



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

JESÚS ALBERTO PÉREZ GUERRERO

**ANÁLISE *IN VIVO* DA OSTEOCONDUTIVIDADE DE BIOMATERIAIS A BASE DE
COLÁGENO, HIDROXIAPATITA E QUERATINA DERIVADOS DE
SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

SOBRAL

2019

JESÚS ALBERTO PÉREZ GUERRERO

ANÁLISE *IN VIVO* DA OSTEOCONDUTIVIDADE DE BIOMATERIAIS A BASE DE
COLÁGENO, HIDROXIAPATITA E QUERATINA DERIVADOS 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)

- G962a Guerrero, Jesús Alberto Pérez.
Análise in vivo da osteocondutividade de biomateriais a base de colágeno, hidroxiapatita e queratina derivados de subprodutos da indústria avícola / Jesús Alberto Pérez Guerrero. – 2019.
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva.
1. Biomateriais. 2. Regeneração óssea. 3. Colágeno. 4. Hidroxiapatita. 5. Queratinas. I. Título.
CDD 660.6
-

JESÚS ALBERTO PÉREZ GUERRERO

ANÁLISE *IN VIVO* DA OSTEOCONDUTIVIDADE DE BIOMATERIAIS A BASE DE COLÁGENO, HIDROXIAPATITA E QUERATINA DERIVADOS 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.

Aprovado em: 18 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Examinador Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Iracema Matos de Melo (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

A todos os venezuelanos no mundo.

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 Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC) da Organização de Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), com apoio da Divisão de Temas Educacionais do Ministério das Relações Exteriores do Brasil (DCE/MRE) que permitiram a cooperação entre a Venezuela e o Brasil.

Ao meu orientador, Dr. Igor Iuco Castro da Silva, por todo o ensinamento, paciência, dedicação 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-CNPAT e pela profícua parceria com o PPGB-UFC para caracterizações biológicas. Ao Fábio Lima Cavalcante, que também em parceria com a Embrapa Agroindústria Tropical-CNPAT ajudou no desenvolvimento dos materiais.

Agradeço aos participantes do Grupo de Estudos em Morfologia (GEM) por todo o apoio, em especial à mestranda Janaina Gomes que compartilhou o mesmo trajeto acadêmico de começo ao fim, ao mestrando Sandro Ponte pelo empréstimo dos equipamentos e colaboração na execução das cirurgias, assim como aos alunos de iniciação científica: Bárbara Cavalcante, Lara Gomes, Lana Karine, Yasmin Teles e Anderson Ângelo pela ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa.

Aos membros do Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Paulo de Tarso, Nívea Maria e Deyse Rodrigues, que sempre me ofereceram incondicionalmente sua ajuda. Obrigado pelo café!

Aos demais colegas de mestrado, por compartilharem angústias e, principalmente, momentos felizes. Obrigado pela amizade.

À minha família, pelo exemplo de dedicação, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço. Gostaria de agradecer especialmente a minha irmã Ana Fernanda Pérez e a minha mãe Ofelia Guerrero Tarazona. Este trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês.

A Jorge Danilo Ponte Linhares pela ajuda nestes últimos dois anos no Brasil.

RESUMO

A indústria avícola brasileira gera abundantes subprodutos de baixo valor econômico que têm potencial de ser transformados em biomateriais osteocondutores para o tratamento clínico de defeitos ósseos extensos que ainda hoje permanece como um problema de saúde pública e desafia a indústria biotecnológica no desenvolvimento de novos biomateriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar biologicamente *in vivo* a osteocondutividade de biomateriais, produzidos a partir de resíduos da indústria avícola para o reparo ósseo. Foram testados 4 hidrogéis à base de colágeno (Col) reticulados com UV/riboflavina e concentrações variáveis de hidroxiapatita (HA) e queratina (Q). Ratos Wistar machos ($n=60$) foram divididos aleatoriamente em 6 grupos e avaliados nos tempos experimentais de 1 e 3 meses (5 ratos/tratamento). Para cada animal foi criado um defeito de tamanho crítico de 8 mm de diâmetro no crânio, preenchido com uma das seguintes condições experimentais: 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Após necrópsias excisionais e processamento histológico, as lâminas obtidas foram analisadas por histomorfometria usando o programa Image J. Para os parâmetros osso neoformado, tecido conjuntivo, biomaterial, osso antigo ou outras estruturas, a densidade porcentual foi tabulada e expressa como média (\pm desvio padrão) e analisados estatisticamente usando o teste paramétrico de ANOVA e pós-teste de Dunnet considerando diferenças significativas se $P<0,05$. A neoformação óssea em 1 mês foi menor para todos os materiais teste e C- em relação ao C+, 19,3%(\pm 1,6), bem como em 3 meses para G1, G3, G4 e C- em relação ao C+, 21,8%(\pm 4,6). A presença de tecido conjuntivo foi maior para todos os materiais-teste em relação ao C+ em 1 e 3 meses, respectivamente 30,8%(\pm 11,5) e 32,1%(\pm 9,1). A presença do biomaterial em 1 mês foi menor para G1, G2 e G3, quase ausente para G4 e ausente para C-, em relação ao C+ [19,9%(\pm 8,2)], em 3 meses para G2 foi menor e ausente para G1, G3, G4 e C- em relação ao C+ [17,5%(\pm 5,2)]. Para osso antigo e outras estruturas não houve diferenças entre os materiais-teste em relação a C+ e C-. Os biomateriais testados mostraram baixa osteocondutividade e alta biodegradabilidade, apresentando G2 o maior potencial de desenvolvimento biotecnológico como membrana de regeneração óssea guiada.

Palavras-chave: Biomateriais. Regeneração óssea. Colágeno. Hidroxiapatita. Queratinas.

ABSTRACT

The Brazilian poultry industry generates plenty low-cost byproducts that have the potential to be transformed into osteoconductive biomaterials for clinical treatment of extensive bone loss that persists as a public health problem and challenges the biotechnology industry to develop new biomaterials. The goal of this work was to evaluate the osteoconductivity of some biomaterials produced from poultry industry waste for bone repair. Four hydrogels, based on collagen (Col) crosslinked with UV/riboflavin and variable concentrations of hydroxyapatite (HA) and keratin (Q), were tested. Male Wistar rats ($n = 60$) were randomly divided into 6 groups and evaluated at 1 and 3 months (5 rats/treatment). For each animal, it was created an 8 mm diameter critical size defect in the skull, and fill it with one of the following experimental conditions: 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), autogenous bone (C+) and blood clot (C-). After excisional necropsies and histological processing, the stained slides were histomorphologically analyzed using ImageJ software. For the parameters, new bone, connective tissue, biomaterial, old bone and other structures, the percentage density was reported as Mean (\pm standard deviation) and analyzed statistically using the parametric ANOVA test and Dunnet's post-test considering significant differences if $P < 0.05$. Bone neoformation at 1 month was lower for all the materials and C- for C+, 19.3% (± 1.6), as well as for 3 months for G1, G3, G4, and C- in relation to C+ 21.8% (± 4.6). The presence of connective tissue was higher for all test materials compared to C+ in 1 and 3 months, respectively 30.8% (± 11.5) and 32.1% (± 9.1). The presence of the biomaterial at 1 month was lower for G1, G2 and G3, almost absent for G4 and absent for C-, compared to C+ [19.9% (± 8.2)], at 3 months for G2 it was lower and absent for G1, G3, G4, and C- in relation to C+ [17.5% (± 5.2)]. For old bone and other structures, there were no differences between the test materials in relation to C+ and C-. The biomaterials tested showed low osteoconductivity and high biodegradability, with G2 having the highest potential of biotechnological development as a membrane in guided bone regeneration.

Keywords: Biomaterials. Bone repair. Collagen. Hydroxyapatite. Keratin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura e reconstrução tridimensional de um osso compacto.....	16
Figura 2	– Tipos de células no tecido ósseo.....	18
Figura 3	– Processo de cicatrização óssea secundária.....	21
Figura 4	– Defeito de tamanho crítico em calvária de rato.....	32
Figura 5	– Procedimento cirúrgico de criação de CSD de 8 mm em calvária de ratos.....	40
Figura 6	– Corte histológico de um CSD e avaliação histomorfométrica.....	43
Figura 7	– Análise histopatológica de defeito de tamanho crítico em ratos de G1 e G2.....	46
Figura 8	– Análise histopatológica de defeito de tamanho crítico em ratos de G3 e G4.....	47
Figura 9	– Análise histopatológica de defeito de tamanho crítico em ratos de C(+) e C(-).....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Análise da porcentagem de osso neoformado na caracterização <i>in vivo</i> em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.....	49
Gráfico 2	– Análise da porcentagem de tecido conjuntivo na caracterização <i>in vivo</i> em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.....	50
Gráfico 3	– Análise da porcentagem de material enxertado na caracterização <i>in vivo</i> em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.	51
Gráfico 4	– Análise da porcentagem de osso antigo na caracterização <i>in vivo</i> em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.....	51
Gráfico 5	– Análise da porcentagem de outras estruturas na caracterização <i>in vivo</i> em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.	52
Gráfico 6	– Análise intragrupos de parâmetros histomorfométricos na caracterização <i>in vivo</i> em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.	53

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	–	Distribuição de hidrogéis avícolas usados na caracterização <i>in vivo</i> da osteocondutividade em CSD em calvária de ratos.....	37
Tabela 2	–	Distribuição de ratos por tratamento na caracterização <i>in vivo</i> da osteocondutividade de biomateriais avícolas em CSD em calvaria de ratos.....	39
Tabela 3	–	Distribuição de média percentual (desvio padrão) de cada parâmetro avaliado.....	49
Tabela 4	–	Histomorfometria de parâmetros biológicos encontrados em defeitos de tamanho crítico de 8 mm em calvária de ratos sob distintos tratamentos experimentais locais, sem células, fatores de crescimento ou alterações sistêmicas.....	54
Quadro 1	–	Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de enxertos ósseos.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANOVA	Análise de Variância
BMP	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPAT	Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Animal
CSD	Defeito de tamanho crítico
Col	Colágeno
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina-Eosina
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OEA	Organização de Estados Americanos
PLGA	Ácido poli(lático-co-ácido glicólico)
Q	Queratina
ROG	Regeneração Óssea Guiada
TCMP	Magnésio Tricálcio fosfato
TCP	Tricálcio fosfato
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SIMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor que
>	Maior que
®	Marca registrada
cm	Centímetros
µm	Micrômetros
Kg	Quilogramas
mg	Miligramas
n°	Número
°C	Graus Célsius
β	Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	Tecido ósseo.....	15
2.1.1	<i>Células.....</i>	16
2.1.2	<i>Matriz extracelular.....</i>	18
2.2	Formação óssea.....	19
2.2.1	<i>Desenvolvimento e crescimento ósseo.....</i>	19
2.2.2	<i>Reparo ósseo.....</i>	20
2.3	Tratamento de perdas ósseas.....	22
2.3.1	<i>Enxertos ósseos.....</i>	22
2.3.1.1	<i>Propriedades.....</i>	23
2.3.1.2	<i>Tipos de enxertos ósseos.....</i>	24
2.3.1	<i>Membranas.....</i>	25
2.4	Biomateriais.....	26
2.4.1	<i>Hidrogéis.....</i>	27
2.4.2	<i>Colágeno.....</i>	27
2.4.3	<i>Queratina.....</i>	29
2.4.4	<i>Hidroxiapatita.....</i>	30
2.5	Caracterização biológica <i>in vivo</i>.....	31
2.5.1	<i>Defeito de tamanho crítico.....</i>	31
2.6	Indústria avícola.....	33
3	JUSTIFICATIVA.....	35
4	OBJETIVOS.....	36
4.1	Objetivo geral.....	36
4.2	Objetivos específicos.....	36
5	METODOLOGIA.....	37
5.1	Biomateriais.....	37
5.1.1	<i>Preparação dos hidrogéis.....</i>	37
5.1.3	<i>Caracterização fisicoquímica e pré-tratamento.....</i>	38
5.2	Animais.....	38

5.2.1	<i>Aspectos éticos</i>	38
5.2.2	<i>Distribuição e cuidado dos animais</i>	38
5.3	Teste de caracterização <i>in vivo</i> de osteocondutividade.....	39
5.3.1	<i>Anestesia e preparação pré-operatória</i>	39
5.3.2	<i>Procedimento cirúrgico: criação do Defeito de Tamanho Crítico</i>	40
5.3.3	<i>Cuidados e avaliação pós-operatória</i>	41
5.3.4	<i>Eutanásia e necropsia</i>	41
5.4	Processamento histológico.....	41
5.4.1	<i>Fixação, desmineralização e clivagem</i>	41
5.4.2	<i>Desidratação, clarificação e impregnação</i>	42
5.4.3	<i>Microtomia e coloração</i>	42
5.5	Análises histopatológicas.....	42
5.5.1	<i>Análise descritiva</i>	42
5.5.2	<i>Análise histomorfométrica</i>	43
5.7	Análises estatísticas.....	44
6	RESULTADOS	45
6.1	Análise histopatológica descritiva.....	45
6.2	Análise histomorfométrica.....	49
6.2.1	<i>Osso neoformado</i>	49
6.2.2	<i>Tecido conjuntivo</i>	50
6.2.3	<i>Material enxertado</i>	50
6.2.4	<i>Osso antigo</i>	51
6.2.5	<i>Outras estruturas</i>	52
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62
	ANEXO I Aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA).....	70
	ANEXO II Cadastro no Ministério do Meio Ambiente – Plataforma SISGEN.....	71
	ANEXO III Instruções para Avaliadores da Defesa de Dissertação (Regimento do PPGB)	73

1 INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos são doenças comuns que afetam seriamente a qualidade de vida dos pacientes associados à incapacidade funcional de movimento, ocorrendo com frequência devido a traumatismos, neoplasias, defeitos congênitos, osteoporose, artrite, dentre outras etiologias (VENKATESAN *et al.*, 2015). O tecido ósseo pode reparar-se espontaneamente após uma lesão, porém quando o defeito ósseo excede as capacidades naturais de regeneração, é necessária uma intervenção cirúrgica para facilitar o reparo e evitar uma degeneração adicional (CROCKETT *et al.*, 2011).

Todos os tratamentos clínicos atuais de reparação e regeneração óssea têm vantagens e desvantagens, mostrando sucesso limitado (TAL, 2012). Para tratamento de grandes defeitos ósseos e minimização de suas complicações, substitutos ósseos são importantes, pois mimetizam as propriedades naturais do osso (KNESER *et al.*, 2006). Os substitutos ósseos utilizados para transplante clínico incluem desde autoenxertos, aloenxertos e xenoenxerto, até materiais sintéticos, como polímeros, cerâmicas, metais e compósitos (TANG *et al.*, 2016). Entretanto, até o momento, não existe um material ideal que atinja todas as características desejáveis a um osseosubstituto (VENKATESAN *et al.*, 2015).

Uma atenção crescente tem sido dada aos materiais produzidos pela engenharia de tecidos na tentativa de reduzir a alta taxa de falha de reconstrução dos defeitos ósseos em cirurgia ortopédica e bucomaxilofacial (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012). O conceito fundamental da engenharia de tecidos aplicada ao osso é induzir o reparo e/ou regeneração de novo osso funcional através da combinação sinérgica de células, arcabouços e moléculas de sinalização. Os arcabouços biocompatíveis são desenhados para imitar estrutural e funcionalmente a matriz extracelular do osso natural fornecendo um microambiente *in vivo* que facilita a adesão, proliferação e diferenciação celular, além de suportar o estresse mecânico para uma osseointegração bem-sucedida (NAYAK *et al.*, 2018).

Avanços na extração, purificação e caracterização de biomoléculas, incluindo colágeno, hidroxiapatita e queratina, levam ao desenvolvimento de biomateriais capazes de serem alternativas economicamente viáveis no tratamento de perdas ósseas (CHEN *et al.*, 2017). O colágeno (Col), um componente primário da matriz extracelular, oferece vantagens particulares por ser uma base excelente para gerar substitutos de tecidos artificiais, pois é biocompatível, biodegradável e prontamente disponível (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010). A hidroxiapatita (HA) também tem sido escolhida para promover a reconstrução óssea devido à sua característica constituição inorgânica, boa biocompatibilidade

e osteocondutividade que induzem a adesão, proliferação e diferenciação celular (SHAVANDI *et al.*, 2015). Assim, os arcabouços de Col/HA tornaram-se um ponto importante de pesquisa nos últimos anos devido ao seu mimetismo com a estrutura e composição do tecido ósseo e seu alto potencial de reparo (CHEN *et al.*, 2017; NISHIKAWA *et al.*, 2005). Além disso, materiais a base de queratina (Q), embora não sejam primariamente elencados ao reparo ósseo, têm despertado interesse na aplicação biotecnológica por sua biocompatibilidade intrínseca, biodegradabilidade, durabilidade mecânica e abundância natural (ROUSE; VAN DYKE, 2010).

