



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

MARIA JANAÍNA PAULA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROGÉIS COM ASSOCIAÇÃO DE COLÁGENO, NANOQUERATINA E
BIOAPATITA PROVENIENTES DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

SOBRAL

2019

MARIA JANAÍNA PAULA GOMES

CARACTERIZAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROGÉIS COM ASSOCIAÇÃO DE COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
PROVENIENTES DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Orientador: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva

SOBRAL

2019

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)

- G615c Gomes, Maria Janáina Paula.
Caracterização da biocompatibilidade e biodegradação de hidrogéis com associação de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de subprodutos da indústria avícola / Maria Janáina Paula Gomes. – 2019.
89 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva.
1. Materiais Biocompatíveis. 2. Tela subcutânea. 3. Colágeno. 4. Bioapatita. 5. Queratinas. I. Título.
CDD 660.6
-

MARIA JANAÍNA PAULA GOMES

CARACTERIZAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE E BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROGÉIS COM ASSOCIAÇÃO DE COLÁGENO, NANOQUERATINA E BIOAPATITA
PROVENIENTES DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa Análises Integrativas de Sistemas Biológicos.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista (Examinadora Interna)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Examinador Externo)
Centro Universitário do Instituto Superior de Teologia Aplicada (UNINTA)

Prof. Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho (Examinador Externo)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Aos meus pais e meus irmãos, por todo apoio e
bons momentos compartilhados.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado (código 001) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, processo BPI n. BP3-0139-00270.01.00/18) pelo apoio financeiro na modalidade de taxa de bancada, ambos fundamentais para a execução desta pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Igor Iuco Castro da Silva, por todo o ensinamento, paciência, experiências compartilhadas, dedicação, momentos de descontração e excelência profissional.

Aos professores Dr. Men de Sá Moreira de Souza Filho e Dra. Morsyleide de Freitas Rosa, pelo pioneirismo no desenvolvimento dos biomateriais avícolas junto à EMBRAPA Agroindústria Tropical e pela profícua parceria com o PPGB-UFC para caracterizações biológicas.

À professora Dra. Ana Liza Paz Souza Batista, pelas importantes contribuições científicas que muito enriqueceram este trabalho, desde sua qualificação até à defesa.

Ao Fábio Lima Cavalcante, que também em parceria com a EMBRAPA Agroindústria Tropical, ajudou no desenvolvimento e caracterização físico-química preliminar dos biomateriais.

Aos participantes do Grupo de Estudos em Morfologia (GEM) por todo o apoio fundamental, em especial aos alunos de iniciação científica: Bárbara Cavalcante, Lara Gomes, Lana Karine, Yasmin Teles e Anderson Ângelo; e ao mestrando Sandro Ponte.

Ao Fábio de Souza, doutorando em Biotecnologia pelo PPGBRN-UFC, por todo o conhecimento transmitido e experiências compartilhadas na linha de pesquisa do grupo.

Ao Jesús Perez, colega de mestrado que foi fundamental em todas as etapas da pesquisa. Obrigada por toda a descontração, apoio e amizade.

Aos demais colegas de mestrado: Feliphy Custódio, Euriana Bezerra, Paulo de Tarso, Mariane Silveira, Pedro Alves, Yuri Loiola, Erivan Ferreira por compartilharem angústias e, principalmente, momentos felizes. Obrigada pela amizade.

Aos professores e funcionários que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGB).

À minha família pelo exemplo de dedicação por todo o apoio. Obrigada Goretti, Olavo, Jaqueline, Jackson, Janderson, Jardel e Jonas.

Ao Robson Couto, por todo amor, companheirismo, carinho e atenção.

“Não há nada como o sonho para criar o futuro. Utopia hoje, carne e osso amanhã.”

Victor Hugo

RESUMO

A busca por novos biomateriais osteocondutores é desejável para potencializar o tratamento clínico de defeitos ósseos. Hidrogéis mimetizando a matriz extracelular óssea poderiam ser uma opção viável e sustentável para a indústria biotecnológica verde, sob o ponto de vista econômico e ambiental. O objetivo desta pesquisa foi caracterizar *in vivo* a biocompatibilidade e biodegradabilidade de hidrogéis de colágeno (Col), nanoqueratina (NQ) e bioapatita (BA) provenientes de subprodutos da indústria avícola. Foram utilizados 45 camundongos machos Swiss divididos em 3 tempos experimentais: 1, 3 e 9 semanas. Nos camundongos que receberam os materiais-teste foram implantadas na região dorsotorácica subcutânea 2 modalidades de hidrogéis avícolas: 100% Col (G1), 90%Col:10%BA (G2), 90%Col:10%NQ (G3) ou 90%Col:5%NQ:5%BA (G4). No grupo Controle negativo (CN), não foi inserido biomaterial nas bolsas formadas. Necrópsias excisionais foram coletadas ao final de cada tempo experimental e processadas histologicamente para análises qualitativa e semiquantitativa da interação biomaterial-tecido, seguindo os critérios da norma ISO 10993-6. A estatística dos dados não-paramétricos foi realizada por teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, considerando diferenças significativas se $p < 0,05$. Resultados referentes à biocompatibilidade e comparados ao CN, demonstraram alta presença de neutrófilos para G1, G3 e G4 em 1 semana e para G3 e G4 em 3 semanas, de linfócitos para G3 em 1 semana, G3 e G4 em 3 semanas e G2 e G3 em 9 semanas e de células gigantes para G2 em 3 semanas, não havendo diferenças quanto a macrófagos. Ainda, houve baixa presença de neovascularização para G1 e G3 em 1 semana e de tecido conjuntivo para G1, G2, G3 e G4 em 1 semana. G1 e G2 foram considerados materiais-teste não irritantes ao longo de todo o período experimental, enquanto G3 e G4 exibiram pouca irritação apenas em 3 semanas. Com relação à biodegradabilidade e comparados ao CN em análise intergrupos, todos os materiais implantados mostraram-se presentes em 1 e 3 semanas, porém só G2 persistiu em 9 semanas. Em análise intragrupos, houve redução progressiva em G1, G3 e G4 ao longo do período experimental. Os dados obtidos demonstram que todos os materiais-teste a base de subprodutos avícolas apresentaram biocompatibilidade ectópica, entretanto, apenas G2 manteve sua integridade e mostra potencial biotecnológico como membrana para terapias de regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: Materiais Biocompatíveis. Tela subcutânea. Colágeno. Bioapatita. Queratinas.

ABSTRACT

The pursuit of new osteoconductive biomaterials is desirable for enhancing the clinical treatment of bone defects. Hydrogels mimicking the bone extracellular matrix could be a viable and sustainable option for the green biotechnology industry, from the economic and environmental point of view. The aim of this study was to characterize *in vivo* the biocompatibility and biodegradability of collagen hydrogels (Col), nanokeratin (NK) and bioapatite (BA) deriving from by-products of the poultry industry. 45 male Swiss mice were utilized, divided in 3 experimental periods: 1, 3 and 9 weeks. In the mice which received the test materials, the dorsal thoracic region was implanted with 2 modalities of poultry-derived hydrogels: 100% Col (G1), 90%Col:10%BA (G2), 90%Col:10%NK (G3) or 90%Col:5%NK:5%BA (G4). In the negative control group (NC), any biomaterial was inserted onto the skin pockets. Excisional necropsies were collected at the end of each experimental period and processed histologically for qualitative and semiquantitative analysis of the biomaterial-tissue interaction, following the criteria of the ISO 10993-6 standard. The statistical analysis of the nonparametric data was carried out by Kruskal-Wallis test and post-hoc Dunn's test, considering significant differences if $p < 0,05$. Regarding the biocompatibility and compared to the NC, there was high presence of neutrophils for G1, G3 and G4 in 1 week and for G3 and G4 in 3 weeks, of lymphocytes for G3 in 1 week, G3 and G4 in 3 weeks and G2 and G3 in 9 weeks and of giant cells for G2 in 3 weeks, not presenting differences regarding macrophages. Nevertheless, there was low presence of neovascularization for G1 and G3 in 1 week and of connective tissue for G1, G2, G3 and G4 in 1 week. G1 and G2 were considered non-irritant test-materials throughout the experimental period, whereas G3 and G4 exhibited little irritation only in 3 weeks. Concerning the biodegradability and compared to the NC in intergroup analysis, all the materials implanted have been present in 1 and 3 weeks, although solely G2 remained for 9 weeks. In the intergroup analysis, there was progressive reduction in G1, G3 and G4 throughout the experimental period. The obtained data indicates that all the test-materials based on by-products presented ectopic biocompatibility, however, only G2 maintained its integrity and shows biotechnological potential as membrane for guided bone regeneration therapy.

Keywords: Biocompatible Materials. Subcutaneous Tissue. Collagen. Bioapatite. Keratins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estrutura tripla-hélice do colágeno	21
Figura 02	Estrutura molecular da α -queratina	23
Figura 03	Estrutura cristalina da hidroxiapatita	24
Figura 04	Reação celular para biomateriais em modelo de implantação subcutânea com o decorrer do tempo (tempo em dias)	28
Figura 05	Reações do sistema imune em função do tempo	30
Figura 06	Desenho experimental da separação dos animais nos grupos experimentais do estudo	38
Figura 07	Delineação experimental da utilização dos camundongos e distribuição dos materiais	38
Figura 08	Desenho esquemático do protocolo cirúrgico	40
Figura 09	Esquema das etapas da análise e processamento histopatológico	42
Figura 10	Análise histopatológica semiquantitativa do tecido subcutâneo de camundongos (5 campos/lâmina)	42
Figura 11	Critérios histopatológicos para análise de biocompatibilidade em subcutâneo de camundongos	43
Figura 12	Critérios histopatológicos para análise de biodegradabilidade em subcutâneo de camundongos	46
Figura 13	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G1 (40x)	49
Figura 14	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G1 (400x)	50
Figura 15	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G2 (40x)	52
Figura 16	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G2 (400x)	53
Figura 17	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G3 (40x)	55
Figura 18	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G3 (400x)	56
Figura 19	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G4 (40x)	58
Figura 20	Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G4 (400x)	59

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais tipos de colágeno	22
Quadro 2	Respostas histológicas encontradas em teste em subcutâneo murino sob distintos tratamentos experimentais locais, sem células, fatores de crescimento ou alterações sistêmicas	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Hidrogéis e suas respectivas composições	37
Tabela 02	Tabela representativa dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais de resposta inflamatória após implantação dos enxertos em tecido subcutâneo de camundongos	44
Tabela 03	Tabela representativa dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais de resposta reparatória após implantação dos enxertos em tecido subcutâneo de camundongos	44
Tabela 04	Cálculo da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de enxertos implantados em tecido subcutâneo de camundongos	45
Tabela 05	Tabela representativa dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais de integridade do enxerto após implantação em tecido subcutâneo de camundongos	47
Tabela 06	Análise semiquantitativa da presença de neutrófilos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	60
Tabela 07	Análise semiquantitativa da presença de linfócitos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	61
Tabela 08	Análise semiquantitativa da presença de macrófagos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	61
Tabela 09	Análise semiquantitativa da presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	62
Tabela 10	Análise semiquantitativa da presença de neovascularização em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos <i>versus</i> controle ao	

	longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	62
Tabela 11	Análise semiquantitativa da presença de tecido conjuntivo em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos versus controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	63
Tabela 12	Resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 1 semana	64
Tabela 13	Resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 3 semanas	65
Tabela 14	Resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 9 semanas	66
Tabela 15	Análise semiquantitativa da presença de material enxertado em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos versus controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BA	Bioapatita
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGM	Células gigantes multinucleadas
CN	Controle negativo
Col	Colágeno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA	Estados Unidos da América
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
G3	Grupo 3
G4	Grupo 4
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-8	Interleucina 8
IP	Intraperitoneal
ISO	International Standards Organization
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MEC	Matriz extracelular
MIP-1b	Proteína inflamatória de macrófagos-1b
NQ	Nanoqueratina
PC	Por campo
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PFI	Proteínas do filamento intermediário
pH	Potencial hidrogeniônico
PPGB	Programa de pós-graduação em Biotecnologia
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF	Fator de transformação do crescimento
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
↑	Aumento
↓	Diminuição
®	Marca registrada
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros quadrados
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
n°	Número
°C	Graus Célsius
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Indústria avícola no Brasil	19
2.2 Biomateriais	20
2.2.1 Colágeno	20
2.2.2 Queratina	22
2.2.3 Bioapatita	24
2.3 Biomateriais de hidrogéis	25
2.4 Biodegradação e biocompatibilidade	26
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4 METODOLOGIA	36
4.1 Tipo de estudo	36
4.2 Aspectos éticos	36
4.3 Animais	36
4.4 Hidrogéis	37
4.5 Protocolo experimental	37
4.5.1 Anestesia	39
4.5.2 Cirurgia em sítio ectópico (subcutâneo)	39
4.5.3 Eutanásia	40
4.6 Processamento histológico	41
4.7 Análise histopatológica	42
4.8 Análise estatística	47
5 RESULTADOS	48

5.1 Análise descritiva	48
5.1.1 G1 (Colágeno 100%)	48
5.1.2 G2 (Colágeno 90% + Bioapatita 10%)	51
5.1.3 G3 (Colágeno 90% + Nanoqueratina 10%)	54
5.1.4 (Colágeno 90% + Bioapatita 5% + Nanoqueratina 5%)	57
5.2. Análise semiquantitativa da interação material/tecido	60
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO I	84
ANEXO II	85
ANEXO III	87
ANEXO IV	89

1 INTRODUÇÃO

Com o avançar da tecnologia, o aumento dos estudos e pesquisas envolvendo a bioengenharia de tecidos tem sido observado. Entende-se esse termo como a aplicação de conhecimentos de engenharia e outras ciências no intuito de promover a reparação ou substituição de tecidos ou órgãos em um organismo vivo (COSTA; QUEIROZ, 2013; DURAINÉ; HU; ATHANASIOU, 2011). Essa ascensão tecnológica trouxe uma expansão no desenvolvimento e uso de biomateriais e dispositivos médicos implantáveis (KEAN; BROWN; CHAPMAN, 2017).

Os biomateriais podem ser definidos como uma substância, ou conjunto de substâncias, de origem natural ou sintética, capazes de promover um aumento ou substituição de qualquer tecido ou órgão de modo parcial ou completo. Para um biomaterial ser bom é importante que o mesmo seja apto a interagir com os tecidos circundantes e possuir bioatividade (BERGMANN; STUMPF, 2013; BRANNIGAN; DOVE, 2016).

Outras características importantes de um biomaterial devem ser a sua capacidade de servir como estrutura de suporte para acomodação celular, possuindo força mecânica suficiente para proteger as células circundantes, mantendo forma e integridade, até que haja regeneração do tecido novo (ENGLER et al., 2006). Além disso, é importante que o biomaterial apresente propriedades biodegradáveis e de remodelação, e sua matriz deve ser atóxica e não causar estimulação às células inflamatórias, ou seja, este deve apresentar nível satisfatório de biocompatibilidade (KEAN; BROWN; CHAPMAN; 2017).

O termo biocompatibilidade foi estabelecido primeiramente por Williams (1986), que a definiu como “a capacidade de um biomaterial promover uma resposta adequada ao hospedeiro em uma dada aplicação específica”. Mais tarde, em 2010, Kohane e Langer redefiniram esse termo ao afirmarem que biocompatibilidade é “uma expressão de benignidade da relação entre um material e seu ambiente biológico”. Dessa forma, o principal objetivo da avaliação da biocompatibilidade é a determinação de efeitos tóxicos ou respostas que poderão causar danos ou efeitos adversos no organismo hospedeiro. As três principais respostas que devem ser levadas em consideração nos testes de biocompatibilidade são as reações inflamatórias, de cicatrização de ferimentos e de imunotoxicidade (ANDERSON, 2010; NAAHIDI et al., 2017).

Para avaliações de biocompatibilidade, a International Standards Organization (ISO), publicou uma série de normas apresentando princípios importantes para a avaliação biológica de biomateriais e dispositivos médicos (ISO 10993), que abrangem diretrizes

envolvendo a caracterização do material, bem como a escolha dos testes necessários para a avaliação da biocompatibilidade. A ISO 10993-6 dispõe sobre testes para avaliação de efeitos locais após implantação de biomateriais destinados ao uso em dispositivos médicos (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2007).

Biomateriais naturais, como é o caso do colágeno, hidroxiapatita, quitosana, alginato e ácido hialurônico, são amplamente estudados e apresentam boa biocompatibilidade e baixo efeito citotóxico, não induzindo respostas inflamatórias crônicas dependendo da sua concentração ou grau de pureza. Ao formar hidrogéis, podem exibir melhores respostas no organismo, já que apresentam semelhanças de estrutura e composição com a matriz extracelular (CASTRO-SILVA, 2009; NAAHIDI et al., 2017).

O colágeno é a proteína mais abundante na matriz extracelular, o que torna essa molécula bastante atrativa em estudos de engenharia tecidual. A substância também é encontrada em tecido conjuntivo como nas fibrocartilagens e cartilagem articular e é naturalmente degradada no organismo pela ação da collagenase (LEE; SINGLA; LEE, 2001). O colágeno foi aplicado como biomaterial em diversos estudos, incluindo pesquisas que buscavam a criação de tecido sintético para as válvulas cardíacas (TAYLOR; CASS; YACOUB, 2006), cartilagem (DELUSTRO et al., 1986), pele (TANGSADTHAKUN et al., 2006), coluna espinhal (JOOSTEN; VELDHUIS; HAMERS, 2004), dentre outros.

A hidroxiapatita é o fosfato de cálcio mais estável sob condições de pH ideal e é encontrada em grandes concentrações na massa óssea e dental em porcentagens que variam de 30 a 70%. Sua estrutura química é similar aos compostos inorgânicos presentes na matriz óssea, e ainda sua bioatividade, biocompatibilidade e facilidade de produção tornam a hidroxiapatita um material adequado para utilização em enxertias (COSTA et al., 2009; FAROKHI et al., 2017; RAMESH; MORATTI; DIAS, 2017).

A literatura temática exhibe bons resultados pela associação da hidroxiapatita com o colágeno na formação de novo osso, incluindo as pesquisas de Calabrese et al. (2016), Campos, Anselme e Soares (2011) e Kikuchi et al. (2001).

Outro biomaterial de origem natural é a queratina. Embora haja poucos estudos sobre sua utilização como biomaterial, a queratina se apresenta como promissora, pois pode ser fabricada sob a forma de filmes, esponjas ou hidrogéis, e, ainda, apresenta sequência de aminoácidos semelhantes aos encontrados na matriz extracelular (VASCONCELOS; CAVACO-PAULO, 2013).

Biomateriais de origem natural como o colágeno, bioapatita e nanoqueratina podem ser obtidos a partir de resíduos produzidos por animais, como por exemplo, o frango, alimento

animal bastante consumido no Brasil (CASTRO-SILVA, 2018). Diariamente penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles e ossos são desperdiçados. Tais resíduos apresentam-se como importantes fontes de proteínas, lipídeos e minerais, tendo, em função disto, grande potencial para a produção de biomateriais com capacidade de promover substrato natural para proliferação e diferenciação celular, dentre os quais se destacam a queratina, colágeno, ácido hialurônico, fibrinogênio e bioapatita, largamente estudados (SOUZA, 2018).

Como os biomateriais ainda são sinônimos de custo elevado, a sua utilização ainda é limitada. Assim, esse trabalho é importante pela busca por produção de um biomaterial que apresente baixo custo ou que seja mais facilmente adquirido para utilização em enxertias. Ainda, a derivação avícola poderia representar concomitantemente a geração de produtos com valor biotecnológico e a minimização do impacto ambiental. Há necessidade de caracterização biológica normalizada de biomateriais para futuro uso clínico ou entrada no mercado de consumo (CASTRO-SILVA, et al., 2009), o que instigou a realização da presente pesquisa. A fonte avícola para esse propósito é algo ainda inédito no panorama internacional e merece ser profundamente estudada, dado seu positivo impacto em termos ambientais, comerciais e assistenciais, pela perspectiva de potencialmente atender à saúde pública humana visando a regeneração óssea (CASTRO-SILVA, et al., 2018).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Indústria avícola no Brasil

A indústria avícola no Brasil vem avançando cada vez mais no cenário mundial, e o hoje o país já está entre os maiores produtores, exportadores e consumidores de carne de frango. No ano de 2017, a indústria brasileira de frangos conseguiu produzir cerca de 13,05 milhões de toneladas, ultrapassando a China, e destacando-se em segundo maior produtor mundial de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos (EUA). Para alcançar essa posição, segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) foi necessário o abatimento de cerca de 5,8 bilhões de cabeças de frango (CAMPOS, 2016).

A exportação também é outro fator importante em relação à indústria avícola e ganhou destaque nas últimas décadas. No ano de 1990, apenas 5% da produção mundial era destinada à exportação, no ano de 2017, esse número subiu para 12%. O Brasil ocupa a primeira colocação entre os maiores exportadores mundiais da carne de frango. Em 2017, o país exportou cerca de 4,3 milhões de toneladas da carne, se tornando o maior exportador mundial, enquanto que os EUA, o segundo maior exportador mundial, vendeu para fora do país, aproximadamente 3,317 milhões de toneladas (RUÍZ, 2018).

O Brasil também se destaca como um dos maiores consumidores de carne de frango no mundo. Em 2016, o país ocupava a quarta colocação, com consumo de 41,1Kg de carne *per capita* (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2017). Já em 2017, esse valor subiu 44,6Kg *per capita*, assumindo a terceira posição (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2017). Esses valores apontam para a grande relevância econômica deste setor para o Brasil.

Como em qualquer ramo da cadeia industrial, na produção avícola também há geração de resíduos e subprodutos que devem ser gerenciados de maneira adequada. Entende-se como um subproduto de origem animal qualquer resíduo gerado durante o processo produtivo que não se destinará à alimentação humana. No processo de abatimento de frangos, são desprezadas diversas partes como carcaças e penas, que, se forem descartadas de modo inadequado, podem gerar grandes impactos ambientais com comprometimento do ecossistema (PINTO et al., 2015).

Muitos resíduos, porém, podem ser reutilizados. É o caso dos dejetos produzidos pelas aves, que podem servir como fertilizantes, por possuir grandes quantidades de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). Cartilagens, ossos, cabeças e pés, podem ser reutilizados sob

forma de ingredientes para a produção de ração para animais domésticos, como o cachorro e o gato (PINTO et al., 2015).

As formas de reaproveitamento de subprodutos podem ser feitas ou não nos próprios abatedouros. Independente disto, os procedimentos tomados devem estar de acordo com Instrução Normativa nº 15 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

A devida utilização de subprodutos tem impacto diretamente relacionados à economia e poluição ambiental do país (JAYATHILAKAN et al., 2012). Por este motivo, maneiras alternativas de utilização estão sendo buscadas e aprimoradas.

2.2 Biomateriais

O termo biomaterial foi definido em 1987 como “um material não-viável utilizado em dispositivos médicos, destinado a interagir com sistemas biológicos” (WILLIAMS, 1987). A partir de então, este campo tem crescido consideravelmente, inclusive dentro da bioengenharia de tecidos, onde é aplicado na substituição de tecidos danificados ou lesados (WILLERTH; SAKIYAMA-ELBERT, 2008).

