar o extravasamento dos produtos para a área receptora. O Grupo 4, comercializado na forma de membrana com 2cm de lagura por 6cm de comprimento, foi recortado no momento da cirurgia e enxertado com auxílio de uma pinça dente de rato (Quinelato, Rio Claro, SP, Brasil). Após realizada cada enxertia subcutânea dos materiais, o retalho correspondente foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4.0 (Ethilon™, Ethicon Inc, Sommerville, NJ, EUA). Os camundongos foram deixados em gaiolas individuais com ração peletada

(Nuvilab CR1[®], Nuvital, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*, não havendo intercorrências pós-operatórias significantes durante o experimento.

Os sacrifícios foram realizados nos tempos experimentais de 1 semana, 3 semanas e 9 semanas após a cirurgia, com 5 animais por condição experimental. Os animais foram eutanaziados com sobredose de solução anestésica, o que causou morte sem dor ou sofrimento. Constatada a morte de cada animal, foi realizada necrópsia excisional, contendo a área do enxerto e sua periferia, com uma margem de segurança de 1cm além da área do enxerto e cada amostra foi colocada em formol 4% tamponado (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) com pH 7,2 por 48 horas para fixação. O esquema resumido de todo o delineamento experimental encontra-se na **Figura 6**.



Figura 6 – Delineamento experimental *in vivo*. Fonte: elaborada pelo autor.

As carcaças dos animais foram descartadas em saco plástico branco especial para lixo com risco biológico e armazenadas sob refrigeração a -20°C em um freezer próprio, até serem coletadas por empresa de coleta de resíduos biológicos para posterior incineração.

4.5. Processamento histológico e análise histopatológica

As amostras não mineralizadas (Grupos 1, 2 e 4), após fixação em formol 4% tamponado por 48 horas, foram clivadas, lavadas em água corrente por 1 hora e seguiram diretamente para desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico puro (VETEC, Rio de Janeiro, RJ, Brasil; 1 banho de 70%, 80%, 90% e 3 banhos de 100%, 1 hora cada), diafanização em 3 banhos de xilol puro (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 30 minutos cada, impregnação em 3 banhos de parafina líquida a 60°C (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 1 hora cada e inclusão em parafina (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil). As amostras mineralizadas (Grupos 3 e 5), após fixação em formol 4% tamponado por 48h, foram desmineralizadas durante 1 hora em solução de ácido nítrico aquoso 10% e formalina 4% tamponada (1:1), de acordo com MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA (2010), e depois imediatamente lavadas em água corrente por 1 hora, antes de seguirem com o mesmo processamento aplicado aos demais grupos. As amostras emblocadas em parafina foram microtomizadas com cortes de 5 µm de espessura e coradas pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE). (**Figura 7**)

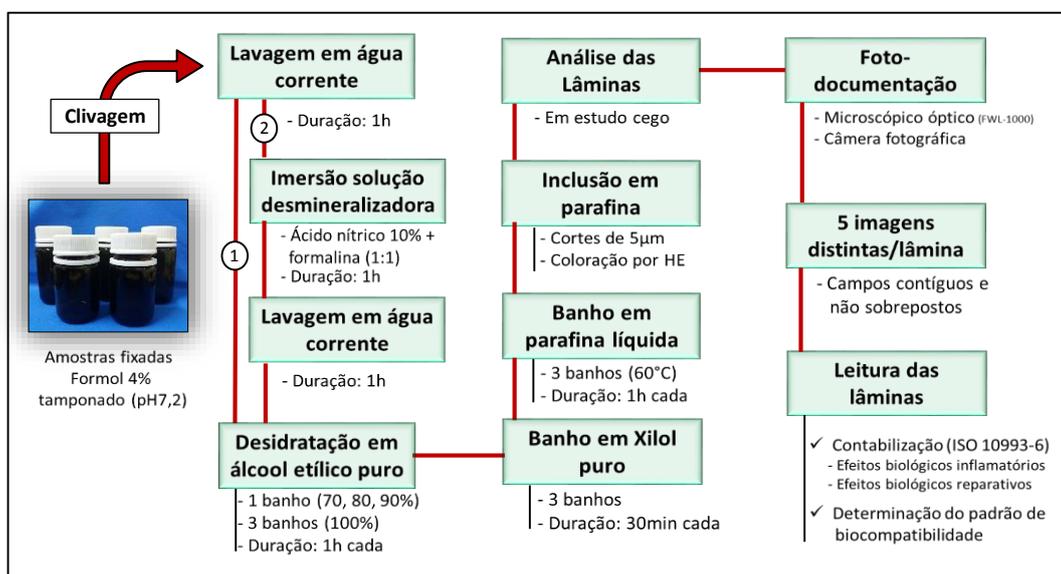


Figura 7 – Etapas do processamento das necrópsias e análise histopatológica. **1**-amostras não mineralizadas, **2** - amostras mineralizadas. Fonte: elaborada pelo autor.

Na análise histopatológica descritiva, todas as lâminas foram avaliadas em supervisão de um patologista e passaram pelo processo de fotodocumentação em um

microscópio óptico FWL-1000 (Feldman Wild Leitz, Manaus, AM, Brasil) utilizando a câmera fotográfica acoplada Cybershot DSC-W300 Super Steady Shoot (Sony, Tóquio, Japão), para descrição dos processos gerais de inflamação, reparo e persistência do enxerto nas diferentes condições experimentais.

Na análise histopatológica quantitativa, também sob supervisão de um patologista, para cada lâmina foram capturadas 5 imagens distintas, em campos contíguos não superpostos (**Figura 8**), que foram contabilizadas de acordo com a presença e intensidade dos parâmetros biológicos condizentes com os processos de inflamação, reparo e presença do enxerto, descritos na norma ISO 10993-6, conforme **Figura 9**. Considerando o número de animais (n=45) e o total de 5 grupos analisados, a fotocaptura de 5 campos por animal (n=5) e os 7 critérios adotados para avaliação dos materiais, essa pesquisa totalizou os números de 375 fotomicrografias capturadas e 2625 campos histológicos analisados separadamente.

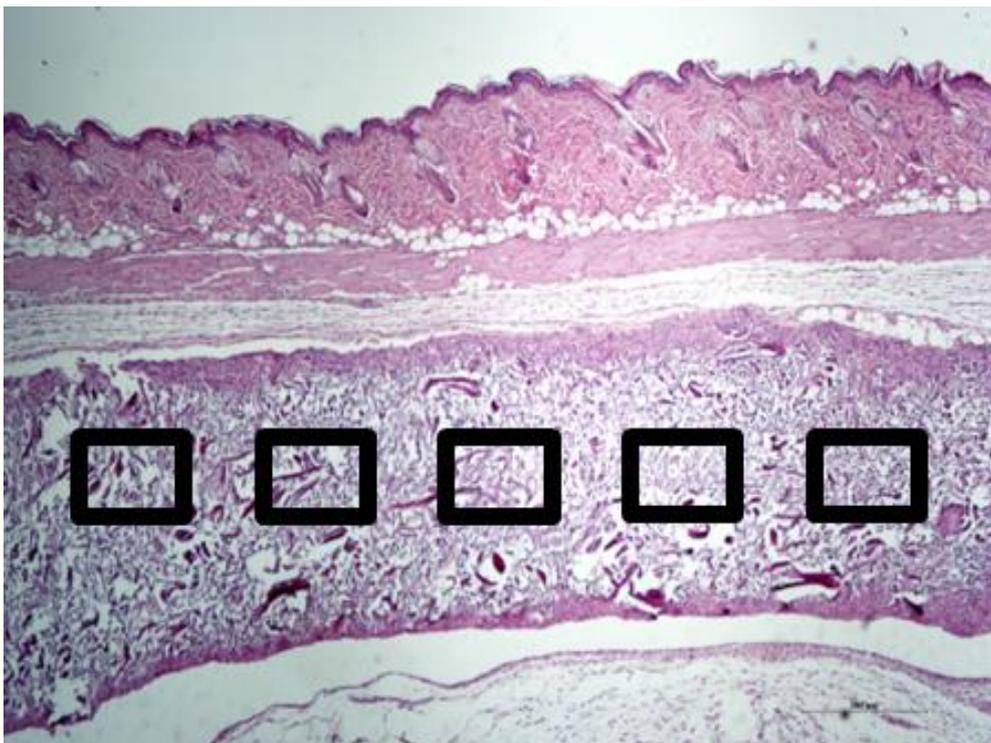


Figura 8 – Representação esquemática por sobreposição da fotocaptura de 5 campos contíguos não superpostos em cada lâmina histológica para avaliação das respostas biológicas locais ao enxerto em tecido subcutâneo de camundongos. Fonte: elaborada pelo autor.

Padrão de resposta inflamatória	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Neutrófilos	0	Raros, 1-5/pc	5-10/pc	Infiltração intensa ou até 50% / pc*	Sobrelotação ou > 50% / pc*
Linfócitos	0	Raros, 1-5/pc	5-10/pc	Infiltração intensa ou até 50% / pc*	Sobrelotação ou > 50% / pc*
Macrófagos	0	Raros, 1-5/pc	5-10/pc	Infiltração intensa ou até 50% / pc*	Sobrelotação ou > 50% / pc*
Células gigantes do tipo corpo estranho	0	Raros, 1-2/pc	3-5/pc	Infiltração intensa ou até 50% / pc*	Em camadas ou > 50% / pc*
<i>Nota: Pc: por campo (400x) *Critério modificado pelos autores</i>					
Padrão de resposta reparativa	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Neovascularização	0	Mínima capilaridade, proliferação, focal, 1-3 brotos	Grupos de 4-7 capilares com estruturas fibroblastóides de suporte	Banda ampla de capilares com estruturas de suporte ou até 50% / pc**	Banda extensa de capilares com estruturas fibroblastóides de suporte ou > 50% / pc**
Fibrose ou Tecido conjuntivo**	0	Banda estreita ou tecido conjuntivo frouxo até 50% / pc*	Banda de espessura moderada ou tecido conjuntivo frouxo de 50-100% / pc*	Banda espessa ou tecido conjuntivo denso até 50% / pc*	Banda extensa ou tecido conjuntivo denso > 50% / pc*
<i>Nota: Pc: por campo (400x) **Critério modificado pelos autores</i>					
Padrão de integridade do enxerto	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Presença do Material***	0 (100% degradado)***	Mínima (até 25%)***	Leve (26-50%)***	Moderada (51-75%)***	Quase total (76-100%)***
<i>Nota: Pc: por campo (400x) ***Critério incluído pelos autores</i>					

Figura 9 – Quadro representativo dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais inflamatórios, reparativos e de biodegradação após implantação dos enxertos em tecido subcutâneo de camundongos. Fonte: Adaptado de ISO 10993-6, Anexo E (ISO, 2007).