A produção de colágeno, hidroxiapatita e queratina a partir de diversas fontes naturais como ossos bovinos, peles de peixes e resíduos de frango tem sido estudada mais intensamente nos últimos anos para o desenvolvimento de novos biomateriais (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010; ROUSE; VAN DYKE, 2010). Desta forma, subprodutos do setor avícola no final da cadeia industrial de beneficiamento de carne de frango como penas, carcaças, peles e tendões constituem uma fonte alternativa promissora destas matérias-primas, que são geradas em grande quantidade, subutilizadas, baratas e com alta disponibilidade (CAVALCANTE, 2017; WANG *et al.*, 2017). Pesquisas recentes corroboram esse potencial e geram produtos à base de queratina de penas (WANG *et al.*, 2017), colágeno de pele (CAVALCANTE, 2017) e hidroxiapatita de ossos e cascas de ovo de frango (CAVALCANTE, 2017; OVIEDO-RONDÓN, 2008), dentre outros.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a osteocondutividade *in vivo* de biomateriais a base de colágeno, hidroxiapatita e queratina, produzidos a partir de subprodutos da indústria avícola e implantados em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos para análise do seu comportamento biológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

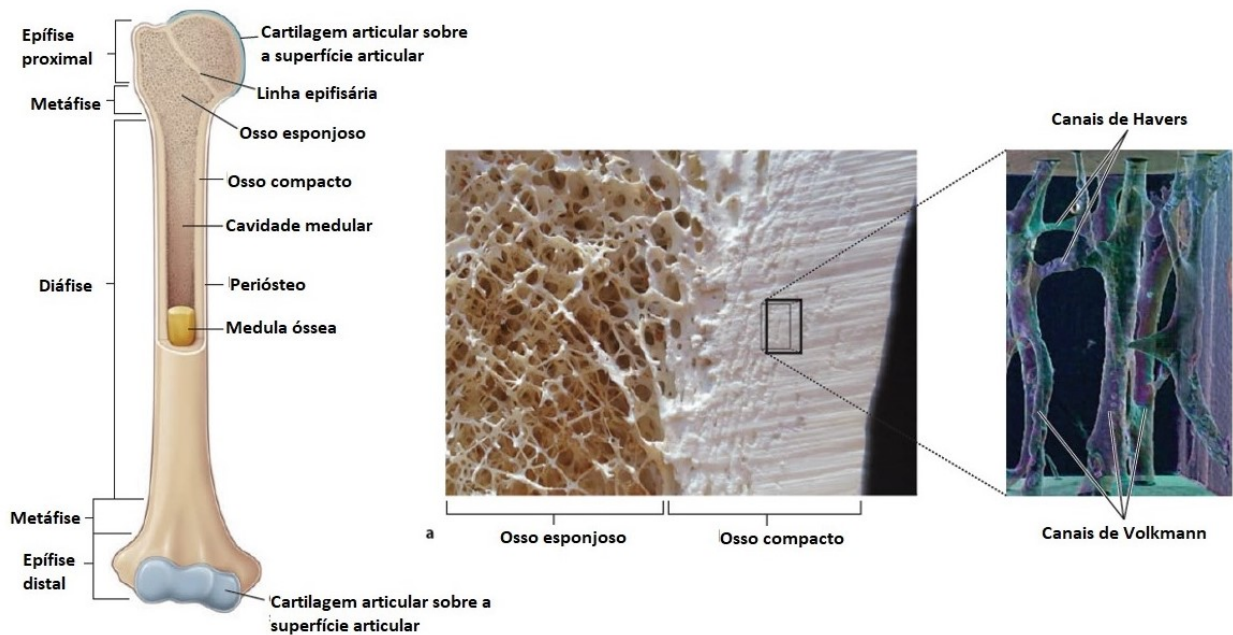
2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo, constituído por células especializadas e uma matriz extracelular que responde a uma grande variedade de estímulos metabólicos, físicos e endócrinos. A característica que distingue o tecido ósseo de outros tipos de tecidos conjuntivos é a mineralização de sua matriz, o que justifica sua consistência dura, capaz de fornecer suporte e proteção (ROSS; PAWLINA, 2016). Ambas as composições orgânica e inorgânica da matriz influenciam nas propriedades físicas do osso, como o grau de rigidez, elasticidade e flexibilidade (TORTORA; DERRICKSON, 2017). Do ponto de vista funcional, os ossos desempenham diversas funções nos vertebrados, tais como: servirem de base para a locomoção corporal, protegerem os órgãos internos mais importantes de lesões, abrigarem os elementos biológicos necessários para a hematopoese e participarem ativamente na homeostase mineral (LEPRES; KERSTEN; TANG, 2016).

Os ossos podem ser classificados estruturalmente em compactos ou esponjosos, e esses dois tipos estão presentes simultaneamente no mesmo osso (FIGURA 1). Nesse sentido, a maioria dos ossos do esqueleto humano consiste em uma mistura de osso compacto externo denso e osso esponjoso interno, com uma quantidade e distribuição muito variáveis permitindo o compromisso ideal entre força e peso (CROCKETT *et al.*, 2011). O revestimento em suas superfícies externas e internas é feito por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas (ou seja, células que atuam na formação óssea), o perióstio e o endóstio, respectivamente, que contêm vasos sanguíneos e nervos que nutrem e dão sensibilidade ao osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O osso compacto, também conhecido como cortical, se organiza de modo lamelar, com lamelas ósseas circulares dispostas ao redor de um vaso sanguíneo, o canal de Havers. As lamelas e os canais de Havers relacionados a elas formam os ósteons, que estão interconectados por canais vasculares denominados canais de Volkmann, formando o sistema de Havers. Já no osso esponjoso não se encontra o sistema de Havers. Neste caso, o osso é composto de espículas ou folhas finas, as trabéculas, que se cruzam em diferentes direções formando um reticulado esponjoso em arranjos irregulares, em cujos espaços vazios interligados está imersa a medula óssea (ROSS; PAWLINA, 2016).

Figura 1 – Estrutura e reconstrução tridimensional de um osso compacto



Fonte: Modificado de ROSS; PAWLINA, (2016).

2.1.1 Células

Como outros tecidos conjuntivos, o tecido ósseo contém uma abundante matriz extracelular que envolve células especializadas amplamente separadas, incluindo células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos, células de revestimento ósseo e osteoclastos, envolvidas em diferentes atividades na remodelação óssea (TORTORA; DERRICKSON, 2017). Células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos correspondem consecutivamente às progressivas diferenciações celulares da linhagem mesenquimal, estando relacionadas ao fenômeno de aposição óssea, ao passo que osteoclastos se originam de pré-osteoclastos derivados de células estaminais hematopóéticas ou ainda a partir de monócitos circulantes, exibindo atuação na reabsorção óssea (ROSS; PAWLINA, 2016).

As células osteoprogenitoras são derivadas de células-tronco mesenquimatosas da medula óssea que podem sofrer mitoses antes do início do processo de diferenciação celular para se tornarem osteoblastos maduros (RUTKOVSKIY; STENSLØKKEN; VAAGE, 2016). Essas células têm forma irregular, núcleo simples, citoplasma reduzido e algumas organelas (TORTORA; DERRICKSON, 2017). As células osteoprogenitoras são encontradas ao longo

da porção interna do periósteo, no endósteo e nos canais dentro do osso que contêm vasos sanguíneos (DENG; LIU, 2005).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação e organização da matriz extracelular do osso e sua posterior mineralização. Estas células apresentam um formato cuboidal com núcleos normalmente arredondados e se organizam em uma monocamada aderente sob a superfície do periósteo e endósteo. Os osteoblastos maduros e metabolicamente ativos apresentam um fenótipo com inúmeras cisternas de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi bem desenvolvido associado a uma grande quantidade de vesículas de secreção, lisossomos e mitocôndrias. Eles sintetizam e secretam fibras de colágeno e outros componentes orgânicos necessários para construir a matriz extracelular do tecido ósseo e iniciam o processo de calcificação (DENG; LIU, 2005). Outras proteínas da matriz óssea produzidas pelos osteoblastos incluem: osteocalcina, osteonectina, sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, trombospondina, proteoglicanos e fosfatase alcalina (ROSS; PAWLINA, 2016).

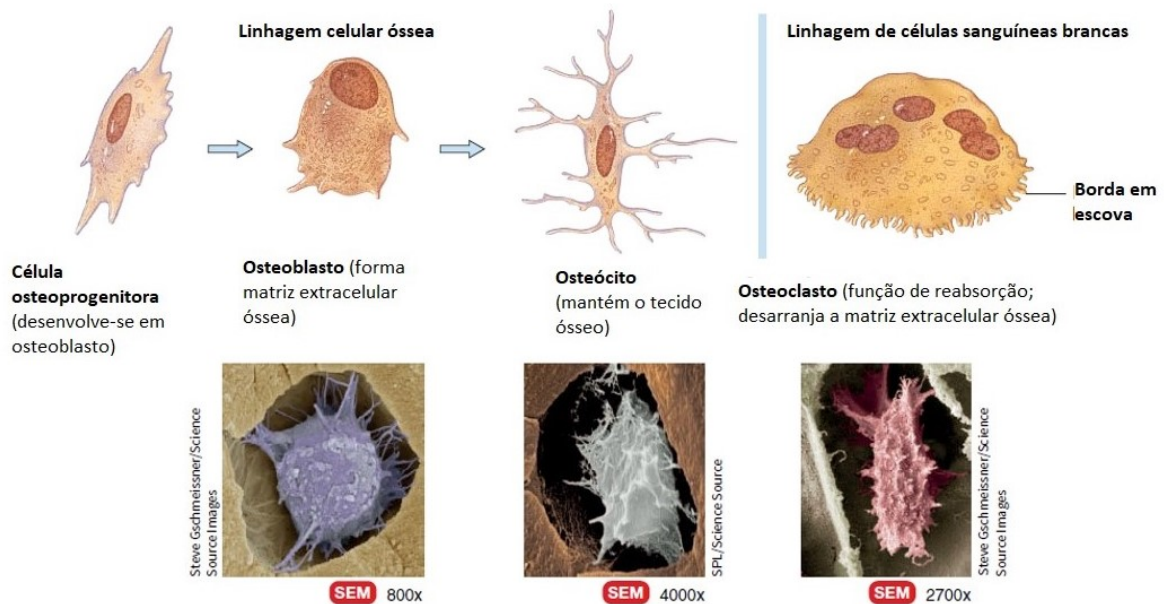
As principais células do tecido ósseo são os osteócitos, células ósseas maduras que mantêm seu metabolismo, como a troca de nutrientes e resíduos com o sangue, embora não excretem materiais de matriz (TORTORA; DERRICKSON, 2017). Os osteócitos têm um núcleo simples e as organelas de seu citoplasma variam em conteúdo e volume de acordo com sua atividade. Essas células passam por várias fases de maturação até serem completamente cercadas pela matriz e permanecem em um estado de repouso aparente (DENG; LIU, 2005).

As células responsáveis pela reabsorção da matriz óssea são os osteoclastos, que estão localizados na superfície óssea e firmemente associados à matriz. Estas são células grandes, móveis e multinucleadas, derivadas da fusão de até 50 monócitos e estão concentradas no endósteo. No lado da célula que enfrenta a superfície óssea, a membrana plasmática dos osteoclastos é profundamente dobrada em uma borda ondulada. Nesse local, a célula libera enzimas lisossômicas e ácidos que digerem as proteínas e os componentes minerais da matriz (DENG; LIU, 2005). Esta ruptura da matriz óssea, denominada reabsorção óssea, faz parte do desenvolvimento normal, manutenção e reparo do osso (CROCKETT *et al.*, 2011).

As superfícies inativas do osso são cobertas por uma camada de células planas muito finas, semelhantes às células endoteliais, chamadas células do revestimento ósseo. Essas células são osteoblastos inativos cujas funções são desconhecidas, mas acredita-se que seu papel mais importante seja separar o fluido intersticial dos fluídos do osso e contribuir para a manutenção das concentrações de cálcio (DENG; LIU, 2005).

Uma síntese dos perfis celulares expressos no tecido ósseo é mostrada na Figura 2.

Figura 2 – Tipos de células no tecido ósseo



Fonte: Modificado de TORTORA; DERRICKSON, (2017).

2.1.2 Matriz extracelular

A matriz óssea extracelular é constituída por componentes orgânicos e inorgânicos. Os componentes orgânicos são principalmente proteínas, das quais a mais abundante é o colágeno, que constitui 90% das proteínas totais da matriz óssea extracelular. A maior parte do colágeno é do tipo I, mas outros tipos de colágeno podem ser encontrados, como colágeno tipo III, V, XI e XIII (SALO, 2002). A estrutura das fibras de colágeno afeta a força do osso e é fisiologicamente alterada com a idade. As proteínas não colagênicas constituem os 10% restantes das proteínas totais que compõem a matriz óssea extracelular e dentre elas estão a osteocalcina, osteonectina, algumas fosfoproteínas, sialoproteínas, fatores de crescimento e proteínas séricas (BARON, 2008).

Os componentes inorgânicos da matriz óssea extracelular são essencialmente placas de cristais de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, que são formados pelos íons fosfato e cálcio. A mineralização é dada pela liberação local de fosfato, que é gerada por fosfatases presentes em vesículas de matriz derivadas de osteoblastos, juntamente com o cálcio abundante no fluido extracelular, resultando na nucleação e crescimento de cristais de hidroxiapatita (CROCKETT *et al.*, 2011). À medida que os cristais se formam, eles combinam com outros sais minerais, como o carbonato de cálcio ($CaCO_3$) e íons como magnésio, fluoreto, potássio e sulfato.

Quando esses sais minerais são depositados na estrutura formada pelas fibras de colágeno da matriz extracelular, elas cristalizam e o tecido endurece (SHAVANDI *et al.*, 2015).

A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas garante ao mesmo tempo dureza e rigidez ao tecido ósseo. Quando se remove a hidroxiapatita dessa equação, o osso mantém sua forma, mas fica tão flexível quanto um tendão. E quando se remove o colágeno, ele também mantém a forma, mas fica tão quebradiço que dificilmente pode ser manipulado sem se partir (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

2.2 Formação óssea

A formação óssea ocorre no desenvolvimento embrionário, está ativa durante a vida toda do indivíduo em um processo chamado remodelação óssea e também é observada em condições traumáticas ou patológicas. O osso é um órgão único, que apresenta capacidade inerente para o crescimento controlado, remodelação contínua em resposta a estímulos mecânicos e autoreparação após danos no tecido (TORTORA; DERRICKSON, 2017).

2.2.1 Desenvolvimento e crescimento ósseo

No corpo humano, existem dois mecanismos principais de formação e crescimento ósseo: a ossificação intramembranosa para ossos chatos e a ossificação endocondral para ossos longos (ROSS; PAWLINA, 2016).

A ossificação intramembranosa ocorre na formação de ossos curtos, ossos do crânio e no crescimento em espessura de ossos longos. Esse tipo de ossificação não depende da presença de tecido cartilaginoso, mas sim de uma membrana conjuntiva na qual haverá diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. As regiões de osteogênese inicial são chamadas de centros primários de ossificação, e o tecido ósseo primário é chamado de osteóide (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Na ossificação intramembranosa, o tecido conjuntivo ocupa o lugar do futuro osso e é lentamente substituído à medida que os centros de ossificação se desenvolvem, permitindo que a calcificação ocorra e formando espículas e trabéculas que se assemelham ao osso esponjoso (TAL, 2012).

Na ossificação endocondral, também referida como ossificação intracartilaginosa, é utilizada uma estrutura modelo de cartilagem na qual são estabelecidos os centros de ossificação primário e secundário (TAL, 2012). A ossificação endocondral ocorre na formação de ossos longos, como o fêmur, na fase embrionária e também nas extremidades

desses ossos ao longo do crescimento do indivíduo. Nesse tipo de ossificação, é primeiro formado um molde em cartilagem hialina do futuro osso, que posteriormente é invadida por vasos sanguíneos, células osteoprogenitoras (que dão origem a osteoblastos) e componentes da medula óssea (que dão origem a osteoclastos). Assim, a matriz cartilaginosa é utilizada como base para a deposição da matriz calcificada, reabsorvida e substituída por osso (ROSS; PAWLINA, 2016).

Embora a formação óssea induzida pela engenharia de tecidos seja diferente destas vias biológicas naturais, a diferenciação osteogênica *in vitro* se assemelha mais ao processo de ossificação intramembranosa (TAL, 2012).

2.2.2 Reparo ósseo

O tecido ósseo pode ser danificado devido a lesão ou doença. Por exemplo, as fraturas ósseas, as lesões traumáticas mais comuns em seres humanos, causam a degradação da matriz óssea, osteócitos, periósteo, endósteo e produzem hemorragia local pelo rompimento dos sistemas de Havers (EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Em caso de uma lesão, o osso pode reparar-se por meio de dois processos: a cicatrização óssea direta ou indireta (ROSS; PAWLINA, 2016).

A cicatrização óssea direta (primária) ocorre quando o osso fraturado é estabilizado cirurgicamente com placas de compressão e o movimento entre os fragmentos fraturados do osso é completamente restrito. Neste processo, o osso sofre uma união óssea interna semelhante à remodelação de um osso maduro (ROSS; PAWLINA, 2016).

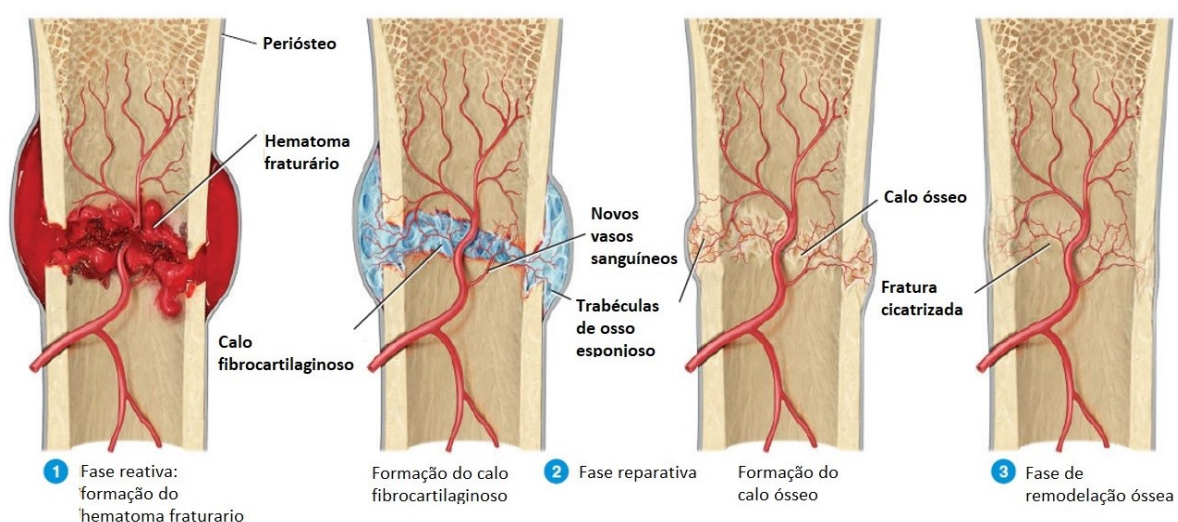
A cicatrização óssea indireta (secundária), em contraste, envolve respostas do periósteo e tecidos moles circundantes, bem como a formação de ossos endocondrais e intramembranosos (ROSS; PAWLINA, 2016). Este tipo de reparo ósseo ocorre em fraturas que são tratadas com fixação óssea não rígida ou semirrígida como dispositivos de fratura ortopédica, fixação externa, preguçamento intramedular ou aplicação de placas metálicas sobre o espaço de fratura (EINHORN; GERSTENFELD, 2015).