Os biomateriais podem ser divididos em dois principais grupos: biomateriais de origem sintética e biomateriais de origem natural. Aqueles originados de modo sintético são classificados em cerâmicas, metais, polímeros não-biodegradáveis ou polímeros biodegradáveis. A principal desvantagem desse tipo de biomaterial é a sua baixa biocompatibilidade com os tecidos circundantes, com base na composição diferente da nativa encontrada em tecidos e órgãos (HA et al., 2013).

Por outro lado, os biomateriais de origem natural são mais propensos a apresentarem biocompatibilidade e são biodegradáveis, podendo agir na adesão, migração, proliferação e diferenciação celular. Assim, quando enxertados em determinada área, podem favorecer a formação da matriz extracelular (MEC). Por essas vantagens, são frequentemente utilizados na substituição ou reparo de tecidos e órgãos (HA et al., 2013). Como exemplos de biomateriais derivados da natureza, tem-se o colágeno, a queratina e a bioapatita.

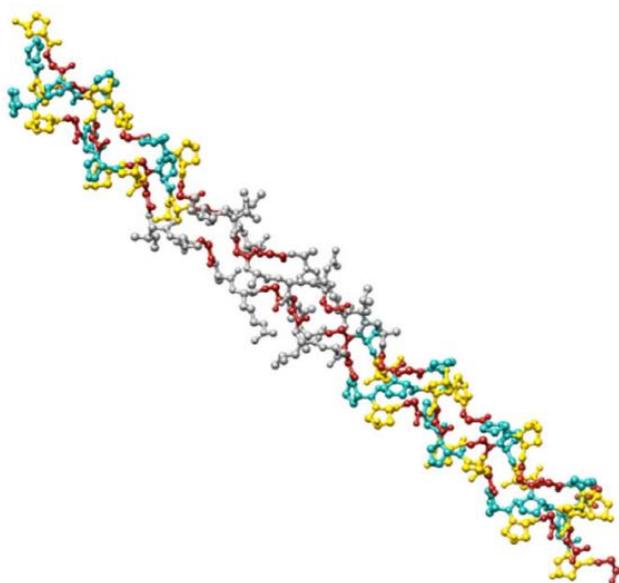
2.2.1 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante no corpo e um dos componentes majoritários da MEC (DRURY; MOONEY, 2003; AMINI-NIK et al., 2010). Além disso,

possui a capacidade de estabilizar e dar força aos tecidos, agindo como um suporte para as diversas estruturas celulares (RODRÍGUES; BARROSO; SÁNCHEZ, 2018). Por possuir essas características, a molécula é vastamente estudada e utilizada em diferentes aplicações dentro das ciências biomédicas, incluindo seu uso em processos de regeneração (SHEIKHOLESLAM et al., 2017).

É importante mencionar que essa proteína apresenta diferentes tipos e todas elas têm uma estrutura baseada em uma cadeia polipeptídica de tripla hélice (Figura 1). No genoma humano, 28 tipos diferentes de colágeno são conhecidos, e o que diferencia uma proteína da outra são alterações na sequência primária e montagem das subunidades polipeptídicas, o tamanho da hélice e as terminações dos domínios helicoidais (DAVIDENKO et al., 2018; RODRÍGUES; BARROSO; SÁNCHEZ, 2018).

Figura 1: Estrutura tripla-hélice do colágeno.



Fonte: RODRÍGUES; BARROSO; SÁNCHEZ (2018).

Apesar de existirem 28 tipos distintos, cerca de 80 a 90% de colágeno presente no organismo são classificados em tipo I, II e III. Além disso, os tipos IV, V, VI e IX também são encontrados em quantidades consideráveis (LODISH et al., 2000). Os principais tipos de colágeno podem ser classificados em fibrilares, associados a fibrilas e formadores de rede. O Quadro 1 mostra o tipo de colágeno, sua classe e onde podem ser encontrados dentro do corpo humano.

Quadro 1: Principais tipos de colágeno

Tipo	Distribuição
Colágeno fibrilar	-
I	Tendões, ligamentos, ossos, córnea
II	Pulmão, córnea, cartilagens, vasos sanguíneos
III	Pele, vasos sanguíneos, intestino
V	Ossos, córnea, placenta
Colágeno associado a fibrila	-
VI	Pele, placenta, pulmão, cartilagens
IX	Córnea, cartilagem, humor vítreo
Colágeno formadores de redes	-
IV	Membranas basais

Fonte: Adaptado de RODRÍGUES; BARROSO; SÁNCHEZ, 2018; SHOULDERS; RAINES, 2009.

Por ser uma proteína presente em grandes concentrações no organismo, o colágeno apresenta naturalmente baixa imunogenicidade. Desta forma, a possibilidade dessa substância provocar reações imunológicas ao ser inserido em um corpo estranho é demasiadamente baixa. Entretanto, existem pequenas frações localizadas na região helicoidal da molécula que podem desencadear alguma resposta imunológica (KUMAR et al., 2014).

Pela sua baixa imunogenicidade, bem como sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e sua aptidão em formar fibras com alta resistência à tração, o colágeno é tido como um bom biomaterial (DAVIDENKO et al., 2018).

Dentre as fontes animais mais comuns envolvidas no processo de extração do colágeno, estão a extração bovina, sendo esta a mais comum, além de ser extraída de peixes, galinhas, cangurus, porcos, dentre outros. Essas fontes são consideradas de baixo valor monetário e de fácil aquisição. O material extraído, entretanto, deve passar por processos de caracterização biológica, pois, mesmo sendo uma molécula segura, pode gerar reações inflamatórias no organismo (SILVIPRIYA et al., 2015).

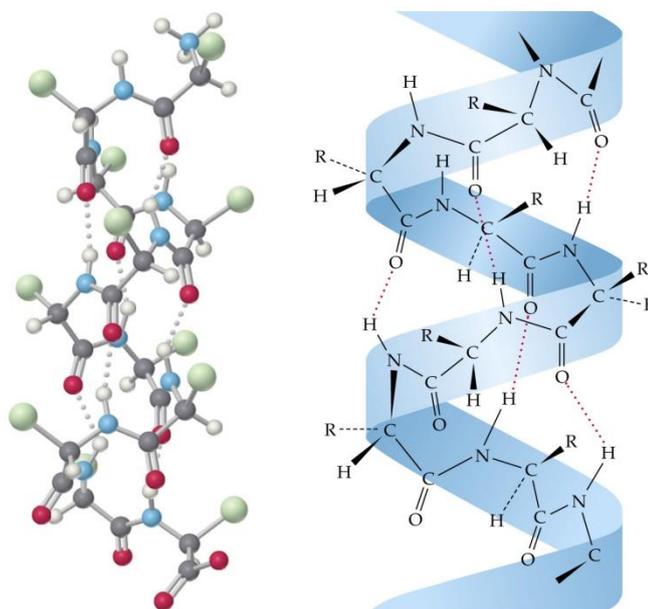
2.2.2 Queratina

A queratina, assim como o colágeno, é uma proteína fibrosa estrutural de grande importância para o organismo e uma das mais abundantes que pode ser encontrada em cabelos, unhas, lãs, chifres e penas. Sintetizada pelos queratinócitos, esta proteína desempenha diversas funções no organismo, incluindo sua contribuição na proteção das células contra estresses mecânicos e não mecânicos. Além disso, alguns tipos de queratinas também possuem funções regulatórias e estão envolvidas em vias de sinalização, como na cura de feridas ou apoptose. É

importante ressaltar também que elas apresentam grande importância no diagnóstico de carcinomas, uma vez que apresentam padrões característicos de expressão em tumores humanos (SHAVANDI et al., 2017; KELLNER; COULOMBE, 2009; MOLL; DIVO; LANGBEIN, 2008).

Pode ser classificada de acordo com sua estrutura secundária em proteínas do filamento intermediário (PFI) e proteínas da matriz. O primeiro grupo é o mais abundante e é descrito na literatura também com o nome de α -queratina (Figura 2). São denominadas assim pois apresentam uma estrutura secundária α -helicoidal. As proteínas da matriz, ou γ -queratina, são proteínas globulares com baixo peso molecular e alto teor de enxofre. Há ainda um terceiro grupo de proteínas de queratinas, denominado de β -queratina que são assim chamadas pois apresentam folhas β -pregueadas em sua estrutura. Responsáveis por proteger as fibras de queratina de danos físico-químicos, este grupo forma a maior parte da cutícula, entretanto, sua extração é dificultosa e não formam estruturas especialmente úteis (HILL; BRANTLEY; DYKE, 2010; VASCONCELOS; CAVACO-PAULO, 2013).

Figura 2: Estrutura molecular da α -queratina.



Fonte: RODRIGUES (2014).

As partículas de queratina podem se apresentar em diferentes tamanhos, incluindo a escala nanométrica, denominadas nanoqueratina (CAVALCANTE, 2017). Essa forma nanométrica apresenta melhores resultados quando comparada à queratina normal, pois a maior

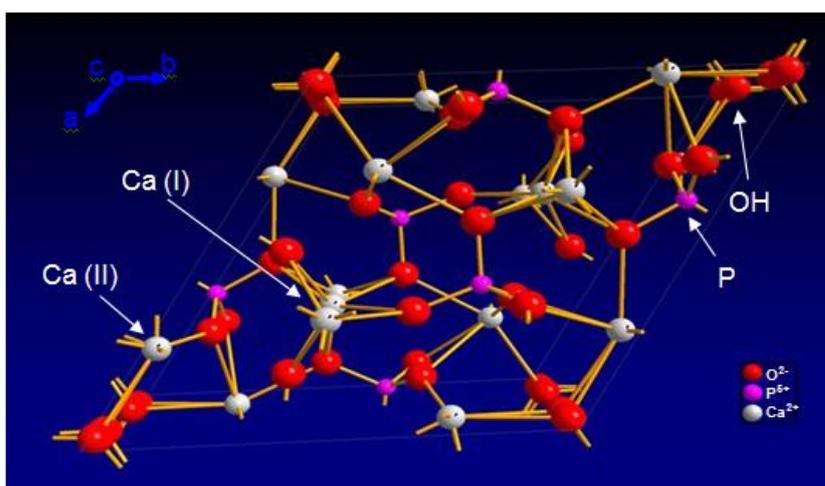
superfície de contato apresentada possibilita uma melhor interação das células com o biomaterial, acelerando assim, o reparo tecidual (SARAVANAN et al., 2013).

2.2.3 Bioapatita

O termo apatita, designado por Wener em 1788, é aplicado a diversos compostos inorgânicos, que apresentam estruturas semelhantes com composições diferentes. A fórmula geral deste grupo de substâncias é descrita como $A_{10}(BO_4)_6Z_2$, onde 'A' é geralmente um metal que pode ser Ca, Pb, Cd, Ir, La, Ce, K e Na; 'B' inclui os elementos P, V, As, Cr, S, C, Al e S; e 'Z' é um ânion como OH^- , Cl^- , F^- e CO_3^{2-} ou H_2O . São compostos químicos especialmente importantes, pois estão presentes nos ossos, dentes e tendões de mamíferos dando a eles estabilidade e força (ŠUPOVÁ, 2014). Sendo a hidroxiapatita (HA) uma apatita, ela se encaixa dentro do contexto dessa definição, onde $A = Ca$; $B = P$ e $Z = OH$ ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) (FAROKHI et al., 2017; BOANINA; GAZZANOB; BIGI, 2010). A hidroxiapatita cálcio-deficiente é denominada de apatita biológica ou bioapatita (ŠUPOVÁ, 2014).

Além disso, a HA se difere da biológica em relação a sua estequiometria e cristalinidade, tendo, em consequência disto, diferenças nas suas propriedades físicas e mecânicas. Bioapatitas, em geral, são menos cristalinas, por vezes, carbonadas, e, em consequência, mais solúvel, pois uma maior quantidade de carbonato, reduz o tamanho do cristal, aumentando, assim, a área superficial e a solubilidade (IBUKI, 2014). A Figura 3 ilustra a estrutura cristalina da hidroxiapatita.

Figura 3: Estrutura cristalina da hidroxiapatita



Fonte: RIVERA-MUÑOZ (2011).

A bioapatita é considerado o principal componente da parte mineralizada em ossos de mamíferos (DALCONI et al., 2003) e são conhecidas por possuírem boa biocompatibilidade. Por essas características, têm sido utilizada e vem sendo objeto de estudo envolvendo enxertos de tecido ósseo (RAMESH; MORATTI; DIAS, 2017).

Sua aplicação como um biomaterial em enxerto ósseo se dá também pela baixa propensão de causar reações de toxicidade, compatibilidade para ligações e baixa capacidade de gerar reações inflamatórias. Essas características estão relacionadas com a sua estrutura cristalina que é semelhante à óssea. Outra vantagem da aplicação de bioapatita como biomaterial neste tecido é sua eficácia de adsorção, que possibilita a incorporação de moléculas bioativas à sua estrutura. Essas propriedades a tornam um material dotado de atividade osteocondutora (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2013; BOSE; TARAFDER, 2012; KLEINER; WRIGHT; WANG, 2014).

É importante mencionar que a bioapatita pode ser utilizada em associação com outros biomateriais, incluindo polímeros como a quitosana e o colágeno. Além disso, evidências mostram que o revestimento de HA melhora a interação de implantes ao osso hospedeiro (CHEN et al., 2012; RAMESH; MORATTI; DIAS, 2017).

2.3 Biomateriais de hidrogéis

Os hidrogéis são definidos como um conjunto de redes formadas por cadeias de homopolímeros ou copolímeros, arranjos de forma tridimensional que apresentam propriedades hidrofílicas e capacidade de inchaço e hidratação e podem ser modificadas para exibir características mecânicas e lubrificantes semelhantes aos diferentes tecidos biológicos de interesse. Podem ter ampla adaptação de tamanho ou forma e são capazes de absorver até milhares de vezes o seu peso seco (CHUAH et al., 2017; SELIKTAR, 2012).

Os hidrogéis podem ser constituídos por macromoléculas naturais ou por polímeros sintéticos. Ambas as formas apresentam grande potencial, pois fornecem um microambiente biomimético semelhante à matriz extracelular, facilitando a adesão, proliferação, diferenciação e diferenciação de células (ZHU; MARCHANT, 2011; CHAUDHARI et al., 2016).

Hidrogéis constituídos de substâncias naturais normalmente apresentam interação mais forte com as células e ainda fornecem locais de adesão para ligação celular. Já os constituídos por substâncias sintéticas possuem certa deficiência em sítios para adesão de células e apresentam interações inespecíficas. Os hidrogéis podem ainda ser constituídos por

uma junção de substâncias naturais e sintéticas. Quando isso ocorre, o hidrogel é denominado de híbrido (LEV; SELIKTAR, 2018).

Os hidrogéis também são classificados como hidrogéis físicos e químicos, de acordo com o mecanismo de interação. Interações físicas, embora não sejam permanentes, evitam que o hidrogel se disperse e incluem cadeias que apresentam, principalmente, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Por outro lado, as interações químicas são constituídas por junções permanentes, formadas por ligações covalentes. A rede de hidrogéis pode incluir junções permanentes e não-permanentes, e essas características influenciam suas propriedades de inchaço, módulo de elasticidade e transporte (ZHU; MARCHANT, 2011).

Os hidrogéis têm sido amplamente estudados e vêm sendo empregados como biomateriais em diversos campos da medicina regenerativa, com intuito de resolver desafios existentes nessa área. Isso se dá, principalmente, por cinco características dos hidrogéis consideradas mais importantes e essenciais para estudos biomédicos: degradação, bioadesão, bioatividade, transporte (por exemplo, liberação controlada de moléculas e fármacos) e propriedades mecânicas (CHUAH et al., 2017; SELIKTAR, 2012).

Além disso, apresentam também a capacidade de encapsular células, baixa toxicidade, alto teor de água, facilidade de modificação, injetabilidade, reajuste espacial *in situ* e biocompatibilidade (CHUAH et al., 2017).

2.4 Biodegradação e biocompatibilidade

A biodegradação, ou biodegradabilidade, pode ser descrita como o processo pelo qual o biomaterial é solubilizado nos fluidos teciduais, onde há redução de seu volume inicial ou mesmo desaparecimento em função do tempo no local de implante. A velocidade de degradação é característica fundamental que interfere na escolha do biomaterial. É importante mencionar que o tempo para o processo de degradação deve ser suficiente para permitir a ocorrência do processo de regeneração local (TABATA, 2009).

Os processos de degradação variam de acordo com o composto e abrangem fatores químicos, físicos e biológicos (CAO; WANG, 2009). Biomateriais do tipo poliméricos apresentam como característica sua facilidade de biodegradação. Polímeros sintéticos são, de modo geral, degradados através de hidrólise simples, enquanto materiais poliméricos naturais são degradados através de ação enzimática (TABATA, 2009). Materiais cerâmicos, entretanto, possuem maior tempo de biodegradação *in vivo*, sendo importantes na ortopedia e na odontologia (ABUKAWA et al., 2006).

Já o termo biocompatibilidade se refere à compatibilidade física, química e biológica entre um biomaterial e os tecidos corporais, que gera resposta adequada do hospedeiro em uma dada aplicação específica. Desta forma, espera-se que um biomaterial biocompatível não exiba efeitos tóxicos ou respostas que poderão causar danos ou reações adversas ao entrar em contato com organismo hospedeiro (ÖZYOL; ÖZYOL; KAREL, 2017).

Os testes de biocompatibilidade são fundamentais para avaliação de dispositivos médicos implantáveis. A partir desses testes, as reações locais e sistêmicas são avaliadas. Em testes de biocompatibilidade, as reações inflamatórias e de imunotoxicidade, bem como a capacidade de cicatrização dos ferimentos são respostas importantes que devem ser levadas em consideração (ANDERSON, 2010; NAAHIDI et al., 2017).

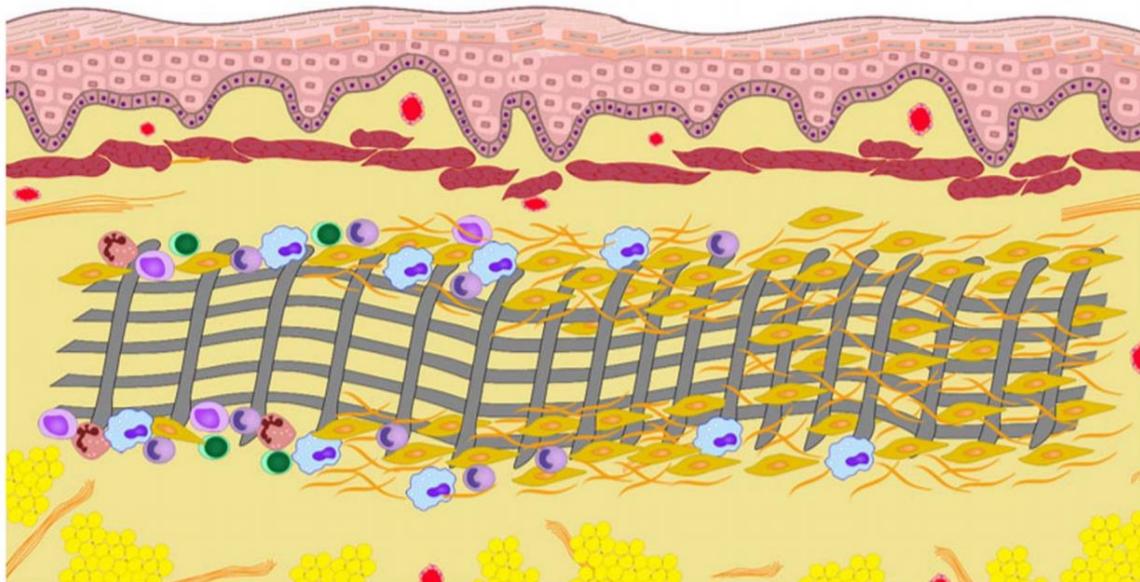
Para testes de biocompatibilidade, a International Standards Organization (ISO), publicou uma série de normas que envolvem princípios fundamentais para a avaliação biológica de dispositivos médicos – ISO 10993 – que englobam diretrizes desde a caracterização de cada biomaterial ou dispositivo médico implantável, até a seleção dos ensaios necessários para a avaliação da biocompatibilidade (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2017).

A ISO 10993 é dividida em 20 partes, em que a parte 1 orienta o experimentador na seleção dos testes; a parte 2 discorre sobre os requisitos necessários para o bem-estar animal, e as partes elencadas de 3-20 são os guias para os procedimentos de ensaios específicos (BORELLI et al., 2010).

A ISO 10993-6 dispõe sobre testes para avaliação de efeitos locais após implantação de biomateriais. Para esses testes, os animais de pequeno porte como camundongos, ratos, hamsteres ou coelhos são preferíveis. O efeito local é avaliado por uma comparação da resposta do tecido causado por um biomaterial cuja biocompatibilidade e aceitabilidade clínica já são estabelecidas com a resposta apresentada pelo biomaterial a ser testado (INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, 2007).

No intuito da caracterização biológica, podem ser realizadas avaliações macroscópicas e microscópicas. Essas avaliações consistem na observação de alterações teciduais como a presença de edema ou hematomas, vistas macroscopicamente, além de presença de infiltrados de células inflamatórias, vascularização, fibrose ou necrose, vistas microscopicamente. A resposta tecidual pode ser visualizada na Figura 4, em que pode ser observada presença de células inflamatórias e de reparo interagindo com o biomaterial.

Figura 4: Reação celular para biomateriais em modelo de implantação subcutânea com o decorrer do tempo (tempo em dias).



Fonte: AL-MAAWI et al. (2017).

2.4.1 Inflamação e reparo

A implantação de biomateriais para ensaios de biocompatibilidade em um organismo biológico gera uma interação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o material implantado, resultando em uma resposta tecidual específica (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). O processo inflamatório é complexo e envolve diferentes tipos de células, incluindo células polimorfonucleares e macrófagos (AL-MAAWI et al. 2017).