O padrão de biocompatibilidade e de biodegradação para cada tipo de material enxertado foi determinado com a ajuda das pontuações médias obtidas em cada condição experimental por comparação ao controle positivo. Embora recomendado pela norma, o controle negativo, isto é, o próprio leito cirúrgico subcutâneo sem tratamento, não foi considerado fidedigno para traçar correlação aos materiais, visto que o parâmetro de biodegradabilidade constituiria um viés à pesquisa, na ausência de um material enxertado. Ademais, a implantação de um material controle que provocasse notória resposta inflamatória e necrose, como é o caso do látex citado em algumas publicações temáticas, não foi realizada nesta pesquisa, justificado pelo cumprimento aos parâmetros éticos em pesquisa animal dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição). Nesse pensamento, a falta de um controle com padrões inflamatórios e de reparo indesejáveis se justifica por:

primeiro, não comprometer a obtenção de dados e resultados referentes à caracterização biológica dos materiais-teste, uma vez que o uso do controle positivo nesse estudo já oferece os parâmetros comparativos suficientes para caracterizar a biocompatibilidade e biodegradação dos mesmos; segundo, a presença do controle negativo pareado ao implante do material teste no mesmo animal poderia desencadear intensa resposta inflamatória e necrose comprometendo o bem-estar do espécime e levando a mudanças comportamentais e fisiológicas que influenciariam na confiabilidade dos dados obtidos, ou acarretar a própria morte do animal; e terceiro, a ausência de um controle notoriamente danoso promoveu redução do sofrimento, da morbidade e da necessidade de usar uma maior quantidade de animais (SARRAF-SILVA; CAVALCANTE; ANDRADE, 2017). De acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o comprometimento do bem-estar animal pode acarretar em consequências como: aumento na variabilidade dos dados; necessidade de um maior número de animais; dificuldade na reprodutibilidade dos resultados; ausência de dados; credibilidade reduzida dos resultados; resultados que não podem ser aplicados a outras situações; resultados impubescíveis; comprometimento na universalidade experimental e uso desnecessário de vidas (CONCEA, 2015).

4.6. Análise estatística

Todos os dados quantitativos foram tabulados e as médias obtidas de cada parâmetro por animal, para compor uma quintuplicata por condição experimental, foram dispostas em gráficos por meio do programa GraphPrism versão 7.0 (GraphPad Software, Inc., EUA), para comparações intragrupos (mesmo grupo experimental, semanas experimentais diferentes) e intergrupos (grupos experimentais diferentes, mesma semana experimental).

Os dados não-paramétricos foram calculados por meio do programa GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad Software, Inc., EUA) usando teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O nível de significância de 5% ($p < 0,05$) foi aplicado para todos os testes estatísticos.

5. RESULTADOS

5.1.1. Análise descritiva

5.1.2. Colágeno

A **Figura 10** demonstra que o Grupo 1 (material-teste de colágeno) sofreu diminuição do seu volume inicial em 1 semana pós-enxerto até sofrer completo desaparecimento em 9 semanas, enquanto o Grupo 4 (material-controle) manteve-se estável.

A **Figura 11** demonstra que o Grupo 1 apresentou em 1 semana infiltrado inflamatório misto, em 3 semanas um tecido de granulação bem vascularizado e em 9 semanas um tecido conjuntivo frouxo, com algumas áreas de fibrose. O Grupo 4 apresentou em 1 semana invasão de infiltrado inflamatório misto, já em 3 semanas e em 9 semanas um tecido de granulação, sem comprometimento de sua integridade morfológica.

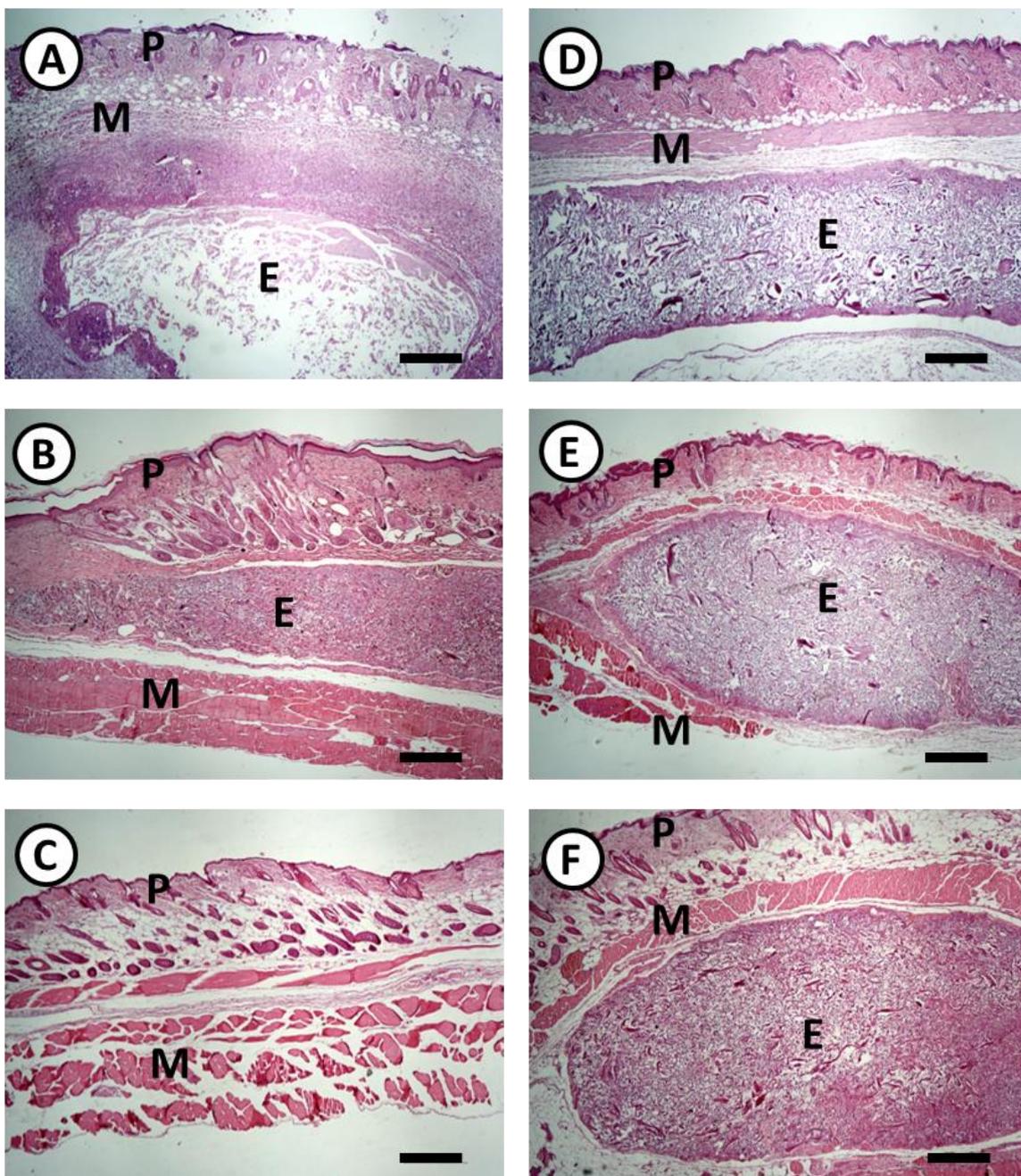


Figura 10 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de colágeno/Grupo 1 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 4 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **P**: pele, **M**: músculo, **E**: enxerto. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200 μ m.