Após a lesão, uma cascata de eventos é acionada para restaurar o estado original do tecido, ocorrendo em três fases: reativa ou inflamatória, reparativa e de remodelação. Os principais estágios da cicatrização óssea indireta são mostrados na Figura 3.

Na fase reativa, a resposta inflamatória aguda inicial à fratura óssea é semelhante à resposta a qualquer lesão que produza destruição e hemorragia tecidual. Inicialmente, é formado um hematoma de fratura (FIGURA 3-1) e a necrose óssea é observada nas

extremidades dos fragmentos ósseos fraturados. Este processo é refletido pela infiltração de células da cascata inflamatória (macrófagos, monócitos, linfócitos, etc.) que migram para o local da lesão (horas a dias) (ROSS; PAWLINA, 2016; TORTORA; DERRICKSON, 2017).

Figura 3 – Processo de cicatrização óssea secundária



Fonte: Modificado de TORTORA; DERRICKSON, (2017).

Na fase de reparativa, também conhecida como fase de cicatrização, proliferam fibroblastos, capilares sanguíneos e células-tronco mesenquimais migram e se diferenciam no local da lesão. O hematoma de fratura é gradualmente substituído por tecido de granulação, um tipo de tecido conjuntivo frouxo recém-formado que contém fibras de colágeno tipo III e tipo II e rica celularidade. O tecido de granulação se torna mais denso e é transformado em calo de fibrocartilagem mole. Enquanto o calo se forma, as células osteoprogenitoras do periosteio dividem-se e se diferenciam em osteoblastos que começam a depositar osteóide na superfície externa do calo (ossificação intramembranosa). Esta nova formação óssea avança para o local da fratura e forma um envelope sobre o calo fibrocartilaginoso. Os centros osteogênicos deste novo osso invadem o calo e começam a depositar o tecido ósseo, com o qual o calo fibrocartilaginoso original é gradualmente substituído por um calo duro (FIGURA 3-2). O calo duro torna-se mais sólido e mecanicamente rígido. Finalmente, como na formação do osso endocondral, o osso esponjoso é gradualmente substituído por tecido ósseo (ROSS; PAWLINA, 2016).

Durante a fase de remodelação, o calo duro é submetido à remodelação óssea para transformar o depósito de tecido ósseo novo em um osso lamelar maduro. Essa reestruturação

ocorre em resposta a estresses mecânicos sinalizados pelos osteócitos e, posteriormente, osteoclastos e osteoblastos (KNESER *et al.*, 2006). Enquanto o osso compacto está sendo formado, os restos do calo duro são removidos pela ação dos osteoclastos e a remodelação óssea gradual restaura o osso à sua forma original (FIGURA 3-3) (ROSS; PAWLINA, 2016).

2.3 Tratamento de perdas ósseas

A capacidade de autoreparação óssea pode estar comprometida nos casos em que há um grande defeito ósseo causado por trauma significativo, doença sistêmica, infecção do osso ou tecidos circundantes, suprimento inadequado de sangue ou fraturas patológicas, decorrentes de malignidade primária ou de metástases (TANG *et al.*, 2016). Existem opções de tratamento clínico para corrigir os defeitos ósseos, incluindo enxertos ósseos e barreiras de membrana, embora cada qual apresente suas vantagens e suas limitações (DIMITRIOU *et al.*, 2012).

2.3.1 Enxertos ósseos

Um enxerto ósseo é um material implantado, usado sozinho ou em combinação com outros materiais, que promove o reparo ósseo em zonas específicas de lesão. A viabilidade do tecido, tamanho do defeito e enxerto, forma e volume, propriedades biomecânicas, capacidade de osteoindução ou osteocondutividade, manipulação e preço são alguns dos fatores que influenciam na seleção de um material ideal para ser usado como enxerto ósseo (TANG *et al.*, 2016).

O Quadro 1 sintetiza as vantagens e as desvantagens de diferentes tipos de enxertos ósseos encontrados na prática clínica de ortopedia e cirurgia bucomaxilofacial.

Quadro 1 – Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de enxertos ósseos		
Tipo de enxerto	Vantagens	Desvantagens
Autoenxerto	Osteogênico, osteocondutor e osteoindutor	Morbidade do paciente em 2 locais cirúrgicos (dor, baixa neovascularização e infecção), menor disponibilidade
Aloenxerto e Xenoenxertos	Osteocondutor, osteoindutor, ausência de morbidade, maior disponibilidade	Não osteogênico e sem vascularização, risco de rejeição e de transmissão de doenças, alto custo
Substitutos biológicos ou Aloplásticos (sintético)	Carreamento de fatores de crescimento/células para promover osteoindução/osteogênese, ausência de morbidade, maior disponibilidade	Osteogênese e biodegradabilidade variáveis, pobre neovascularização, risco de rejeição, propriedades mecânicas limitadas

Fonte: TANG *et al.* (2016)

2.3.1.1 Propriedades

A biologia das interações envolvendo os materiais produzidos com a finalidade de promover regeneração óssea incluem os seguintes conceitos-chave: biocompatibilidade, osteocondução, osteoindução e osteogênese (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). A biocompatibilidade é uma propriedade inata de qualquer biomaterial, enquanto que a osteocondução, osteoindução e osteogênese são específicas ao uso de materiais usados como enxertos ósseos (KUMAR; VINITHA; FATHIMA, 2013). Apesar de existirem diferentes mecanismos de formação óssea (osteogênese, osteoindução e osteocondução), nem todos os biomateriais para enxerto apresentam essas três propriedades, o que é normal e está relacionado à sua origem. Entretanto, é essencial que um material com potencial de ser usado como enxerto ósseo disponha de pelo menos uma delas (VIDIGAL, 2016).

A palavra biocompatibilidade refere-se à qualidade de um material de não ter efeitos tóxicos ou prejudiciais em um sistema biológico quando entra em contato com ele. No sentido mais simples, um material ou dispositivo biocompatível não deve causar efeitos indesejáveis aos tecidos do hospedeiro levando à morte celular (GALLER *et al.*, 2011). Assim, todo material que pode estar em contato de forma segura com algum tipo de tecido por um tempo determinado pode ser considerado biocompatível (NAYAK *et al.*, 2018).

A osteocondutividade refere-se à capacidade que um material de enxerto tem de servir de arcabouço para a migração de células ósseas nativas adjacentes para formar osso novo sobre a superfície do material (TAL, 2012). Esta propriedade está relacionada principalmente aos materiais mineralizados, sendo boa parte deles comercializada sob o nome genérico de hidroxiapatita. A maior, senão a única, prova de que um material é osteocondutor é a imagem histológica do osso circundando e em íntimo contato com a partícula do biomaterial (VIDIGAL, 2016).

A osteoindução refere-se à capacidade do enxerto de recrutar células-tronco mesenquimais indiferenciadas, presentes na área receptora, para induzir a diferenciação em células formadoras de osso, os osteoblastos (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). Esta propriedade está relacionada à presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), contidas em ossos de origem natural (autógeno, alógeno e xenógeno) que desencadeiam o processo de diferenciação (VIDIGAL, 2016). A combinação de enxertos ósseos com fatores de crescimento (como a fibrina rica em plaquetas ou BMP) amplia a promoção da adesão celular sobre materiais apenas osteocondutores, criando assim materiais osteoindutores. Outra estratégia para suplantiar a osteoindutividade limitada é o

desenvolvimento de novos materiais biomiméticos dopados com íons metálicos, como zinco e estrôncio, que podem estimular osteoblastos ou inibir osteoclastos respectivamente, dessa forma colaborando para o crescimento ósseo no defeito ósseo em regeneração (ROLVIEN *et al.*, 2018).

Já a osteogênese é a capacidade que o material de enxerto possui de formar osso por si só, sem depender das células do leito receptor. Células osteogênicas viáveis (de osteoblastos a células-tronco mesenquimais) são carregadas pelo biomaterial e atuam na produção de osso novo diretamente dentro do próprio enxerto ósseo (GIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005). O osso autógeno é o único biomaterial que apresenta estas três propriedades juntas (osteoindução, osteocondução e osteogênese) e, por consequência, é considerado na literatura temática o padrão-ouro no tratamento de perdas ósseas (VIDIGAL, 2016).

2.3.1.2 Tipos de enxertos ósseos

Os enxertos podem ser classificados de acordo com sua origem em autógenos (mesmo doador e receptor), alógenos (doador e receptor diferentes, porém de mesma espécie), xenógenos (doador e receptor de espécies diferente) ou aloplásticos (sintéticos, obtidos por engenharia de tecidos) (SINHORET; VITTI; CORRER-SOBRINHO, 2013).

Convencionalmente, os autoenxertos são os enxertos mais eficazes uma vez que são coletados do próprio corpo do paciente, geralmente da crista ilíaca, fíbula, costelas ou mandíbula (ROGERS; GREENE, 2012). Embora o uso do próprio osso reduza o risco de rejeição e transmissão de doenças, também aumenta a ocorrência de morbidade pós-cirúrgica, devido a que essa modalidade terapêutica precisar de dois locais de manipulação (leito doador e receptor) em um mesmo ato cirúrgico. Além do risco de infecção pela coleta, o processo pode ser extremamente doloroso e, como em todas as cirurgias, existe sempre o risco de complicações (EINHORN; GERSTENFELD, 2015). Os autoenxertos são osteocondutores, osteoindutores e osteogênicos, o que faz deles a escolha ideal. No entanto, a quantidade de osso disponível para autoenxertos é limitada e o procedimento cria um local de cicatrização secundária (BURCHARDT, 1983; TAL, 2012).

Os aloenxertos, por outro lado, também são enxertos ósseos humanos, mas ao contrário dos autoenxertos que são coletados do próprio paciente, os aloenxertos são de um doador externo ou fonte cadavérica (TAL, 2012). Embora os aloenxertos eliminem a necessidade de uma cirurgia adicional no receptor, também não exibem as propriedades não-

imunogênicas dos autoenxertos, dessa forma aumenta o risco de rejeição. Dependendo de como o enxerto alógeno foi coletado, armazenado e tratado para descellularização e descontaminação, exibirá osteocondução, mas pode não apresentar propriedades osteoindutoras e osteogênicas (MANKIN; HORNICEK; RASKIN, 2005).

Os xenoenxertos são enxertos ósseos coletados de outras espécies diferentes da humana, como os bovinos, e são utilizados como matriz calcificada (TAL, 2012). Esses enxertos são osteocondutores, mas não osteoindutores ou osteogênicos já que durante o processamento e descellularização destes materiais as proteínas sofrem desnaturação e o material perde a capacidade osteoindutora intrínseca (VIDIGAL, 2016).

Os enxertos sintéticos, também conhecidos como aloplásticos, são enxertos ósseos artificiais que podem ser feitos de materiais biologicamente ativos, como polímeros, cerâmicas, biovidros ou mesmo sais minerais de cálcio, sulfato e fosfato (TAL, 2012). Esses enxertos podem ser funcionalizados com fatores de crescimento para aumentar suas habilidades osteocondutoras e osteoindutoras (KUMAR; VINITHA; FATHIMA, 2013).

2.3.1 Membranas

Além dos enxertos, o uso de barreiras biológicas representa outra estratégia para a regeneração óssea, particularmente, em casos de grandes defeitos ósseos secundários a trauma, infecção ou excisão de tumor. Este procedimento envolve o uso de uma membrana ou cimento, que evita a invasão de tecido mole circundante para a área do defeito que de outra maneira impediria o crescimento do tecido ósseo (AHO *et al.*, 2013). Esta técnica de tratamento visa garantir um microambiente favorável para o estabelecimento do coágulo sanguíneo, formação da rede de fibrina, o recrutamento, a proliferação e a diferenciação de células osteogênicas, em um processo conhecido como osteopromoção. Algumas membranas em engenharia de tecidos são relatadas com propriedades osteoindutoras, osteogênicas e angiogênicas e demonstram resultados satisfatórios em vários estudos clínicos (MASQUELET *et al.*, 2010).

A combinação de enxertos ósseos (sejam autógenos, alógenos, xenógenos ou aloplásticos) com membranas (bioreabsorvíveis ou não-reabsorvíveis) é possível em um mesmo tratamento cirúrgico de perdas ósseas, conhecido como regeneração óssea guiada (ROG). Na ROG, as barreiras de membranas protegem o local da lesão óssea e impedem a invasão do tecido mole circundante criando uma câmara para guiar o processo de regeneração óssea, enquanto os enxertos ósseos atuam como materiais preenchedores da cavidade óssea.

Deste modo, o efeito sinérgico da associação dos dois biomateriais pode aumentar a formação de novo osso (DIMITRIOU *et al.*, 2012).

2.4 Biomateriais

Entende-se por biomaterial uma substância, de origem natural ou sintética, que interage com um sistema biológico com o objetivo de promover o reparo de órgãos ou tecidos injuriados, ou ainda aumentar ou substituir uma função natural dos mesmos (GALLER *et al.*, 2011; GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Os biomateriais se definem por serem biocompatíveis com o sistema biológico com o qual estão em contato, além de possuírem propriedades físico-químicas adequadas, incluindo força, rigidez, biodegradabilidade e porosidade, que são necessárias para uso em aplicações biomédicas (NAYAK *et al.*, 2018).

Dentre as diversas aplicações dos biomateriais, vale ressaltar seu uso como matrizes temporárias ou arcabouços que causam interações celulares desejáveis, por meio de análises topográficas e biológicas, de nano ou microescala, que contribuem na formação de novos tecidos (NAYAK *et al.*, 2018). A utilização de um biomaterial como arcabouço fornece um microambiente tridimensional favorável para o reparo tecidual porque facilita a interação célula-material, a colonização, proliferação, diferenciação e migração celular, a deposição de matriz extracelular, o transporte de nutrientes, a excreção de metabólitos e a interação de fatores de crescimento (LANGER; TIRRELL, 2004). A interação célula/biomaterial é um passo essencial para o reparo tecidual e ocorre por intermédio de proteínas que facilitam a adesão celular à superfície do biomaterial (SARAVANAN *et al.*, 2013). Numerosos biomateriais tem sido explorados para produzir arcabouços relacionados à regeneração óssea. Neste sentido, a escolha da matriz do arcabouço depende da aplicação específica do biomaterial (NAYAK *et al.*, 2018).

Os biomateriais podem ser classificados, de acordo com sua origem em: naturais ou sintéticos ou em quanto a sua composição em: polímeros, metais ou ligas, biocerâmicas ou biovidros e compósitos (BRONZINO; WONG; PETERSON, 2012).

A palavra compósito refere-se a uma combinação heterogênea, em escala macroscópica, de dois ou mais materiais, diferindo em composição, morfologia e propriedades físicas, feita para produzir características físicas, químicas e mecânicas específicas (SALERNITANO; MIGLIARESI, 2003). A pesquisa de novos compósitos consiste na busca de diferentes elementos que juntos em único material apresentam suas melhores qualidades maximizadas, o que como constituintes individuais não alcançariam.

Além disso, materiais compósitos permitem um design flexível, uma vez que sua estrutura e propriedades podem ser adaptadas para aplicações específicas (BRONZINO; WONG; PETERSON, 2012).

2.4.1 Hidrogéis

Os hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais capazes de reter grandes quantidades de água e fluidos biológicos devido a sua hidrofília, conferida pela presença de grupamentos amino, amida, carboxila e hidroxila ao longo das cadeias poliméricas porosas. As suas estruturas alcançam um alto grau de semelhança com a matriz extracelular, tornando-os capazes de simular tecidos biológicos e exibindo excelente biocompatibilidade, pelo que têm sido amplamente estudados no desenvolvimento de aplicações biomédicas direcionadas à engenharia de tecidos buscando a liberação controlada de fármacos (HOFFMAN, 2012).

Os polímeros capazes de formar hidrogéis podem ser de origem natural (colágeno, quitosana, alginato, gelatina, ácido hialurônico ou albumina) ou sintética. Independente da origem do material utilizado, um hidrogel deve ser capaz de servir como uma matriz extracelular sintética que organiza as células em uma arquitetura tridimensional orientando a formação e o crescimento do tecido desejado (DRURY; MOONEY, 2003). Os polímeros naturais anteriormente citados possuem esse potencial, em função de sua composição e propriedades similares a da matriz extracelular conjuntiva, garantindo biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade e supressão de resposta imunológica (CHEN *et al.*, 2017).

2.4.2 Colágeno

O colágeno é a proteína mais abundante em humanos, principal componente do tecido conjuntivo, representando aproximadamente 25% do peso seco total de mamíferos. A estrutura básica do colágeno apresenta três cadeias polipeptídicas (cadeias α) dispostas paralelamente em forma de fibras. Cada cadeia é composta por mais de mil aminoácidos com base na sequência -Gly-X-Y-. A presença de glicina é essencial em cada terceira posição a fim de permitir uma embalagem apertada das três cadeias α na molécula de tropocolágeno e as posições X e Y são preenchidas por outros aminoácidos, principalmente prolina e 4-hidroxiprolina (ALBERTS, 2010).