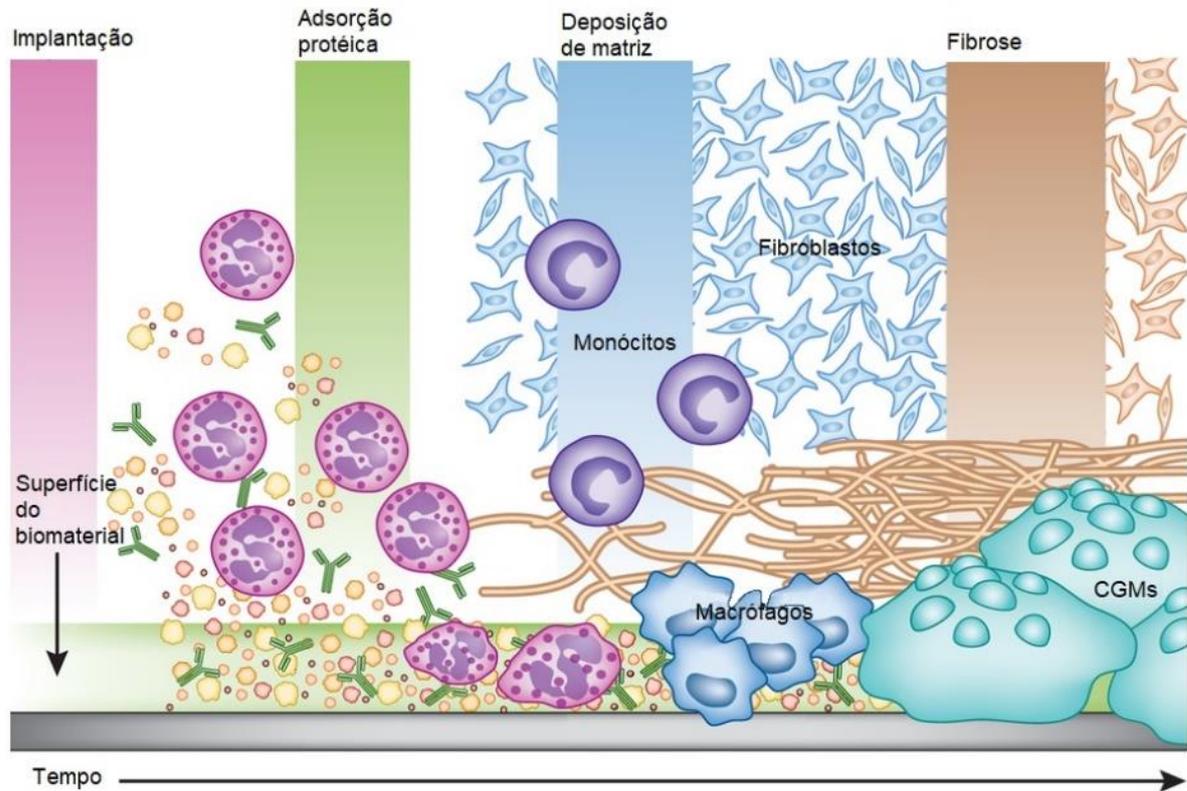
O implante é sempre acompanhado por injúria, devido aos procedimentos cirúrgicos utilizados. Essa injúria ao tecido provoca o recrutamento de células inflamatórias oriundas da corrente sanguínea para o local do implante (FRANZ et al., 2011).

Em frações de segundos após o primeiro contato do material com os tecidos circundantes, as proteínas do sangue e do interstício provenientes dos vasos extravasados adsorvem à superfície do biomaterial. Essas proteínas determinam o recrutamento de células inflamatórias. O exsudato sanguíneo também consiste na liberação de plaquetas, que formam um coágulo rico em fibrina por agregação. O coágulo serve como um depósito para citocinas e fatores de crescimento, fornecendo sinais para o início do reparo da ferida e servem como uma matriz para migração e ligação celular. As proteínas do sistema complemento iniciam a resposta imune, que promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e induzem a quimiotaxia de

outras células inflamatórias como os neutrófilos e macrófagos (VISHWAKARMA et al., 2016; KIM et al., 2014).

O infiltrado inflamatório agudo é formado essencialmente por neutrófilos, que migram rapidamente para o local da implantação. Lá, promovem a liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem degradar a superfície do material. Os componentes citotóxicos, se presentes, podem danificar o tecido circundante e prolongar a resposta inflamatória. Os neutrófilos também são importantes na liberação de quimiocinas, como a interleucina 8 (IL-8), cujo principal alvo são os próprios neutrófilos. Além disso, os neutrófilos ativados também secretam MCP-1 (Proteína quimioatraente de monócitos-1) e MIP1b (Proteína inflamatória de macrófagos-1b). Ambas as quimiocinas são conhecidas como quimioatraentes potentes e fatores de ativação de monócitos, macrófagos, células dendríticas imaturas e linfócitos. O aumento da liberação dessas quimiocinas pelos neutrófilos suprime sua infiltração. Assim, essas células geralmente desaparecem após os primeiros dias da implantação (KRUGER et al., 2015; VISHWAKARMA et al., 2016).

A inflamação crônica se desenvolve quando há persistência do estímulo inflamatório. Os monócitos circundantes recrutados para a área inflamada migram para o tecido conjuntivo e se tornam macrófagos. Essa ativação macrofágica lesiona os tecidos por produzir metabólitos tóxicos. Células como os linfócitos, eosinófilos, plasmócitos e células gigantes também estão envolvidas na inflamação crônica. Na tentativa tecidual de defesa a um corpo estranho e para restringir a toxicidade do produto, são liberados fatores de crescimento (como os PDGF, TGF, TGF- β), fatores de angiogênese e citocinas fibrinogênicas geradoras de fibrose, a fim de circunscrever o material implantado. (FRANZ et al., 2011). A Figura 5 ilustra a reação do processo inflamatório na presença de um biomaterial.

Figura 5: Reações do sistema imune em função do tempo.

Legenda: CGM – Célula gigante multinucleada. Fonte: STUDENT SITE (2015).

Diversos pesquisas utilizando biomateriais apontam a relação entre o processo inflamatório e a resposta de biocompatibilidade e biodegradabilidade. O quadro 2 sintetiza estudos dentro da literatura temática, envolvendo biomateriais e caracterização da resposta inflamatória e reparatória usando o teste biológico em subcutâneo murino.

Quadro 2: Respostas histológicas encontradas em teste em subcutâneo murino sob distintos tratamentos experimentais locais, sem células, fatores de crescimento ou alterações sistêmicas.

Autor (ano)	Modelo	Tratamento	Inflamação	Reparo	Biomaterial
Al-Maawi et al (2018)	rato	Membrana colágena bovina (Symbios®)	Suave em 3 dias (↑ linfócitos), 10 dias (↑ macrófagos e ↓ células gigantes), 15 dias (↑ células gigantes e ↓ macrófagos) e 30 dias (↓ macrófagos e células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (3-30 dias)	Integridade da membrana até 30 dias
Andrade et al (2011)	camundongo	Membrana de látex natural	Intensa em 2 dias (↑ neutrófilos), moderada em 7 dias (↑ neutrófilos) e moderada-discreta em 14 dias (↓ neutrófilos)	↑ vascularização e estabilidade de colágeno em 7 e 14 dias	Integridade de todas as membranas até 14 dias
		Membrana de látex desnaturado	Moderada em 2-7 dias (↑ neutrófilos) e suave em 14 dias (↓ neutrófilos)	↑ vascularização e estabilidade de colágeno em 7 e 14 dias	
		Membrana de PTFE	Moderada em 2-7 dias (↑ neutrófilos) e discreta em 14 dias (↓ neutrófilos)	↑ colágeno em 7 e 14 dias	

Barros et al (2012)	camundongo	Enxerto aloplástico (HA estequiométrica) Enxerto aloplástico (carbonato apatita)	Em ambos, suave em 1 semana (↓ células mononucleares e células gigantes) e discreta em 3 semanas (↓ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (1-3 semanas)	Em ambos, degradação parcial em 3 semanas
Bittencourt et al (2014)	rato	Xenoenxerto bovino (75% HA:25% COL) HA estequiométrica	Moderada em 5 e 10 semanas (↑ células gigantes) Sem resposta inflamatória	Em ambas, estabilidade do tecido conjuntivo (5-10 semanas)	Em ambas, integridade de partículas até 10 semanas
Brito et al (2009)	rato	Membrana de quitosana	Moderada em 7-15 dias (↑ neutrófilos e linfócitos), discreta em 30 dias (↑ linfócitos, ↓ neutrófilos e células gigantes)	Tecido de granulação (7-30 dias), ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (7-60 dias)	Integridade da membrana até 60 dias
Cestari et al (2010)	rato	Xenoenxerto (Osso cortical bovino descelularizado)	Intensa em 7 dias (↑ neutrófilos e macrófagos), moderada em 14 dias e discreta em 28 e 60 dias (↓ macrófagos e células gigantes); sem linfócitos e plasmócitos em todos os períodos	Cápsula mais evidente em 7 dias, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (14-60 dias)	Degradação parcial (1% em 14 dias, 12,5% em 28 dias e 40,4% em 60 dias)
Corradetti et al (2017)	rato	Membrana de colágeno Membrana de colágeno-condroitin sulfato	Intensa em 1-3 dias (↓ macrófagos), moderada em 7 dias e ausente em 21 dias Intensa em 1-3 dias (↑ macrófagos), moderada em 7 dias e ausente em 21 dias	Em ambas, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (7-21 dias)	Degradação quase completa em 21 dias Degradação completa em 21 dias
Doloff et al (2017)	camundongo	Esferas de hidrogel de alginato	Moderada em 14 dias (↑ macrófagos, ↓ neutrófilos e linfócitos B)	Presença de tecido conjuntivo e vascularização em 14 dias	Integridade de partículas até 14 dias
Fernandes et al (2010)	rato	Sulfato de cálcio	Suave em 7 dias e 28 dias (↓ linfócitos e ↑ células gigantes) e ausente em 84 dias	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (7-84 dias)	Degradação total em 84 dias
Gasque et al (2008)	camundongo	Membrana colágena bovina	Moderada em 3 dias (↑ neutrófilos) e 7 dias (↑ macrófagos), leve em 15-30 dias (↑ macrófagos e ↓ neutrófilos) e ausente em 60 dias; sem células gigantes	↑ gradual do tecido conjuntivo (7-60 dias)	Degradação parcial (7-30 dias) e total (60 dias)
Gasque et al (2011)	camundongo	Membrana colágena bovina	Moderada em 3-30 dias (↑ macrófagos); sem células gigantes	↑ gradual do tecido conjuntivo (15-60 dias)	Degradação parcial (15-30 dias) e total (60 dias)
Giorno et al (2014)	camundongo	Enxerto aloplástico (HA estequiométrica) Enxerto aloplástico (1% ZnHA) Enxerto aloplástico (1% PbHA)	Suave em 1 semana (↑ neutrófilos, ↓ plasmócitos, macrófagos), discreta em 3 e 9 semanas (↑ macrófagos) Suave em 1 semana (↑ neutrófilos, plasmócitos, macrófagos e ↓ células gigantes), discreta em 3 semanas (↑ macrófagos, ↓ neutrófilos e células gigantes) e 9 semanas (↑ macrófagos) Suave em 1 semana (↑ macrófagos e ↓ neutrófilos e plasmócitos), discreta em 3 semanas (↓ macrófagos e células gigantes) e 9 semanas (↓ macrófagos)	Tecido de granulação em 1 semana, ↑ gradual do tecido conjuntivo (1-9 semanas) Tecido de granulação em 1 semana, ↑ gradual do tecido conjuntivo (1-9 semanas) Tecido de granulação em 1 semana, ↑ gradual do tecido conjuntivo (1-9 semanas)	Integridade de partículas até 9 semanas Integridade de partículas até 9 semanas Integridade de partículas até 9 semanas
Hoornaert et al (2016)	rato	Membrana de PLGA Membrana de PLA	Moderada em 4-26 semanas (↑ macrófagos e células gigantes) Mesmos eventos, com mais macrófagos e células gigantes	Em ambas, tecido de granulação em 8 semanas, ↑ gradual do tecido conjuntivo/vascularização (8-26 semanas)	Degradação parcial (16 semanas) e completa (52 semanas)
Janune et al (2006)	rato	Xenoenxerto (Osso bovino misto medular)	Moderada em 3 dias (↑ neutrófilos e células mononucleares), discreta em 7-30 dias (↑ células mononucleares,	Tecido de granulação em 3 dias, ↑ gradual do tecido conjuntivo/	Integridade do material até 60 dias

			↓ células gigantes) e 60 dias (↓ células gigantes)	vascularização (7-60 dias)	
Jardelino et al (2009)	camundongo	Xenoexerto bovino inorgânico (Osseus®) Xenoexerto bovino (BioOss®)	Suave em 1 semana (↑ neutrófilos e ↓ macrófagos), em 3-9 semanas (linfócitos) Suave em 1 semana (↑ células mononucleares e algumas células gigantes), em 3-9 semanas (linfócitos)	↑ gradual do tecido conjuntivo (1-9 semanas) Melhor organização em 1 semana, ↑ gradual do tecido conjuntivo (1-9 semanas)	Integridade de partículas até 9 semanas
Jardelino et al (2010)	camundongo	Membrana de colágeno suíno	Intenso em 1 semana (↑ macrófagos e ↓ neutrófilos), moderada em 3 semanas (↑ macrófagos e ↓ células gigantes), ausente em 9 semanas	Tecido de granulação em 1 semana, ↑ gradual do tecido conjuntivo (1-9 semanas)	Degradação quase total (3 semanas) e total (9 semanas)
Jardelino et al (2012)	camundongo	Membrana de alginato-capsul	Intenso em 1 semana (↑ neutrófilos e linfócitos), moderada em 3 semanas (↑ linfócitos e ↓ células gigantes) e 9 semanas (↑ linfócitos)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (3-9 semanas)	Degradação inicial (1 semana), e avançada, com resíduos presentes (9 semanas)
Korzinskas et al (2018)	camundongo	Membrana de PTFE Membrana de colágeno	Discreta em 10-30 dias (↓ macrófagos, neutrófilos) Moderada em 10-30 dias (↑ macrófagos, eosinófilos, ↓ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (10-30 dias)	Em ambas, integridade das membranas até 30 dias
Lima et al (2010a)	camundongo	Membrana colágena suína	Intensa em 1 semana (↑ macrófagos e linfócitos), moderada em 3 semanas (↑ macrófagos, linfócitos e neutrófilos, ↓ célula gigante) e leve em 9 semanas (↓ macrófagos, linfócitos e células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (3-9 semanas)	Degradação parcial (1-9 semanas)
Lima et al (2010b)	camundongo	Aloplástico (5% ZnHA) Aloplástico (HA estequiométrica)	Moderada com reação de corpo estranho (↓ neutrófilos, ↑ células gigantes e células mononucleares) em 7 dias, discreta de 14-28 dias (↓ células gigantes e mononucleares) e ausente em 60 dias Mesmos eventos, com ↓ de células gigantes mais lenta	Cápsula fibrosa e ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (7-60 dias) Mesmos eventos, mas ↓ vascularização	Integridade de partículas até 60 dias
Lima et al (2011)	camundongo	Aloplástico (biovidro/níobio)	Moderada em 1 semana (↑ células mononucleares) e discreta em 3-9 semanas (↑ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (1-9 semanas)	Integridade de partículas até 9 semanas
Lomelino et al (2011)	rato	Aloplástico (70% βTCP:30% HA)	Moderada em 15 dias (↑ linfócitos, macrófagos e células gigantes) e discreta (↓ linfócitos, macrófagos e células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (15-45 dias)	Integridade de partículas até 45 dias
Minotti et al (2015)	rato	Cimento MTA (Angelus®) Cimento branco Portland (Irajazinho®) Cimento cinza Portland (Minetti®) Cimento cinza Portland (Votoran®)	Em todos, moderada em 15 dias (↑ macrófagos e células gigantes) e discreta em 30-60 dias (↓ macrófagos, células gigantes, linfócitos e plasmócitos); MTA (< inflamação) e Minetti (> inflamação)	Em todos, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (15-60 dias)	Não avaliado
Oliveira et al (1993)	rato	Aloplástico (HA microgranular)	Intensa em 3-24 h (↑ neutrófilos), granuloma de corpo estranho de 7-30 dias (↑ macrófagos e células gigantes) até 60 dias (↓ macrófagos e células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (7-60 dias)	Degradação parcial (60 dias)
Oliveira et al (1999)	rato	Xenoexerto (osso cortical bovino microgranular tratado a 100°C) Xenoexerto (osso cortical bovino microgranular tratado a 1000°C)	Em ambos, intensa em 10 dias (↑ macrófagos e células gigantes, ↓ neutrófilos), moderada em 20 dias (↓ macrófagos) e discreta em 30-60 dias (↓ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (10-60 dias)	Degradação parcial em 60 dias Integridade de partículas até 60 dias
Oliveira et al (2003)	rato	Xenoexerto (osso cortical bovino)	Intensa-moderada entre 10-20 dias (↑ macrófagos e células	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno	Degradação parcial em 60 dias

		macrogranular tratado a 100°C) Xenoenxerto (osso cortical bovino macrogranular tratado a 1000°C)	gigantes) e discreta em 30-60 dias (↓ macrófagos e células gigantes); células gigantes mais exuberantes no grupo de 1000°C, porém não relacionadas à reabsorção	e vascularização (10-60 dias)	Integridade de partículas até 60 dias
Oliveira et al (2004)	rato	Membrana de osso cortical bovino desmineralizado	Intensa-moderada em 1-3 dias (↑ neutrófilos e linfócitos), moderada em 7 dias (↑ neutrófilos e linfócitos e ↓ células gigantes) e 15 dias (↓ neutrófilos e ↑ células gigantes) e quase ausente de 30-60 dias (↓ macrófagos e células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (7-60 dias)	Degradação progressiva (15 dias) até quase completo desaparecimento (60 dias)
Oliveira et al (2006)	rato	Membrana de osso cortical bovino desmineralizado (Genderm®) Membrana de osso cortical bovino desmineralizado tratada com tetraciclina (Baumer®)	Em ambas, intensa-moderada em 1-3 dias (↑ neutrófilos e linfócitos), moderada em 7 dias (↓ neutrófilos e linfócitos) e 15 dias (↓ neutrófilos e linfócitos e ↑ células gigantes) e quase ausente de 30-60 dias (↓ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (7-60 dias)	Degradação progressiva (15 dias) até quase completo desaparecimento (60 dias)
Oliveira et al (2008)	rato	Xenoenxerto (osso bovino/colágeno)	Moderada em 10 dias (↑ linfócitos e plasmócitos), ausente a partir de 20 dias	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (10-60 dias)	Integridade de partículas até 60 dias
Santana et al (2009)	rato	Eponja colágena hidrolisada (Hemospon®)	Discreta em 3 dias (↑ neutrófilos e ↓ linfócitos), ausente a partir de 7 dias; ausência de células gigantes	↓ tecido de granulação (3-7 dias), ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (7-21 dias)	Degradação progressiva (7-14 dias) até completo desaparecimento (21 dias)
Sena et al (2014)	rato	Adesivo aloplástico (wollastonita-poli(N-butil-2-cianocrilato)	Moderada em 1 semana (↑ mononucleares, ↓ neutrófilos e células gigantes), discreta em 3-9 semanas (↑ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (1-9 semanas)	Integridade de partículas até 9 semanas
Shimizu et al (2004)	camundongo	Pasta de hidróxido de cálcio	Necrose (1 semana) e reação de corpo estranho (macrófagos, células gigantes, linfócitos) decrescente entre 1-3 semanas e ausência em 12 semanas	Tecido de granulação em 1-3 semanas, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (até 12 semanas) e calcificações entre 3-12 semanas	Degradação parcial (1 semana) a total (3-12 semanas)
Sicca et al (2000)	rato	Xenoenxerto (osso cortical microgranular desproteínizado-GenOx®) Xenoenxerto (osso cortical macrogranular desproteínizado-GenOx®)	Em ambos, intensa em 10 dias (↑ em macrófagos e células gigantes, ↓ neutrófilos e linfócitos), moderada aos 20 dias (↑ em macrófagos e células gigantes), suave em 30-60 dias (↓ macrófagos e células gigantes)	Em ambos, tecido de granulação em 10 dias, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (20, 30 e 60 dias)	Integridade de partículas até 60 dias
Wang et al (2017)	rato	Hidrogel de queratina de frango	Presente entre 7-14 dias, ausente a partir de 21 dias	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e vascularização (7-28 dias)	Degradação parcial (7 dias) a total (28 dias)
Yamatogi et al (2005)	rato	Membrana de cortical óssea desmineralizada liofilizada bovina Membrana colágena bovina	Moderada em 15 dias (↑ células mononucleares) e 30 dias (↓ células mononucleares) Moderada em 15 dias (↑ neutrófilos) e 30 dias (↑ células gigantes)	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno (15-60 dias)	Em ambas, integridade até 15 dias, degradação quase total em 30 dias e total em 60 dias
Zambuzzi et al (2005)	rato	Xenoenxerto (Osso bovino inorgânico medular)	Moderada em 10 dias (↑ em macrófagos e células gigantes, ↓ neutrófilos, plasmócitos e linfócitos), leve em 20-30 dias (↓ macrófagos e ↑ de células gigantes) e em 60 dias (↓ células gigantes)	Gradual ↓ de tecido de granulação e ↑ do tecido conjuntivo/colágeno e angiogênese (10, 20, 30 dias), fibrose intensa aos 60 dias	Integridade de partículas até 60 dias
Zambuzzi et al (2006a)	rato	Xenoenxerto (Osso bovino inorgânico macrogranular poroso)	Intensa-moderada em 10 dias (↑ em macrófagos e células gigantes, ↓ neutrófilos e linfócitos), moderada aos 20 dias (↑ em macrófagos e células	Tecido de granulação em 10 dias, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno	Integridade de partículas até 60 dias

			gigantes), suave em 30 e 60 dias (↑ em células gigantes)	e angiogênese (20, 30 e 60 dias)	
Zambuzzi et al (2006b)	rato	Xenoexerto (Osso fetal bovino acelular desmineralizado)	Discreta aos 10 dias (↓ em células mononucleares e células gigantes), ausente nos demais períodos	↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e angiogênese (10, 20, 30 e 60 dias)	↓ de trabéculas ósseas/reabsorção parcial do enxerto em 60 dias
Zambuzzi et al (2009)	rato	Xenoexerto (HA bovina-Genox® microgrânulos) Xenoexerto (HA bovina-Genox® macrogrânulos)	Em ambos, moderada aos 10 dias (↑ em macrófagos e ↓ em células gigantes, neutrófilos e linfócitos), suave em 20, 30 e 60 dias (↑ em células gigantes)	Em ambos, ↑ gradual do tecido conjuntivo/colágeno e angiogênese (20, 30 e 60 dias)	Em ambos, integridade de partículas até 60 dias

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a biocompatibilidade e a biodegradabilidade de hidrogéis de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes da indústria avícola.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar semiquantitativamente a biocompatibilidade e biodegradabilidade de hidrogéis com composição de 100% colágeno de origem avícola em tecido subcutâneo murino, segundo norma ISO 10993-6;
- Avaliar semiquantitativamente a biocompatibilidade e biodegradabilidade de hidrogéis com composição de 90% colágeno + 10% bioapatita de origem avícola em tecido subcutâneo murino, segundo norma ISO 10993-6;
- Avaliar semiquantitativamente a biocompatibilidade e biodegradabilidade de hidrogéis com composição de 90% colágeno + 10% nanoqueratina de origem avícola em tecido subcutâneo murino, segundo norma ISO 10993-6;
- Avaliar semiquantitativamente a biocompatibilidade e biodegradabilidade de hidrogéis com composição de 90% colágeno + 5% bioapatita + 5% nanoqueratina de origem avícola em tecido subcutâneo murino, segundo norma ISO 10993-6;
- Verificar qual o material que expressou melhor a biocompatibilidade e a biodegradação.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

O estudo foi do tipo experimental, qualitativo e semiquantitativo. Segundo Cajueiro (2012), um estudo experimental é aquele em que se utiliza ferramentas práticas para a manipulação do objeto em estudo. Além disso, é necessário que se desenvolva nas etapas do experimento, a manipulação dos elementos da pesquisa apresentando um controle, que será necessário para fins comparativos. O estudo é dito como semiquantitativo porque pode ser mensurado através de valores numéricos (CAJUEIRO, 2012).