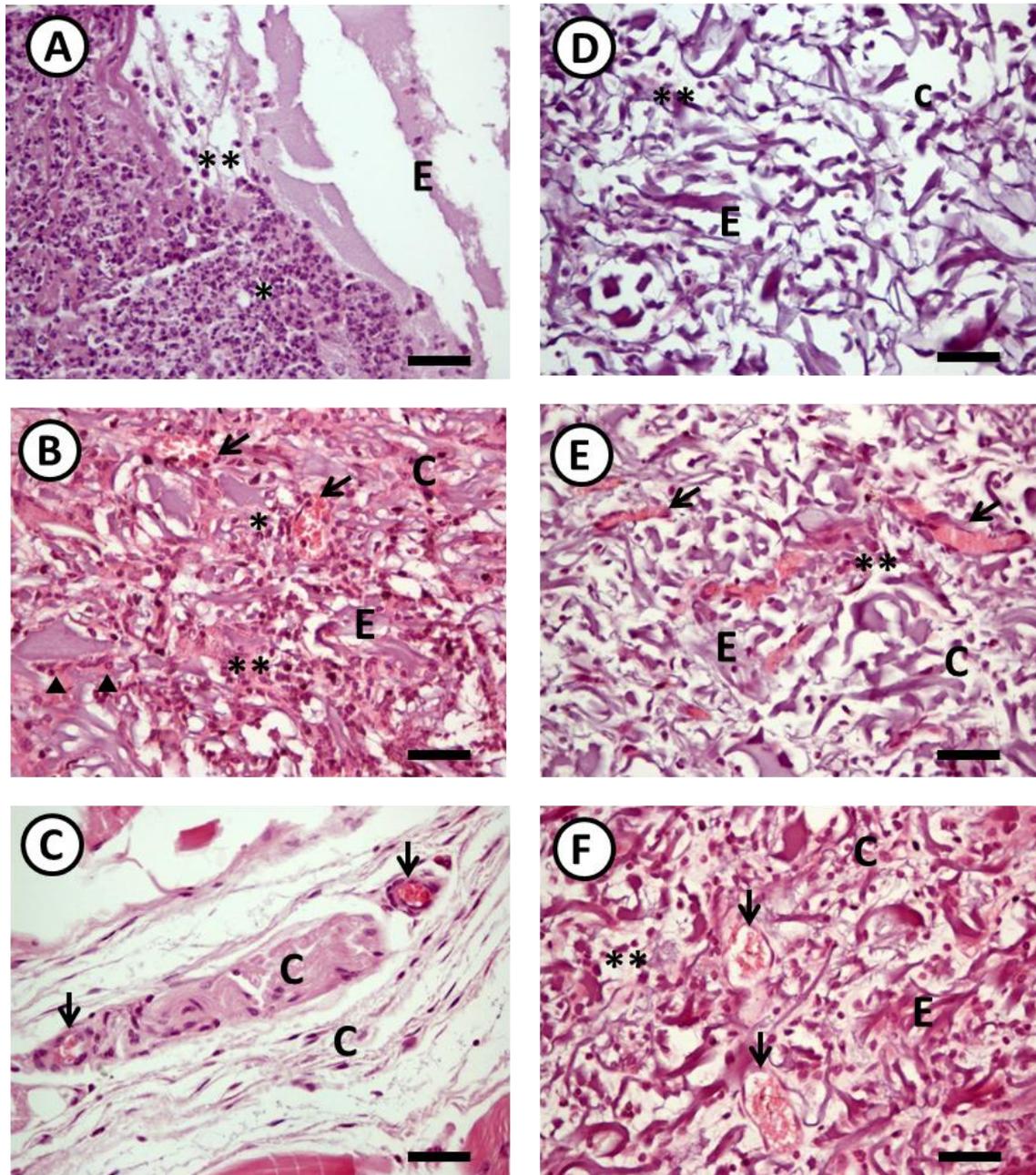


Figura 11 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de colágeno/Grupo 1 (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 4 (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (*) ou linfocítico (**), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (▶), vasos sanguíneos (→), fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (C) e enxerto (E). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20μm.

5.1.3. Nanoqueratina

A **Figura 12** demonstra que o Grupo 2 (material-teste de nanoqueratina) sofreu diminuição do seu volume inicial em 1 semana pós-enxerto até sofrer completo desaparecimento em 9 semanas, enquanto o Grupo 4 (material-controle) manteve-se estável.

A **Figura 13** demonstra que o Grupo 2 apresentou em 1 semana infiltrado inflamatório misto, em 3 semanas um tecido de granulação vascularizado e rico em células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho e em 9 semanas a persistência do tecido de granulação. O Grupo 4 apresentou em 1 semana invasão de infiltrado inflamatório misto, em 3 semanas e em 9 semanas um tecido de granulação, sem comprometimento de sua integridade morfológica.

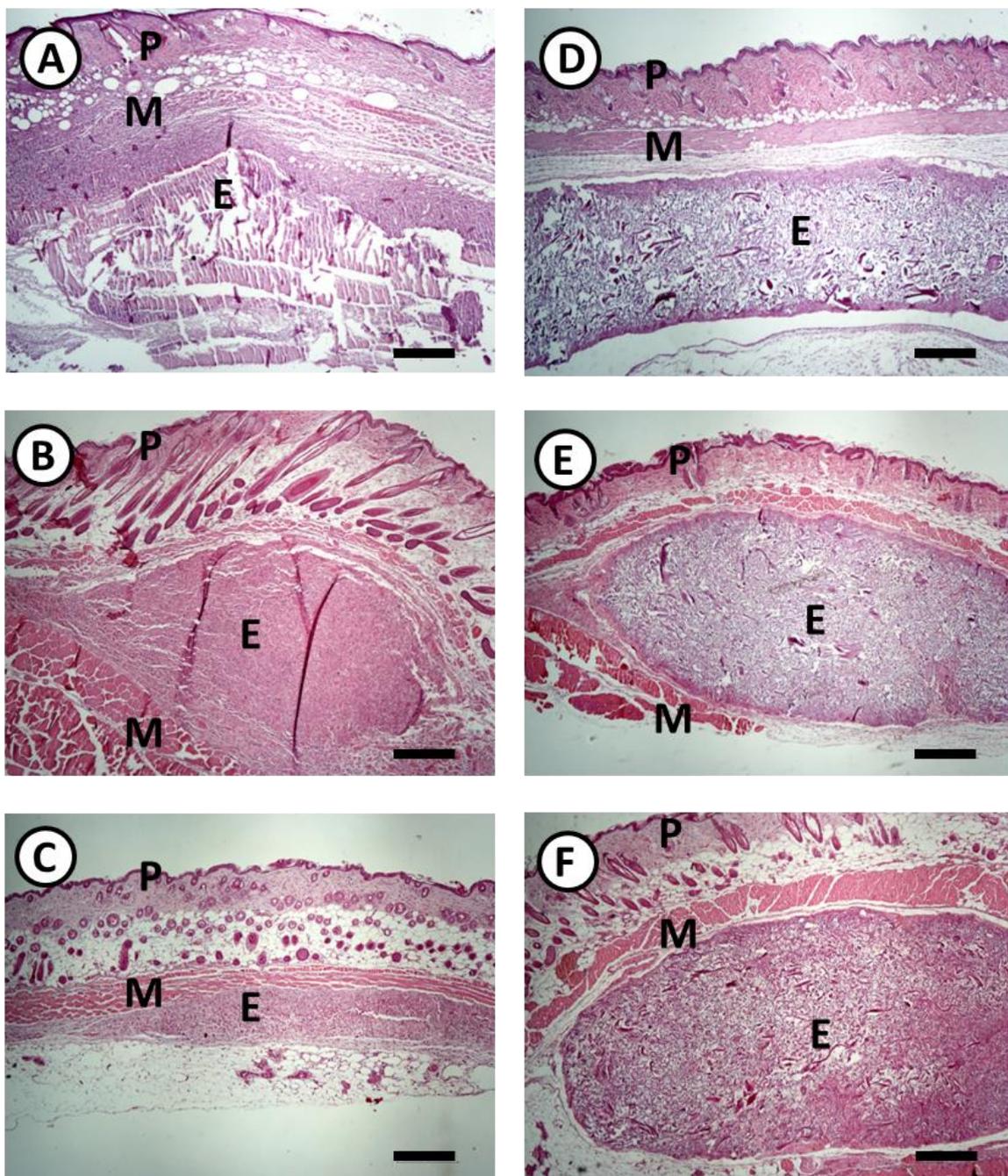


Figura 12 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de queratina/Grupo 2 (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 4 (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). P: pele, M: músculo, E: enxerto. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200 μ m.

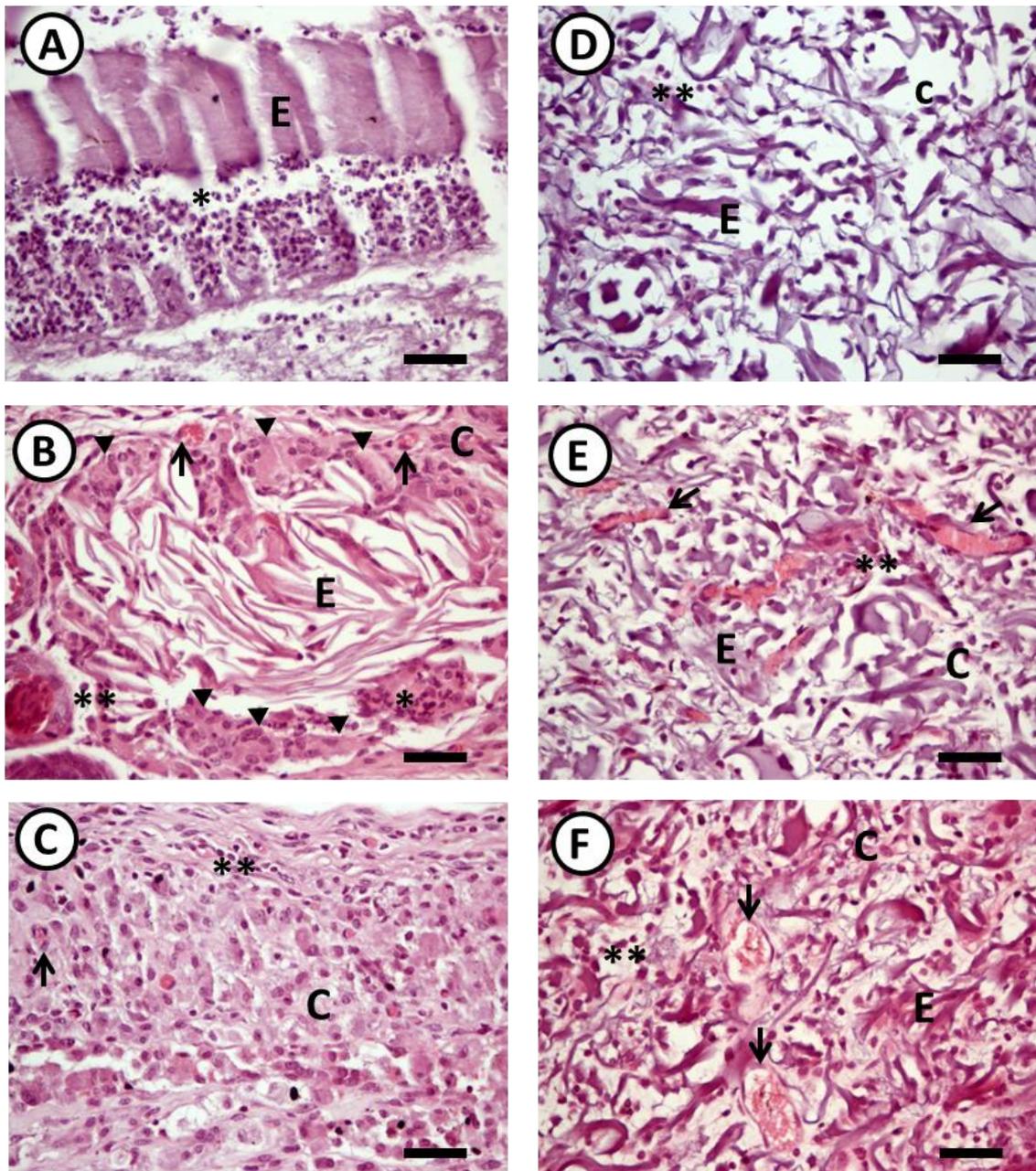


Figura 13 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de queratina/Grupo 2 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 4 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (*) ou linfocítico (**), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (▶), vasos sanguíneos (→) e fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (C) e enxerto (E). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20μm.