De acordo com o local onde se encontra e com a sua estrutura tridimensional, o colágeno pode apresentar diferentes características. Até hoje, foram caracterizados 29 tipos de

colágeno distintos de composição e propriedades diferentes. Dentre os tipos de colágeno, encontra-se o colágeno do tipo I, considerado como a proteína mais abundante em animais, presente principalmente na pele, ossos e tendões. O colágeno tipo I pode ser encontrado em grande quantidade na matriz extracelular na forma de fibrilas e sua função principal é fornecer força e resistência ao tecido conjuntivo, além de servir como um ligante natural para células e possuir um papel fundamental na regulação do reparo tecidual (KUCCHARZ, 1992).

O colágeno pode ser extraído de várias fontes naturais considerando que é uma proteína animal mais abundante da natureza (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010). Pode ser extraído de quase todos os animais vivos; no entanto, fontes comuns de colágeno incluem pele e tendões bovinos, pele suína, cauda de rato, dentre outros. O colágeno e alguns de seus derivados, como o colágeno parcialmente hidrolisado (gelatina), são amplamente utilizados na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica.

A extração do colágeno a partir de subprodutos animais inclui uma etapa de descélularização, que quando não realizada de forma eficiente, pode torná-lo imunogênico (KUCCHARZ, 1992). Portanto, embora se saiba que o colágeno seja naturalmente biocompatível, novos biomateriais à base dessa proteína têm que obrigatoriamente passar por uma etapa de caracterização biológica, considerando que as propriedades do colágeno diferem levemente de um animal para outro e que o processo de extração e purificação podem alterar as suas características físico-químicas e influenciar na reposta tecidual (GOLDSMITH, 1999).

O colágeno pode ser usado em aplicações biomédicas como arcabouço para regeneração de tecidos. Embora extraível de muitas fontes diferentes, a diversidade dos arcabouços de colágeno acelular é bastante limitada devido a aspectos imunológicos, disponibilidade e tamanho do material (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN, BERTHOD, 2010).

Os biomateriais à base de colágeno podem ser originários de duas técnicas fundamentais. A primeira é uma matriz de colágeno descélularizada que preserva a forma original do tecido e a estrutura da matriz extracelular, enquanto a outra depende da extração, purificação e polimerização do colágeno e seus diversos componentes para formar um arcabouço funcional. Ambas as técnicas podem ser submetidas a vários métodos e protocolos de reticulação que são aplicáveis a uma grande variedade de fontes de tecido e espécies de origem com o objetivo de aumentar suas propriedades de resistência mecânica e enzimática para fins de implantação (PARENTEAU-BAREIL; GAUVIN; BERTHOD, 2010). O princípio de uma reação de reticulação depende da modificação de grupos amina e carboxila dentro das moléculas de colágeno, para permitir a formação de ligações covalentes. Vários

métodos foram desenvolvidos para reticular os arcabouços de colágeno. Estas técnicas de polimerização são distribuídas em três tipos: reticulação física, química e enzimática; sendo as técnicas de reticulação química as mais diversificadas (ROUSE; VAN DYKE, 2010).

2.4.3 Queratina

Assim como o colágeno, a queratina é uma proteína encontrada em grande quantidade em mamíferos, presente em células especializadas denominadas queratinócitos no epitélio. Os materiais queratinosos desempenham variadas funções e podem ser encontrados em diversas espécies animais, na forma de lã, penas, escamas, unhas, chifres, bicos, etc (WANG *et al.*, 2017).

O termo queratina refere-se originalmente à ampla categoria de proteínas insolúveis que se associam como filamentos intermediários e formam a maior parte do citoplasma de células de epitélio de revestimento e de anexos cutâneos (ALBERTS, 2010). De acordo com o tipo de estrutura secundária que apresenta, a queratina pode ser classificada em α -queratina, formadas por α -hélice, ou β -queratina, formadas por folhas β -pregueadas. Ambas são constituídas por cadeias polipeptídicas, sendo o sulfurado cisteína o componente majoritário, possibilitando a existência de um grande número de ligações dissulfeto intra e intermoleculares. Esta disposição molecular confere à queratina as propriedades de resistência mecânica e pouca solubilidade em um grande número de solventes (ROUSE; VAN DYKE, 2010; VASCONCELOS; CAVACO-PAULO, 2013).

Crescentes esforços buscam fabricar e caracterizar novos biomateriais à base de queratina, como filmes, esponjas, arcabouços e fibras, com o intuito de conseguir modular melhor as propriedades físicas e mecânicas das queratinas e, deste modo, criar biomateriais que tenham características apropriadas para diferentes aplicações biomédicas. Até o presente momento, muitos trabalhos foram reportados sobre materiais baseados em queratina demonstrando sua citocompatibilidade e biodegradação. No entanto, raros foram os testes biológicos para a regeneração de tecido ósseo (ROUSE; VAN DYKE, 2010; SHARMA; GUPTA, 2016).

O interesse em utilizar a queratina como biomaterial em aplicações biomédicas é baseado nas propriedades fundamentais como biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade e abundância natural de matéria-prima. Na perspectiva da engenharia de materiais, as proteínas de queratina tem como vantagem uma habilidade intrínseca de automontagem e polimerização em arcabouços porosos e fibrosos para formarem uma matriz

tridimensional favorável para a adesão celular. Na perspectiva biológica, exibem sinais de reconhecimento celular que permite a infiltração, ligação e proliferação das células, acreditando-se que as queratinas participem de algumas funções moduladoras do comportamento celular. Assim, a conservação da bioatividade dentro dos biomateriais da queratina também poderia ser vantajosa para o controle de funções biológicas específicas em uma variedade de aplicações de engenharia de tecidos (VASCONCELOS; CAVACO-PAULO, 2013).

2.4.4 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA), representada pela fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é o principal componente inorgânico de ossos e dentes, constituindo cerca de 70% dos minerais ósseos. Do ponto de vista químico, a hidroxiapatita é um tipo de apatita que contendo íons de cálcio, fosfato e hidroxilo na sua estrutura cristalina (DENG *et al.*, 2013). As hidroxiapatitas de origem biológica também apresentam outros componentes, que incluem íons, tais como carbonato (CO_3^{2-}), hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), sódio (Na^+), potássio (K^+), magnésio (Mg^{+2}), fluoreto (F^-) e cloreto (Cl^-) (APARICIO; GINEBRA, 2015).

A baixa proporção de cálcio/fosfato, o tamanho menor dos cristais e grande quantidade de substituição de carbonato são características típicas das HAs biológicas, características estas que aumentam a solubilidade das apatitas e influenciam positivamente a sua biocompatibilidade (DENG *et al.*, 2013). Além disso, as semelhanças químicas com a porção inorgânica dos tecidos calcificados conferem às hidroxiapatitas biológicas propriedades como osse condução e bioatividade (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Além das características biológicas, as hidroxiapatitas também apresentam características físico-químicas que fazem destas biomateriais adequados para utilização como substitutos ósseos e articulares em cirurgia bucomaxilofacial, bem como em outras aplicações biomédicas. Fatores críticos como a morfologia, homogeneidade, porosidade, cristalinidade, tamanho de partícula e pureza afetam as propriedades mecânicas, biocompatibilidade, osteocondutividade e bioatividade de um material biocerâmico. Portanto, quando a HA é considerada para uma aplicação biomédica, tais fatores físicos e químicos devem ser avaliados (SHAVANDI *et al.*, 2015).

A obtenção de hidroxiapatita pode ser feita basicamente de duas formas: síntese em laboratório ou extração a partir de tecidos de animais (CAVALCANTE, 2017). Além da conversão de resíduos de baixo custo para um produto de valor agregado, a HA obtida a partir

de recursos biogênicos sugere ter uma melhor biocompatibilidade devido à sua semelhança físico-química com apatita óssea natural. Os materiais de resíduos mais comuns para as produções HA incluem: ossos bovinos, ossos de peixe, cascas de ovos e conchas marinhas. A HA de bioresíduos tem sido um campo interessante devido a características especiais do material produzido e devido aos benefícios econômicos e ambientais da redução de resíduos (JAHANGIR *et al.*, 2008).

2.5 Caracterização biológica *in vivo*

A aplicação clínica de um biomaterial exige que o mesmo apresente características físicas, químicas e biológicas satisfatórias. A caracterização biológica de um biomaterial consiste em testes que são realizados *in vitro* e *in vivo*, com o objetivo de conhecer o padrão de resposta celular e tecidual desencadeado pelo biomaterial quando em contato com sistemas biológicos (WANG *et al.*, 2017).

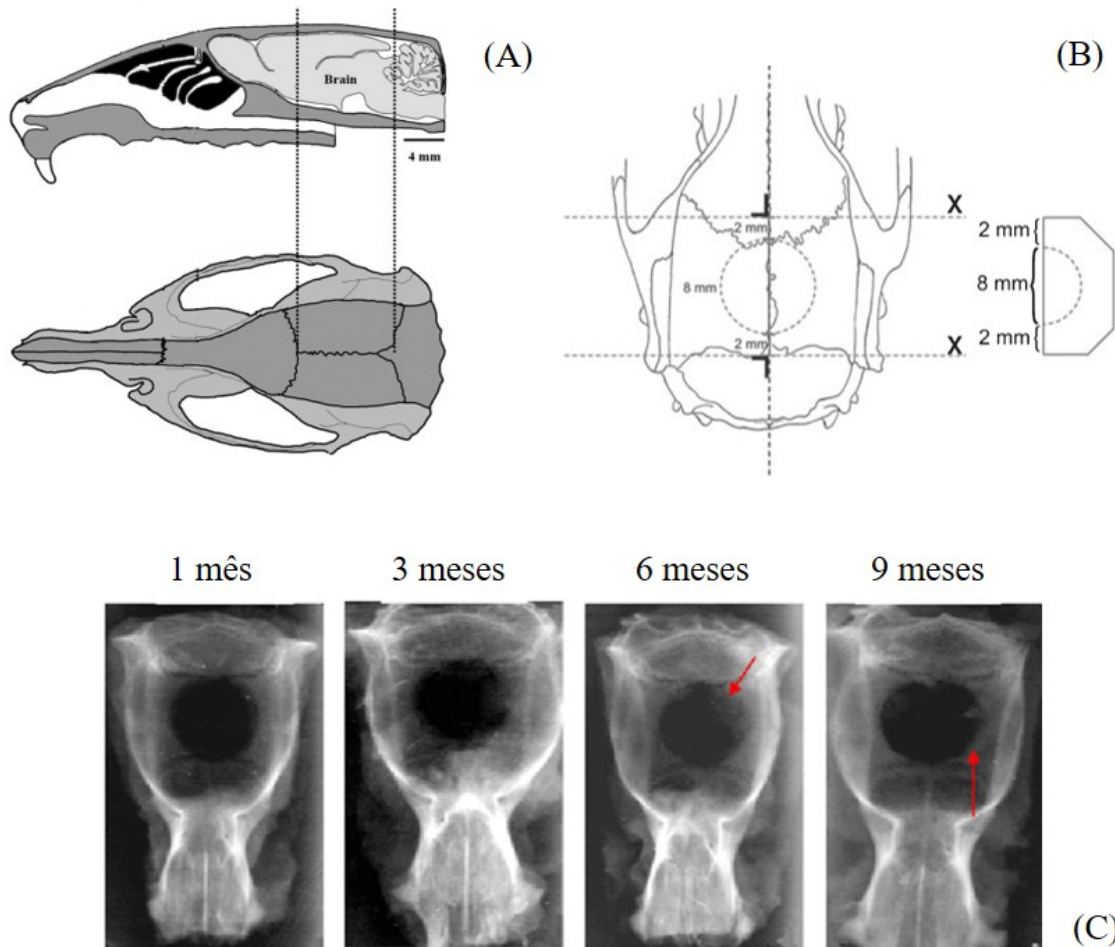
2.5.1 Defeito de tamanho crítico

O modelo de defeito em calvária é um exemplo de um teste de caracterização biológica *in vivo*, extensamente utilizado para o desenvolvimento de materiais de reparo ósseo. Tipicamente, os defeitos são preenchidos com um agente promotor de crescimento ósseo ou deixados sem tratamento como uma lesão de controle negativo, avaliando a resposta biológica do material em diferentes tempos experimentais (UMOH *et al.*, 2009). Diferentes espécies animais como camundongos (COWAN *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2001), ratos (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; SCHLIEPHAKE *et al.*, 2004), coelhos (HIRANO *et al.*, 2006) e cães (SATO; URIST, 1985) têm sido usados como modelos em testes de caracterização biológica *in vivo*.

Em ratos, um defeito ósseo em calvária é criado com profundidade total ou transcraniana, tendo como limites anteroposteriores as suturas coronal e lambdóidea e limite mediano a sutura sagital, por meio da utilização de uma broca trefina acoplada a motor cirúrgico rotatório manejada sob uma orientação axial (FIGURA 4). Uma gama de diâmetros internos de brocas trefinas já foi relatada para criação de um defeito ósseo crítico: 3 mm (OZCELIK *et al.*, 2004), 4 mm (INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2004; MAH *et al.*, 2004), 5 mm (AYBAR; TERRITORIALE; MISSANA, 2005; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; DONOS *et al.*, 2004), 6 mm (JUNG *et al.*, 2006), 7 mm (KANOU *et*

al., 2005; KHOURI *et al.*, 1996), 8 mm (BLUM *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2006; LUTOLF *et al.*, 2003; SARTORIS *et al.*, 1987) e até de 9 mm (ARNAUD, 2000; NUSSENBAUM; RUTHERFORD; KREBSBACH, 2005).

Figura 4 — Defeito de tamanho crítico em calvária de rato



Fonte: Adaptado de MESSORA *et al.*, (2008); STAMEGNA *et al.*, (2014). **Legenda:** (A) vista médio sagital e dorsal da calvária do rato. (B) Dimensão da amostra a ser incluída em um bloco de parafina para processamento histológico. (C) Radiografia digital do defeito de tamanho crítico em diferentes tempos experimentais

Um Defeito de Tamanho Crítico ou *Critical Size Defect* (CSD) pode ser definido como o menor tamanho de ferida intraóssea em um osso particular ou espécie animal que não cicatrizará espontaneamente durante o tempo de vida do animal, de acordo com o trabalho clássico nesta temática (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Diferentes estudos mostraram que defeitos de 8 mm de diâmetro criados em calvária de ratos Sprague-Dawley adultos na região interparietal do crânio não repararam espontaneamente em 12 semanas, sendo observada uma

formação óssea inferior a 50% do defeito, por técnicas radiográfica e histopatológicas (FIGURA 4C). Uma formação óssea mínima em geral ocorre nas margens do defeito da calvária, dado o crescimento ósseo centrípeto (da borda para o centro do defeito) esperado, embora também possa se observar no centro do defeito ósseo a presença espontânea de ilhas de osso novo (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Uma grande variedade de técnicas avaliativas tem sido usada para quantificar o crescimento ósseo, após a cirurgia, dentro do defeito. Mais comumente, essas investigações envolvem análises de amostras necropsiadas, por histologia (GOSAIN *et al.*, 2000) ou imaginologia, seja usando radiografias ou microtomografias (COWAN *et al.*, 2004). A análise histomorfométrica do osso da calvária sugere ser mais precisa por envolver a determinação da fração do defeito que foi coberto por osso novo (UMOH *et al.*, 2009). Esse valor da Área Fracional Óssea é determinado após o sacrifício e é usado como uma indicação quantitativa do crescimento ósseo no modelo (WÜRZLER *et al.*, 1998).

2.6 Indústria avícola

De acordo com o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (2018), no ano de 2017 o Brasil produziu 13,05 milhões de toneladas de carne de frango, das quais 66,9% se destinaram ao mercado interno e os demais 33,1% à exportação, sendo considerado o segundo maior produtor de carne de frango, ficando atrás apenas dos Estados Unidos da América (EUA). Dados da ABPA mostram que o Brasil no ano 2017 exportou 4320 milhões de toneladas de carne de frango de um valor aproximado de 7236 milhões de dólares (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2018). Tais números colocam o país em posição de destaque internacional e demonstram a capacidade produtiva do setor avícola brasileiro.

A indústria avícola gera, anualmente, bilhões de toneladas de resíduos e subprodutos. Aproximadamente 37% do peso vivo dos frangos de corte não são consumidos pelos seres humanos (MEEKER; HAMILTON, 2006). O crescimento da indústria avícola cria em decorrência uma grande quantidade de resíduos e subprodutos que são subaproveitados e contribuem na poluição ambiental. Dentre os resíduos produzidos, podem se destacar os de natureza sólida, como penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles e ossos (EL BOUSHY; VAN DER POEL, 2013). Tais resíduos apresentam-se como importantes fontes de proteínas, lipídeos e minerais com grande potencial para serem usados na produção de biomateriais, dentre os quais podem se destacar a queratina, o colágeno, o ácido hialurônico, o fibrinogênio

e a hidroxiapatita, que são largamente estudados para diversas aplicações biomédicas (WANG *et al.*, 2017; OVIEDO-RONDÓN, 2008).

Por outro lado, o setor avícola também deve se preocupar com o desenvolvimento de suas atividades de forma sustentável e equilibrada. Em função disto, se faz necessário o correto manejo dos resíduos gerados pelas atividades do setor avícola, bem como o refinamento de processos tecnológicos capazes de agregar valor a esses resíduos. É importante fortalecer a cadeia produtiva e gerar novas possibilidades de emprego e renda, ao mesmo tempo em que se minimiza o impacto socioambiental e contribui-se com a preservação do meio ambiente (CARIOCA; BARROS; COELHO, 2014; OVIEDO-RONDÓN, 2008).

Nesse sentido, o aproveitamento de resíduos sólidos da indústria avícola para o desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas converge com a busca por alternativas para o desenvolvimento sustentável na área de biotecnologia (CARIOCA; BARROS; COELHO, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

A incidência mundial de lesões ósseas, sejam locais ou sistêmicas, tem tendência acentuada de crescimento, tornando-se um problema de saúde pública mundial (AMINI; LAURENCIN; NAKUVARAPU, 2012). Estudos aprofundados relataram as deficiências, limitações e complicações consideráveis dos tratamentos clínicos atuais para reparação e regeneração óssea, usando autoenxertos e aloenxertos ósseos (BRYDONE; MEEK; MACLAINE, 2010; TAL, 2012). Embora tais intervenções clínicas demonstrem melhora no ganho ósseo, nenhuma delas possui todas as características biológicas ideais: potenciais osteocondutivo, osteoindutivos e angiogênicos elevados, segurança biológica, baixa morbidade do paciente, ausência de restrições de tamanho, acesso pronto aos locais cirúrgicos, longa vida útil e custo razoável (AMINI; LAURENCIN; NUKAVARAPU, 2012).