4.2 Aspectos éticos

O estudo científico foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Ceará, situada na Avenida Comandante Maurocelio Rocha Pontes, nº 100 no bairro Derby, Sobral, Ceará, sob registro de nº 04/17 (Anexo I), de responsabilidade do professor Dr. Igor Iuco Castro da Silva. O mesmo foi avaliado e considerado aprovado por atender os princípios éticos e legislação vigente à experimentação animal no Brasil.

Os experimentos foram realizados seguindo as normas e os procedimentos contidos na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008), que regulamenta os Procedimentos para o Uso Científico de Animais; na Resolução nº 1.000, de 11 de maio de 2012, que dispõe sobre Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais e dá outras Providências e nas Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (BRASIL, 2013).

Ainda, respeitando a legislação brasileira no que tange a biodiversidade nacional e a necessidade de registro junto ao Sistema Nacional de Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado, a presente pesquisa também foi cadastrada na plataforma eletrônica do SISGEN do Ministério do Meio Ambiente, especificando o uso *ex situ* de material avícola neste estudo (Anexo II)

4.3 Animais

Foram utilizados para o experimento 45 camundongos albinos da espécie *Mus musculus* da variedade Swiss, adultos e do sexo masculino, com peso e idade aproximando-se de 30 a 40 gramas e seis semanas, respectivamente, provenientes do Biotério Central da

Universidade Federal do Ceará-Fortaleza e hospedados no Biotério Setorial da Universidade Federal do Ceará-Sobral ao longo de todo o experimento. Os animais foram aleatoriamente divididos em grupos experimentais, de acordo com o tipo de hidrogel que foi enxertado.

4.4 Hidrogéis

Todos os hidrogéis foram preparados no laboratório da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Fortaleza, onde foram previamente caracterizados físico-quimicamente, já prontos para serem utilizados *in vivo*. Foram produzidos 4 hidrogéis com características distintas, como aponta os dados da Tabela 1.

Tabela 1: Hidrogéis e suas respectivas composições.

Hidrogel	Composição
Hidrogel 1	100% de colágeno
Hidrogel 2	90% de colágeno + 10% de bioapatita
Hidrogel 3	90% de colágeno + 10% de nanoqueratina
Hidrogel 4	90% de colágeno + 5% de nanoqueratina + 5% de bioapatita

Fonte: Elaborada pela autora

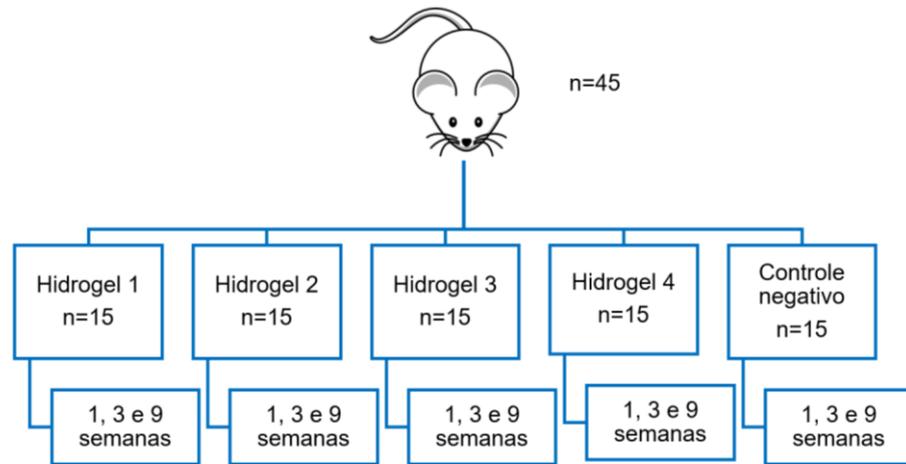
É notável pela Tabela 1 que o colágeno corresponde à maior parte do hidrogel formado e que os outros componentes (nanoqueratina e bioapatita) apresentam no máximo 10% do hidrogel. Esses valores podem ser explicados a partir de estudos prévios de Cavalcante (2017), em que foi possível observar que a adição em maiores porcentagens desses componentes junto ao colágeno levou à formação de um hidrogel mais denso e de menor porosidade, sugerindo que a nanoqueratina e bioapatita podem provocar uma redução no espaçamento da estrutura interna dos poros.

4.5 Protocolo experimental

Os camundongos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com o hidrogel enxertado, e um grupo controle negativo, em três tempos experimentais cada: 1, 3 e 9 semanas, de acordo com a ISO 10993-6 (2007).

O desenho experimental da organização dos grupos de animais de acordo com o hidrogel e o tempo experimental pode ser vista no Figura 6.

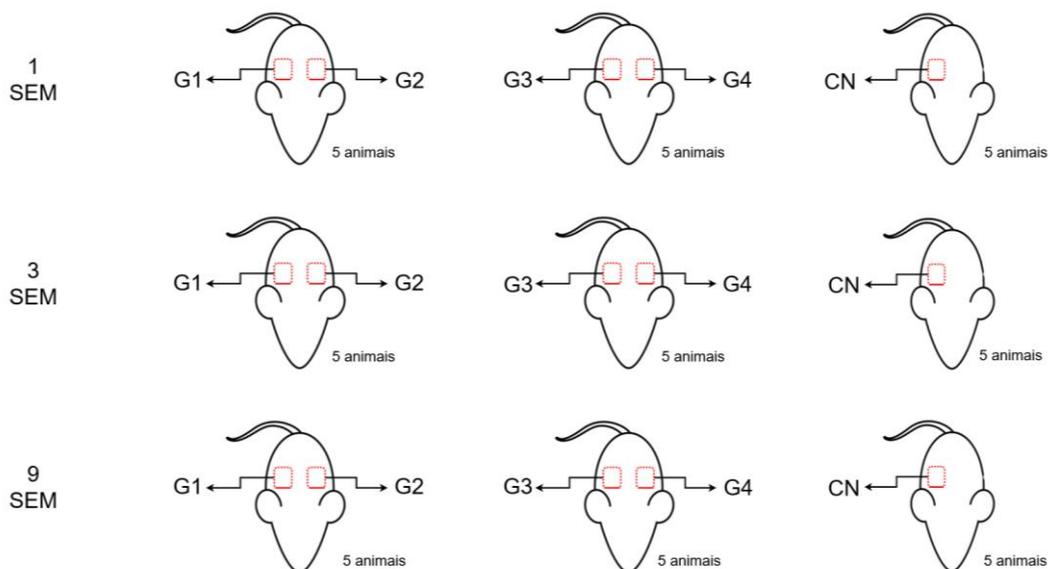
Figura 6: Desenho experimental da separação dos animais nos grupos experimentais do estudo.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para otimizar a utilização dos animais dos grupos-teste de acordo com os princípios de redução, refinamento e substituição do padrão 3R em experimentação animal (HAMPSHIRE; GILBERT, 2018), em cada camundongo foram enxertados dois hidrogéis distintos, um em cada lado do dorso. Já nos camundongos do grupo controle negativo, foram realizadas incisões no lado direito do dorso, sem a realização de enxertia no tecido subcutâneo, em 1, 3 e 9 semanas, como mostra a Figura 7.

Figura 7: Delineamento experimental da utilização dos camundongos e distribuição dos materiais



Fonte: Elaborada pela autora.

Antes de se iniciar o procedimento cirúrgico, os camundongos foram submetidos à anestesia geral por meio de administração intraperitoneal (IP) de uma solução anestésica. Quando as espécies animais permaneceram completamente imóveis e sem resposta a estímulos dolorosos, foram colocadas sobre um campo operatório estéril, onde foram feitas as cirurgias para a inserção dos biomateriais em estudo.

4.5.1 Anestesia

Os fármacos utilizados no protocolo de indução da anestesia foram a quetamina[®] e xilazina[®]. A quetamina[®] é um anestésico dissociativo que produz analgesia, amnesia e imobilização, caracterizado pela ativação do sistema nervoso central e estímulo do sistema simpático. É frequentemente associada à xilazina[®], visando a redução dos efeitos colaterais exibidos com a administração de quetamina[®] (GARGIULO et al, 2012; KILIÇ; HENKE, 2004).

Nesse estudo, foram administrados nos animais, após a pesagem, uma solução anestésica composta por quetamina[®] (100 mg/kg) e xilazina[®] (12mg/kg) (FISH et al., 2008; FLECKNELL, 2009) que foi aplicada por via IP no quadrante abdominal inferior direito do animal, com duração de efeito de aproximadamente 45 minutos (NEVES; MANCINI FILHO; MENEZES, 2013).

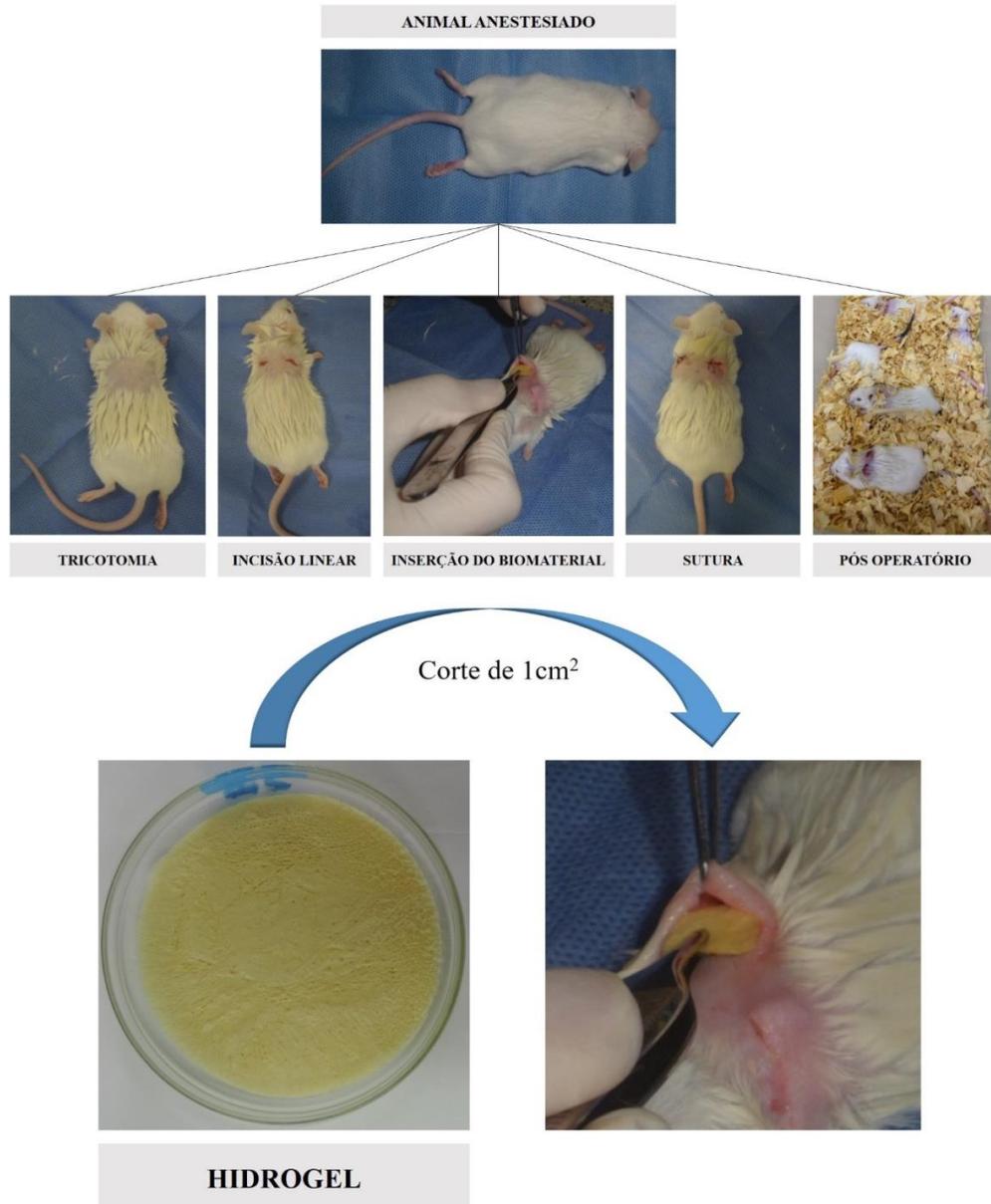
4.5.2 Cirurgia em sítio ectópico (subcutâneo)

Após anestesia, os camundongos foram submetidos ao processo de tricotomia. Com a área do dorso livre de pelos, foram iniciadas as cirurgias sobre um campo operatório estéril. Antes das incisões, a área tricotomizada foi degermada com gaze embebida em solução de clorexidina 2%. Em seguida, duas incisões lineares de aproximadamente 1cm foram traçadas no dorso do animal com auxílio de lâmina de bisturi, e, em sequência, foram criadas bolsas subcutâneas, através de divulsão do tecido subcutâneo com tesoura romba, para inserção do biomaterial. Em ambos os lados foram inseridos os hidrogéis de acordo com os grupos experimentais (Figura 7). Para o grupo controle negativo, a incisão e a criação da bolsa subcutânea foi realizada apenas no lado direito do dorso do animal, sem a inserção de qualquer material.

Em seguida foram realizadas as suturas das bolsas subcutâneas, com fio de nylon 4.0. Ao fim dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram alocados em gaiolas com ração

palhetada e água *ad libitum*, até o momento da eutanásia. A Figura 8 é um desenho esquemático do protocolo cirúrgico.

Figura 8: Desenho esquemático do protocolo cirúrgico.



Fonte: Elaborada pela autora.

4.5.3 Eutanásia

O uso de agentes eutanaziantes visa promover uma morte no animal experimental sem dor e sofrimento, através de mecanismos que incluem a depressão direta de neurônios vitais; hipóxia ou por meio de desarranjo da atividade cerebral do animal (MURRAY, 2007).

Para eutanasiar os camundongos do estudo, foram administrados por via IP uma solução contendo quetamina e xilazina, em uma sobredose cinco vezes maior comparada à dose anestésica usada. Constatada a morte, foi realizada necropsia excisional, contendo a área do enxerto e a sua periferia para posterior processamento e análise histopatológica. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos especiais para lixo com risco biológico e permaneceram congeladas em freezer até a coleta por uma empresa terceirizada e posterior incineração.

4.6 Processamento histológico

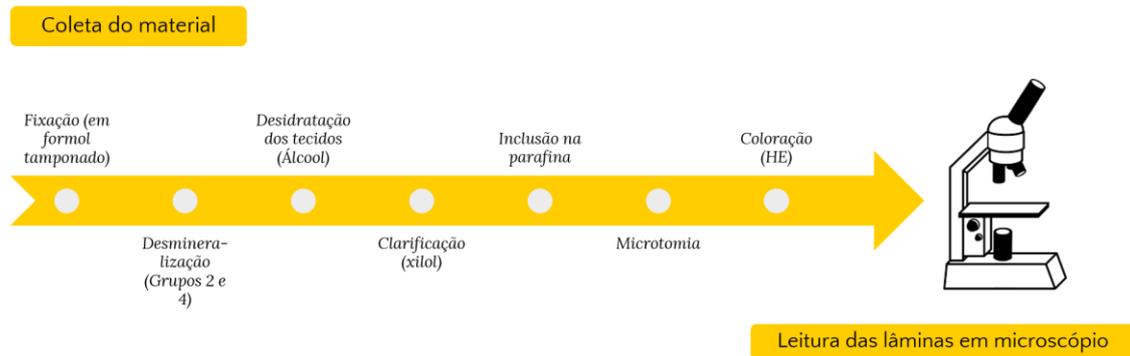
Após a coleta do material, o mesmo foi submetido pelo processo de fixação, uma etapa importante no processamento histopatológico pois visa interromper o metabolismo celular, estabilizando e preservando os elementos teciduais (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Para fixação, foi utilizado formol tamponado na concentração de 4% por 48 horas seguida por lavagem em água corrente por aproximadamente 60 minutos.

Para o processamento dos grupos 2 e 4 (hidrogéis com diferentes teores de bioapatita), foi necessário uma fase adicional depois da fixação, denominada desmineralização. Essa etapa visou a retirada de componentes inorgânicos do material, que poderiam impedir uma análise histológica adequada. Para isso, o material fixado foi imerso em solução desmineralizadora rápida (Alkimia, Brasil) por 4 horas, seguida por lavagem em água corrente durante 60 minutos.

A próxima etapa foi a desidratação dos tecidos. Nessa etapa, o álcool etílico puro em concentrações crescentes foi utilizado. Para a fase de desidratação, o material permaneceu imerso no álcool 70%, 80%, 90% e 100% por intervalo de 1 hora em cada uma das concentrações alcoólicas.

Para que haja a remoção do álcool, o próximo estágio do processamento foi a clarificação, também chamada de diafanização, onde as amostras foram submetidas a banhos em xilol puro por 60 minutos. Passado esse tempo, foram banhadas em parafina líquida (56°C-60°C) por 1 hora, seguida de inclusão em parafina. Cortes de 5µm foram feitos com a utilização de um aparelho denominado micrótomo e corados com a técnica de coloração Hematoxilina-Eosina. A Figura 9 sintetiza as etapas do processamento histológico.

Figura 9: Esquema das etapas de processamento histológico.



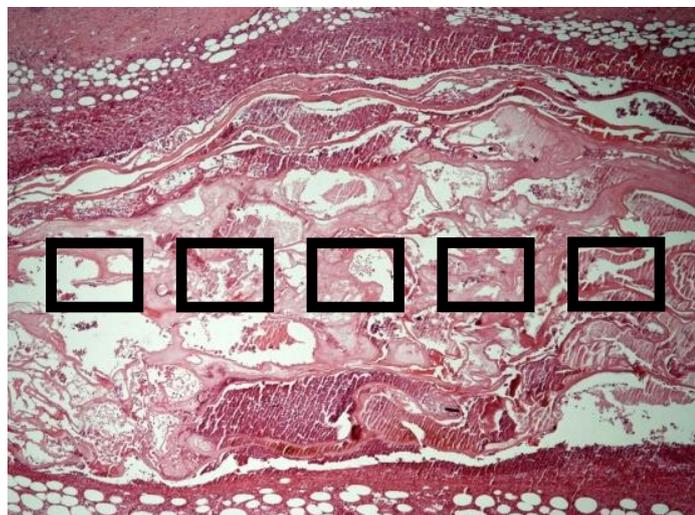
Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Análise histopatológica

Todas lâminas foram examinadas à microscopia de luz convencional por um patologista experiente e pela mestrand, previamente treinada e calibrada, em um estudo cego. Inicialmente, foi realizada análise descritiva de todos os grupos experimentais e registro fotodocumental das imagens mais representativas das respostas teciduais de cada condição.

Para as análises semiquantitativas, foram obtidas 5 fotomicrografias por lâmina usando um microscópio óptico FWL-1000 (Feldman Wild Leitz, Brasil) com magnificação de 400x e as imagens foram capturadas com uma câmera acoplada Cybershot DSC-W300 Super Steady Shoot (Sony, Brasil), totalizando 375 microfotografias. As imagens obtidas foram analisadas por um patologista experiente e um pesquisador previamente treinado (SOUZA, 2018). A Figura 10 ilustra o processo de obtenção de imagens a serem analisadas.

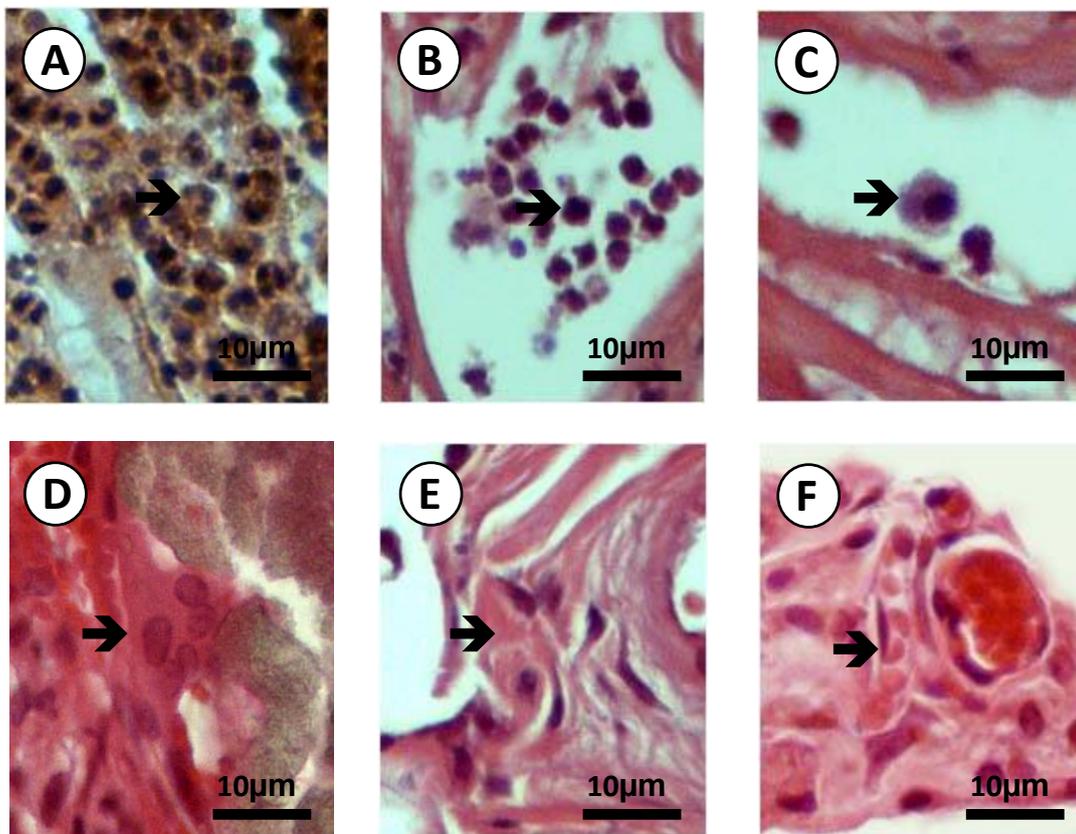
Figura 10: Análise histopatológica semiquantitativa do tecido subcutânea de camundongos (5 campos/lâmina)



Fonte: Elaborada pela autora.

Para cada imagem obtida, a análise semiquantitativa de biocompatibilidade das lâminas histológicas foi realizada com base em critérios histopatológicos compatíveis com respostas de inflamação (presença de neutrófilos, linfócitos, macrófagos e células gigantes) e reparo (neovascularização e fibrose) encontradas em cada tempo experimental. A Figura 11 demonstra os critérios utilizados para análise.

Figura 11: Critérios histopatológicos para análise de biocompatibilidade em subcutâneo de camundongos (→). Neutrófilo (A), Linfócito (B), Macrófago (C), Célula gigante multinucleada (D), Tecido conjuntivo (E) e Neovascularização (F). Coloração: Hematoxilina-Eosina.



Fonte: Elaborada pela autora.

A gradação para cada critério histopatológico se baseou na norma ISO 10993-6, que preconiza pontuações específicas para cada um deles na análise de biocompatibilidade, variando de 0 a 4. As Tabelas 2 e 3 demonstram as pontuações atribuídas às respostas inflamatórias e reparatórias, respectivamente.

Tabela 2: Tabela representativa dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais de resposta inflamatória após implantação dos enxertos em tecido subcutâneo de camundongos.

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*

Nota: *pc: por campo (400x) Critério modificado pelos autores.

Fonte: Adaptado de ISO 10993-6, anexo E (ISO, 2007).