5.1.4. Biopatita

A **Figura 14** demonstra que o Grupo 3 (material-teste de bioapatita) sofreu diminuição do seu volume inicial em 1 semana pós-enxerto até sofrer parcial reabsorção em 9 semanas, enquanto o Grupo 5 (material-controle) manteve-se estável.

A **Figura 15** demonstra que o Grupo 3 apresentou em 1 semana infiltrado inflamatório mononuclear, em 3 semanas um tecido de granulação vascularizado e com presença moderada de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho e em 9 semanas a persistência de células gigantes, tendo o tecido de granulação cedido espaço a tecido conjuntivo frouxo ou áreas de fibrose. O Grupo 5 apresentou em 1 semana discreto infiltrado inflamatório polimorfonuclear, em 3 semanas e em 9 semanas mínimo infiltrado inflamatório, com algumas células gigantes, quadro compatível com sua reabsorção parcial.

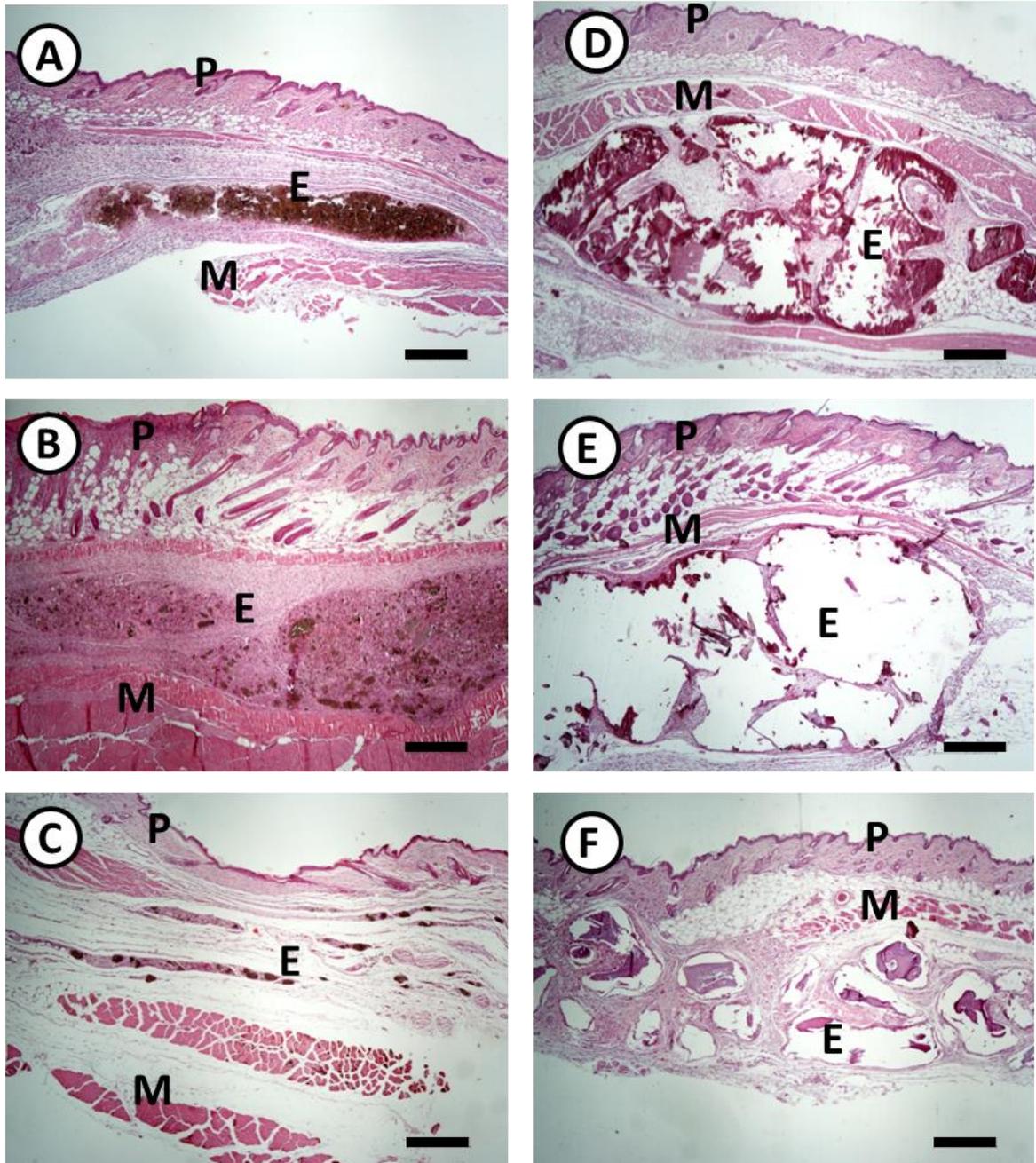


Figura 14 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de bioapatita/Grupo 3 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 5 (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **P**: pele, **M**: músculo, **E**: enxerto. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200μm.

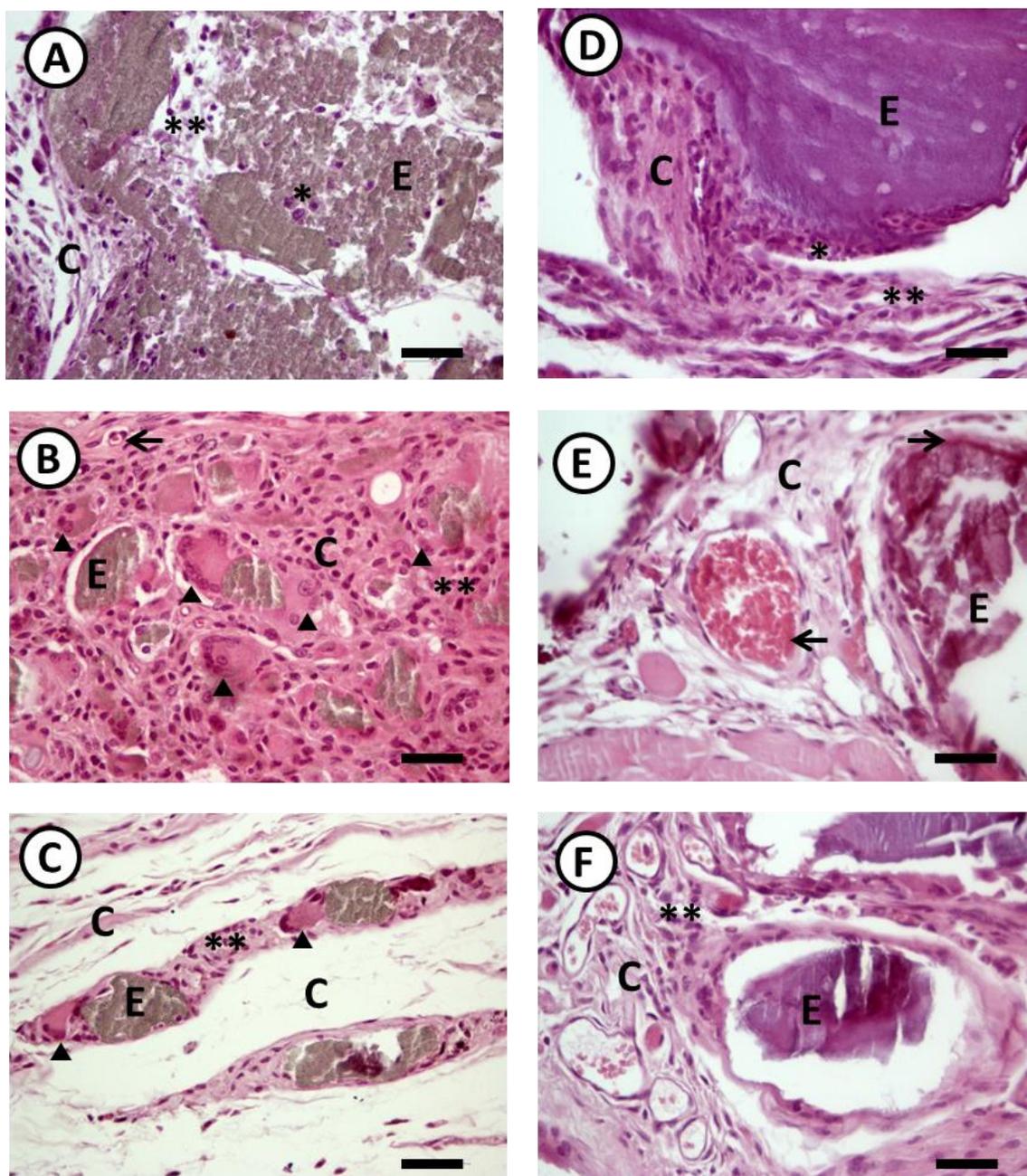


Figura 15 – Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de material-teste de bioapatita/Grupo 3 (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) ou material-controle/Grupo 5 (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (*) ou linfocítico (**), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (▶), vasos sanguíneos (→) e fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (C) e enxerto (E). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 200µm.

5.1.5. Análise semiquantitativa da interação material/tecido

A **Tabela 4** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da contagem de neutrófilos para todos os grupos (G1 a G5) em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 semana, a presença de neutrófilos foi maior em G1 e G2 comparados a G4 ($p < 0,001$) e em G3 comparado a G5 ($p < 0,001$). Em 3 e 9 semanas, não houve diferenças significativas intergrupos.

Tabela 4: Análise semiquantitativa da presença de neutrófilos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	NEUTRÓFILOS				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	1 (0-4)*	2 (0-4)†	1 (0-4)‡	0 (0-0)*·†	0 (0-3)‡
3 SEMANAS	0 (0-2)	0 (0-4)	0 (0-1)	0 (0-3)	0 (0-1)
9 SEMANAS	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-0)	0 (0-0)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,001$ (*, †, ‡). Fonte: elaborada pelo autor.

A **Tabela 5** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da contagem de linfócitos para todos os grupos (G1 a G5) em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 semana, a presença de linfócitos foi maior em G1 e G2 comparados a G4 ($p < 0,001$). Em 3 semanas, a presença de linfócitos foi maior em G1 comparado a G4 ($p < 0,001$). Em 9 semanas, não houve diferenças significativas intergrupos.