No mercado de consumo, existem pelo menos 200 alternativas comercialmente diferentes que podem ser usadas como enxertos ósseos (MEDTRONIC, 2011). No entanto, o mercado dos enxertos é muito limitado pelo preço dos materiais. No Brasil, o mercado de xenoenxertos é dominado por várias empresas locais, oferecendo produtos bons e menos dispendiosos do que os oferecidos por marcas internacionais, embora sejam de qualidade menor. Com opções baratas disponíveis em um país sensível ao custo, o mercado de xenoenxerto está configurado para continuar crescendo nos próximos anos (RESERCH AND MARKETS, 2017).

Nesse sentido, espera-se contribuir com o desenvolvimento biomateriais nacionais a partir de subprodutos da indústria avícola que sejam tão eficazes quanto os disponíveis atualmente no mercado com a finalidade de regeneração óssea, tornando esta tecnologia mais acessível para um setor mais amplo da população, igualmente contribuindo para a diminuição do impacto ambiental desses subprodutos avícolas subutilizados.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar biologicamente *in vivo* a osteocondutividade de biomateriais produzidos a partir de subprodutos da indústria avícola para o reparo ósseo em ratos.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar o comportamento biológico e potencial osteocondutor de biomateriais derivados de subprodutos da indústria avícola enxertados em defeitos ósseos de tamanho crítico de 8 mm em calvária de ratos.
- Quantificar por métodos histomorfométricos a densidade percentual de tecido ósseo neoformado em associação a tecido conjuntivo e biomaterial em CSD tratados com hidrogéis a base de colágeno avícola.
- Estudar a influência da incorporação de hidroxiapatita e queratina em hidrogéis de colágeno no reparo ósseo.

5 METODOLOGIA

5.1 Biomateriais

5.1.1 Preparação dos hidrogéis

Todos os biomateriais usados para a caracterização biológica *in vivo* da osteocondutividade foram produzidos na Embrapa Agroindústria Tropical (EMBRAPA, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil). As matérias primas usadas na preparação dos hidrogéis foram obtidas de subprodutos da indústria avícola, onde o colágeno foi obtido de peles e tendões, a queratina de penas e a hidroxiapatita de ossos de frango (CAVALCANTE, 2017). No total, foram preparados 4 tipos de hidrogéis de colágeno reticulados com riboflavina com um teor de 1,5% de sólidos dissolvidos de diferente composição de Colágeno (Col), Hidroxiapatita (HA) e Queratina (Q) (TABELA 1).

Tabela 1 — Distribuição de hidrogéis avícolas usados na caracterização *in vivo* da osteocondutividade em CSD em calvaria de ratos

Grupo	Composição dos hidrogéis		
	Colágeno - Col (%)	Hidroxiapatita - HA (%)	Queratina - Q (%)
G1	100	0	0
G2	90	10	0
G3	90	0	10
G4	90	5	5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente o colágeno foi dissolvido em ácido acético 0,05 M durante 24 h, sob agitação a temperatura de 4 °C. Após a dissolução, a solução de colágeno foi neutralizada com NaOH 5% (m/m) e adicionou-se tampão PBS 10X em proporção 1:9. Em seguida, foram adicionados a hidroxiapatita e a queratina nas percentagens descritas anteriormente. Sob uma agitação constante, foi acrescentada a riboflavina atingindo uma concentração final de 0,005% (m/v). A mistura foi disposta em placas de Petri a uma altura de 4 mm e exposta a radiação UV com potência de 15 mW/cm² durante 30 min em uma câmara UV (Bioforce UV/Ozone ProCleaner Plus) para a reticulação química entre os aminoácidos das fibrilas de colágeno e congelado em ultrafreezer a -70 °C por 24 h e em seguida liofilizado até a obtenção dos hidrogéis livres de umidade (CAVALCANTE, 2017).

5.1.3 Caracterização físico-química e pré-tratamento

As características físicas e químicas dos materiais podem influenciar a resposta do tecido. Portanto, os biomateriais testados na caracterização da osteocondutividade foram caracterizados na Embrapa Agroindústria Tropical por Calorimetria Exploratória Diferencial, ou *Differential Scanning Calorimeter* (DSC), Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier ou *Fourier Transform Infrared spectroscopy* (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os resultados físico-químicos favoráveis obtidos validaram o avanço para a etapa seguinte de caracterização biológica (CAVALCANTE, 2017).

Previamente à caracterização *in vivo* da osteocondutividade, os biomateriais foram modelados em secções circulares de 8 mm de diâmetro com uma massa média de 0,037 g (\pm 0,006 g). Cada secção foi esterilizada por exposição à radiação UVA por 30 min a 25 °C em uma câmara de fluxo laminar vertical (Pachane, Brasil). Após a preparação e esterilização, os materiais foram manipulados assepticamente até o procedimento de implantação.

5.2 Animais

5.2.1 Aspectos éticos

A pesquisa com animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobral, sob o protocolo #04/17 (ANEXO I).

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).

5.2.2 Distribuição e cuidado dos animais

Foram usados 60 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, variedade Wistar, machos, com 12 semanas de idade e com peso médio entre 220-250 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (BIOCEN/UFC, Fortaleza, CE, Brasil). Os animais foram

divididos aleatoriamente em 6 grupos de 10 animais (4 grupos testes e 2 grupos controles) e avaliados nos tempos experimentais de 1 e 3 meses ($n = 5$ animais/tratamento). Como controle positivo ou C(+), foi usado o osso autógeno fragmentado proveniente da calvária, enquanto que para o controle negativo ou C(-), não foi utilizado nenhum material de enxerto, mas o próprio preenchimento pelo coágulo sanguíneo formado naturalmente após realização do defeito ósseo (TABELA 2).

Tabela 2 — Distribuição de ratos por tratamento na caracterização *in vivo* da osteocondutividade de biomateriais avícolas em CSD em calvaria de ratos

Grupo	Tempo experimental		Número total
	1 mês	3 meses	
C(-)	5	5	10
C(+)	5	5	10
G1	5	5	10
G2	5	5	10
G3	5	5	10
G4	5	5	10

Fonte: Elaborada pelo autor.

Durante todo o período experimental, os animais ficaram em grupos de entre 2-3 animais e permaneceram em um ambiente controlado, com ventilação e ciclos claro/escuro de 12 h, ração peletizada (Nuvilab, Brasil) e água *ad libitum*, sendo monitorados pelo pesquisador responsável do Biotério Setorial da Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral.

5.3 Teste de caracterização *in vivo* de osteocondutividade

5.3.1 Anestesia e preparação pré-operatória

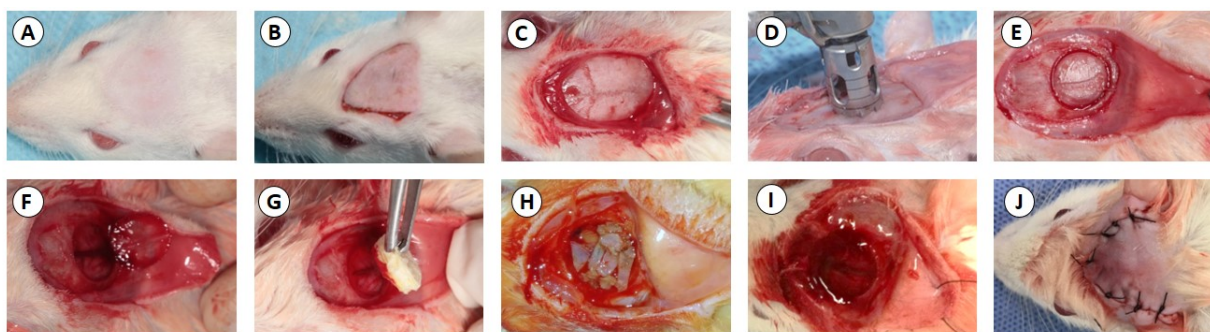
Os animais foram submetidos a anestesia geral por via intraperitoneal de cloridrato de quetamina (100 mg/kg, Vetnil, Brasil) e cloridrato de xilazina (12 mg/kg, Syntec, Brasil). Após a constatação da imobilidade e estabilidade da frequência respiratória dos animais, a região frontoparietal do crânio foi tricotomizada usando um barbeador elétrico (Phillips OneBlade, Holanda) e submetida a assepsia com gel de clorexidina 2% (Vic Pharma, Brasil). Os animais foram colocados sobre campos operatórios descartáveis estéreis individuais, confeccionados em polipropileno (TNT) nas dimensões de 20x30 cm, para início do implante dos materiais.

5.3.2 Procedimento cirúrgico: criação do Defeito de Tamanho Crítico

Em cada rato, foi realizada uma incisão semilunar na pele cobrindo a região frontoparietal do crânio usando um bisturi com lâmina n.º 15. O retalho mucoperiosteal foi elevado com o auxílio de descolador de periósteo do tipo Molt e a cortical óssea frontoparietal do crânio foi exposta. Em seguida, foi realizada uma craniectomia circular de 8 mm para construção de um CSD, utilizando uma broca cirúrgica trefina de 8 mm de diâmetro interno (Sistema de Implantes Nacionais, Brasil) acoplada a um contra ângulo redutor com rotação de 20:1 (Dentscler, Brasil) e a um micromotor cirúrgico (VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda., Brasil). Para diminuir o dano térmico, a área do defeito foi irrigada com abundante solução salina (NaCl 0,9%) fria e estéril durante todo o procedimento (PAULO *et al.*, 2011).

O fragmento osteotomizado foi retirado delicadamente com auxílio de um cinzel Ochsenbein N.º 1, e efetuado o preenchimento completo do defeito com uma das 6 modalidades terapêuticas descritas anteriormente na Tabela 2. O retalho foi reposicionado e suturado com fio de nylon 4.0 (TechNew, Brasil). As etapas do procedimento cirúrgico estão representadas na Figura 5.

Figura 5 — Procedimento cirúrgico de criação de CSD de 8 mm em calvárias de ratos



Fonte: Elaborada pelo autor. **Legenda:** (A) Tricotomia e antissepsia na calvária, (B) desenho da incisão, (C) exposição do crânio na região interparietal, (D) criação de defeito de tamanho crítico (8 mm) usando uma broca trefina, (E) delimitação do defeito, (F) remoção da tabua óssea na área do defeito, (G) preenchimento do defeito com o material teste, (H) controle positivo: osso autólogo, (I) controle negativo: coágulo sanguíneo e (J) sutura do retalho.

5.3.3 Cuidados e avaliação pós-operatória

Os ratos foram deixados em gaiolas individuais com ração peletizada e água *ad libitum*. Para garantir o bem-estar animal, após a realização do procedimento cirúrgico, foi ministrado Meloxicam (2 mg/kg, Ourofino, Brasil) por via subcutânea a cada 12 h durante 48 h, reavaliando o quadro local e sistêmico do animal para garantir que a dor foi controlada (NEVES; MANCINI; WENZEL, 2013).

5.3.4 Eutanásia e necropsia

Os animais foram eutanasiados nos tempos experimentais correspondentes de 1 mês ($n= 30$) ou 3 meses ($n= 30$) após a cirurgia. A eutanásia dos animais foi feita por sobredose de solução anestésica por aplicação intraperitoneal usando 5 vezes a doses usada na anestesia (500 mg/kg cloridrato de quetamina e 60 mg/kg cloridrato de xilazina). Constatada a morte do animal, foi realizada a necropsia excisional contendo a área do defeito e sua periferia, com uma margem de segurança de 5 mm utilizando um disco de Carborundum (Megaforth, USA) acoplado ao micromotor cirúrgico.

As carcaças dos animais foram acondicionadas em saco plástico branco especial para lixo com risco biológico e armazenadas sob refrigeração a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em um freezer até serem coletadas por empresa contratada pela UFC Sobral para posterior incineração.

5.4 Processamento histológico

5.4.1 Fixação, desmineralização e clivagem

Imediatamente após a coleta das amostras, estas foram fixadas por 48 h em formalina neutra 10% (v/v) (QEEL, Brasil) tamponada com tampão fosfato a pH 7,2. Posteriormente foram lavadas em água corrente durante 1 hora e desmineralizadas em solução ácida desmineralizadora rápida de ossos (Allkimia, Brasil) por 48 h e lavadas novamente com água corrente por 1 h. Por fim, cada peça cirúrgica foi clivada no centro do defeito crítico, no sentido do plano anatômico frontal ou perpendicular ao plano sagital mediano para posterior inclusão de ambas peças.

5.4.2 Desidratação, clarificação e impregnação

O processamento histológico foi feito em um processador de tecidos semiautomático (Leica TP1020, Alemanha). Logo após a desmineralização, as amostras foram desidratadas em álcool etílico (Dinâmica, Brasil) em concentrações crescentes (um banho a 70%, 80%, 90% e três banhos de 100%) por 1 h cada. Em seguida, procedeu-se com a clarificação em 2 banhos de xilol (Dinâmica, Brasil) por 1 h cada e posterior impregnação em 3 banhos de parafina líquida a 60°C (Synth, Brasil) por 1 h cada. Finalmente, as amostras foram incluídas em blocos de parafina com auxílio de uma central de inclusão (Leica EG1150, Alemanha).

5.4.3 Microtomia e coloração

As amostras foram cortadas em lâminas de 5 µm de espessura usando um micrótomo rotatório (Leica RM2125 RTS, Alemanha). Finalmente, os cortes foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE) seguindo o protocolo descrito por Molinaro *et al.*, (2009). Cada lâmina foi devidamente identificada para posterior análise.

5.5 Análises histopatológicas

5.5.1 Análise descritiva

Todas as lâminas foram avaliadas qualitativamente quanto ao processo de reparo ósseo, formação de tecido conjuntivo e persistência do enxerto nas diferentes condições experimentais.

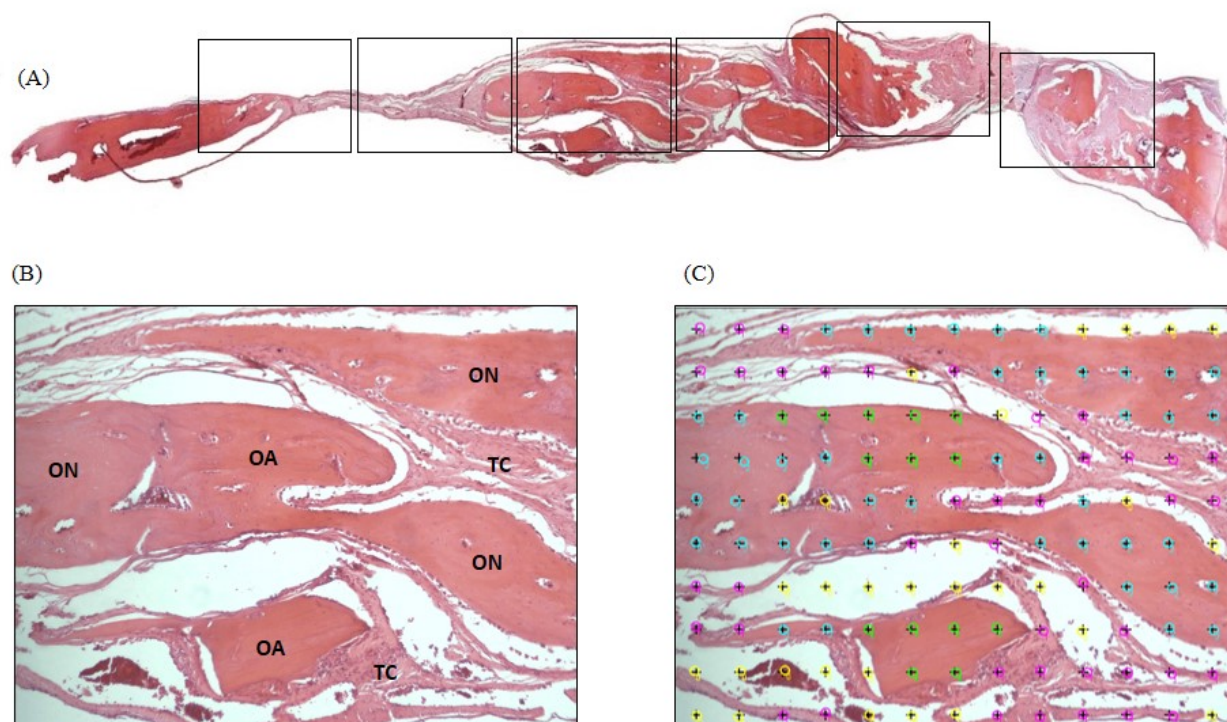
Para cada condição experimental (referente a um grupo por tempo experimental), foram obtidas fotomicrografias com uma câmera digital Cybershot DSC-W300 Super Steady Shoot (Sony, Brasil) conectada a um microscópio óptico (FWL-1000; Feldman Wild Leitz, Manaus, Brasil) com ampliação de 100x. Foi avaliado toda a extensão do defeito (de uma borda a outra) em todos os grupos (C-, C+, G1, G2, G3, G4,) e tempos experimentais (1 e 3 meses) para explicar os fenômenos biológicos anteriormente descritos no defeito de tamanho crítico em ratos.

5.5.2 Análise histomorfométrica

Para cada lâmina (referente a um animal por tratamento), foram obtidas fotomicrografias com uma câmera digital Cybershot DSC–W300 Super Steady Shoot (Sony, Brasil) conectada a um microscópio óptico (FWL-1000; Feldman Wild Leitz, Manaus, Brasil). Foram avaliados campos contíguos não sobrepostos (5 a 7 por corte) com ampliação de 100x, contendo toda a extensão do defeito, totalizando 365 imagens.