Tabela 3: Tabela representativa dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais de resposta reparatória após implantação dos enxertos em tecido subcutâneo de camundongos.

Resposta reparatória	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Neovascularização	0	Proliferação capilar mínima, focal, 1-3 brotos	Grupos de 4-7 capilares com estruturas fibroblásticas de suporte	Banda larga de capilares com estruturas de apoio ou até 50% / pc**	Extensa banda de capilares com estruturas fibroblásticas de apoio 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*

Nota: *pc: por campo (400x) Critério modificado pelos autores.

Fonte: Adaptado de ISO 10993-6, anexo E (ISO, 2007).

Baseado na norma ISO 10993-6 (2007), foi proposto para avaliação semiquantitativa dos critérios de inflamação e reparo para cada condição experimental (grupos e tempos experimentais) o sistema de cálculo da biocompatibilidade da Tabela 4.

Tabela 4: Cálculo da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de enxertos implantados em tecido subcutâneo de camundongos.

Critérios	Pontuações por tempo experimental				
	G1	G2	G3	G4	C-
Neutrófilos	Média/condição experimental				
Linfócitos	Média/condição experimental				
Macrófagos	Média/condição experimental				
Células gigantes de corpo estranho	Média/condição experimental				
Subtotal (x2)	Soma de critérios de inflamação				
Neovascularização	Média/condição experimental				
Fibrose	Média/condição experimental				
Subtotal	Soma de critérios de reparo				
TOTAL	Soma dos subtotais				

Cálculo: Amostra teste – Controle Negativo; no caso de diferença negativa, considera-se resultado como zero.

De acordo com este resultado, comparar a uma das faixas a seguir para determinar o ranking de irritação de cada produto.

Sob condições experimentais, a amostra teste será considerada:

- não irritante (0,0 – 2,9);
- pouco irritante (3,0 – 8,9);
- moderadamente irritante (9,0 – 15,0); ou
- severamente irritante (>15)

Em relação ao tecido quando comparada ao controle negativo.

Fonte: Adaptado de ISO 10993-6, Anexo E (ISO, 2007).

A norma ISO 10993-6 (2007) preconiza a classificação de materiais-teste quanto a sua biocompatibilidade em quatro categorias, a saber: não irritante, pouco irritante, moderadamente irritante e severamente irritante.

Para determinar as pontuações de biocompatibilidade, foi determinado primeiro o padrão de inflamação (I_x) usando a equação (1).

$$I_x = 2 \left(\frac{\sum(N + L + M + C)}{n} \right) \quad (1)$$

Onde, I_x = padrão de inflamação; o subíndice x corresponde aos grupos teste (t) ou controle (c); N = mediana do score dos neutrófilos por animal; L = mediana do score dos

linfócitos por animal; M = mediana do score dos macrófagos por animal; C = mediana do score de células gigantes por animal, e n quantidade de animais por grupo.

Em seguida, foi determinado o padrão de reparo (R_x) usando a equação (2).

$$R_x = \frac{\sum(A + F)}{n} \quad (2)$$

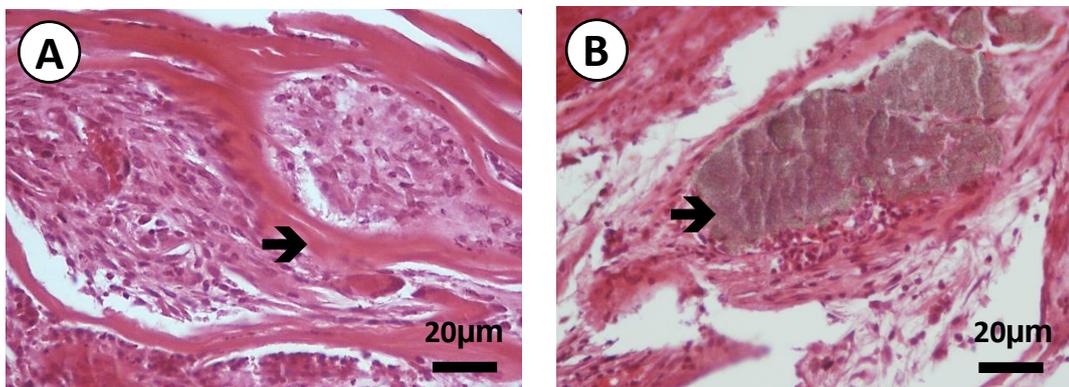
Onde, R_x representa o padrão de reparo; o subíndice x corresponde aos grupos teste (t) ou controle (c); A = mediana do score de neovascularização por animal; F = mediana do score de fibrose por animal, e n quantidade de animal por grupo.

$$S = (I_t + R_t) - (I_c + R_c) \quad (3)$$

Onde, S = Score de irritação; I_t = padrão de inflamação dos grupos teste; R_t = padrão de reparo do grupo teste; I_c = padrão de inflamação do grupo controle; R_c = padrão de reparo do grupo controle.

Para cada imagem obtida, a análise semiquantitativa de biodegradabilidade das lâminas histológicas foi realizada com base na presença de material encontrado em cada tempo experimental, de acordo com as diferentes morfologias apresentadas pelos hidrogéis testados, conforme demonstrado pela Figura 12.

Figura 12: Critérios histopatológicos para análise de biodegradabilidade em subcutâneo de camundongos. →: Biomaterial (morfologia variável, de camadas eosinofílicas no hidrogel de colágeno-nanoqueratina, **A** a partículas no hidrogel de colágeno-biopatita, **B**). Coloração: Hematoxilina-Eosina.



Fonte: Elaborada pela autora.

Similar à gradação de biocompatibilidade preconizada pela norma ISO 10993-6 (2007) e baseado em Souza (2018), foi proposto para avaliação semiquantitativa o sistema de cálculo da biodegradabilidade descrito na Tabela 5.

Tabela 5: Tabela representativa dos critérios de avaliação dos efeitos biológicos locais de integridade do enxerto após implantação em tecido subcutâneo de camundongos.

Integridade do enxerto	Pontuações				
	0	1	2	3	4
Presença do Material	(100% degradado)	Mínima (até 25%)	Leve (26-50%)	Moderada (51-75%)	Quase total (76-100%)

*Nota: *pc: por campo (400x) Critério modificado pelos autores.*

Fonte: SOUZA, 2018.

4.8 Análise estatística

Todas as medianas obtidas de cada parâmetro por animal foram dispostas em tabelas por meio do *software* Excel versão 2016 para posterior análise estatística por meio do *software* GraphPad InStat versão 3.0 (GraphPad Software, Inc., EUA).

Os dados não paramétricos foram calculados utilizando o 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, incluindo comparações intragrupos (mesmo grupo experimental, semanas experimentais diferentes) e intergrupos (grupos experimentais diferentes, mesma semana experimental).

5 RESULTADOS

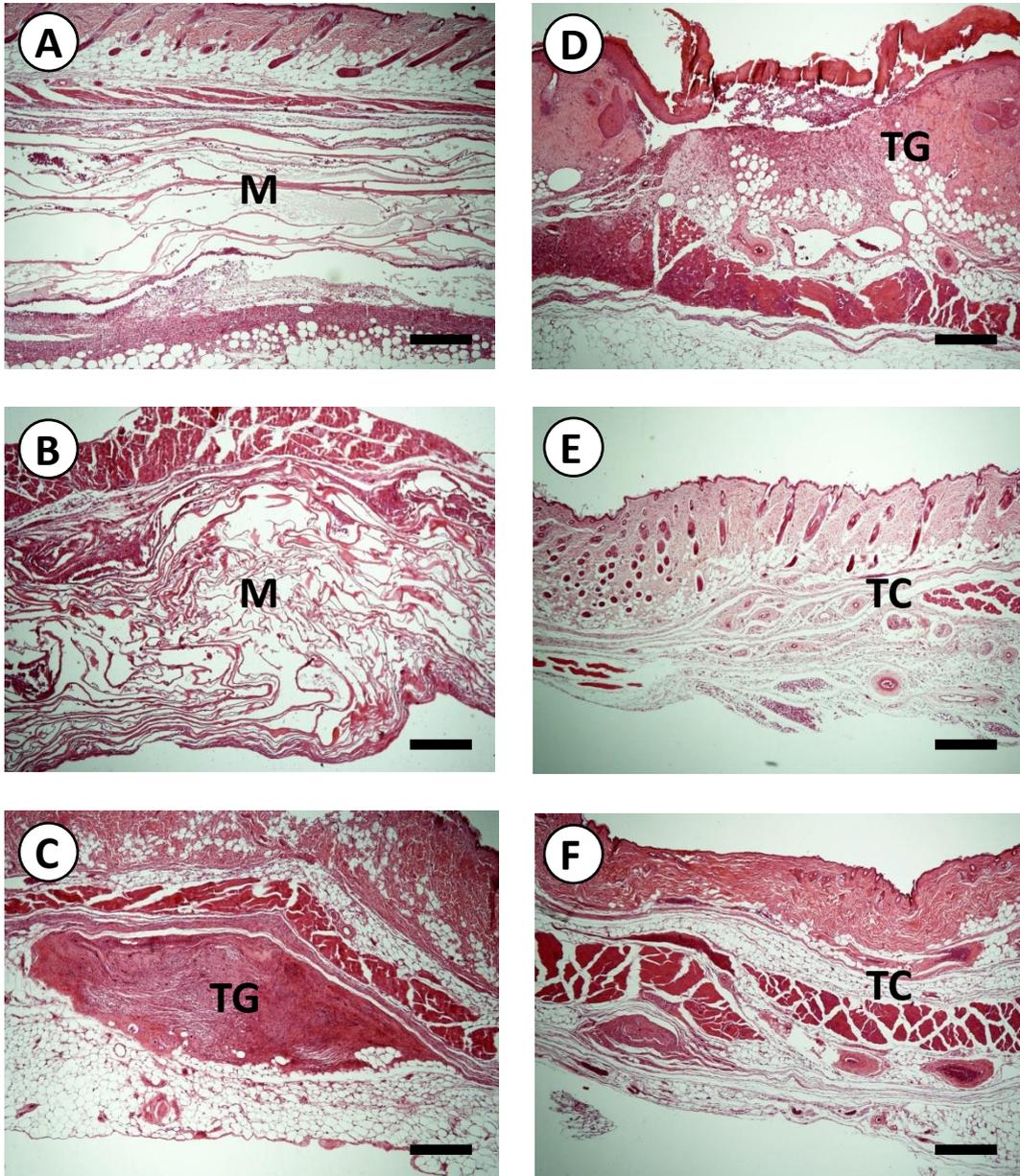
5.1 Análise descritiva

5.1.1 G1 (Colágeno 100%)

A Figura 13 (A, B e C) ilustra que G1 exibiu uma redução gradual do volume inicial do hidrogel de colágeno ao longo do período experimental, até seu desaparecimento em 9 semanas, notando-se a presença de tecido de granulação em substituição ao biomaterial. No CN (D, E e F), houve presença inicial de tecido de granulação e abundante neovascularização em 1 semana, substituído por tecido conjuntivo em 3 e 9 semanas.

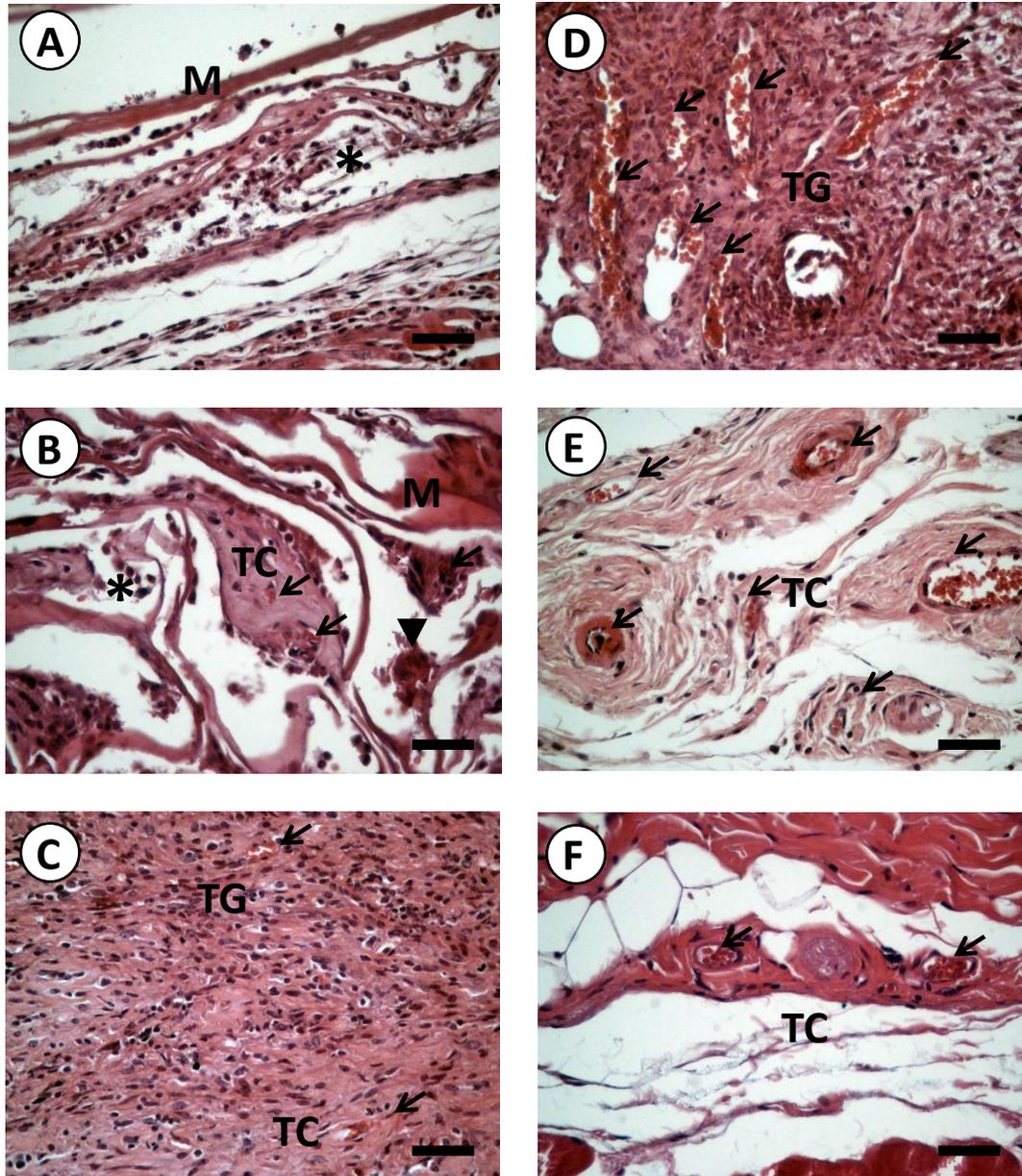
A Figura 14 (A, B e C) ilustra que G1 exibiu presença de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos e linfócitos) em 1 semana e de evidências de células gigantes e reparo tecidual em 3 e 9 semanas, por meio de neovascularização e tecido conjuntivo. A presença de fragmentos do biomaterial foi perceptível até 3 semanas. No CN (D, E e F), observou-se tecido de granulação em 1 semana e sua substituição por tecido conjuntivo, com progressivo depósito de colágeno, em 3 e 9 semanas.

Figura 13. Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G1 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou CN (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **M**: material, **TG**: tecido de granulação, **TC**: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 14: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G1 (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) ou CN (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). M: material, TG: tecido de granulação, TC: tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório (*), célula gigante (▶) e vasos sanguíneos (→). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm.



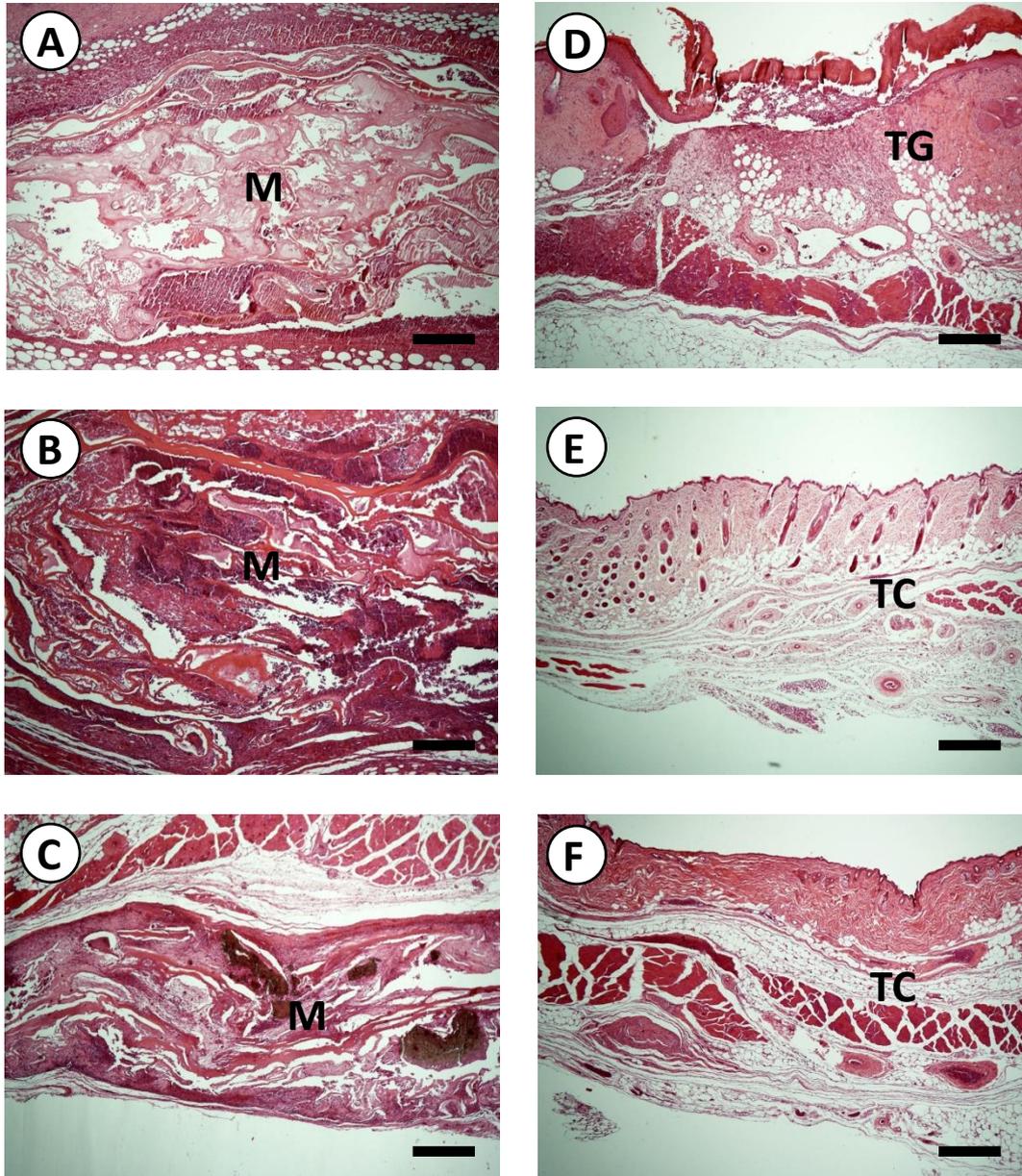
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.2 G2 (Colágeno 90% + Bioapatita 10%)

A Figura 15 (A, B e C) ilustra que G2 exibiu uma redução gradual do volume inicial do hidrogel de colágeno + BA ao longo do período experimental, porém o mesmo ainda esteve presente em 9 semanas, notando-se a presença de tecido de granulação em substituição ao biomaterial. No CN (D, E e F), houve presença inicial de tecido de granulação em 1 semana, substituído por tecido conjuntivo em 3 e 9 semanas.

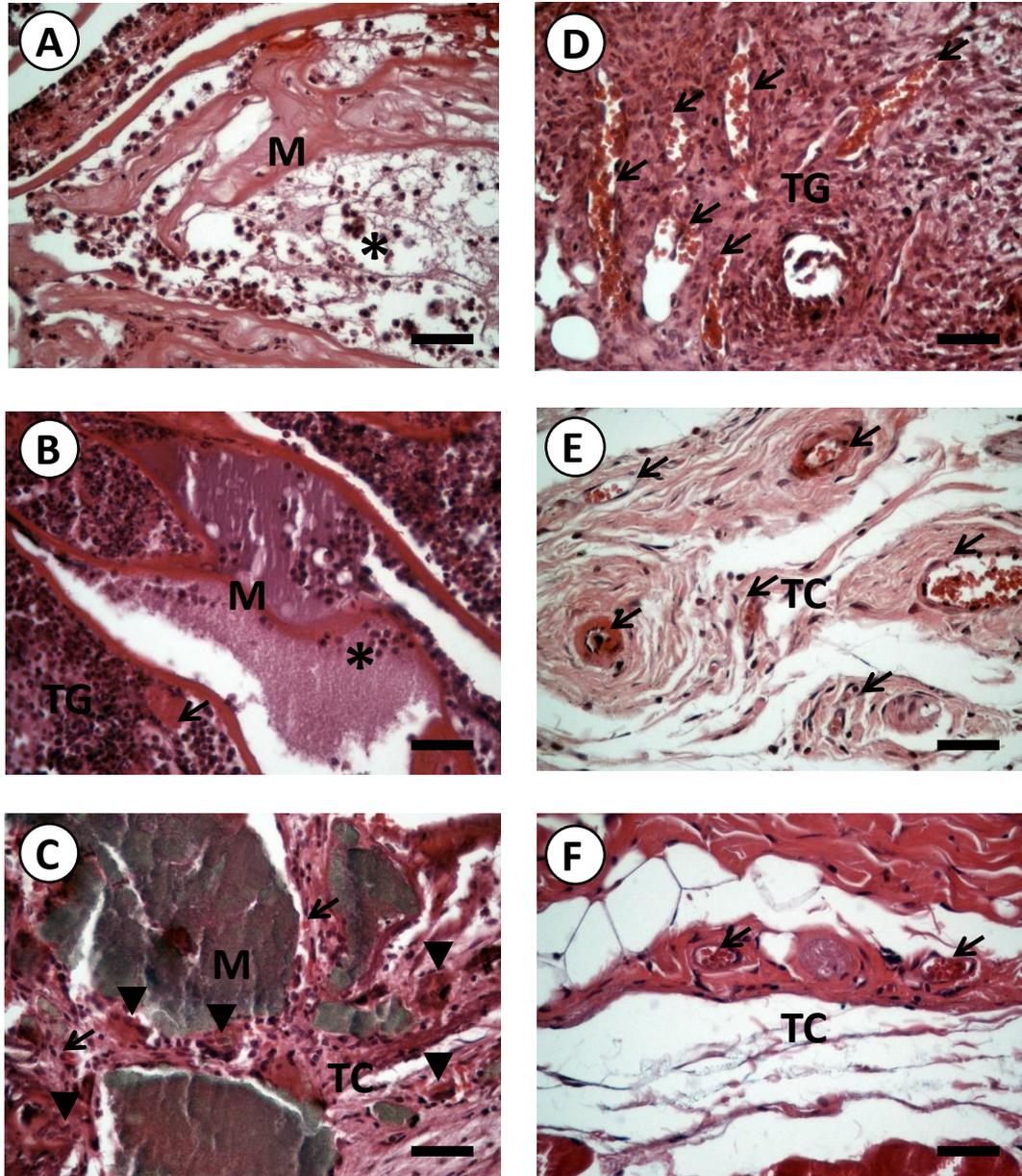
A Figura 16 (A, B e C) ilustra que G2 exibiu presença de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos e linfócitos) em 1 semana e de evidências de tecido de granulação e abundância de células gigantes em 3 e 9 semanas. A presença de fragmentos do biomaterial foi perceptível até 9 semanas. No CN (D, E e F), observou-se tecido de granulação e abundante neovascularização em 1 semana e sua substituição por tecido conjuntivo, com progressivo depósito de colágeno, em 3 e 9 semanas.