Tabela 5: Análise semiquantitativa da presença de linfócitos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	LINFÓCITOS				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	3 (2-3)*	3 (2-3)†	3 (2-3)	1 (1-2)*·†	2 (1-3)
3 SEMANAS	2 (1-3)‡	2 (1-3)	2 (2-3)	2 (1-3)‡	1 (0-3)
9 SEMANAS	1 (0-1)	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-1)	1 (0-2)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,001$ (*, †, ‡). Fonte: elaborada pelo autor.

A **Tabela 6** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da contagem de macrófagos para todos os grupos (G1 a G5) em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 semana, a presença de macrófagos foi maior em G1 e G2 comparados a G4 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente) e em G3 comparado a G5 ($p < 0,01$). Em 3 semanas, a presença de macrófagos foi maior em G3 comparado a G5 ($p < 0,01$). Em 9 semanas, a presença de macrófagos foi maior em G2 comparado a G4 ($p < 0,01$).

Tabela 6: Análise semiquantitativa da presença de macrófagos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	MACRÓFAGOS				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	1 (0-1)*	1 (0-1)‡	1 (0-2)†	0 (0-1)*·‡	0 (0-1)†
3 SEMANAS	3 (0-4)	2 (0-4)	1 (0-1)†	1 (0-1)	0 (0-1)†
9 SEMANAS	0 (0-2)	2 (0-4)†	0 (0-1)	0 (0-1)†	0 (0-0)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (†) ou $P < 0,001$ (‡). Fonte: elaborada pelo autor.

A **Tabela 7** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da contagem de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho para todos os grupos (G1 a G5) 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 e 3 semanas, não houve diferenças significativas intergrupos. Em 9 semanas, a presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho foi maior em G2 comparado a G4 ($p < 0,05$).

Tabela 7: Análise semiquantitativa da presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	CÉLULAS GIGANTES DO TIPO CORPO ESTRANHO				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	0 (0-1)	0 (0-0)	1 (0-3)	0 (0-2)	1 (0-2)
3 SEMANAS	0 (0-1)	1 (0-3)	3 (0-3)	1 (0-2)	2 (1-3)
9 SEMANAS	0 (0-1)	1 (0-3)*	2 (1-3)	0 (0-1)*	1 (0-2)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,05$ (*). Fonte: elaborada pelo autor.

A **Tabela 8** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da contagem de neovascularização para todos os grupos (G1 a G5) em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 semana, a presença de neovascularização foi maior em G1 e G2 comparado a G4 ($p < 0,001$). Em 3 e 9 semanas, não houve diferenças significativas intergrupos.

Tabela 8: Análise semiquantitativa da presença de neovascularização em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	NEOVASCULARIZAÇÃO				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	2 (0-4)*	2 (0-4)†	1 (0-3)	0 (0-1)*·†	2 (0-4)
3 SEMANAS	1 (0-4)	2 (0-4)	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (1-2)
9 SEMANAS	1 (0-4)	1 (0-3)	1 (0-4)	0 (0-4)	1 (0-4)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,001$ (*, †). Fonte: elaborada pelo autor.

A **Tabela 9** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da contagem de tecido conjuntivo para todos os grupos (G1 a G5) em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 semana, a presença de tecido conjuntivo foi maior em G1 comparado a G4 ($p < 0,05$). Em 3 semanas, a presença de tecido conjuntivo foi maior em G1 comparado a G4 ($p < 0,05$). Em 9 semanas, a presença de tecido conjuntivo foi maior em G1 comparado a G4 ($p < 0,01$).

Tabela 9: Análise semiquantitativa da presença de tecido conjuntivo em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	TECIDO CONJUNTIVO				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	1 (1-3)*	1 (0-2)	1 (1-2)	1 (0-1)*	1 (1-2)
3 SEMANAS	1 (1-3)†	1 (0-3)	2 (1-2)	1 (0-2)†	1 (1-3)
9 SEMANAS	2 (1-3)‡	1 (1-2)	2 (1-3)	1 (0-3)‡	1 (0-2)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P < 0,05$ (*, †) ou $P < 0,01$ (‡). Fonte: elaborada pelo autor.

A **Tabela 10** demonstra a mediana e os valores máximo e mínimo da presença de material enxertado para todos os grupos (G1 a G5) em 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto, em análises intergrupos. Em 1 semana, a presença de material enxertado foi menor em G1 e G2 comparados a G4 ($p<0,001$) e em G3 comparado a G5 ($p<0,05$). Em 3 semanas, a presença de material enxertado foi maior em G1 e G2 comparado a G4 ($p<0,001$). Em 9 semanas, a presença de material enxertado foi maior em G1 e G2 comparado a G4 ($p<0,001$).

Tabela 10: Análise semiquantitativa da presença de material enxertado em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controles ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por tratamento.

	PRESENÇA DE MATERIAL ENXERTADO				
	G1	G2	G3	G4	G5
1 SEMANA	1 (0-3)†	0 (0-1)‡	4 (1-4)*	4 (3-4)†‡	1 (0-3)*
3 SEMANAS	0 (0-1)†	0 (0-1)‡	3 (1-4)	4 (3-4)†‡	2 (1-4)
9 SEMANAS	0 (0-0)†	0 (0-0)‡	2 (1-4)	4 (0-4)†‡	2 (1-3)

Legenda: colágeno avícola (G1), nanoqueratina avícola (G2), bioapatita avícola (G3), colágeno bovino controle para G1 e G2 (G4) e osso bovino mineralizado controle para G3 (G5). Análise estatística não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Diferenças significantes intergrupos: $P<0,05$ (*) ou $P<0,001$ († ou ‡). Fonte: elaborada pelo autor.

6. DISCUSSÃO

O colágeno extraído de peles e tendões de pés de frango apresentou-se biocompatível, com infiltrado inflamatório misto decrescente com células gigantes, tecido conjuntivo estável, presença parcial do material em 3 semanas e reabsorção total em 9 semanas. Resultados semelhantes foram relatados por Rahmanian-Schwarz et al. (2014), que avaliaram a biocompatibilidade de uma membrana de colágeno bovino e observaram o mesmo infiltrado inflamatório misto decrescente, reabsorção parcial em 3 semanas e reabsorção total em 6 semanas. Entretanto, Jardelino et al. (2010) quando avaliaram uma membrana de colágeno de peritônio suíno que se apresentou biocompatível, com infiltrado inflamatório inicialmente polimorfoclear e posteriormente mononuclear que foi decrescendo no período experimental, presença moderada de células gigantes, intensa proliferação de fibroblastos e vasos sanguíneos, observaram que a reabsorção total do material foi mais precoce, ocorrendo em 3 semanas (JARDELINO *et al.*, 2010).

A presença de macrófagos e células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em 3 semanas caracteriza uma resposta inflamatória crônica, o que pode justificar a reabsorção dos materiais a base de colágeno. A ausência de resposta inflamatória e presença de resposta reparativa após 9 semanas indicam que não houve inflamação severa, ressaltando a boa biocompatibilidade dos materiais, assim como observado por Jardelino et al. (2010) e Rahmanian-Schwarz et al. (2014). Neste estudo, o fenômeno de reparo foi evidenciado pela deposição crescente de tecido conjuntivo a partir de 3 semanas e neovascularização em 9 semanas no local do implante. Em contraste, Rahmanian-Schwarz et al. (2014) observaram neovascularização e encapsulação precoce já em 1 semana após implante em subcutâneo de camundongos de uma membrana de colágeno bovino e após 6 semanas já não foram detectadas evidências de encapsulação, formação de cicatriz ou neovascularização e inflamação a longo prazo. De forma similar, Kim et al. (2007) avaliaram a biocompatibilidade de uma membrana de colágeno de submucosa de intestino suíno e observaram a presença de fibrose e neovascularização em 2 semanas pós-implante em subcutâneo.

A nanoqueratina extraída de penas de frango apresentou-se biocompatível, com infiltrado inflamatório misto decrescente com células gigantes, tecido conjuntivo estável, presença parcial em 3 semanas e reabsorção total em 9 semanas. Os resultados foram

similares ao colágeno avícola, embora com maior intensidade de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho entre 3 e 9 semanas. Segundo a norma ISO 10993-6 (2007), além das características físico-químicas do biomaterial como composição química, tamanho da partícula e cristalinidade, a forma de apresentação ou morfologia do produto implantado também pode influenciar na resposta biológica induzida no tecido. Isso corrobora a hipótese de que a nanoqueratina processada em lâminas friáveis possa ter elicitado uma resposta inflamatória crônica mais intensa e contribuído para aceleração do fenômeno reabsortivo. Wang et al. (2017) também comprovaram a biocompatibilidade de queratina obtida de penas de frango na forma de hidrogel quando implantada em subcutâneos de ratos, com resposta inflamatória aguda e neovascularização em 1 semana, pico de inflamação mista em 2 semanas e em 4 semanas, redução da inflamação e completa dissolução do material. Os autores sugerem que esse hidrogel possa ser usado para o reparo de feridas cutâneas (WANG *et al.*, 2017a).

Na avaliação do potencial uso como compósito, Saravanan *et al.* (2013) obtiveram nanopartículas de queratina de penas de frango e avaliaram sua biocompatibilidade *in vitro*, em cultura de osteoblastos humanos, em associação a uma matriz de quitosana. Como resultados observaram que a presença de nanoqueratina aumentou a degradação da matriz de quitosana e a adesão de proteínas de adsorção podendo melhorar a interação célula/material, dessa forma sugerindo potencial para utilização na terapia de defeitos ósseos (SARAVANAN *et al.*, 2013). Apesar da biocompatibilidade e biodegradabilidade descritas *in vitro* e *in vivo*, uma desvantagem referente ao uso da nanoqueratina como biomaterial para o reparo ósseo é seu curto prazo de reabsorção. A reabsorção é uma característica necessária e desejada para o uso de um biomaterial para engenharia de tecidos como enxertos ou carreadores de células, pois não precisam ser removidos após implante evitando, assim, possíveis complicações cirúrgicas e desconforto para o paciente (JARDELINO *et al.*, 2010). Porém, dependendo do seu tempo de reabsorção, o material pode servir para reparo limitado de alguns tecidos. No caso específico do tecido ósseo, torna-se necessário a presença da estrutura e função do biomaterial por no mínimo seis semanas, tempo necessário para a migração de células osteogênicas e início da regeneração do tecido perdido (JARDELINO *et al.*, 2010).