Os parâmetros avaliados na análise quantitativa histomorfométrica foram: tecido ósseo neoformado (ON), tecido ósseo antigo (OA), tecido conjuntivo (TC), material enxertado (M) e outras estruturas fora dessas definições (X). Cada fotomicrografia foi inserida no programa ImageJ 1.8.0 (National Institutes of Health, EUA), calibrado em micrômetros/pixel. Uma grade de 130 pontos foi sobreposta à imagem e cada ponto foi contado de acordo com a estrutura morfológica correspondente. As imagens obtidas foram quantificadas por um patologista experiente e um pesquisador previamente treinado. A Figura 6 sumariza o processo de obtenção das fotomicrografias e contagem histomorfométrica.

Figura 6 — Corte histológico de um CSD e avaliação histomorfométrica.



Fonte: Elaborada pelo autor. **Legenda:** (A) Imagem representativa de um defeito de tamanho crítico em calvária de rato contendo seis campos contínuos não sobrepostos. (B) Ampliação de um campo com magnificação de 100x mostrando osso novo (ON), osso antigo (OA) e tecido conjuntivo (TC). (C) Análise histomorfométrica usando o programa ImageJ mostrando sobreposição de grade de 130 pontos e parâmetros de contagem em cores distintas.

A partir do número de pontos absoluto obtido, foi determinada a densidade porcentual (%*i*) de cada parâmetro usando a Equação 1; onde p_i representa o número de pontos do parâmetro *i*; e *P* o número total de pontos.

$$\%i = \left(\frac{p_i}{P}\right) 100\% \quad (1)$$

5.7 Análises estatísticas

A densidade porcentual de cada parâmetro foi tabulada e expressa como a média (\pm desvio padrão) para cada tratamento e tempo experimental (GARG; MOHANTY, 2013). Os resultados foram dispostos em gráficos por meio do programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, EUA), para comparações da resposta biológica intergrupos (grupos experimentais diferentes, mesmo tempo) e intragrupos (mesmo grupo, tempos experimentais diferentes).

Os dados paramétricos da densidade porcentual média para cada parâmetro foram submetidos a uma análise de variância unidirecional (ANOVA) e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Nas análises intergrupos foi aplicado o pós-teste de Dunnett comparando a diferença entre as médias dos grupos experimentais em relação a ambos controles, considerando diferenças significativas com valores de $p < 0,05$. Nas análises intragrupos foi aplicado o pós-teste *t* de Student não pareado para determinar as diferenças entre as médias de cada parâmetro de um mesmo grupo em tempos experimentais diferentes, considerando diferenças significativas com valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Análise histopatológica descritiva

Em G1 (FIGURA 7A-D), notaram-se áreas de osso neoformado adjacentes ou em ilhas próximas à borda do defeito em 1 mês e 3 meses. No centro do defeito, houve presença do hidrogel de 100% Col permeado por tecido conjuntivo em 1 mês; já em 3 meses, o hidrogel esteve ausente e substituído por tecido conjuntivo.

Em G2 (FIGURA 7E-H), notaram-se áreas de osso neoformado adjacentes ou em ilhas próximas à borda do defeito em 1 mês e 3 meses; destaca-se a maior quantidade de osso neoformado não adjacente à borda do defeito em comparação a G1. No centro do defeito, apesar da redução do volume inicial em 1 mês do hidrogel de 90% Col + 10% HA, o biomaterial ainda esteve presente em 3 meses e o tecido conjuntivo de permeio ao biomaterial em 1 mês tornou-se mais denso em 3 meses.

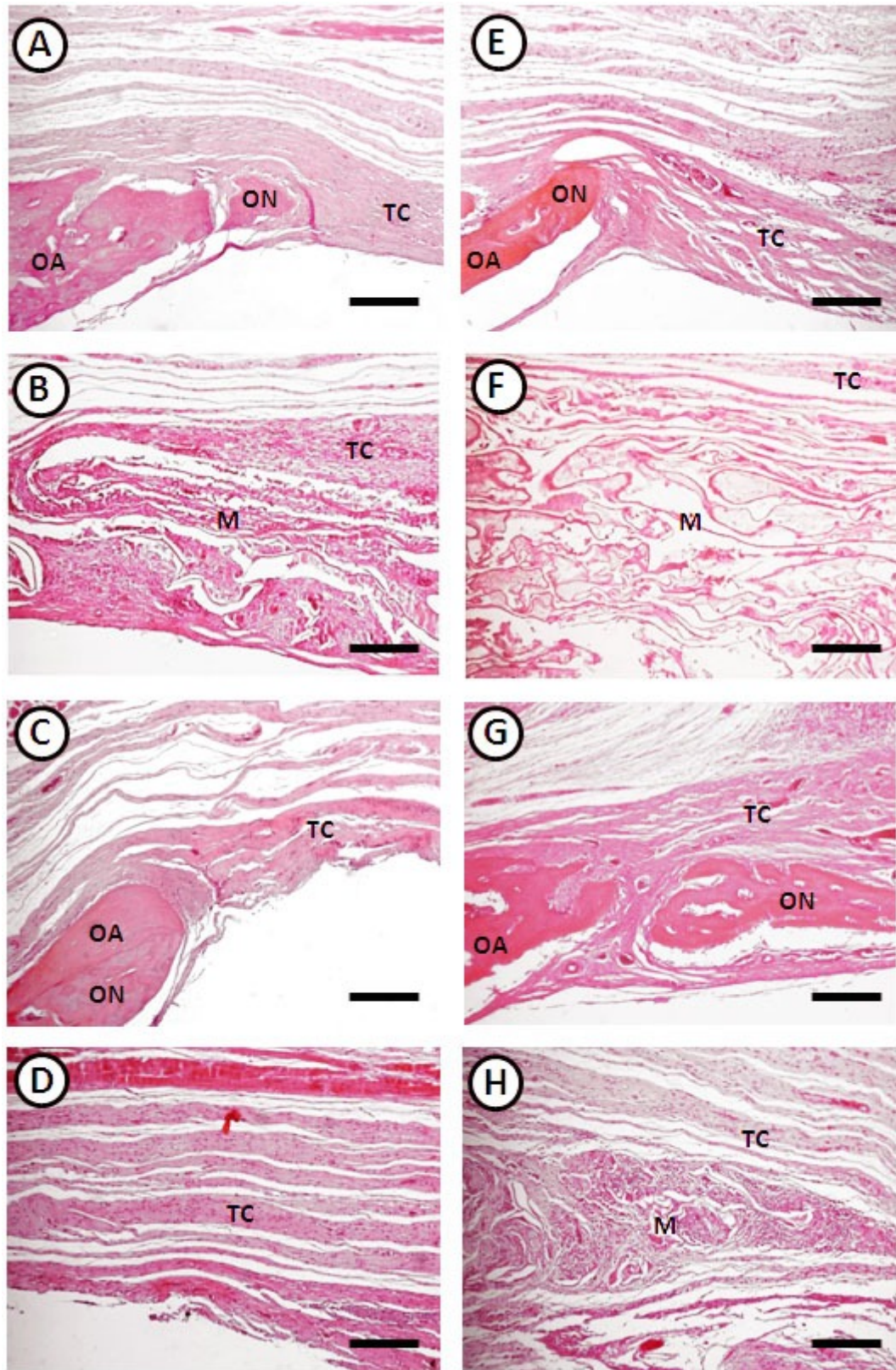
Em G3 (FIGURA 8A-D), notaram-se áreas de osso neoformado adjacentes ou em ilhas próximas à borda do defeito em 1 mês e 3 meses. No centro do defeito, houve presença do hidrogel de 90% Col + 10% Q permeado por tecido conjuntivo em 1 mês; já em 3 meses, o hidrogel esteve ausente e substituído por tecido conjuntivo.

Em G4 (FIGURA 8E-H), notaram-se áreas de osso neoformado adjacentes ou em ilhas próximas à borda do defeito em 1 mês e 3 meses. No centro do defeito, houve praticamente total ausência do hidrogel de 90% Col + 5% HA + 5% Q; na área por ele ocupada esteve presente rico tecido de granulação em 1 mês, substituído por tecido conjuntivo em 3 meses.

Em C(+) (FIGURA 9A-D), notaram-se áreas de osso neoformado mais exuberantes frente a todos os grupos, adjacentes ou em ilhas próximas à borda do defeito em 1 mês e 3 meses, bem como no centro do defeito. No centro do defeito, o osso autógeno foi suavemente sendo reabsorvido e substituído por osso neoformado entre 1 mês e 3 meses, não sendo notadas mudanças qualitativas na presença do tecido conjuntivo.

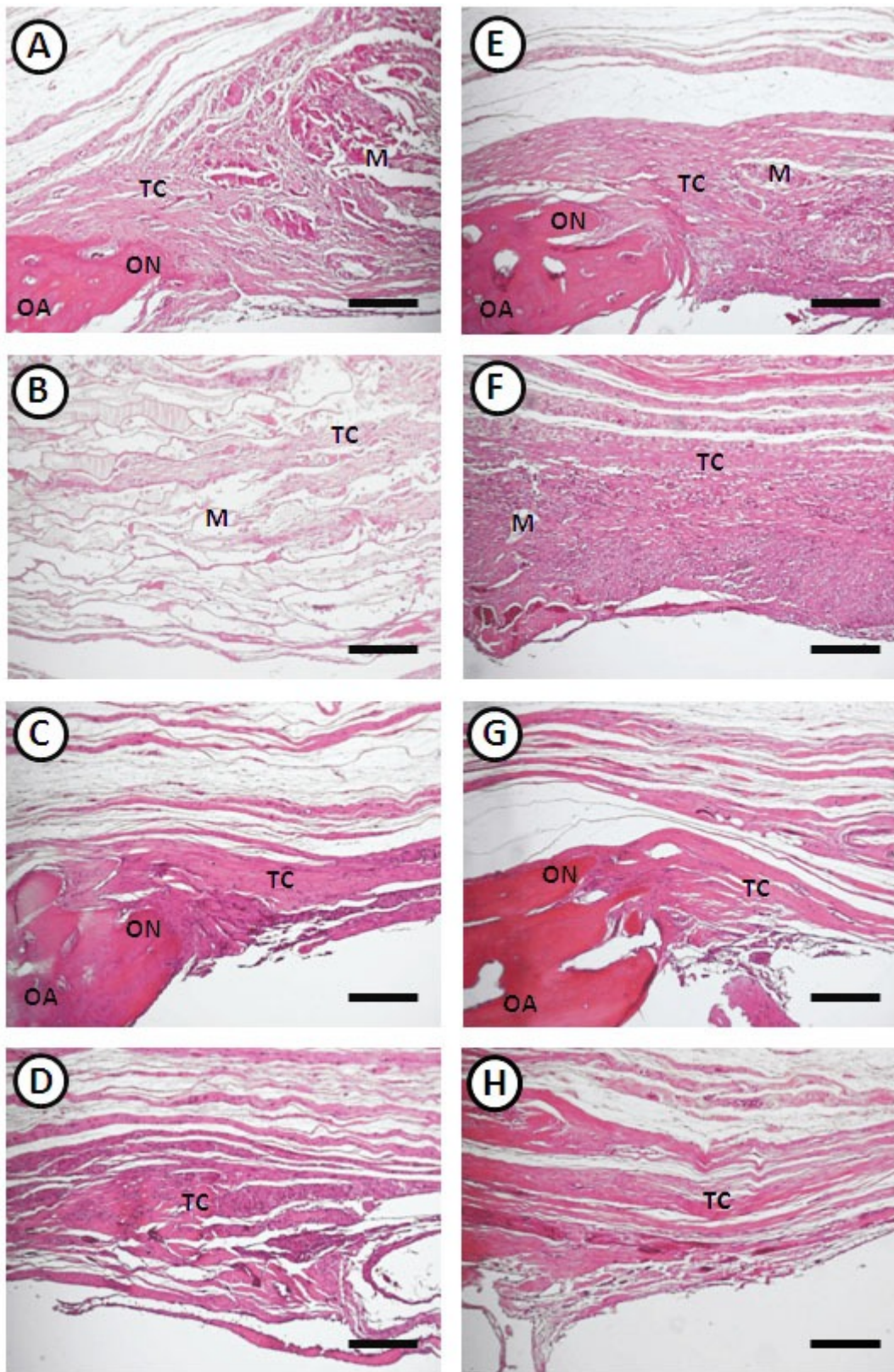
Em C(-) (FIGURA 9E-H), notaram-se áreas de osso neoformado adjacentes ou em ilhas próximas à borda do defeito em 1 mês e 3 meses. No centro do defeito, raras e pequenas ilhas de osso neoformado, ausência de material (grupo sem enxerto) e abundante presença de tecido conjuntivo em 1 mês e 3 meses.

Figura 7 — Análise histopatológica de defeito de tamanho crítico em ratos de G1 e G2.



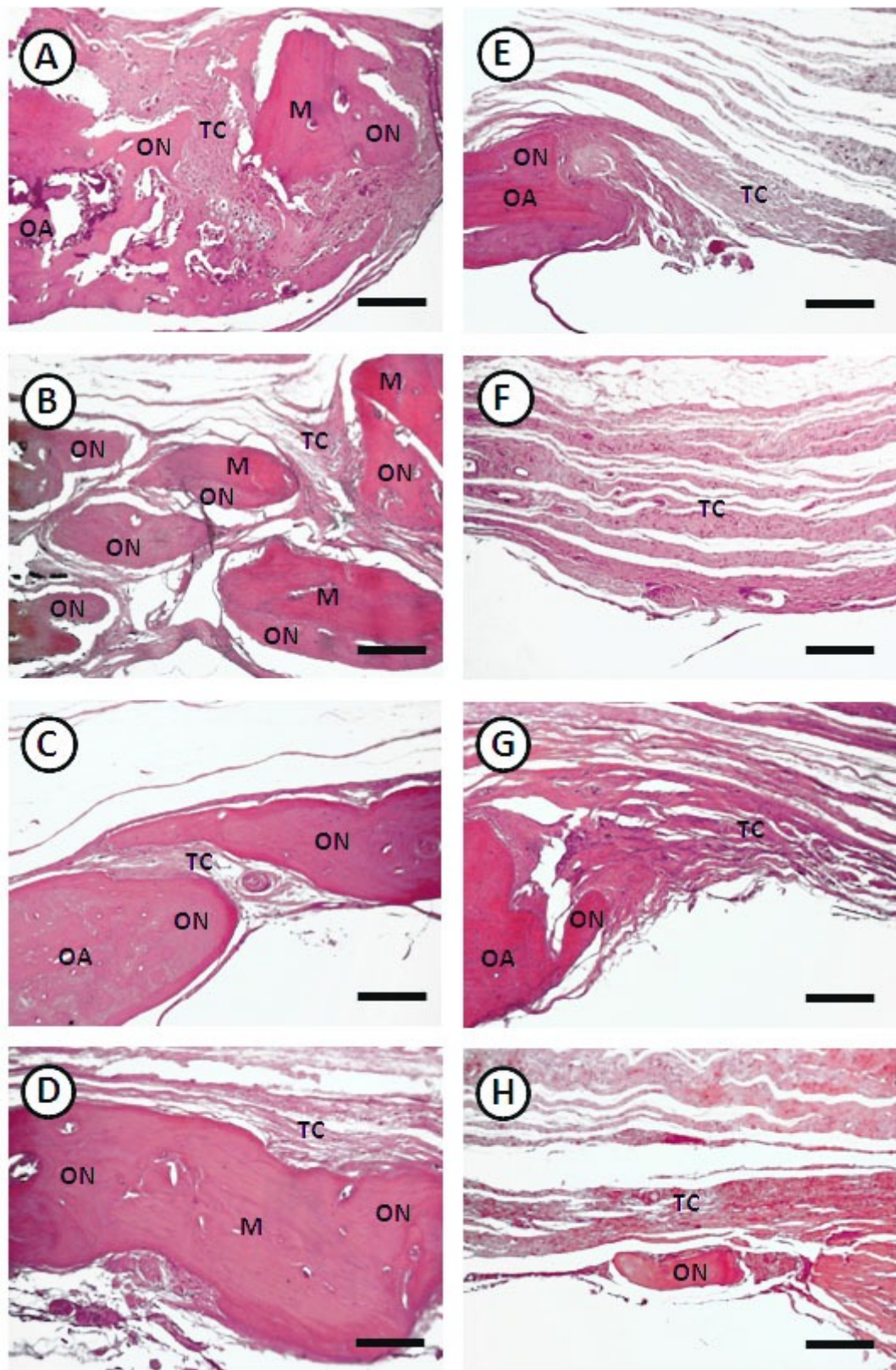
Fonte: Elaborada pelo autor. **Legenda:** G1 (A, 1 mês – borda; B, 1 mês – centro, C, 3 meses – borda, D, 3 meses – centro) e G2 (E, 1 mês – borda, F, 1 mês – centro, G, 3 meses – borda, H, 3 meses – centro). ON: Osso novo, OA: Osso antigo, M: Material, TC: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 100x. Barra de escala: 100µm.

Figura 8 — Análise histopatológica de defeito de tamanho crítico em ratos de G3 e G4.



Fonte: Elaborada pelo autor. **Legenda:** G3 (A, 1 mês – borda; B, 1 mês – centro; C, 3 meses – borda; D, 3 meses – centro) e G4 (E, 1 mês – borda; F, 1 mês – centro; G, 3 meses – borda; H, 3 meses – centro). ON: Osso novo, OA: Osso antigo, M: Material, TC: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 100x. Barra de escala: 100µm.

Figura 9 — Análise histopatológica de defeito de tamanho crítico em ratos de C(+) e C(-).