Figura 15: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G2 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou CN (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **M**: material, **TG**: tecido de granulação, **TC**: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 16: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G2 (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) ou CN (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). M: material, TG: tecido de granulação, TC: tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório (*), célula gigante (▶) e vasos sanguíneos (→). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm.



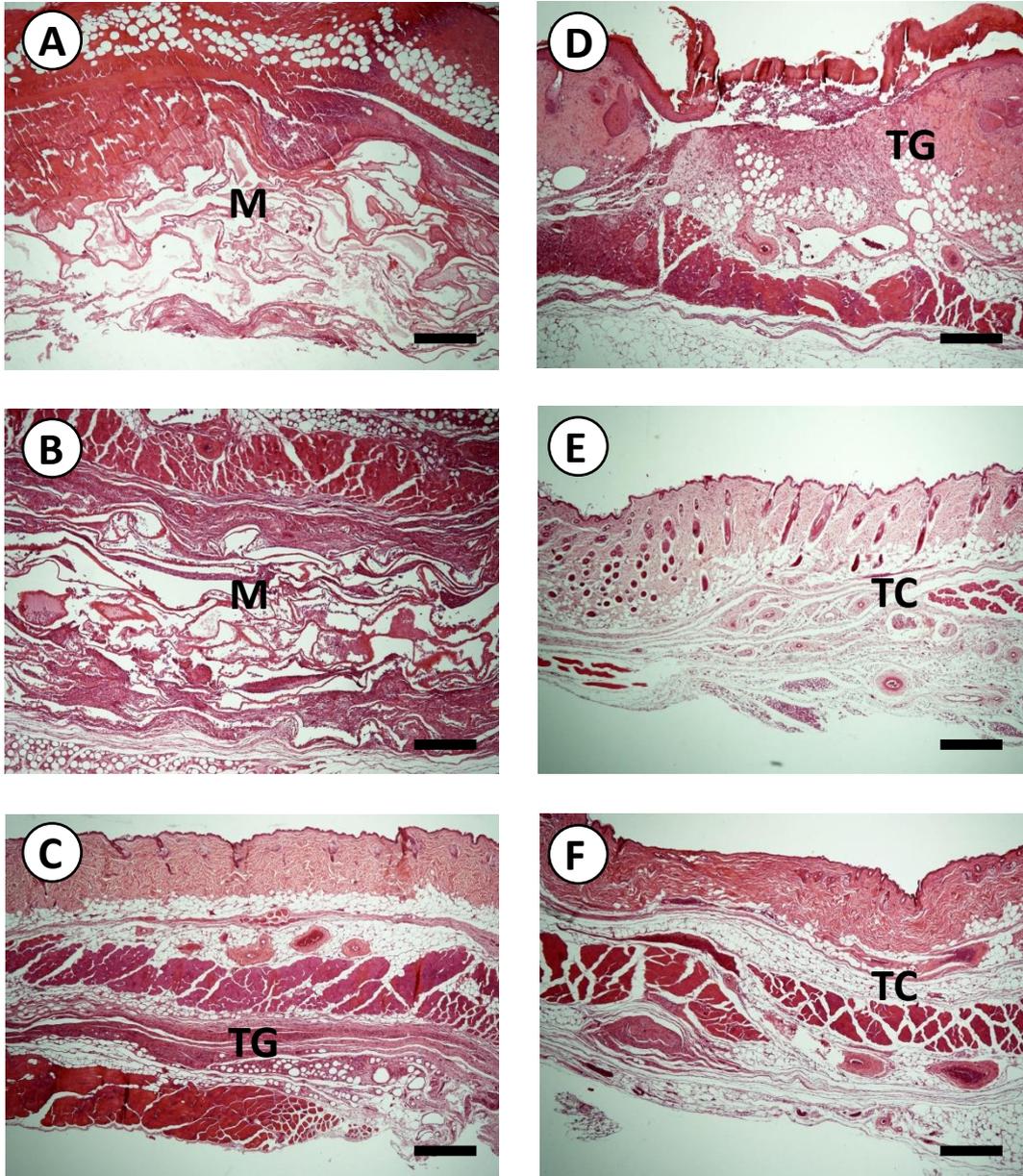
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.3 G3 (Colágeno 90% + Nanoqueratina 10%)

A Figura 17 (A, B e C) ilustra que G3 exibiu uma redução gradual do volume inicial do hidrogel de colágeno + NQ ao longo do período experimental, até seu desaparecimento em 9 semanas, notando-se a presença de tecido de granulação em substituição ao biomaterial. No CN (D, E e F), houve presença inicial de tecido de granulação em 1 semana, substituído por tecido conjuntivo em 3 e 9 semanas.

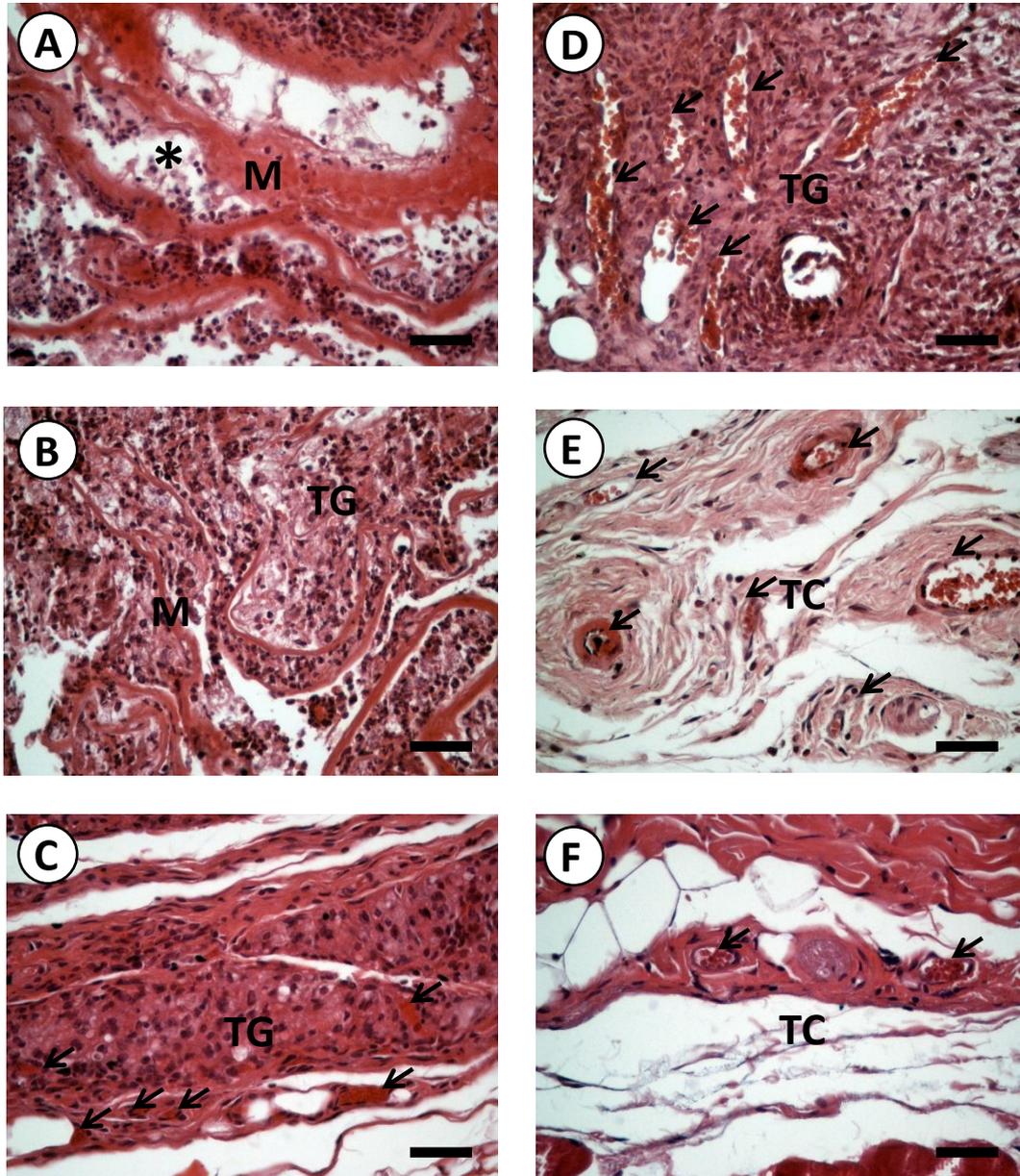
A Figura 18 (A, B e C) ilustra que G3 exibiu presença de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos e linfócitos) em 1 semana e presença de tecido de granulação em 3 e 9 semanas. A presença de fragmentos do biomaterial foi perceptível até 3 semanas. No CN (D, E e F), observou-se tecido de granulação e abundante neovascularização em 1 semana e sua substituição por tecido conjuntivo, com progressivo depósito de colágeno, em 3 e 9 semanas.

Figura 17: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G3 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou CN (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **M**: material, **TG**: tecido de granulação, **TC**: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G3 (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) ou CN (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). M: material, TG: tecido de granulação, TC: tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório (*) e vasos sanguíneos (→). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm.



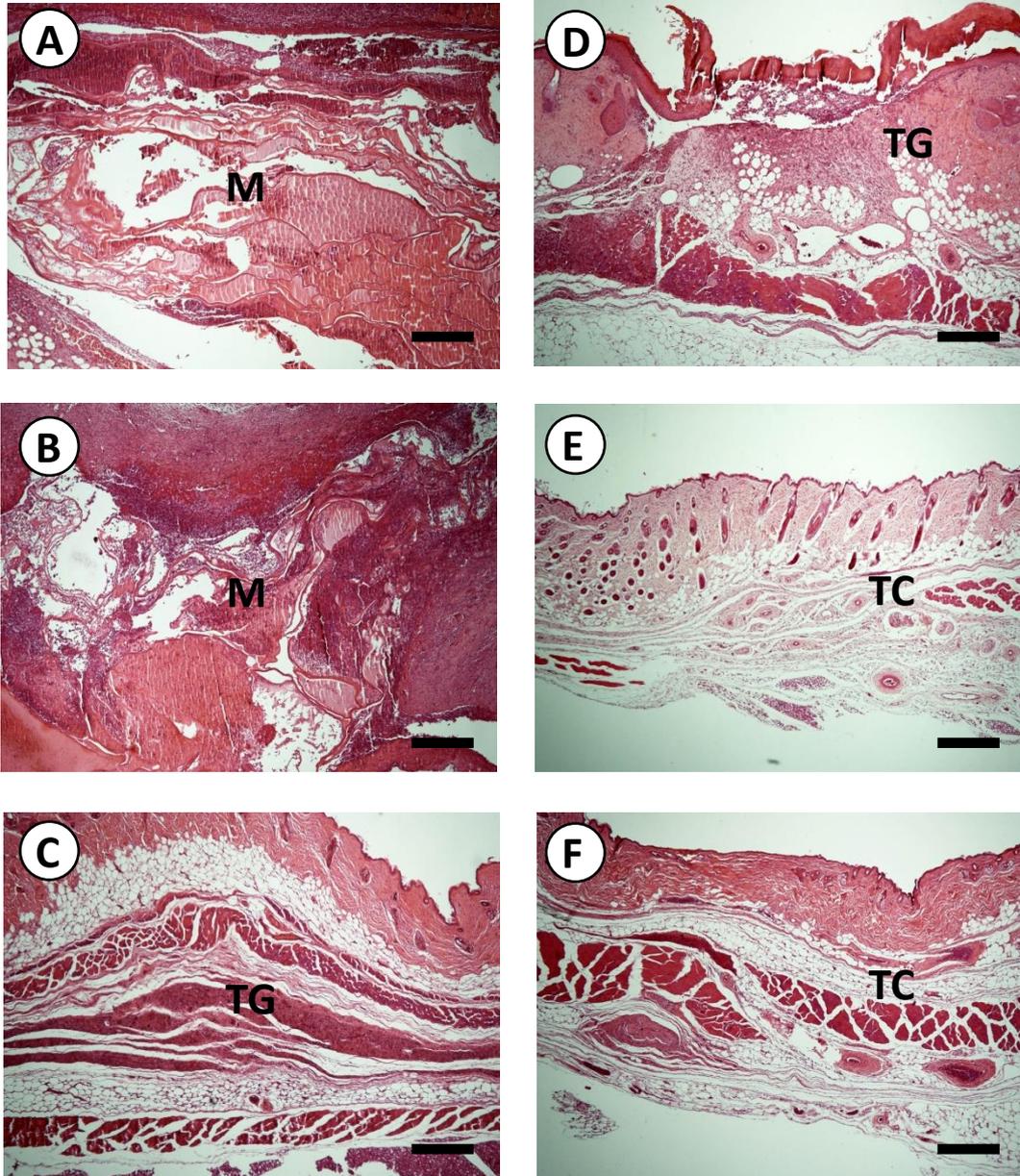
Fonte: Elaborada pela autora.

5.1.4 (Colágeno 90% + Bioapatita 5% + Nanoqueratina 5%)

A Figura 19 (A, B e C) ilustra que G4 exibiu uma redução gradual do volume inicial do hidrogel de colágeno + BA + NQ ao longo do período experimental, até seu desaparecimento em 9 semanas, notando-se a presença de tecido de granulação em substituição ao biomaterial. No CN (D, E e F), houve presença inicial de tecido de granulação em 1 semana, substituído por tecido conjuntivo em 3 e 9 semanas.

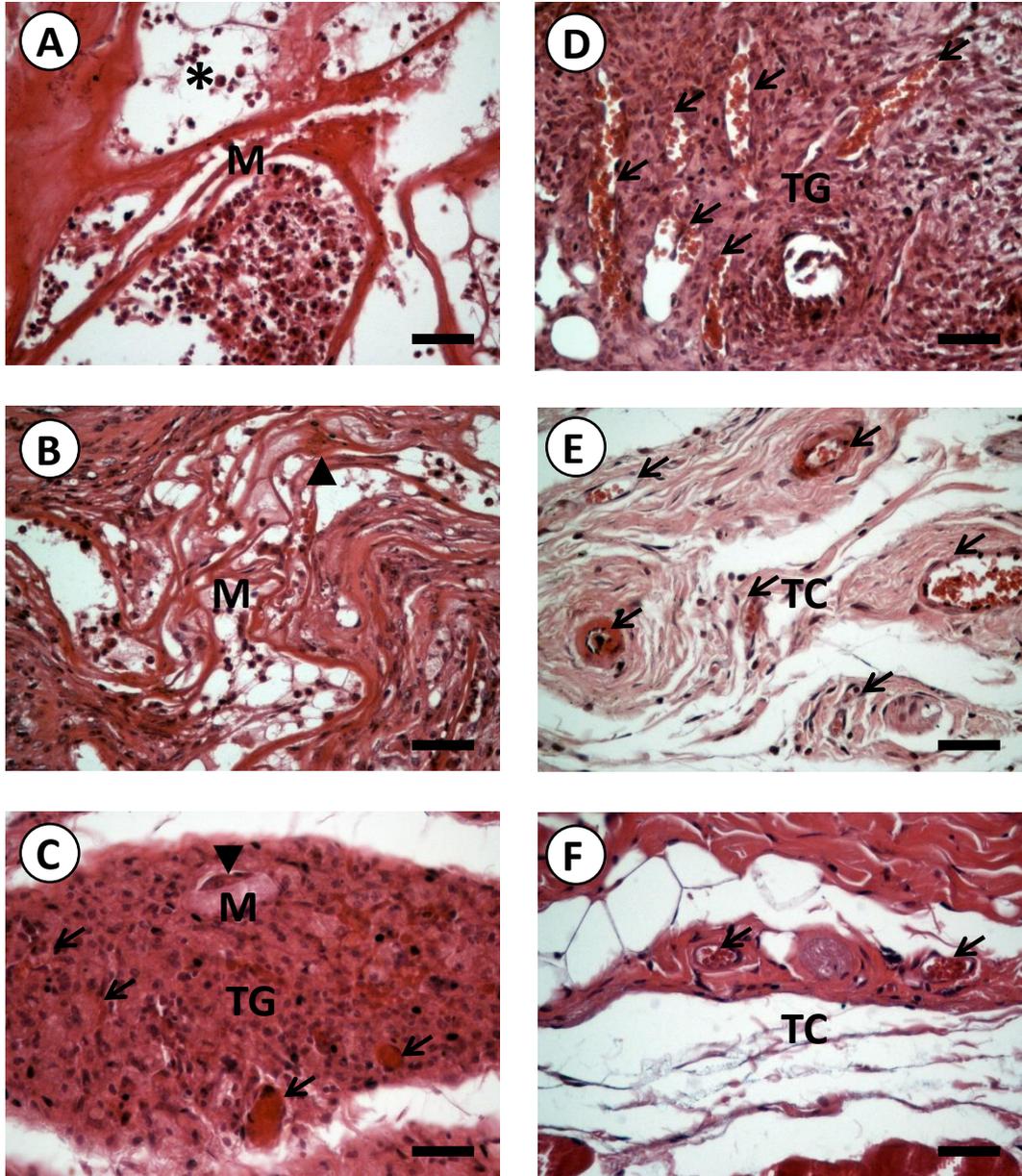
A Figura 20 (A, B e C) ilustra que G4 exibiu presença de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos e linfócitos) em 1 semana e presença de tecido de granulação e evidente neovascularização em 3 e 9 semanas. A presença de fragmentos do biomaterial foi perceptível até 3 semanas, com raros resquícios em 9 semanas. No CN (D, E e F), observou-se tecido de granulação e abundante neovascularização em 1 semana e sua substituição por tecido conjuntivo, com progressivo depósito de colágeno, em 3 e 9 semanas.

Figura 19: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G4 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou CN (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **M**: material, **TG**: tecido de granulação, **TC**: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 40x. Barra de escala: 200µm.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 20: Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos de G4 (**A**, 1 semana, **B**, 3 semanas e **C**, 9 semanas) ou CN (**D**, 1 semana, **E**, 3 semanas e **F**, 9 semanas). **M**: material, **TG**: tecido de granulação, **TC**: tecido conjuntivo, infiltrado inflamatório (*), célula gigante (▶) e vasos sanguíneos (→). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 20µm.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.2. Análise semiquantitativa da interação material/tecido

A Tabela 6 demonstra a mediana da contagem de neutrófilos para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. Os grupos G1, G3 e G4 apresentaram aumento de neutrófilos significativos ($P < 0,001$), comparados ao controle negativo na primeira semana com enxerto. Já com 3 semanas após o implante, foi verificado aumento comparado ao CN nos grupos G3 ($P < 0,001$) e G4 ($P < 0,01$). No tempo experimental de 9 semanas, verificou-se ausência dessas células.

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

	NEUTRÓFILOS				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	1 (0-3) ^a	1 (0-2)	1 (0-4) ^a	1 (0-3) ^a	0 (0-1) ^b
3 SEMANAS	0 (0-2)	0 (0-2)	1 (0-3) ^a	0 (0-2) ^a	0 (0-1) ^b
9 SEMANAS	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno: 10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina, Controle negativo (CN).

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se às diferenças entre os grupos-teste e o controle negativo.

A Tabela 7 demonstra a mediana da contagem de linfócitos para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. O grupo G3 foi o que mais apresentou aumento de linfócitos ao longo de todo o período experimental ($P < 0,01$ em 1 semana e $P < 0,001$ em 3 e 9 semanas), quando em comparação com CN. Além disso, o grupo G4 apresentou aumento significativo das contagens de linfócitos na semana 3, com $P < 0,001$ e o grupo G2, em 9 semanas, com $P < 0,05$. O G1 não apresentou diferença significativa com relação ao CN.

Tabela 7: Análise semiquantitativa da presença de linfócitos em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	LINFÓCITOS				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	1 (1-3)	1 (0-2)	2 (0-3) ^a	1 (0-3)	1 (0-1) ^b
3 SEMANAS	1 (0-2)	1 (0-3)	2 (1-3) ^a	1 (1-3) ^a	1 (0-1) ^b
9 SEMANAS	1 (0-1)	1 (0-2) ^a	1 (0-3) ^a	1 (0-3)	0 (0-1) ^b

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno: 10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina, Controle negativo (CN).

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se às diferenças entre os grupos-teste e o controle negativo.

A Tabela 8 demonstra a mediana da contagem de macrófagos para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. Embora possa-se sugerir em G2, G3 e G4 um aumento da mediana na semana 3 após a enxertia dos hidrogéis, esses resultados não foram significativos, mantendo-se constante e discreta a presença dessas células.

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

	MACRÓFAGOS				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	1 (0-2)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)
3 SEMANAS	0 (0-1)	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	0 (0-1)
9 SEMANAS	0 (0-0)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno: 10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina, Controle negativo (CN).

A Tabela 9 demonstra a mediana da contagem de células gigantes do tipo corpo estranho para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. Na análise entre os grupos experimentais e o controle negativo, o G2 apresentou maior índice de células gigantes em 3 semanas ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle. Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo controle.

Tabela 9: Análise semiquantitativa da presença de células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	CÉLULAS GIGANTES DO TIPO CORPO ESTRANHO				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)
3 SEMANAS	0 (0-1)	0 (0-2) ^a	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1) ^b
9 SEMANAS	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-2)	0 (0-1)

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno: 10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina, Controle negativo (CN).

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se às diferenças entre os grupos-teste e o controle negativo.

A Tabela 10 demonstra a mediana da quantificação da presença de neovascularização para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. Na análise entre os grupos testados e o controle negativo, verificou-se que G1 e G3 apresentaram baixa neovascularização em 1 semana ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente). Os demais grupos nos demais tempos experimentais apresentaram resultados semelhantes ao controle negativo, convergindo com um aumento gradual da neovascularização, sem diferenças significativas intergrupos.

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

	NEOVASCULARIZAÇÃO				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	0 (0-1) ^b	0 (0-2)	0 (0-2) ^b	0 (0-2)	1 (0-3) ^a
3 SEMANAS	0 (0-2)	1 (0-3)	0 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-2)
9 SEMANAS	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-2)

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno: 10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina, Controle negativo (CN).

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se às diferenças entre os grupos-teste e o controle negativo.

A Tabela 11 demonstra a mediana da quantificação da presença de tecido conjuntivo para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. Na análise entre os grupos experimentais e o controle negativo, verificou-se que houve uma menor presença de tecido conjuntivo em todos os grupos-teste na semana 1

($P < 0,001$). Nos demais tempos experimentais, os grupos apresentaram resultados semelhantes ao controle negativo, convergindo com um aumento gradual do tecido conjuntivo, sem diferenças significativas intergrupos.