Uma potencial aplicabilidade para o colágeno e nanoqueratina avícola testados, considerando sua acelerada biodegradabilidade total em até 9 semanas, é sua utilização como uma esponja hemostática. A utilização de agentes hemostáticos em procedimentos

cirúrgicos em sítios intraorais de pequena dimensão, como preenchimento de alvéolos frescos pós-exodontia, minimizam complicações pós-operatórias como sangramento prolongado, dor e demora de cicatrização, especialmente no caso de pacientes diabéticos, hemofílicos, anêmicos, hipertensos e entre outras doenças relacionadas (SANTANA *et al.*, 2009). As esponjas à base colágeno têm sido as mais utilizadas e na Odontologia são comumente aplicadas em procedimentos de reparo e regeneração periodontal, como a Hemospon[®] (TechNew, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) que, em um estudo *in vivo* em subcutâneo de ratos, apresentou reabsorção completa em 3 semanas pós-implante (SANTANA *et al.*, 2009), assim como observado em nossos resultados para o colágeno e a nanoqueratina. A queratina também tem sido estudada como agente hemostático e cicatrizante e tem apresentado resultados promissores, como demonstrado por Wang *et al.* (2017b) ao avaliarem hidrogéis de queratina de penas de frango na cicatrização de feridas e observarem fechamento de 90% da lesão do grupo tratado em 10 dias comparado a apenas 60% do grupo não-tratado no mesmo tempo.

Outra potencial aplicabilidade para o colágeno e nanoqueratina avícola testados, considerando sua acelerada biodegradabilidade em até 9 semanas, é sua utilização para desenvolvimento biotecnológico de barreiras de membrana reabsorvíveis para uso no Reparo Tecidual Guiado (RTG) ou Reparo Ósseo Guiado (ROG) conjugadas a enxertos ósseos em Odontologia. Um problema associado à perda dentária é a reabsorção do osso alveolar. Isso afeta a sua altura e espessura e dificulta a instalação de implantes dentários, sendo necessária a realização de enxertia de osso autógeno (NÓIA *et al.*, 2017). Porém, um problema relacionado a esse processo é a reabsorção do enxerto, que pode variar de 25 a 50% (NÓIA *et al.*, 2014). A RTG ou ROG utiliza-se de membranas reabsorvíveis ou não como barreiras físicas sobre áreas de enxerto objetivando tornar o processo de reparo tecidual mais eficiente, pois as membranas possibilitam o isolamento de células associadas com o reparo tecidual e impede a infiltração de células indesejadas (GERZSON *et al.*, 2016) e ainda diminuem a reabsorção do enxerto aumentando a eficácia do processo (KIM *et al.*, 2009). Na ROG, as membranas são utilizadas para revestimento de áreas de enxertia a fim de impedir a invasão do tecido epitelial e conjuntivo e garantir a formação óssea em áreas de interesse, como no caso de implantes ósseo-integrados (GERZSON *et al.*, 2016). Para aplicação na ROG, as membranas, sejam elas reabsorvíveis ou não, devem apresentar os seguintes requisitos: biocompatibilidade, segurança biológica ao uso, não-antigenicidade e induzir pouca ou nenhuma reposta

inflamatória (BUSER, 2010). No entanto, o uso de membranas reabsorvíveis torna-se mais vantajoso, uma vez que não depende ser removido, evitando a necessidade de segundo tempo cirúrgico (GERZSON *et al.*, 2016).

Dentro desse contexto e de acordo com os nossos resultados, colágeno e nanoqueratina avícolas apresentam características biológicas favoráveis para desenvolvimento de membranas reabsorvíveis para uso clínico. Boa adesão celular, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-imunogenicidade e fácil manipulação tornam tais materiais adequados para uso em RTG (KIM *et al.*, 2009; BUNYARATAVE; WANG, 2001). Atualmente a grande maioria das membranas reabsorvíveis comercialmente disponíveis são à base de colágeno, incluindo: Lumina-Coat[®] e Lumina-Coat Double-Time[®] (Criteria, São Paulo, SP, Brasil), Bio-Gide[®] (Geistlich, São Paulo, SP, Brasil) e BioMend[®] (Zimmer, FL, EUA). Por outro lado, ainda não existem disponíveis membranas à base de nanoqueratina para fins de RTG, um potencial a ser explorado em estudos futuros. As células envolvidas na ROG, os osteoblastos, atingem maturidade entre 3 e 4 semanas, logo a membrana utilizada deve manter-se estável por tempo suficiente para o repovoamento seletivo por osteoblastos (GERZSON *et al.*, 2016). Alguns autores sugerem que uso de membranas em dupla camada pode aumentar a sua estabilidade, como mostrado por Kim *et al.* (2009) que observaram que a dupla camada de membrana de colágeno sobre enxerto ósseo em defeito de tamanho crítico em calvária de coelhos prolonga o tempo de reabsorção de 4 para 6 semanas quando comparada à camada única.

A bioapatita extraída de ossos de frango apresentou-se biocompatível, com infiltrado inflamatório misto decrescente com células gigantes, tecido conjuntivo estável e reabsorção parcial até 9 semanas. Embora a presença moderada de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho fosse evidente entre 3 e 9 semanas, os resultados de biodegradação diferiram do colágeno e da nanoqueratina avícola, que sofreram reabsorção total, enquanto fragmentos de bioapatita ainda estiveram presentes. A reabsorção parcial apresentada pela bioapatita ressalta o seu potencial para a engenharia de tecidos com aplicações no reparo de tecido ósseo, uma vez que a biodegradabilidade é uma característica importante para o reparo tecidual permitindo uma melhor interação entre biomaterial e tecido local facilitando a formação de tecido novo (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2015). Deng *et al.* (2013) compararam as características físico-química e biológica *in vitro* de apatitas naturais e observaram que

as mesmas apresentaram boa citocompatibilidade. A baixa proporção de cálcio/fosfato, o tamanho dos cristais e a grande quantidade de substituição de carbonato, características típicas das bioapatitas, aumentaram a solubilidade das moléculas de apatitas e influenciaram positivamente na sua citocompatibilidade (DENG *et al.*, 2013). A parcial reabsorção da bioapatita avícola em tecido subcutâneo estimula o interesse em futuros estudos ortotópicos para avaliar sua capacidade como enxerto osseocondutor *in vivo*, incluindo defeitos de tamanho crítico.

Dentre os materiais à base de fosfato de cálcio, a hidroxiapatita ainda é o mais utilizado pela bioengenharia óssea, pois possui composição mineral semelhante ao osso humano e, além disso, é biocompatível, apresenta excelente bioatividade e osteocondutividade (GRENHO *et al.*, 2015; GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2013; TRIPATHI; BASU, 2012). No entanto, a hidroxiapatita possui baixa biodegradabilidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* e isso tem sido considerado o principal fator limitante para sua aplicação clínica (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2015). Chissov *et al.* (2008) corroboram esse comportamento, demonstrando que grânulos de hidroxiapatita enxertados em subcutâneos de camundongos, embora biocompatíveis, permaneceram intatos até 9 semanas pós-enxerto. A geração de compósitos é uma alternativa que busca unir as características de diferentes materiais para alcançar um produto final mais vantajoso. Para superar a baixa reabsorção da hidroxiapatita sozinha, sua associação a colágeno, queratina, quitosana e fribroína de seda tem melhorado sua biodegradabilidade (GHOLIPOURMALEKABADI *et al.*, 2015).

Salgado *et al.* (2016) demonstraram que criogéis a base de colágeno e nanohidroxiapatita em diferentes proporções (30:70, 50:50 e 70:30) enxertados em ratos no tecido subcutâneo não induziram inflamação significativa (pequeno recrutamento de macrófagos, linfócitos e raras células gigantes), promoveram angiogênese periférica ao enxerto e reparo fibroso de 1 a 4 semanas e em defeito ósseo de tamanho crítico, na proporção 30:70, sofreu degradação contínua e neoformação óssea parcial após 8 e 12 semanas (SALGADO *et al.*, 2016). Bittencourt *et al.* (2014) demonstraram que xenoenxerto bovino de hidroxiapatita e colágeno (75:25) *in vitro* exibia ausência de citotoxicidade imediata até 72 horas, aderência e espraiamento celular sobre o material em 1 semana e *in vivo*, ausência de foco de necrose e presença de tecido de granulação de intensidade moderada após 5 semanas e grânulos do xenoenxerto intatos e envoltos por tecido conjuntivo frouxo e algumas células gigantes multinucleadas do tipo corpo

estranho após 10 semanas. De forma similar, Gholipourmalekabadi *et al.* (2015) demonstraram que um nanocompósito de hidroxiapatita e fibroína de seda também apresentou *in vitro* uma atoxicidade em até 72 horas de exposição indireta, bem como *in vivo* biocompatibilidade em subcutâneo de camundongos, sem aumento significativo de linfócitos na área do enxerto mas com aumento significativo de macrófagos associado à degradação do material, entre 1 e 4 semanas. Dias *et al.* (2017) comparou o efeito biológico de um compósito poroso de hidroxiapatita e queratina (40:60) enxertado em defeito ósseo em tíbia de ovino ao de uma membrana porosa de colágeno tipo I. Ambos exibiram biocompatibilidade e, embora o compósito tenha apresentado um percentual de osteóide menor do que a membrana, o enxerto apresentou tempo de reabsorção superior, sendo possível sua detecção após 12 semanas enquanto o colágeno foi totalmente reabsorvido em apenas 4 semanas. Nesse estudo, o compósito apresentou taxa de reabsorção similar à taxa de regeneração do tecido ósseo, mantendo a estabilidade do leito cirúrgico até a atuação pelo sistema de reparo ósseo do hospedeiro (DIAS *et al.*, 2017).