Fonte: Elaborada pelo autor. **Legenda:** C(+) (A, 1 mês – borda; B, 1 mês – centro, C, 3 meses – borda, D, 3 meses – centro) e C(-) (E, 1 mês – borda, F, 1 mês – centro, G, 3 meses – borda, H, 3 meses – centro). ON: Osso novo, OA: Osso antigo, M: Material, TC: tecido conjuntivo. Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 100x. Barra de escala: 100µm.

6.2 Análise histomorfométrica

A Tabela 3 sumariza a distribuição da média percentual (\pm desvio padrão) obtida em cada parâmetro analisado por histomorfometria, para cada condição experimental.

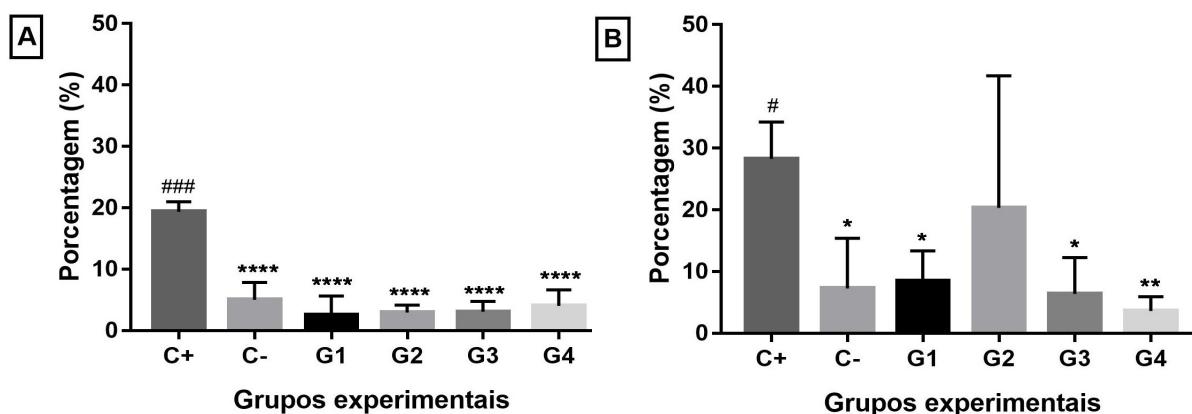
Tabela 3 — Distribuição de média percentual (desvio padrão) de cada parâmetro avaliado						
1 mês						
Parâmetros	G1	G2	G3	G4	C+	C-
ON	2,6 (\pm 3,1)	2,9 (\pm 1,2)	3,1 (\pm 1,7)	4,0 (\pm 2,6)	19,3 (\pm 1,6)	5,0 (\pm 2,9)
OA	1,9 (\pm 2,1)	2,1 (\pm 1,4)	1,3 (\pm 1,0)	2,3 (\pm 1,2)	2,4 (\pm 1,4)	2,7 (\pm 1,0)
TC	69,4 (\pm 7,3)	57,8 (\pm 22,2)	56,6 (\pm 19,3)	64,5 (\pm 8,1)	30,8 (\pm 11,5)	52,1 (\pm 5,1)
M	3,9 (\pm 4,0)	13,4 (\pm 21,3)	17,5 (\pm 15,3)	0,1 (\pm 0,1)	19,9 (\pm 8,2)	0,0 (\pm 0,0)
X	22,2 (\pm 7,8)	23,8 (\pm 14,0)	21,6 (\pm 12,8)	29,1 (\pm 6,9)	27,5 (\pm 4,5)	40,2 (\pm 4,6)
3 meses						
Parâmetros	G1	G2	G3	G4	C+	C-
ON	6,5 (\pm 3,8)	15,7 (\pm 15,7)	4,9 (\pm 4,5)	2,8 (\pm 1,8)	21,8 (\pm 4,6)	5,6 (\pm 6,3)
OA	3,4 (\pm 1,7)	3,5 (\pm 1,8)	1,7 (\pm 0,8)	2,4 (\pm 1,5)	2,5 (\pm 1,5)	3,6 (\pm 1,8)
TC	53,6 (\pm 7,2)	58,6 (\pm 17,8)	59,7 (\pm 8,1)	61,8 (\pm 5,0)	32,1 (\pm 9,1)	48,4 (\pm 9,3)
M	0,0 (\pm 0,0)	2,1 (\pm 4,2)	0,0 (\pm 0,0)	0,0 (\pm 0,0)	17,5 (\pm 5,2)	0,0 (\pm 0,0)
X	36,5 (\pm 7,7)	20,1 (\pm 7,7)	33,7 (\pm 3,7)	33,0 (\pm 6,7)	26,2 (\pm 4,5)	42,4 (\pm 4,8)

Fonte: Elaborada pelo autor. Legenda: osso neoformado (ON), osso antigo (OA), tecido conjuntivo (TC), material enxertado (M) e outras estruturas (X).

6.2.1 Osso neoformado

Em 1 mês, todos os grupos tiveram menos osso neoformado (2,6- 5,0%) em relação ao C(+) (19,3%) ($P < 0,0001$). Em 3 meses, todos os grupos, exceto G2, também exibiram menos osso (de 2,8 a 6,5%) em relação ao C(+) (21,8%) ($P < 0,05$). O G2 apresentou 15,7% de osso novo e não foi estatisticamente diferente em relação a nenhum dos controles (GRÁFICO 1).

Gráfico 1 — Análise da porcentagem de osso neoformado na caracterização *in vivo* em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.

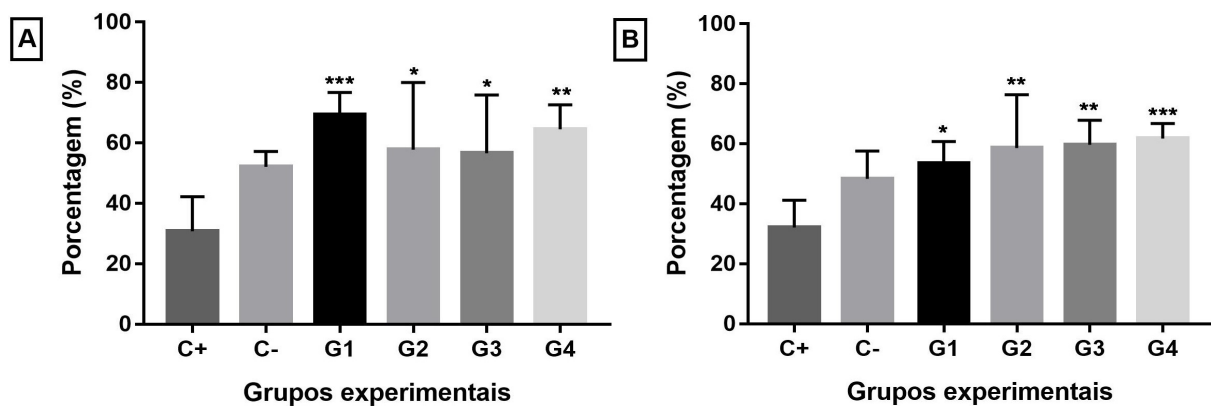


Fonte: Elaborado pelo autor. Legenda: Tempo experimentais de 1 mês (A) e 3 meses (B). 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Médias (Desvio padrão) analisadas pelo teste paramétrico de ANOVA e pós-teste de Dunnett. Diferenças significativas em relação ao C+: $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) e $P < 0,0001$ (****); e em relação ao C-: $P < 0,05$ (#), e $P < 0,001$ (###).

6.2.2 Tecido conjuntivo

Em 1 mês, todos os grupos exibiram mais tecido conjuntivo (56,6-69,4%) em relação ao C(+) (30,8%) ($P<0,05$). Em 3 meses, todos os grupos também exibiram mais tecido conjuntivo (53,6-61,8%) em relação ao C(+) (32,1%) ($P<0,05$). Entretanto, não houve diferenças entre os materiais experimentais com C(-) nos tempos avaliados (GRÁFICO 2).

Gráfico 2 — Análise da porcentagem de tecido conjuntivo na caracterização *in vivo* em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola

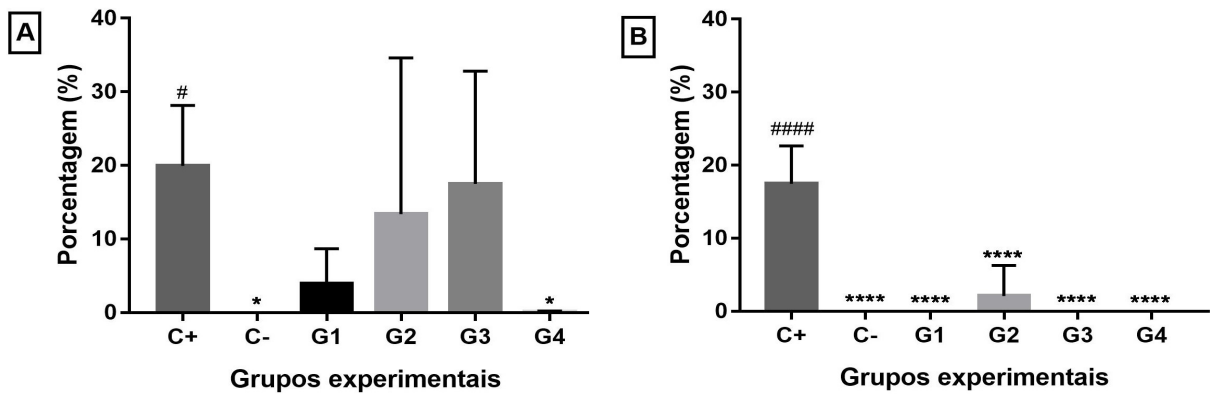


Fonte: Elaborado pelo autor. **Legenda:** Tempo experimentais de 1 mês (A) e 3 meses (B). 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Médias (Desvio padrão) analisadas pelo teste paramétrico de ANOVA e pós-teste de Dunnett. Diferenças significativas em relação ao C+: $P<0,05$ (*), $P<0,01$ (**) e $P<0,001$ (***).

6.2.3 Material enxertado

Em 1 mês, a presença do biomaterial para G1, G2 e G3 (3,9-17,5%) não foi diferente em relação ao C+ (19,9%), mas foi menor para G4 (0,1%, $P<0,05$) e ausente para C(-). Em 3 meses, G2 foi o único material ainda presente (2,1%), embora em quantidade bem menor em relação ao C+ (17,5%, $P<0,0001$) (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 — Análise da porcentagem de material enxertado na caracterização *in vivo* em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.

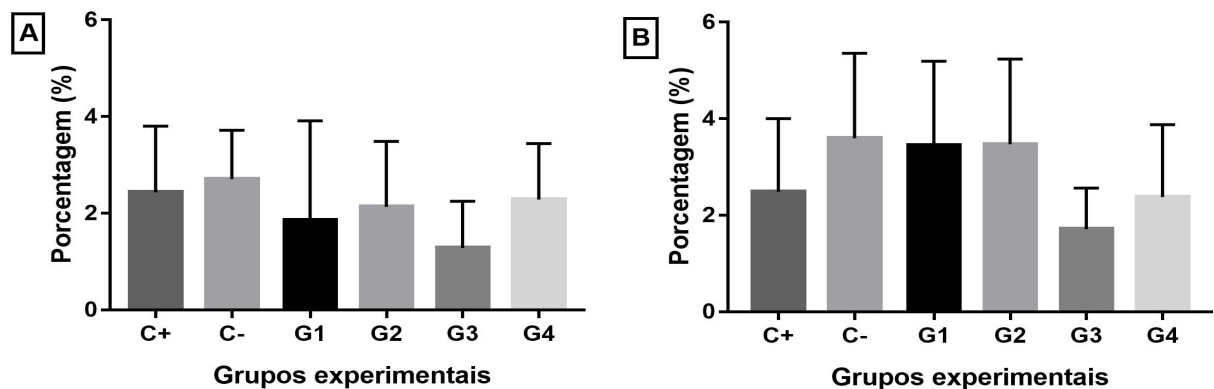


Fonte: Elaborado pelo autor. **Legenda:** Tempo experimentais de 1 mês (A) e 3 meses (B). 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Médias (Desvio padrão) analisadas pelo teste paramétrico de ANOVA e pós-teste de Dunnet. Diferenças significativas em relação ao C+: $P < 0,05$ (*), e $P < 0,0001$ (****), e em relação ao C-: $P < 0,05$ (#), e $P < 0,0001$ (####).

6.2.4 Osso antigo

Em 1 mês, não houve diferenças significativas entre os grupos quanto a presença de osso antigo (1,3-2,3%) em relação ao C(+) e C(-), respectivamente 2,4% e 2,7%. Em 3 meses, também não houve diferenças significativas entre os grupos quanto a presença de osso antigo (1,7-3,5%) em relação ao C(+) e C(-), respectivamente 2,5% e 3,6% (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 — Análise da porcentagem de osso antigo na caracterização *in vivo* em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.

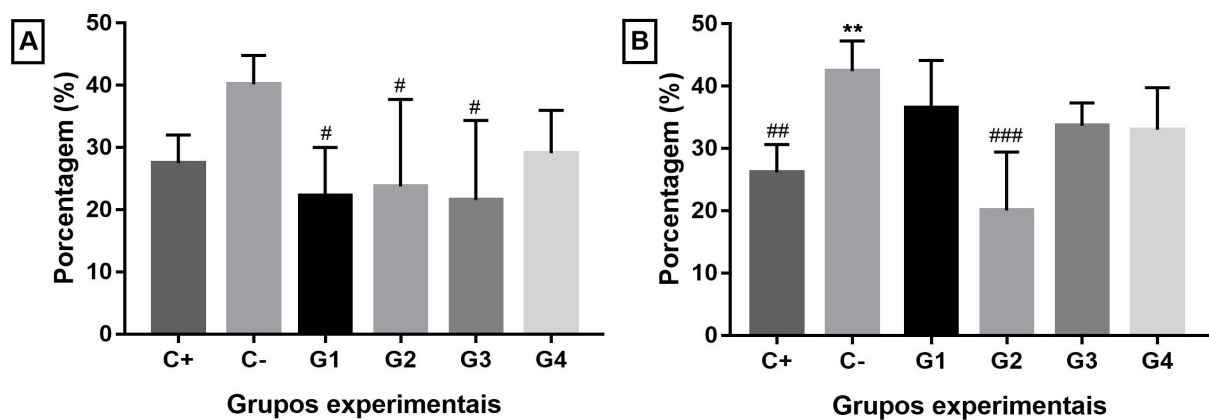


Fonte: Elaborado pelo autor. **Legenda:** Tempo experimentais de 1 mês (A) e 3 meses (B). 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Médias (Desvio padrão) analisadas pelo teste paramétrico de ANOVA e pós-teste de Dunnet.

6.2.5 Outras estruturas

Em 1 mês, não houve diferenças significativas entre os grupos quanto a presença de outras estruturas (21,6-29,1%) em relação ao C(+) (27,5%). Em 3 meses, também não houve diferenças significativas entre os grupos quanto a presença de outras estruturas (20,1-36,5%) em relação ao C(+) (26,2%) (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 — Análise da porcentagem de outras estruturas na caracterização *in vivo* em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.



Fonte: Elaborado pelo autor. **Legenda:** Tempo experimentais de 1 mês (A) e 3 meses (B). 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Médias (Desvio padrão) analisadas pelo teste paramétrico de ANOVA e pós-teste de Dunnett. Diferenças significativas em relação ao C+: $P < 0,01$ (**), e em relação ao C-: $P < 0,05$ (#), e $P < 0,01$ (###).

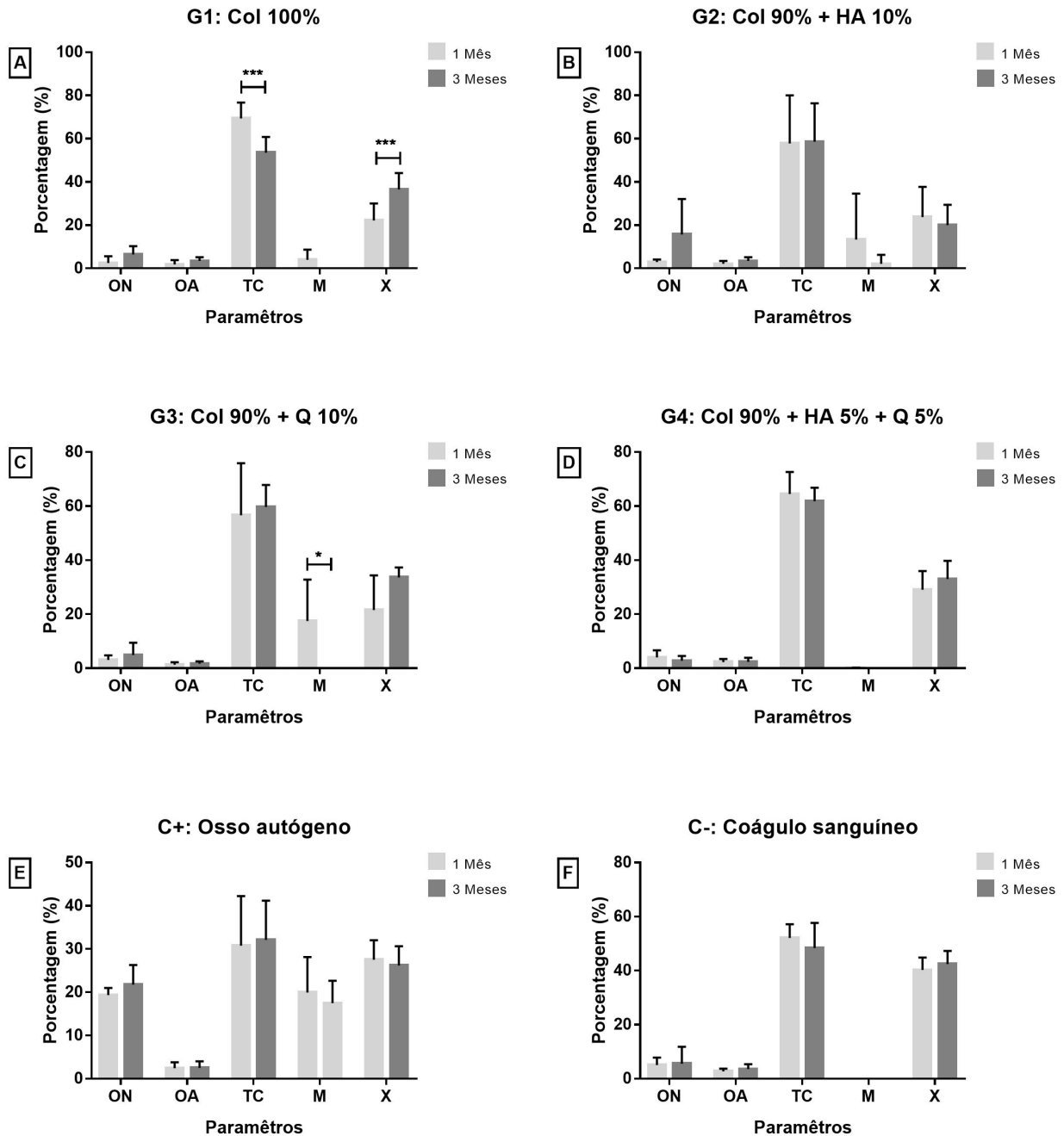
6.2.6 Análise intragrupos

Dentre os cinco parâmetros histológicos avaliados para os quatro grupos experimentais e os dois controles, foram encontradas diferenças significativas ao longo do tempo (entre 1 mês e 3 meses) em somente em três deles, conforme descrito no Gráfico 6.