Tabela 11: Análise semiquantitativa da presença de tecido conjuntivo em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	TECIDO CONJUNTIVO				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	1 (0-1) ^b	1 (0-2) ^b	0 (0-1) ^b	1 (0-1) ^b	2 (1-2) ^a
3 SEMANAS	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-3)	1 (0-2)	1 (1-2)
9 SEMANAS	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)	2 (1-3)

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno: 10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina, Controle negativo (CN).

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se às diferenças entre os grupos-teste e o controle negativo.

A Tabela 12 apresenta a resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 1 semana. A tabela elenca os critérios inflamatórios e reparatórios e atribui scores a partir do cálculo com os mesmos. Os dados foram baseados de acordo com o anexo E da ISO 10993-6 (Anexo III), a Tabela 4 e as equações 1, 2 e 3.

Tabela 12: Resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 1 semana.

Critérios	Pontuações por tempo experimental																								
	G1					G2					G3					G4					C-				
Neutrófilos	1	1	1	1	3	0	0	1	1	1	3	1	0	1	1	2	2	1	0	0	1	0	0	0	0
Linfócitos	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	2	1	1	1	2	3	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1
Células gigantes de corpo estranho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal (x2)	7,2					3,6					5,2					6,4					2,8				
Neovascularização	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	2
Fibrose	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	2	1	2	2	2
Subtotal	0,6					1,2					0,4					0,6					3,0				
Total	7,8					4,8					5,6					7,0					5,8				
Padrão de Irritação	2 Não irritante					0* Não irritante					0* Não irritante					1,2 Não irritante					-				

* Padrão de irritação negativo pontuado como zero, como recomenda a Norma ISO 10993-6 (2007).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dessa tabela, pode-se inferir que em 1 semana, todos os grupos de hidrogéis testados apresentaram um padrão de biocompatibilidade classificado como não irritante pela norma ISO 10993-6, com scores de 2 para G1, 0 para G2 e G3, e 1,2 para G4, quando subtraídas com o controle negativo.

A Tabela 13 apresenta a resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 3 semanas. A tabela elenca os critérios inflamatórios e reparatórios e atribui scores a partir do cálculo com os mesmos. Os dados foram baseados de acordo com o anexo E da ISO 10993-6 (Anexo III), a Tabela 4 e as equações 1, 2 e 3.

Tabela 13: Resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 3 semanas.

Critérios	Pontuações por tempo experimental																								
	G1					G2					G3					G4					C-				
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	0	1	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Linfócitos	1	1	1	0	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	0	0	1
Macrófagos	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Células gigantes de corpo estranho	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal (x2)	1,6					4,8					6,8					6,4					1,6				
Neovascularização	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	2	0	0	0	0	1	1	2	1	1	1	1
Fibrose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
Subtotal	1,4					1,8					1,4					1,4					2,4				
Total	3,0					6,6					8,2					7,8					4,0				
Padrão de Irritação	0*					2,6					4,2					3,8					-				
	Não irritante					Não irritante					Pouco irritante					Pouco irritante									

* Padrão de irritação negativo pontuado como zero, como recomenda a Norma ISO 10993-6 (2007).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dessa tabela, pode-se inferir que, em 3 semanas, os grupos de hidrogéis testados à base de colágeno (G1) e à base de colágeno + HA (G2) apresentaram um padrão de biocompatibilidade classificado como não irritante pela norma ISO 10993-6, com scores de 0 e 2,6, respectivamente. Já os grupos G3 e G4, com scores mais altos, se classificam em pouco irritantes, com pontuações de 4,2 e 3,8, respectivamente, quando subtraídas com o controle negativo.

A Tabela 14 apresenta a resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 9 semanas. A tabela elenca os critérios inflamatórios e reparatórios e

atribui scores a partir do cálculo com os mesmos. Os dados foram baseados de acordo com o anexo E da ISO 10993-6 (Anexo III), a Tabela 4 e as equações 1, 2 e 3.

Tabela 14: Resposta da avaliação semiquantitativa da biocompatibilidade de materiais implantados em tecido subcutâneo de camundongos para o tempo experimental de 9 semanas.

Critérios	Pontuações por tempo experimental																												
	G1					G2					G3					G4					C-								
Neutrófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfócitos	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	2	1	2	2	1	1	0	0	1	0	0	1	1
Macrófagos	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células gigantes de corpo estranho	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subtotal (x2)	1,2					3,2					3,2					3,6					1,2								
Neovascularização	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fibrose	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2
Subtotal	1,8					2,2					2,6					2,8					2,8								
Total	3,0					5,4					5,8					6,4					4,0								
Padrão de Irritação	0*					1,4					1,8					2,4					-								
	Não irritante					Não irritante					Não irritante					Não irritante													

* Padrão de irritação negativo pontuado como zero, como recomenda a Norma ISO 10993-6 (2007).

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dessa tabela, pode-se inferir que em 9 semanas, todos os grupos de hidrogéis testados apresentaram um padrão de biocompatibilidade, classificado como não irritante pela norma ISO 10993-6, com scores de 0 para G1, 1,4 para G2, 1,8 para G3 e 2,4 para G4, quando subtraídas do controle negativo.

A Tabela 15 demonstra a mediana da quantificação da presença de material enxertado para todos os grupos (G1 a G4 e CN) nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas pós-enxerto. Na análise entre os grupos testados e o controle negativo, verificou-se que todos os grupos experimentais em 1 e 3 semanas apresentaram quantidades significativas de

biomaterial ($P < 0,001$) em relação ao controle. Em uma análise entre as semanas experimentais, onde se avaliou a degradação do biomaterial em um dado grupo ao longo das condições experimentais, constatou-se que nos grupos G1, G2, G3 e G4 mantiveram presença parcial do hidrogel nas semanas 1 e 3, e que apenas em G2 foi verificado a presença significativa do biomaterial mesmo após as 9 semanas de experimento ($P < 0,001$), embora em quantidade reduzida.

Tabela 15: Análise semiquantitativa da presença de material enxertado em tecido subcutâneo de camundongos nos diferentes grupos *versus* controle ao longo do período experimental. Mediana das pontuações (valor mínimo-valor máximo), 25 campos por condição.

	PRESENÇA DE MATERIAL ENXERTADO				
	G1	G2	G3	G4	CN
1 SEMANA	3 (1-4) ^{A,a}	2 (0-3) ^a	2 (1-3) ^{A,a}	2 (1-3) ^{A,a}	0 (0-0) ^b
3 SEMANAS	2 (0-3) ^{A,a}	2 (1-3) ^a	2 (0-3) ^{A,a}	2 (0-3) ^{A,a}	0 (0-0) ^b
9 SEMANAS	0 (0-1) ^B	1 (0-3) ^a	1 (0-1) ^B	0 (0-2) ^B	0 (0-0) ^b

Legenda: 100% colágeno avícola (G1), 90% colágeno:10% bioapatita (G2), 90% colágeno:10% nanoqueratina (G3), 90% colágeno:5% bioapatita:5% nanoqueratina. Controle negativo (sem tratamento) para os grupos experimentais.

^{A,B} Sobrescritos maiúsculos referem-se às diferenças entre as semanas dentro de cada grupo testado

^{a,b} Sobrescritos minúsculos referem-se às diferenças entre os grupos-teste e o controle negativo.

6 DISCUSSÃO

A literatura científica mostra diferentes classes de biomateriais testados em tecido subcutâneo para determinação de sua biocompatibilidade e, em alguns casos, sua biodegradabilidade: biomateriais cerâmicos (BARROS et al., 2012; BITTENCOURT et al., 2014; GIORNO et al., 2014; SHIMIZU et al., 2014), poliméricos (AL-MAAWI et al., 2018; ANDRADE et al., 2011; CORRADETTI et al., 2017; DOLOFF et al., 2017; GASQUE et al., 2008; GASQUE et al., 2011; HOORNAERT et al., 2016; JARDELINO et al., 2012; KORZINSKAS et al., 2018; WANG et al., 2017), metais e biovidros (LIMA et al., 2011).

O presente estudo converge com a fenomenologia biológica pós-enxerto encontrada nos estudos temáticos, que em geral apontam que biomateriais podem eliciar respostas inflamatórias em modelo murino de intensidade moderada entre 1 semana (AL-MAAWI et al., 2018; ANDRADE et al., 2011; CORRADETTI et al., 2017; GASQUE et al., 2011; LIMA et al., 2011; SENA et al., 2014; WANG et al., 2017) e 3 semanas (CESTARI et al., 2010; GASQUE et al., 2011; GIORNO et al., 2014; JARDELINO et al., 2012; KORZINSKAS et al., 2018; LIMA et al., 2010a), praticamente desaparecendo depois desse período (AL-MAAWI et al., 2018; CORRADETTI et al., 2017; FERNANDES et al., 2010; JARDELINO et al., 2010; LIMA et al., 2011; MINOTTI et al., 2015; SENA et al., 2014; SICCA et al., 2000; ZAMBUZZI et al., 2006a).

A presença dos neutrófilos foi mais significativa durante a primeira semana nos grupos G1, G3 e G4 neste estudo. Isso justifica-se, pois os neutrófilos são células presentes na inflamação aguda, que após injúria e extravasamento dos vasos, migram do sangue para o local da implantação e são considerados a primeira linha de defesa do organismo (FRANZ et al., 2011).

Interessantemente, a persistência de índices elevados de neutrófilos em G3 e G4 em 3 semanas no presente estudo poderia estar relacionada à nanoqueratina, pois a literatura aponta que em materiais poliméricos esse tipo de resposta inflamatória aguda pode ser mais acentuada (ANDRADE et al., 2011; BRITO et al., 2009; GASQUE et al., 2008; JANUNE et al., 2006; JARDELINO et al., 2012; LIMA et al., 2010a; SANTANA et al., 2009).

Necrose é um achado negativo em termos de biocompatibilidade, encontrada em agregado trióxido mineral (MORETTON et al., 2000) ou pasta de hidróxido de cálcio (SHIMIZU et al., 2014). Esses achados destoam dos resultados obtidos nessa pesquisa, pois morte celular extensiva não foi encontrada em nenhuma das condições experimentais testadas. Por este motivo, não foi contabilizado nesse estudo, embora seja um dos critérios presentes no

sistema de avaliação semiquantitativo de biocompatibilidade, descrito na ISO 10993-6 (Anexo III).

A presença de linfócitos está associada à inflamação crônica, sendo fundamentais na ativação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, são células que diferenciam em plasmócitos capazes de liberarem anticorpos e agir diretamente sobre um corpo estranho (VISHWAKARMA et al., 2016). Os achados do experimento demonstram que os linfócitos estiveram aumentados em todos os tempos experimentais em G3. Além disso, houve aumento significativo de linfócitos em G4 em 3 semanas e G2 em 9 semanas.

O perfil linfocitário ou inflamatório crônico é mais prevalente após os primeiros dias de enxertia (AL-MAAWI et al., 2018; BRITO et al., 2009; JARDELINO et al., 2012; LIMA et al., 2010a; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006). Porém, é possível encontrar linfócitos mesmo após o intervalo de 3 semanas (BRITO et al., 2009; JARDELINO et al., 2009; JARDELINO et al., 2012; LIMA et al., 2010a) e 9 semanas (JARDELINO et al., 2009; JARDELINO et al., 2012). Esses achados confirmam com os dados do presente estudo, onde se notou a presença discreta de linfócitos ainda em 9 semanas. A ausência de perfil leucocitário é rara e mais associada à presença de biocerâmicas (CESTARI et al., 2010; BITTENCOURT et al., 2014).

Os macrófagos são encontrados, principalmente, em materiais da classe dos polímeros (AL-MAAWI et al., 2018; CORRADETTI et al., 2017; DOLOFF et al., 2017; GASQUE et al., 2008; GASQUE et al., 2011; HOORNAERT et al., 2016; JARDELINO et al., 2010; KORZINSKAS et al., 2018), mas podem também ser encontrados nos materiais da classe das cerâmicas (GIORNO et al., 2014; LOMELINO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 1993). Embora os dados desse estudo não tenham apontado diferença significativa intergrupos em relação aos macrófagos, houve prevalência dessas células na semana 3, nos grupos G2, G3 e G4. Esses dados convergem com outros estudos envolvendo biocompatibilidade e biodegradabilidade, que demonstram serem os macrófagos, células ricas em lisossomos e com capacidade de fagocitar corpos estranhos, bem como liberar citocinas e fatores de crescimento envolvidos com regeneração tecidual, o que explicaria o gradativo desaparecimento de biomateriais implantados (FRANZ et al., 2011; GIORNO et al., 2014; JARDELINO et al., 2010; LIMA et al., 2010a; ZAMBUZZI et al., 2016a).

Dependendo do agente causador da inflamação, o grau de fagocitose dos macrófagos não é o suficiente. Desta forma, estes podem, eventualmente, fundir-se e formar o que se chama de células gigantes do tipo corpo estranho, com maior capacidade fagocitária.

Essas células são particularmente importantes, pois, além disso, estão associadas ao reparo tecidual (AL-MAAWI et al., 2017).

As células gigantes do tipo corpo estranho são mais encontradas em resposta a materiais cerâmicos de grandes dimensões (BITTENCOURT et al., 2014; FERNANDES et al., 2010; JARDELINO et al., 2009; LIMA et al., 2010b; LOMELINO et al., 2011; MINOTTI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 1993; ZAMBUZZI et al., 2009), embora também seja possível observar sua presença nos materiais poliméricos (AL-MAAWI et al., 2018; HOORNAERT et al., 2016) e biovidros (LIMA et al., 2011). Os achados dessa pesquisa apontaram um aumento significativo de células gigantes para G2 em 3 semanas, quando comparado ao CN, dessa forma apresentando a bioapatita avícola resposta similar às biocerâmicas encontradas na literatura.

A neovascularização é etapa fundamental no reparo, pois os novos vasos formados vão garantir o aporte de nutrientes e oxigênio aos tecidos. Sua regulação é baseada em numerosos fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, componentes da matriz extracelular, moléculas de adesão celular e fatores vasoativos. Uma angiogênese inadequada, limita transporte de sangue entre a microvasculatura e os biomateriais implantados que poderá resultar em isquemia local e potencialmente levar a uma necrose (MODULEVSKY; CUERRIER; PELLING, 2016; RICKERT et al., 2003). O presente estudo apontou que apenas no tempo experimental de 1 semana houve baixa quantidade de vasos sanguíneos em relação ao CN, ou seja, nos demais tempos de experimento, nas semanas 3 e 9, a quantidade de vasos sanguíneos foi semelhante ao controle negativo. Esses dados poderiam inferir um potencial pró-angiogênico dos hidrogéis testados e sugerir a explicação do porquê de não ter sido observada necrose dos tecidos ao longo do período experimental.

A formação de vasos sanguíneos é aparente em diversos biomateriais em tempos de implantação semelhantes (ANDRADE et al., 2011; CORRADETTI et al., 2017; FERNANDES et al., 2010; JANUNE et al., 2006; JARDELINO et al., 2012; KORZINSKAS et al., 2018; LIMA et al., 2011; MINOTTI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006; SICCA et al., 2000; WANG et al., 2017). Dessa forma, os presentes resultados de neovascularização em todos os grupos de hidrogéis convergem com a literatura.

Um bom resultado de biocompatibilidade após a aplicação biomédica de biomateriais depende de uma cicatrização bem-sucedida de feridas. A cicatrização é um processo altamente complexo, composto por várias fases sobrepostas, que incluem inflamação, angiogênese e deposição de matriz (RICKERT et al., 2003). O tecido de granulação formado é uma fase mista de inflamação e reparo, que pode estar mais persistente nos materiais do tipo

cerâmicas (GIORNO et al., 2014; SHIMIZU et al., 2014; ZAMBUZZI et al. 2006a) e polímeros (BRITO et al., 2009; HOORNAERT et al., 2016; JARDELINO et al., 2010).

A nova colagenização e vascularização do tecido pós-enxerto são fundamentais para garantir o reparo do tecido conjuntivo lesionado e foram observados em diversas pesquisas (AL-MAAWI et al., 2018; CORRADETTI et al., 2017; FERNANDES et al., 2010; JARDELINO et al., 2012; KORZINSKAS et al., 2018; LIMA et al., 2010a; LIMA et al., 2010b; LIMA et al., 2011; MINOTTI et al., 2015; WANG et al., 2017).

A presente pesquisa apontou que apenas no tempo experimental de 1 semana houve baixa presença de tecido conjuntivo em relação ao controle negativo, isto é, nos tempos experimentais de 3 e 9 semanas, a quantidade da presença de tecido conjuntivo se assemelha ao CN. Esses dados demonstram que no decorrer do período experimental, houve incremento gradual de tecido conjuntivo, possivelmente devido à biodegradação observada para cada biomaterial testado.

A biodegradabilidade de um biomaterial pode variar de acordo com diferentes parâmetros: classe do biomaterial, tamanho, processamento ou tratamento durante sua formulação, constituição química, entre outros (SONI et al., 2010). Em relação à classe, as cerâmicas exibem menor degradabilidade do material em relação ao tempo (BARROS et al., 2012; BITTENCOURT et al., 2014; CESTARI et al., 2010; GIORNO et al., 2014; JARDELINO et al., 2009; LIMA et al., 2010b; LOMELINO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 1993; ZAMBUZZI et al. 2009), já os materiais poliméricos sofrem maior biodegradação ao longo do período experimental (CORRADETTI et al., 2017; GASQUE et al., 2008; GASQUE et al., 2011; JARDELINO et al., 2010; JARDELINO et al., 2012; SANTANA et al., 2009; WANG et al., 2017).

Há poucos relatos de biomateriais poliméricos que mantêm por 9 semanas ou mais tempo sua integridade em tecido subcutâneo murino (AL-MAAWI et al., 2018; BRITO et al., 2009; HOORNAERT et al., 2016; KORZINSKAS et al., 2018), embora o padrão de degradação parcial ou total ocorra em 3 semanas (CORRADETTI et al., 2017; GASQUE et al., 2008; GASQUE et al., 2011; JARDELINO et al., 2010; SANTANA et al., 2009) ou até mesmo em 1 semana (LIMA et al., 2010a; WANG et al., 2017).

Os dados da presente pesquisa apontam que todos os hidrogéis testados, nos tempos experimentais de 1 e 3 semanas apresentaram quantidades significativas de biomaterial em relação ao controle. Quando avaliou-se a presença dos hidrogéis na semana 9, apenas o G2 apresentou números significativos em relação ao CN. Dentro desse cenário, os achados dessa pesquisa convergem que, embora todos os materiais tenham sido biocompatíveis, o material

que mais apresentaria perfil de desenvolvimento como membrana é o G2, dada sua mais prolongada permanência.

Na ISO 10993-6, em seu anexo E, também cita-se a infiltração gordurosa como um dos critérios sugeridos para a avaliação semiquantitativa de biocompatibilidade. Este parâmetro, assim como a presença de necrose, não foi utilizado na presente pesquisa e se justifica pelo fato do tecido subcutâneo ser um ambiente *in situ* já apropriadamente rico em células adiposas de hipoderme e por ser critério infrequente de análise na literatura temática de biomateriais, conforme demonstram as referências temáticas consultadas para este estudo.

7 CONCLUSÃO

A maioria dos hidrogéis testados, à base de subprodutos provenientes da indústria avícola, apresentaram biocompatibilidade ou não irritação segundo a norma ISO 10993-6 em todos os tempos experimentais. Os grupos G3 e G4 apresentaram grau de irritação leve apenas na semana 3, sugerindo associação deste fenômeno à presença de nanoqueratina.

Todos os hidrogéis testados apresentaram biodegradação ao longo do período experimental, onde a presença do biomaterial foi decrescendo ao longo das semanas, sendo ausente em G1, G3 e G4 e ainda presente em G2 em 9 semanas, sugerindo associação deste último fenômeno à presença de bioapatita.

A resposta biológica apresentada em G2, incluindo biocompatibilidade satisfatória e biodegradabilidade moderada, apontam esse grupo como o biomaterial com potencial biotecnológico promissor para futuras aplicações como membranas para terapias de regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS

ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental Clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205-216, 2006.

AKRAM, M. et al. Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. **Journal of Materials Science**, v. 49, n. 4, p. 1461-1475, 2013.

AL-MAAWI, S. et al. In vivo cellular reactions to different biomaterials - Physiological and pathological aspects and their consequences. **Seminars in Immunology**, v. 29, p. 49-61, 2017.

AL-MAAWI, S. et al. In vivo Implantation of a bovine-derived collagen membrane leads to changes in the physiological cellular pattern of wound healing by the induction of multinucleated giant cells: an adverse reaction? **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 6, n. 104, p. 1-13, 2018.

AMINI-NIK, S. et al. Ultrafast mid-IR laser scalpel: protein signals of the fundamental limits to minimally invasive surgery. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. 1-6, 2010.

ANDERSON, J. M. Biocompatibility and bioresponse to biomaterials, p. 693-716. In: ATALA, A. et al. **Principles of Regenerative Medicine**. 2. ed. Elsevier Inc., 2010.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.

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

BARROS, E. et al. In vivo and in vitro biocompatibility study of nanostructured carbonateapatite. **Key Engineering Materials**, v. 493-494, p. 247-251, 2012.

BERGMANN, C. P.; STUMPF, A. **Dental ceramics: microstructure, properties and degradation**. 1. ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013.

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.

BOANINA, E.; GAZZANOB, M.; BIGI, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 1882-1894, 2010.

BORELLI, V. et al. **Biocompatibilidade de biomateriais: estudo exploratório sobre a aplicação da norma ISO 10.993**. In: 6th Latin American Congress of Artificial Organs and Biomaterials, 2010. Disponível em: <https://www.ipen.br/biblioteca/2010/eventos/16145.pdf>. Acesso em: 19 de fev. 2018.

BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n.4, p. 1401-1421, 2012.

BRANNIGAN, R. P.; DOVE, A. P. Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 1, p. 9-21, 2016.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 15**. Publicada no Diário Oficial da União Nº 211, Seção 1, páginas 78-82, 2003.

BRASIL. Decreto Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/2008/lei-11794-8-outubro-2008-581883-publicacaooriginal-104628-pl.html>. Acesso em: 19 out. 2016.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 598, de 25 de junho de 2013. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, nº 121, 26 de junho de 2013. Seção 1, p. 13-15, 2013.

BRITO, M. K. M. et al. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 1, p. 35-40, 2009.

CAJUEIRO, R. L. P. **Manual para elaboração de trabalhos acadêmicos – guia prático do estudante**. 1. ed. Petrópolis: Editora Vozes, 2012.

CALABRESE, G. et al. Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation *in vitro*. **Plos One**, v. 11, n. 3, 2016.

CAMPOS, A. **A indústria de frangos no Brasil**. Repórter Brasil, 2016. Disponível em: http://reporterbrasil.org.br/wp-content/uploads/2016/07/Monitor2_PT.pdf. Acesso em: 10 de jan. 2018.

CAMPOS, D. M.; ANSELME, K. A.; SOARES, G. D. A. *In vitro* biological evaluation of 3-d hydroxyapatite/collagen (50/50 wt. (%)) scaffolds. **Materials Research**, v. 15, n. 1, 2011.