Tais evidências da literatura mostram que a associação de materiais na forma de compósitos apresenta-se satisfatória em termos de biocompatibilidade, biodegradabilidade e, por vezes, osseocondutividade. Os bons resultados biológicos individuais dos materiais testados nessa pesquisa e o potencial sinergismo dos mesmos encorajam a realização de estudos futuros para a produção e avaliação de hidrogéis com diferentes proporções de colágeno, nanoqueratina e bioapatita avícola para geração de barreiras de membrana úteis em regeneração tecidual guiada ou óssea.

7. CONCLUSÃO

O material testado a base de colágeno derivado da indústria avícola é biocompatível, por apresentar declínio de infiltrado inflamatório e cicatrização estável em tecido subcutâneo ao longo do período experimental. Devido a sua constituição polimérica e à reabsorção acelerada e total, sugere potencial individual de desenvolvimento biotecnológico como agente hemostático para tratamento de pequenos defeitos ósseos.

O material testado a base de nanoqueratina derivada da indústria avícola é biocompatível, por apresentar declínio de infiltrado inflamatório e cicatrização estável em tecido subcutâneo ao longo do período experimental. Devido a sua constituição polimérica e à reabsorção acelerada e total, sugere potencial individual de desenvolvimento biotecnológico como agente hemostático para tratamento de pequenos defeitos ósseos.

O material testado a base de bioapatita derivada da indústria avícola é biocompatível, por apresentar declínio de infiltrado inflamatório e cicatrização estável em tecido subcutâneo ao longo do período experimental. Devido a sua constituição biocerâmica e à reabsorção lenta e parcial, sugere potencial individual de desenvolvimento biotecnológico como enxerto ósseo para tratamento de perdas ósseas pequenas a moderadas.

REFERÊNCIAS

- AITASALO, K. M.; PELTOLA, M. J. Bioactive glass hydroxyapatite in fronto-orbital defect reconstruction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 120, n. 7, p. 1963-1972, 2007.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European Spine Journal**.; v. 10, v. 8, n. 2, p. 96-101, 2001.
- AMBROSIO, L.; NETTI, P. A. Biomimetic hydrogels for tissue reconstruction. **11th International Ceramic Congress, 4th Forum on New Materials, CIMTEC**. p. 4-9, 2006.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**., Elsevier, v. 20, p. 86-100, 2008.
- ANDERSSON, M. *et al.* Effect of molecular mobility of polymeric implants on soft tissue reactions: An in vivo study in rats. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A**, p. 652-660, 2007.
- BITTENCOURT, R. C. *et al.* Preclinical evaluation of a xenogenic hydroxyapatite/collagen-based bone substitute material. **Revista Odonto Ciência**, v. 29, n. 1, p. 6-13, 2014.
- BUSER, D. **20 anos de regeneração óssea guiada na Implantodontia**. São Paulo: Quintessence; 2010. cap. 3.
- BRASIL. Associação Brasileira de Proteína animal – ABPA. **Relatório Anual**, 2017.
- BUNYARATAVEJ, P.; WANG, H. L. Collagen membranes: a review. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 2, p. 215-229, 2001.
- CARIOCA, J. O. B.; BARROS, L. M.; COELHO, A. L. **Biotechnology for the Development of a Green Economy**. Fortaleza, 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition, 2014, p. 945.
- CASTRO-SILVA, I. I. *et al.* Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **Innovations Implant Journal**. Biomater Esthet, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 70-75, Set/Dez. 2009.
- CASTRO-SILVA, I. I.; LIMA, F. M. S.; GRANJEIRO, J. M. Enxertos ósseos na Odontologia brasileira: cenário, desafios e perspectivas na visão da Gestão em Saúde. **Revista Fluminense de Odontologia**, v. 1, n. 39, p. 63-71, 2013.
- CAVALCANTE, F. L. **Preparo de hidrogéis neutros de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de sub-produtos da indústria avícola**. 2017. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CHISSOV V. I. *et al.* Study of *In Vivo* Biocompatibility and Dynamics of Replacement of Rat Shin Defect with Porous Granulated Bioceramic Materials. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Cell technologies in biology and medicine**, v. 146, n. 1, p. 139-143, 2008.

CHU, P. K.; LIU, X. **Biomaterials fabrication and processing handbook**. Boca Raton: CRC press, 2008.

COLEMAN, N. J.; NICHOLSON, J. W.; AWOSANYA, K. A preliminary investigation of the in vitro bioactivity of white Portland cement. **Cement and Concrete Research**; v. 37, p. 1518–1523, 2007.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Resolução Normativa nº. 25, de 29 de setembro de 2015. **Diário Oficial da União**, nº 189, Seção 1, p. 4, Out., 2015.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins pathologic bases of disease**. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2004.

CRITERIA LTDA. Disponível em: <www.criteria.com.br>. Acesso em: 20 de Jan de 2018.

DANESH, F. *et al.* Biocompatibility and Mineralization Activity of Fresh or Set White Mineral Trioxide Aggregate, Biomimetic Carbonated Apatite, and Synthetic Hydroxyapatite. **Journal of Endodontics**. v. 36, n. 6, p. 1036-1041, 2010.

DENG, Y *et al.* Biomimetic synthesis and biocompatibility evaluation of carbonated apatites template-mediated by heparin. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 2905–2913, 2013.

DIAS, G. J. *et al.* Osteoconduction in keratin–hydroxyapatite composite bone-graft substitutes. **Journal of biomedical materials research b: applied biomaterials**, v. 105b, n. 7, p. 2034-2044, 2017.

FOURNIER, E. *et al.* Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. **Biomaterials**, v. 24, n. 19, p. 3311-3331, 2003.

FRATZL, P. Collagen: Structure and Mechanics. **Potsdam: Springer**, p. 15-16, 2008.

FRIESS, W. Collagen: biomaterial for drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.**, v. 45, p. 113-136, 1998.

GALLER, K. M. *et al.* Scaffolds for Dental Pulp Tissue Engineering. **Advances in Dental Research**, v. 23, n. 3, p. 333-339, 2011.

GERZSON, A. S. *et al.* Membranas para barreira utilizadas em ROG: características e indicações. **Journal of Clinical Dentistry and Research**. v. 13, n. 4, p. 120-125, Out-Dez, 2016.

GHOLIPOURMALEKABADI, M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluations of three-dimensional hydroxyapatite/silk fibroin nanocomposite scaffolds. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.**, v. 62, n. 4, p. 441–450, Janeiro, 2015.

GIORNO, B. *et al.* Comparative *in vivo* study of biocompatibility of apatites incorporated with 1% zinc or lead ions versus stoichiometric hydroxyapatite. **Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering**, v. 19, p. 109-120, 2014.

GRENHO, L. *et al.* Antibacterial activity and biocompatibility of three-dimensional nanostructured porous granules of hydroxyapatite and zinc oxide nanoparticles—an *in vitro* and *in vivo* study. **Nanotechnology**, v. 26, n. 315101, p. 1-10, Julho, 2015.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de calcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Quim Nova**; v. 33, n. 6, p. 1352-8, 2010.

GUZMAN, R. C. *et al.* Mechanical and biological properties of keratose biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, p. 8205-8217, 2011.

HELARYM, C. *et al.* Evaluation of dense collagen matrices as medicated wound dressing for the treatment of cutaneous chronic wounds. **Biomaterials Science.**, v. 3, p. 373–382, 2015.

IBUKI, F. K. Síntese e caracterização de nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas e análise da interação destas com o tecido dentinário. **Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2014.

ISO 10993-6 - **Biological Evaluation of Medical Devices**. Tests for Local Effects after Implantation; Part-6. International Organization for Standardization ISO, Geneva, Switzerland, 2007.

JARDELINO, C. *et al.* Porcine peritoneum as source of biocompatible collagen in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 332-336, Jul-Ago, 2010.

JARDELINO, C. *et al.* Biocompatibility analysis of a novel reabsorbable alloplastic membrane composed of alginate-Capsul. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 60, p. 419-423, 2012.

JUANG, J. Y.; BOGY, D. B. Nanotechnology advances and applications in information storage. **Microsystem Technologies.**, v. 11, p. 950–957, 2005.

KAMARUDIN, N. B. *et al.* Statistical investigation of extraction parameters of keratin from chicken feather using Design-Expert. **Biotechnology**, v. 7, n. 127, p. 1-9, 2017.

KATTI, D. S. *et al.* Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. **Advanced Drug Delivery Reviews.**, v. 54, n. 7, p. 933–961, 2002.

KEANE, T. J. *et al.* Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, v. 33, p.1771-1781, 2012.

- KIM, M. S. *et al.* An in vivo study of the host tissue response to subcutaneous implantation of PLGA- and/or porcine small intestinal submucosa-based scaffolds. **Biomaterials**, v. 28, p. 5137-5143, 2007.
- KIM, S. H. *et al.* The efficacy of a double-layer collagen membrane technique for overlaying block grafts in a rabbit calvarium model. **Clinical Oral Implants Research**, v. 72, n. 10, p. 1124-1132, 2009.
- KONOP, M. *et al.* The role of allogenic keratin-derived dressing in wound healing in a mouse model. **Wound Repair Regeneration**, v. 25, p. 62-74, 2017.
- KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ J. Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects, **Waste Manage.** v. 31, p. 1689-1701, 2011.
- KUCHARZ, E. J. Biosynthesis of Collagen. **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 31–53. 1992.
- LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 1, p. 487-492, April, 2004.
- LEE, H. R. *et al.* Comparative Characteristics of Porous Bioceramics for an Osteogenic Response *In Vitro* and *In Vivo*. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.
- LIMA, C. J. *et al.* Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. **Matéria (UFRJ)**, v. 16, p. 574-582, 2011.
- LIU, H.; CAO, T. Dental application potential mesenchymal stromal cells and embryonic stem cells. **The Chinese journal of dental research**, v. 13, n. 2, 2010.
- LIU, Q. *et al.* Insight into Biological Apatite: Physiochemical Properties and Preparation Approaches. **Bio Med Research International**, v. 2013, p. 1-13, 2013.
- LODISH, H; BERQ, A; ZIPURSKY, S.L; MATSUDAIRA, P; BALTIMORE, D; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2000.
- LOMELINO, R. O. *et al.* The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (β -TCP/HA 70:30) granules increases bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 3, p. 781-788, 2012.
- LUCAS, T. *et al.* Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **Journal of Immunology**. v. 184, n. 7, p. 3964-3977, 2010.
- LUO, T. *et al.* Development and assessment of kerateine nanoparticles for use as a hemostatic agent. **Materials in Science Engineering**, v. 63, p. 352–358, 2016.
- MIDDLETON, J.; TIPTON, A. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2335-2346, 2000.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a formação de técnicos em laboratório de saúde**. Rio de Janeiro, EPSJV; IOC, v. 2, 2010, 290 p.

NÓIA, C. F. *et al.* Associação entre osso autógeno e material heterógeno como forma de otimização de resultado em enxertia óssea: relato de caso. **Dental Pres Implantology**, v. 8, n. 8, p. 50-59, Out-Dez, 2014.

NÓIA, C. F. *et al.* Sandwich Osteotomies to Treat Vertical Defects of the Alveolar Ridge. **Implant Dentistry**, v. 26, n. 1, p. 101-105, 2017.

NYSKA, A. *et al.* Histopathology of biodegradable polymers: Challenges in interpretation and the use of a novel compact MRI for biocompatibility evaluation. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 25, p. 461-67, 2014.

ONUKI, Y. *et al.* A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 2, n. 6, p. 1003-1015, 2008.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Tecnologias para mitigar o impacto ambiental da produção de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 239-252, 2008.

PASTERIS, J. D. *et al.* Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implications for bone and biomaterials. **Biomaterials**, v. 25, n. 2, p. 229-238, 2004.

PAULO, A. O. *et al.* Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. **Brazilian Dental Journal**, v. 22, p. 322-328, 2011.

RAHMANIAN-SCHWARZ, A. *et al.* In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 102a, n. 4, p. 1173-1179, Abril, 2014.

ROGERS, G. F.; GREENE, A. K. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 23, n. 1, p. 323-327, 2012.

SALGADO, C. L. *et al.* Biodegradation, biocompatibility, and osteoconduction evaluation of collagen-nanohydroxyapatite cryogels for bone tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 104a, n. 1, p. 57-70, 2016.

SANTANA, R. B. *et al.* Análise da resposta cicatricial da esponja Hemospon implantada em tecido conjuntivo de ratos. **Revista Brasileira de Implantologia**, v. 15, p. 15-18, Out-Dez., 2009.

SARAVANAN, D. K. *et al.* Chitosan scaffolds containing chicken feather keratin nanoparticles for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 481-486, 2013.

SARRAF-SILVA, L. C.; CAVALCANTE, L. S.; ANDRADE, T. A. As regras de bem estar animal e seu impacto na pesquisa científica. Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos - SP, Brasil. **Anais do VI Encontro Nacional de Pós-Graduação**, v. 1, p. 368-372, 2017.

SCHMALZ, G.; ARENHOLT-BINDSLEV, D. **Biocompatibility of dental materials**. 1ª Ed., Berlim: Springer Science & Business Media, 2009.

SCHUH, J. C. L. Medical Device Regulations and Testing for Toxicologic Pathologists. **Toxicologic Pathology**, v. 36, n. 1, p. 63-69, 2008.

SENA, L. A. *et al.* Biocompatibility of wollastonite-poly (n-butyl-2-cyanoacrylate) composites. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1121-1129, 2014.

SINHORET, M. A. C.; VITTI, R. P.; CORRER-SOBRINHO, L. Biomateriais na Odontologia: panorama atual e perspectivas futuras. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas**, v. 67, n. 3, p. 178-186, 2013.

SUPOVÁ, M.; MARTYNKOVÁ, G. SIMHA; SUCHARDA, Z. Bioapatite made from chicken femur bone. **Ceramics-Silikáty**, v. 55, n. 3, p. 256-260, 2011.

TAGA, M. L. *et al.* Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane. **Interational Journal of Oral Maxillofacial Implants**. v. 23, n. 3, p. 427-436, 2008.

TRIPATHI, G.; BASU, B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: Physico-mechanical and biological evaluations. **Ceramics International**, v. 38, p. 341-349, 2012.

VEISEH, O. *et al.* Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. **Nature Materials**. v. 14, p. 643-651, 2015.

WANG, J. *et al.* Development of feather keratin nanoparticles and investigation of their hemostatic efficacy. **Materials Science and Engineering**. C68, p. 768-773, 2016a.

WANG, Y. *et al.* Electrospun polyurethane/keratin/AgNP biocomposite mats for biocompatible and antibacterial wound dressings, **Journal of Materials Chemistry. B** 4, p. 635-648, 2016b.

WANG, J. *et al.* Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 341-350, 2017a.

WANG, J. *et al.* Keratose/poly (vinyl alcohol) blended nanofibers: fabrication and biocompatibility assessment. **Materials Science and Engineering C** 72, p. 212-219, 2017b.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **Journal of Pathology**., v. 214, p. 199-210, 2008.

XING, Z. C. *et al.* Keratin Nanofibers as a Biomaterial. **IPCBE**, v. 2, p. 120-124, 2011.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurocélvio Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Caracterização da biocompatibilidade e osseocondutividade de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de subprodutos da indústria avícola**, registrada com o nº 04/17, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/06/2017.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2017 até 30/06/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênico Wistar e Camundongos heterogênico Swiss
Nº de animais	165
Peso/Idade	Ratos: 200g/2-3 meses; Camundongos: 30g/2-3meses
Sexo	Ratos: 60♂; Camundongos: 53♀ e 52♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 12 de junho de 2017.

Profª. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

ANEXO II

Qualis CAPES do periódico a submeter o artigo produto da pesquisa

02/01/2018

Plataforma Sucupira

BRASIL Acesso à informação Participe Serviços Legislação Canais (<http://www.brasil.gov.br>)


ACESSO RESTRITO

(/sucupira/portais/menu_portal.jsf)

INÍCIO (/SUCUPIRA/PUBLIC/INDEX.JSF) >> Qualis >> Qualis Periódicos

Qualis Periódicos

* Evento de Classificação:

Área de Avaliação:

 INTERDISCIPLINAR

ISSN:

Título:

 Acta cirúrgica brasileira

Classificação:

 -- SELECIONE --

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0102-8650	ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA (IMPRESSO)	INTERDISCIPLINAR	B1
1678-2674	ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA (ONLINE)	INTERDISCIPLINAR	B1

1 a 2 de 2 registro(s)

(/sucupira/publio/index.xhtml)

(<http://www.capes.gov.br>) (<http://www.ufrn.br>) (<https://www.rnp.br>) (<http://www.mec.gov.br>) (<http://www.brasil.gov.br>)

Compatibilidade

 (<http://www.google.com/intl/pt-BR/chrome/>)
  (<http://br.mozdev.org/firefox/download/>)
  (<http://www.apple.com/safari/download/>)

Versão do sistema: 3.4.10 | Copyright 2016 Capes. Todos os direitos reservados.

ANEXO III

Informações complementares do periódico

Scope and policy

Acta Cirúrgica Brasileira is a peer-reviewed journal that publishes original papers on basic and applied research in surgery, and biomedical sciences, new surgical techniques, surgical education, advances in biomedicine and scientific communication, which is relevant to surgical practice and teaching.

Acta Cirúrgica Brasileira meets the standards of International Committee of Medical Journal Editors (www.icmje.org): Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research, Authorship and Contributorship, and International Clinical Trial Registration (<http://www.who.int/ictrp/network/en/>). The Journal adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE). As per these guidelines, failure to adhere to the conditions outlined within will result in the editor publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article.

Acta Cirúrgica Brasileira is registered in PUBMED/MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/9103983>) and SciELO (<http://www.scielo.br/acb>) and complies with funding agencies policies that require deposition of the published articles they finance into overtly databases.

Acta Cirúrgica Brasileira has rule, norm, standard and style must be fulfill. Authors must follow the Instructions available from www.scielo.br/acb (English). Please, review accurately the manuscript before submitting for publication, otherwise, the manuscript will be unsubmitted to you by the Editorial Office, during the preliminary evaluation.

Manuscript fees

In order to participate in publication costs, International Authors have a charge of US\$ 1000.00 and Brazilian Authors R\$ 1000,00 for each accepted manuscript. We will update our prices for accepted articles submitted from January 15th, 2017.

Online Submission

The articles should be sent through the electronic management system at: <https://mc04.manuscriptcentral.com/acb-scielo>. Further information or questions please contact Prof. Saul Goldenberg (sgolden@terra.com.br)

Copyright transfer

A copyright transfer form, signed by the lead author, must be uploaded as a complementary file as soon as the manuscript is submitted. The authors undersigned transfer copyright of the article "....." to Acta Cirúrgica Brasileira. They declare that this is an original unpublished article that does not transgress any copyright or intellectual property rights of other people and it is not being evaluated for publication in other journals. The article has been read and each contribution was approved. Date.....
Names and signature of authors.....

Authorship

Acta Cirúrgica Brasileira considers all article participants as authors. Authors are considered those who have effective intellectual and scientific contribution to the work. It is not the role of the editor, arbitrate conflicts related to authorship. The **lead author** is responsible for the integrity of the article as a whole, not necessarily be the first author, however must be the **corresponding author**. The Journal does not accept undergraduate and graduate as lead authors. The **lead author** takes responsibility for the effective participation of each author and the agreement with the content of the article. Participants who had purely technical activity (surgery, literature review, department heads, services or funded) should be listed in the acknowledgements.

Publication types

The journal accepts research articles, preferably on experimental surgery, clinical research and review requested by the Editorial Board. Systematic reviews and meta-analyzes focusing on surgical topics of current interest will be considered for publication.

The Journal does not accept a case report or case and retrospective studies.

English language

The manuscript should be reviewed by experts in scientific English prior to submission. The certificate by the language revision company or language reviewer should be uploaded as an additional document when submitting the article.

Editorial review and processing

Manuscripts submitted by authors to the Acta Cirúrgica Brasileira will be initially evaluated by the Editor-in-Chief, regarding the scope and standards. In this phase, the manuscript may be rejected or returned to the author for adjustments. If the manuscript is in accordance with the rules, it will be forwarded to the Associate Editor, who shall designate the peer-reviewers for evaluation of the scientific content. The Associate Editor communicates to the Editor-in-Chief for the final decision. The process can be followed by the author in the management system. All accepted manuscript will be edit by our publishing team to fit format of the journal. After authors' approval, the manuscript will be published.