CAO, Y.; WANG, B. Biodegradation of silk biomaterials. **International Journal of Molecular Science**, v. 10, n. 4, p. 1514-1524, 2009

CASTRO-SILVA, I. I. et al. Biotechnological potential of by-products of the Brazilian animal protein industry in the generation of xenogeneic biomaterials for bone regeneration. **Trends in Research**, v. 1, n. 3, p. 1-2, 2018.

CASTRO-SILVA, I. I.; ZAMBUZZI, W. F.; GRANJEIRO, J. M. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. **Innovations Implant Journal**, v. 4, n. 3, p. 70-75, 2009.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 2. vol. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

CAVALCANTE, F. L. **Preparo de hidrogéis neutros de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de sub-produtos da indústria avícola**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CESTARI, T. M. et al. Biocompatibility evaluation of a new bioresorbable pin for membrane fixation. **Brazilian Dental Journal**, v. 21, n. 6, p. 482-490, 2010.

CHAUDHARI, A. A. et al. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 2016.

CHEN, Y. et al. In vitro biocompatibility and osteoblast differentiation of an injectable chitosan/nano-hydroxyapatite/collagen scaffold. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, n. 1, p. 1-6, 2012.

CHUAH, Y. J. et al. Hydrogel based cartilaginous tissue regeneration: recent insights and technologies. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 4, p. 613-631, 2017.

CORRADETTI, B. et al. Immune tuning scaffold for the local induction of a pro-regenerative environment. **Scientific Reports**, v. 7, n. 17030, p. 1-13, 2017.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita: obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4, n. 3, p. 29-38, 2009.

COSTA, M. M.; QUEIROZ, P. R. M. Bioengenharia de tecido epitelial e cartilaginoso. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 11, n. 2, p. 107-119, 2013.

DALCONI, M. C. et al. Structure of bioapatite in human foetal bones: An X-ray diffraction study. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 200, p. 406-410, 2003.

DAVIDENKO, N. et al. Selecting the correct cellular model for assessing of the biological response of collagen-based biomaterials. **Acta Biomaterialia**, v. 65, n. 1, p. 88-101, 2018.

DELUSTRO, F. et al. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 20, n. 1, p. 109-120, 1986.

DOLOFF, J. C. et al. Colony stimulating factor-1 receptor is a central component of the foreign body response to biomaterial implants in rodents and non-human primates. **Nature Materials**, v. 16, n. 6, p. 671-680, 2017.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, 2003.

DURAINÉ, G.; HU, J.; ATHANASIOU, K. Bioengineering in the oral cavity: insights from articular cartilage tissue engineering. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 26, p. 11-24, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, **Embrapa suínos e aves**, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 10 de jan. 2018.

ENGLER, A. J. et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 677-687, 2006.

FAROKHI, M. et al. Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 68-91, 2017.

FERNANDES, G. V. O. et al. Procedimentos normatizados para a caracterização de biomateriais. Sulfato de cálcio como estudo de caso. **Revista implantnews**, v.7, n. 3, p. 45-53, 2010.

FISH, E. R. **Anaesthesia and Analgesia for Laboratory Animals**. 2. ed. Oxford: Elsevier, 2008.

FLECKNELL, P. **Laboratory Animal Anaesthesia**. 3. ed. Elsevier, 2009.

FRANZ, S. et al. Immune responses to implants: a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, v. 32, n. 28, p. 6692-6709, 2011.

GARGIULO, S. et al. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. **ILAR Journal**, v. 53, n. 1, p. 55-69, 2012.

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.

HA, T. L. B. et al. Naturally derived biomaterials: preparation and application. In: ANDRADES, J. A. **Regenerative Medicine and Tissue Engineering**. 1. ed. 2013.

HAMPSHIRE, V. A.; GILBERT, S. H. Refinement, reduction, and replacement (3R): strategies in preclinical testing of medical devices. **Toxicologic Pathology**, 2018. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/0192623318797289?ai=1gvoi&mi=3ricys&af=R#articleCitationDownloadContainer>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

HILL, P.; BRANTLEY, H.; DYKE, M. V. Some properties of keratin biomaterials: kerateines. **Biomaterials**, v. 31, n. 4, p. 585-593, 2010.

INTERNATIONAL STANDARDS ORGANIZATION, Part 6: Tests for local effects after implantations. In: **Biological Evaluation of Medical Devices**. 2. ed. Switzerland, 2007.

IVANOVA, E.P.; BAZAKA, K.; CRAWFORD, R.J. Natural polymer biomaterials: advanced applications. In: IVANOVA, E.P.; BAZAKA, K.; CRAWFORD, R.J. **New Functional Biomaterials for Medicine and Healthcare**. 1. ed. Elsevier, 2013.

JANUNE, D.D.J. et al. Avaliação da resposta tecidual ao implante de osso bovino misto medular em subcutâneo de ratos. **Innovations Implant Journal**, v. 1, n 1 p 21-27, 2006.

JARDELINO, C. et al. Biocompatibility analysis of a novel reabsorbable alloplastic membrane composed of alginate-Capsul. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 60, n. 4, p. 419-423, 2012.

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

JARDELINO, C.L. et al. Biocompatibility of bovine anorganic xenograft. **Key Engineering Materials**, v. 396-398, p. 3-6, 2009.

JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.

JOOSTEN, E. A.; VELDHUIS, W. B.; HAMERS, F. P. Collagen containing neonatal astrocytes stimulates regrowth of injured fibers and promotes modest locomotor recovery after spinal cord injury. **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 1, p. 127-142, 2004.

KEAN, C. O.; BROWN, R. J.; CHAPMAN, J. The role of biomaterials in the treatment of meniscal tears. **Peer J**, v. 5, p. 1-26, 2017.

KELLNER, J. C.; COULOMBE, P. A. Keratins and protein synthesis: the plot thickens. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 2, p. 157-159, 2009.

KIKUCHI, M. et al. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo. **Biomaterials**, v. 22, n. 13, p. 1705-1711, 2001.

KILIÇ, N.; HENKE, J. Comparative studies on the effect of S(+)-ketamine medetomidine and racemic ketamine-medetomidine in mouse. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 15, n. 1-2, p. 15-17, 2004.

KIM, Y. K. et al. Modification of biomaterials with a self protein inhibits the macrophage response. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 7, p. 989-994, 2014.

KLEINER, L.W.; WRIGHT, J.C.; WANG, Y. Evolution of implantable and insertable drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 181, n.1, p.1-10, 2014.

KOHANE, D. S.; LANGER, R. Biocompatibility and drug delivery systems. **Chemical Science**, v. 1, n.4, p. 441-446, 2010.

KORZINSKAS, T. et al. In Vivo Analysis of the biocompatibility and macrophage response of a non-resorbable PTFE membrane for guided bone regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 1-12, 2018.

KRUGER, P. et al. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 3, 2015.

KUMAR, V. A. et al. A nanostructured synthetic collagen mimic for hemostasis. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 4, p. 1484-1490, 2014.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, n. 1-2, p. 1-22, 2001.

LEV, R.; SELIKTAR, D. Hydrogel biomaterials and their therapeutic potential for muscle injuries and muscular dystrophies. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 138, 2018.

LIMA, C.J. et al. Análise histológica de uma membrana colágena de submucosa intestinal suína. **Revista Implantnews**, v. 7, n. 4, p. 515-520, 2010a.

LIMA, C.J. et al. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. **Revista Matéria**, v. 16, n. 1, p. 574 – 582, 2011.

LIMA, I.R. et al. Evaluation of the *in vivo* biocompatibility of hydroxyapatite granules incorporated with zinc ions. **Materials Research**, v. 13, n. 4, p. 563-568, 2010b.

LODISH, H. et al. Collagen: The fibrous proteins of the matrix. In: LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 4. ed. New York, 2000.

LOMELINO, R.O. et al. The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (bTCP/HA 70:30) granules increases bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 3, p. 781-788, 2012.

MINOTTI, P.G. et al. Rat subcutaneous tissue response to calcium silicate containing different arsenic concentrations. **Journal of Applied Oral Science**, v. 23, n. 1, p. 42-48, 2015.

MODULEVSKY, D. J.; CUERRIER, C. M.; PELLING, A. E. Biocompatibility of subcutaneously implanted plant-derived cellulose biomaterials. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. 1-19, 2016.

MOLL, R.; DIVO, M.; LANGBEIN, L. The human keratins: biology and pathology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, n. 6, p. 705-733, 2008.

MORETTON, T. R. et al. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 52, n. 3, p. 528-533, 2000.

MURRAY, M. J. Euthanasia. In: LEWBART, G. A. **Invertebrate Medicine**. 1. ed. Ames IA: Blackwell Publishing, 2006.

MURRAY, P. E., GODOY, C.G., GODOY, F. F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 12, n. 3, p. 258-266, 2007.

NAAHIDI, S. et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 5, p. 530-544, 2017.

NEVES, S. M. P.; MANCINI FILHO, J.; MENEZES, E. W. **Manual de cuidados e procedimentos com animais de laboratório do biotério de produção e experimentação da FCF-IQ/USP**. 1. ed. São Paulo: FCF-IQ/USP, 2013.

OLIVEIRA, D.T. et al. Hidroxiapatita microgranular: comportamento biológico em tecido subcutâneo de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 22, n. 2, p. 197-202, 1993.

OLIVEIRA, R. C. et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. **Revista FOB**, v. 7, n 3/4, p. 85-93, 1999.

OLIVEIRA, R. C. et al. Marcadores bioquímicos e microscópicos como ferramentas investigativas da resposta tecidual envolvidas com a associação de osso cortical bovino/colágeno em subcutâneo de ratos. **Innovations Implant Journal - Biomaterials and esthetics**. v. 3, n. 6, p. 17-22, 2008.

OLIVEIRA, R.C. et al. Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo de enxerto xenógeno. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 38, n. 9, p. 551-560, 2003.

OLIVEIRA, R.C. et al. Dynamics of subcutaneous tissue response to the implantation of tetracycline-treated or untreated membrane of demineralized bovine cortical bone in rats. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 21, p. 167-177, 2006.

OLIVEIRA, R.C. et al. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 15, n. 1, p. 3-8, 2004.

ÖZYOL, P.; ÖZYOL, E.; KAREL, F. Biocompatibility of intraocular lenses. **Turkish Journal of Ophthalmology**, v. 47, n. 4, p. 221-225, 2017.

PINTO, L. A. M. et al. Aspectos ambientais do abate de aves: uma revisão. **Revista UNINGÁ**, v. 22, n. 3, p. 44-50, 2015.

RAMESH, N.; MORATTI, S. C.; DIAS, G. J. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. **Journal of Biomedical Materials Research**, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28650094>> Acesso em: 23 de nov. 2017.

RICKERT, D. et al., The importance of angiogenesis in the interaction between polymeric biomaterials and surrounding tissue. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 28, n. 3, p. 175-181, 2003.

RIVERA-MUÑOZ, E. M. Hydroxyapatite-Based Materials: Synthesis and Characterization. In: Fazel-Rezai, R. **Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges**. 1. ed. 2011. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and>

challenges/hydroxyapatite-based-materials-synthesis-and-characterization. Acesso em: 27 de jan. 2018.

RODRIGUES, J. **Queratina: molécula da semana**. FCiências, 2014. Disponível em: <https://www.fciencias.com/2014/07/31/queratina-molecula-da-semana/>. Acesso em: 28 jan. 2019.

RODRÍGUES, M. I. A.; BARROSO, L. G. R.; SÁNCHEZ, M. L. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 17, n. 1, p. 20-26, 2018.

RUÍZ, B. Industria avícola: el negocio correcto. **Industria Avícola**, v. 65, n. 1, p. 6-11, 2018.

SANTANA, R. B. et al., Análise da reposta cicatricial da esponja Hemospon® implantada em tecido conjuntivo de rato. **Revista brasileira de implantodontia**, v. 15, n.4, p. 15-18, 2009.

SARAVANAN, S. et al. Chitosan scaffolds containing chicken feather keratin nanoparticles for bone tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, n. 1, p. 481-486, 2013.

SELIK TAR, D. Designing Cell-Compatible Hydrogels for Biomedical Applications. **Science**, v. 336, n. 6085, p. 1124-1128, 2012.

SENA, L. A. et al., Biocompatibility of wollastonite-poly(N-butyl-2-cyanoacrylate) composites. **Journal of Biomedical Materials Research b: applied biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1121-1129, 2014.

SHAVANDI, A. et al. Keratin: dissolution, extraction and biomedical application. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 9, p. 1699-1735, 2017.

SHEIKHOLESLAM, M. et al. Biomaterials for skin substitutes. **Advanced Healthcare Materials**, 2017. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adhm.201700897/abstract>. Acesso em: 21 de jan. 2018.

SHIMIZU, T. et al., Histopathological evaluation of subcutaneous tissue reaction in mice to a calcium hydroxide paste developed for root canal fillings. **Journal of International Medical Research**, v. 32, n. 4, 416-421, 2004.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 929-958, 2009.

SICCA, C. M. et al., Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, v. 8, n. 1/2, p. 1-10, 2000.

SILVIPRIYA, K. S. et al. Collagen: animal sources and biomedical application. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 3, p. 123-127, 2015.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, **USDA: consumo mundial de carne de frango em 2017**. Disponível em: <http://sna.agr.br/usda-consumo-mundial-de-carne-de-frango-em-2017/>. Acesso em: 13 de jan. 2018.

SONI, S. et al. Biodegradable biomaterials. **Recent Patents on Biomedical Engineering**, v. 3, p. 30-40, 2010.

SOUZA, F. F. P. **Biocompatibilidade e biodegradação de colágeno, nanoqueratina e bioapatita derivados da indústria avícola**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2018.

STUDENT SITE 29. **Biomaterials and foreign body reaction**, 2015. Disponível em: <https://beng43429f2015.coursepress.yale.edu/2015/09/14/biomaterials-and-foreign-body-reaction/>. Acesso em: 15 jan. 2019.

ŠUPOVÁ, M. Isolation and preparation of nanoscale bioapatites from natural sources: a review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, p. 546-563, 2014.

TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. 3, p. 311-324, 2009.

TANGSADTHAKUN, C. et al. Properties of collagen/chitosan scaffolds for skin tissue engineering. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 16, n. 1, p. 37-44, 2006.

TAYLOR, P. M.; CASS, A. E. G.; YACOUB, M. H. Extracellular matrix scaffolds for tissue engineering heart valves. **Progress in Pediatric Cardiology**, v. 21, n. 2, p. 219-225, 2006.

TRIPATHI, G; BASU, B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering: physico-mechanical and biological evaluations. **Ceramics International**, v. 38, n. 1, p. 341-349, 2012.

VASCONCELOS, A.; CAVACO-PAULO, A. The use of keratin in biomedical applications. **Current Drug Targets**, v. 14, n. 5, p. 612-619, 2013.

VISHWAKARMA, A. et al. Engineering immunomodulatory biomaterials to tune the inflammatory response. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 6, p. 470-482, 2016.

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, 2017.

WILLERTH, S. M.; SAKIYAMA-ELBERT, S. E. Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery. In: HARVARD STEM CELL INSTITUTE. **StemBook: The Stem Cell Research Community**. 1. ed. 2008.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials**. 1. ed. Chester, 1986.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials**. 1. ed. Amsterdam; New York: Elsevier, 1987.

YAMATOGLI, R. S. et al., Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 35, n. 4, p. 837-842, 2005.

ZAMBUZZI, W.F. et al., Avaliação bioquímica de xenoinplantantes em subcutâneo de rato. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 9, n. 4, p 44-51, 2006b.

ZAMBUZZI, W.F. et al., Microscopic analysis of porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 4, p. 382-386, 2005b.

ZAMBUZZI, W.F. et al., MMP-9 and CD68 (+) cells are required for tissue remodeling in response to natural hydroxyapatite. **Journal of Molecular Histology**, v. 40, n. 4, p. 301-309, 2009.

ZAMBUZZI, W.F. et al., Rat subcutaneous tissue response to macrogranular porous anorganic bovine bone graft. **Brazilian Dental Journal of Ribeirão Preto**, v. 17, n. 4, p. 274-278, 2006a.

ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Review of Medical Devices**, v. 8, n. 5, p. 607-626, 2011.

ANEXO I
PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA UFC)



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

C E R T I F I C A D O

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

CADASTRO NO MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – PLATAFORMA SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A576649

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A576649**
 Usuário: **Igor Iuço Castro da Silva**
 CPF/CNPJ: **093.941.517-88**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Gallus gallus

Título da Atividade: **Síntese, caracterização físico-química e biológica de hidrogéis de colágeno, queratina e apatita provenientes de subprodutos da indústria avícola**

Equipe

Igor Iuço Castro da Silva	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Pro
Men de Sá Moreira de Souza Filho	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical -
Morsyleide de Freitas Rosa	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical -
Paula Bianca Viana Pinheiro	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical -
Fábio Lima Cavalcante	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical -
Francisco Fábio Pereira de Souza	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Pro
Jesús Alberto Pérez Guerrero	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Pro
Maria Janaina Paula Gomes	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Pro

Yasmin Alves Teles de Menezes	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Cur
Bárbara Nunes Cavalcante	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Cur
Francisco Anderson Angelo Aragão	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Cur
Lara Gomes de Alcântara	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Cur

Parceiras Nacionais

00.348.003/0135-22 / Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

07.272.636/0001-31 / Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral

Resultados Obtidos**Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Dissertação de mestrado 1: <http://www.reposit>**

Identificação do meio onde foi divulgado: **Dissertação de mestrado 2: <http://www.reposit>**

Data do Cadastro: **06/09/2018 19:55:04**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **20:00** de **06/09/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO III

Norma 10993-6 – anexo E

ISO 10993-6:2007(E)

Annex E (informative)

Examples of evaluation of local biological effects after implantation

Examples of quantitative scoring systems are given in the Bibliography (see References [16], [17], [25] and [26]).

For each histological characteristic evaluated, such as capsule formation, inflammation, presence of polymorphonuclear cells, giant cells, plasma cells and/or degradation of material, the semi-quantitative scoring system used should be described in the evaluation report.

Some examples of such semi-quantitative scoring systems are described below and in the Bibliography (see References [25], [26], [31], [40] and [41]). The evaluation system as described in Tables E.1 and E.2, may be converted to an implant evaluation system as described in Table E.3.

For examples of scoring systems used for biological evaluation of degradable materials, see Reference [19].

Table E.1 — Examples of a histological evaluation system — Cell type/response

Cell type/response	Score				
	0	1	2	3	4
Polymorphonuclear cells	0	Rare, 1-5/phf ^a	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Lymphocytes	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Plasma cells	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Macrophages	0	Rare, 1-5/phf	5-10/phf	Heavy infiltrate	Packed
Giant cells	0	Rare, 1-2/phf	3-5/phf	Heavy infiltrate	Sheets
Necrosis	0	Minimal	Mild	Moderate	Severe

^a phf = per high powered (400 x) field.

Table E.2 — Examples of a histological evaluation system — Response

Response	Score				
	0	1	2	3	4
Neovascularisation	0	Minimal capillary proliferation, focal, 1-3 buds	Groups of 4-7 capillaries with supporting fibroblastic structures	Broad band of capillaries with supporting structures	Extensive band of capillaries with supporting fibroblastic structures
Fibrosis	0	Narrow band	Moderately thick band	Thick band	Extensive band
Fatty infiltrate	0	Minimal amount of fat associated with fibrosis	Several layers of fat and fibrosis	Elongated and broad accumulation of fat cells about the implant site	Extensive fat completely surrounding the implant

ISO 10993-6:2007(E)

Table E.3 — Example of a semi-quantitative evaluation system

Test sample:	Implantation interval:					
	Test sample			Control sample		
Animal number:						
Inflammation						
Polymorphonuclear						
Lymphocytes						
Plasma cells						
Macrophages						
Giant cells						
Necrosis						
SUB-TOTAL (× 2)						
Neovascularisation						
Fibrosis						
Fatty infiltrate						
SUB-TOTAL						
TOTAL						
GROUP TOTAL						
AVERAGE ^a	TEST (-) CONTROL =					
Traumatic necrosis						
Foreign debris						
No. sites examined						
^a Used to determine irritant ranking shown below as the conclusion. A negative difference is recorded as zero.						

Conclusion: Under the conditions of this study, the test sample was considered a

- non-irritant (0,0 up to 2,9)
- slight irritant (3,0 up to 8,9)
- moderate irritant (9,0 up to 15,0)
- severe irritant (> 15)

to the tissue as compared to the negative control sample.

ANEXO IV

Instruções para Avaliadores da Defesa de Dissertação (Regimento Interno do PPGB)

Art. 42°. A avaliação do exame de qualificação verificará os seguintes critérios:

- I - Apresentação do tema, revisão ampla, atualizada e crítica da literatura e delimitação do problema;
- II - Argumentação quanto à justificativa denotando a relevância teórica e prática da proposta;
- III - Redação clara e precisa dos objetivos e sua coerência com o problema da pesquisa;
- IV - Coerência metodológica relativamente aos objetivos de pesquisa, e uso apropriado dos materiais e métodos, na organização e na análise de dados;
- V - Uso da linguagem consoante a norma culta da língua e o estilo de redação científica;
- VI - Habilidade de síntese, coerência e coesão lógica do texto (ligação entre capítulos/seções/frases/parágrafos);
- VII - Viabilidade do cronograma do projeto tendo em vista o prazo de conclusão do curso de mestrado (24 meses).

Art. 55°. A Comissão Examinadora que julgará a dissertação será constituída de especialistas credenciados com título de doutor ou equivalente, aprovada pelo Colegiado do Programa e designada pelo Coordenador, sendo composta de no mínimo 3 (três) membros, sendo um externo ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Parágrafo único - Poderão participar da Comissão Examinadora professores ativos e aposentados do Programa ou de outros Programas de Pós-Graduação afins, além de profissionais com titulação pertinente.

Art. 56°. O trabalho de dissertação deve seguir as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC, apresentando: introdução, objetivos, referencial teórico, metodologia, resultados e conclusão.

§ 1°. O trabalho de dissertação também poderá constar de um artigo em inglês, precedido de introdução, objetivos e referencial teórico em português e de acordo com as normas da ABNT e as Normas Técnicas para Trabalhos Científicos da UFC.

§ 2°. A apresentação oral da defesa de dissertação deverá ser realizada no idioma português e o aluno terá 45 minutos para apresentar seu trabalho em sessão pública.

§ 3°. A avaliação da defesa de dissertação verificará os mesmos critérios constantes no **Art. 42°**, com exceção do item VII.

Art. 57°. A Comissão Examinadora indicará a aprovação ou não da dissertação baseando-se na avaliação do trabalho entregue e na sua apresentação pública, atribuindo ao candidato uma das seguintes menções: aprovado ou reprovado.

§ 1°. Será considerado aprovado ou reprovado o aluno que receber esta menção pela maioria dos membros da comissão julgadora;

§ 2°. O aluno que recebeu a menção reprovado é cancelado de imediato do programa;

§ 3°. No caso de modificação sugerida na dissertação ou na tese, a ocorrência é registrada na ata de defesa e o aluno deve efetuar a modificação dentro do prazo máximo de 90 (noventa) dias para reapresentação do referido trabalho, através de parecer fundamentado.

§ 4°. Após a aprovação final o aluno entregará à Secretaria do Programa um exemplar da dissertação em meio digital (CD ROM), no formato word e pdf, que deverá estar de acordo com as normas vigentes para apresentação de dissertações.