Para G1, foi observada uma diminuição significativa de 1 a 3 meses na quantidade de tecido conjuntivo (de 69,4% para 53,6%, $P < 0,001$) e um aumento significativo de outras estruturas (de 22,2% para 36,5%, $P < 0,001$).

Além disso, para G3 houve uma diminuição significativa de 1 a 3 meses na quantidade de biomaterial (de 17,5% para 0,0%, $P < 0,05$).

Gráfico 6 — Análise intragrupos de parâmetros histomorfométricos na caracterização *in vivo* em ratos da osteocondutividade de biomateriais derivados da indústria avícola.



Fonte: Elaborado pelo autor. **Legenda:** 100% Col (G1), 90% Col + 10% HA (G2), 90% Col + 10% Q (G3), 90% Col + 5% HA + 5% Q (G4), osso autógeno (C+) e coágulo sanguíneo (C-). Médias (Desvio padrão) analisadas pelo teste paramétrico de ANOVA e pós-teste t de student. Diferenças significativas $P < 0,05$ (*) e $P < 0,001$ (**).

7 DISCUSSÃO

A opção da padronização do defeito de 8mm de diâmetro em calvária de ratos na presente pesquisa converge com a maioria da literatura especializada e dessa forma mostra sua ampla reprodutibilidade científica para comparações de resultados com diferentes tipos de tratamentos empregados para regeneração óssea (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; CARDOSO *et al.*, 2006; MESSORA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2008; PAULO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013; ALLON *et al.*, 2014; BITTENCOURT *et al.*, 2014; SPIN *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016; SAÇAK *et al.*, 2017; AN *et al.*, 2017), conforme a Tabela 4.

Tabela 4 — Histomorfometria de parâmetros biológicos encontrados em defeitos de tamanho crítico de 8 mm em calvária de ratos sob distintos tratamentos experimentais locais, sem células, fatores de crescimento ou alterações sistêmicas (Continua)

Autor (ano)	Tratamento	Osso neoformado	Tecido conjuntivo	Biomaterial
Allon <i>et al.</i> , (2014)	Aloplástico (Biovidro)	1,80% (2,50) (4 sem)	NA	2,4% (0,08) (4 sem)
An <i>et al.</i> , (2017)	Coágulo	4,1% (2,9) (2 sem)		-
		4,12% (1,21) (8 sem)		-
	Membrana colágena (DHT)	1,20% (0,37) (2 sem)	NA	1,63% (0,44) (2 sem)
		3,04% (1,19) (8 sem)		0,27% (0,18) (8 sem)
	Osso alógeno (FDBA)	10,74% (1,76) (2 sem)		3,30% (0,69) (2 sem)
		19,38% (5,48) (8 sem)		1,64% (0,88) (8 sem)
	13,42% (0,86) (2 sem)	4,95% (0,80) (2 sem)		
	DHT + FDBA	19,52% (1,99) (8 sem)		1,55% (0,47) (8 sem)
Bittencourt <i>et al.</i> , (2014)	Coágulo	9,8% (2,1) (6 meses)	30,2% (5,6) (6 meses)	-
		15,0% (4,7) (9 meses)	27,8% (6,3) (9 meses)	-
	Xenoenxerto 75% HA: 25% Col	21,4% (4,0) (6 meses)	22,7% (7,6) (6 meses)	37,7% (5,6) (6 meses)
		26,0% (3,2) (9 meses)	24,6% (7,4) (9 meses)	37,8% (4,3) (9 meses)
Cardoso <i>et al.</i> , (2006)	Coágulo	10,3% (5,8) (15 dias)	NA	NA
		7,0% (4,4) (30 dias)		
		7,6% (3,6) (60 dias)		
	Biovidro (Biogran)	9,2% (8,1) (15 dias)		
		12,6% (7,7) (30 dias)		
		15,8% (10,7) (60 dias)		
	Biovidro (Perioglas)	6,9% (6,4) (15 dias)		
		7,7% (2,2) (30 dias)		
		10,6% (2,9) (60 dias)		
Costa <i>et al.</i> , (2016)	Coágulo	9% (5) (1 mês)	35% (3) (1 mês)	-
		8% (4) (6 meses)	33% (2) (6 meses)	-
	Membrana de colágeno (Genderm)	10% (3) (1 mês)	41% (3) (1 mês)	-
		6% (2) (6 meses)	37% (3) (6 meses)	-
	βTCP	22% (5) (1 mês)	44% (2) (1 mês)	38% (2) (1 mês)
		13% (3) (6 meses)	38% (2) (6 meses)	35% (2) (6 meses)
	βTCP+membrana de colágeno	9% (3) (1 mês)	42% (1) (1 mês)	41% (1) (1 mês)
		32% (5) (6 meses)	37% (2) (6 meses)	41% (4) (6 meses)
	βTCMP	12% (5) (1 mês)	42% (1) (1 mês)	46% (2) (1 mês)
		18% (1) (6 meses)	39% (2) (6 meses)	39% (3) (6 meses)
	βTCMP+membrana de colágeno	6% (3) (1 mês)	35% (1) (1 mês)	43% (3) (1 mês)
		40% (4) (6 meses)	36% (2) (6 meses)	32% (3) (6 meses)

Tabela 4 — Histomorfometria de parâmetros biológicos encontrados em defeitos de tamanho crítico de 8 mm em calvária de ratos sob distintos tratamentos experimentais locais, sem células, fatores de crescimento ou alterações sistêmicas (Conclusão)

Autor (ano)	Tratamento	Osso neoformado	Tecido conjuntivo	Biomaterial		
Ferreira <i>et al.</i> , (2013)	Coágulo	1,0% (0,5) (8 sem) 5,1% (0,2) (12 sem)				
	PLGA	1,5% (0,5) (8 sem) 3,0% (0,7) (12 sem)				
	Colágeno	3,0% (0,1) (8 sem) 6,0% (0,6) (12 sem)				
	HAP-Gel	7,0% (1,5) (8 sem) 3,4% (0,7) (12 sem)	NA	NA		
	TiO ₂ -HAP-Gel	17,5% (2,5) (8 sem) 7,90% (0,35) (12 sem)				
	Osso autógeno	7,0% (2,0) (8 sem) 9,6% (0,6) (12 sem)				
	Lee <i>et al.</i> , (2016)	Aloenxerto descelularizado	42,50% (0,65) (12 sem)	NA	NA	
Messora <i>et al.</i> (2008)	Coágulo	7,8% (2,3) (1 mês) 12% (4) (3 meses)	NA	NA		
Oliveira <i>et al.</i> , (2008)	Osso autógeno	4,5% (1,5) (7 dias) 14,1% (6,6) (14 dias) 29,9% (2,9) (21 dias) 40,2% (5,9) (30 dias)	68,2% (1,5) (7 dias) 46,2% (8,9) (14 dias) 26,4% (5,8) (21 dias) 35,6% (15,5) (30 dias)	27,3% (2,8) (7 dias) 39,7% (9,7) (14 dias) 43,7% (4,8) (21 dias) 24,2% (11,2) (30 dias)		
		Osso Bovino desmineralizado (DBB)	53,5% (6,4) (90 dias) 1,9% (1,1) (7 dias) 12,0% (8,3) (14 dias) 11,8% (2,7) (21 dias) 8,8% (6,0) (30 dias) 15,6% (9,3) (90 dias)	20,5% (8,0) (90 dias) 51,1% (11,2) (7 dias) 86,8% (8,0) (14 dias) 88,1% (2,7) (21 dias) 91,1% (6,0) (30 dias) 84,4% (9,4) (90 dias)	26,0% (8,9) (90 dias) 47,0% (0,8) (7 dias) 1,2% (0,4) (14 dias) 0,1% (0,1) (21 dias) 0,0% (0,0) (30 dias) 0,02% (0,04) (90 dias)	
			Coágulo	2,00% (1,16) (30 dias) 4,62% (2,82) (90 dias)	23% (8) (30 dias) 22,0% (5,5) (90 dias)	- -
	Osso autógeno			8,25% (3,18) (30 dias) 10,94% (3,95) (90 dias)	21% (9) (30 dias) 16,9% (5,4) (90 dias)	23% (10) (30 dias) 24,2% (6,8) (90 dias)
				Xenoenxerto bovino HA(75%)-Col(25%)	4,50% (1,49) (30 dias) 8,46% (1,07) (90 dias)	29% (2) (30 dias) 29,0% (1,8) (90 dias)
	Saçak <i>et al.</i> , (2017)	Coágulo Enxerto Autólogo Biovidro	7,3% (2,2) (12 sem) 9,0% (2,0) (12 sem) 9,0% (2,1) (12 sem)	NA	NA	
	Spin <i>et al.</i> , (2015)	Coágulo	4,0% (0,4) (15 dias) 5,2% (2,3) (60 dias)	95,60% (0,05) (15 dias) 94,0% (1,5) (60 dias)	- -	
Biovidro			3,0% (1,9) (15 dias) 3,1% (0,9) (60 dias)	72% (12) (15 dias) 73% (8) (60 dias)	23% (15) (15 dias) 22,0% (7,5) (60 dias)	
		Osso bovino liofilizado	1,7% (0,5) (15 dias) 6,3% (1,6) (60 dias)	79,0% (4,5) (15 dias) 80,0% (5,5) (60 dias)	18,0% (4,0) (15 dias) 13,0% (5,5) (60 dias)	
			Biovidro/Osso bovino liofilizado	3,2% (0,8) (15 dias) 4,8% (0,9) (60 dias)	68% (17) (15 dias) 80,0% (6,0) (60 dias)	28% (15) (15 dias) 15,0% (6,5) (60 dias)
		Tavakoli-Darestani <i>et al.</i> , (2014)		Coágulo Hidroxiapatita	0,8% (2,0) (8 sem) 69,5% (9,5) (8 sem)	NA
Zambuzzi <i>et al.</i> , (2012)		Coágulo Autoenxerto Osso inorgânico bovino	5% (3) (1 mês) 20% (11) (1 mês) 7% (5) (1 mês)	32% (8) (1 mês) 24% (9) (1 mês) 42% (11) (1 mês)	- - 15% (9) (1 mês)	

Fonte: Elaborada pelo autor. **Legenda:** Não avaliado (NA), não reportado (-), Colágeno (Col), Hidroxiapatita (HA). **Nota:** Porcentagem (desvio padrão) determinada a partir de áreas em mm² em defeitos de 8 mm de diâmetro.

A Tabela 4 mostra que os tempos experimentais de 1 mês e 3 meses são consistentes na literatura para avaliar a regeneração óssea, evidenciando reparo ósseo inicial e avançado respectivamente. Tais tempos convergem com o desenho metodológico da presente pesquisa e dessa forma validam sua aceitabilidade. Ainda assim, existem alguns poucos estudos que se propõem a avaliar osso neoformado em períodos bem precoces, de 7 a 15 dias (CARDOSO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SPIN *et al.*, 2015; AN *et al.*, 2017) analisando somente o processo inflamatório anterior ao reparo (PAULO *et al.*, 2011), o que representa um viés para avaliar a osteocondutividade *in vivo* de terapias ósseas, dada a possibilidade de interpretação de falsos negativos.

Um defeito de tamanho crítico não permite a regeneração óssea espontânea no tempo de vida do animal, a não ser que algum tipo de material osteoindutor, osteocondutor ou osteogênico seja usado como preenchimento (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). A presença de osso neoformado normal de um defeito crítico de 8 mm em calvária de ratos não tratado, preenchido apenas com coágulo sanguíneo, pode variar de 2% a 9% em 1 mês (CARDOSO *et al.*, 2006; MESSORA *et al.*, 2008; PAULO *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2016) e de 4 a 12% em 3 meses (MESSORA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2013; PAULO *et al.*, 2011; SAÇAK *et al.*, 2017). Já quando é usado osso autógeno no preenchimento de um defeito crítico, pode-se observar presença de osso neoformado variando de 8,25% a 40,2% em 1 mês (OLIVEIRA *et al.*, 2008; PAULO *et al.*, 2011) e de 9,6% a 53,5% em 3 meses (OLIVEIRA *et al.*, 2008; PAULO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013).

Os dados histomorfométricos deste estudo, que exibiram média percentual de osso neoformado para o osso autógeno ou C(+) em 1 mês de 19,3% e em 3 meses de 21,8%, bem como para o coágulo sanguíneo ou C(-) em 1 mês de 5,0% e em 3 meses de 5,6%, em geral se assemelham às faixas porcentuais encontradas na literatura para os dois padrões de controle experimental. O fato da neoformação óssea no C(-) ter sido ligeiramente abaixo do padrão esperado em 3 meses após cirurgia só reforça o fato de que sem biomaterial de preenchimento a regeneração óssea em defeito crítico é prejudicada.

Em análise dos grupos experimentais (G1 a G4), os dados histomorfométricos obtidos neste estudo demonstraram que não houve diferença significativa de neoformação óssea (2,6-5,0%) em relação ao C(-) no período de 1 mês para nenhum dos materiais testados e houve uma significativa menor formação óssea (de 2,8 a 6,5%) em relação ao C(+) em 3 meses. O G2 apresentou 15,7% de osso neoformado, o que sugere em primeira análise um melhor desempenho dentro desse parâmetro; entretanto, G2 não exibiu diferença estatística em

relação a nenhum dos dois controles em 3 meses. Esse resultado poderia ser explicado pelo grande desvio padrão encontrado (15,7), sugerindo a existência de respostas biológicas heterogêneas entre os animais, sendo necessário o aprofundamento dos estudos de caracterização para compreender melhor esse comportamento atípico em sítio ortotópico de implantação do biomaterial.

Ao analisar as faixas percentuais esperadas de osso neoformado na literatura para outros biomateriais implantados em calvária de ratos em distintos tempos experimentais, é possível observar que a formação de osso varia significativamente dependendo do tipo do material usado. A quantidade de osso neoformado encontrado de 1 mês a 3 meses para tratamentos de defeitos críticos com biomateriais poliméricos como colágeno, ácido poli(lático-co-ácido glicólico) (PLGA) ou matrizes ósseas desmineralizadas pode variar entre 3 e 10% (OLIVEIRA *et al.*, 2008; FERREIRA, *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016; AN *et al.*, 2017); para biomateriais compósitos a base de colágeno suplementados com uma fase mineral, como HA, β -TCP, β -TCMP, variar entre 3,4 e 9% (PAULO *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2016); e para cerâmicas (HA, β -TCP, β -TCMP) ou biovidros, de diferentes composições dopados ou não com íons metálicos, variar entre 1,8 e 22% (CARDOSO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2008; ALLON *et al.*, 2014; SPIN *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016; SAÇAK *et al.*, 2016; AN *et al.*, 2017).

Dessa forma, o resultado acerca da osteocondutividade exibido por G1 se assemelha à faixa percentual esperada para a classe de polímeros à qual pertence, ao passo que G2, G3 e G4 exibem semelhança de percentuais de osteocondutividade em relação à faixa encontrada para biomateriais compósitos, corroborando assim a literatura.

Estudo de Tavakoli-Darestani (2014) revelou um ganho ósseo de 69,5% de osso neoformado em 8 semanas com uso de HA. Esse valor está acima do esperado para osso autógeno e poderia ser interpretado como discrepante ou um falso positivo. Por outro lado, também pode reforçar a afirmação da literatura de que as cerâmicas possuem alta capacidade de osteocondução, mas que podem apresentar respostas muito heterogêneas, tal como foi observado e poderia explicar o comportamento atípico em G2, um hidrogel híbrido de colágeno e hidroxiapatita.

A hidroxiapatita é um dos materiais mais amplamente utilizados na produção de substitutos ósseos (SHAVANDI *et al.*, 2015). O uso difundido de HA na cirurgia ortopédica tem direcionado muitos esforços para o avanço dos biomateriais baseados em HA através de modificações na superfície, a fim de alcançar graus mais elevados de biocompatibilidade e osteocondutividade (NISHIKAWA *et al.*, 2005). A utilidade da HA como substituto do enxerto

ósseo é determinada especificamente por seu diâmetro e interconectividade dos poros, maximizando o crescimento ósseo com tamanhos mínimo dos poros de 100 μm (preferencialmente de 150 a 200 μm) (GUPTA *et al.*, 2015).

Cavalcante (2017) trabalhando também com hidrogéis avícolas de colágeno reticulados com riboflavina suplementados com HA e Q, embora de concentrações diferentes utilizadas neste estudo, reportou diâmetros variados de 50 até 379 μm sem um padrão de distribuição uniforme. A desigualdade nos tamanhos e a distribuição dos poros dos hidrogéis testados também poderiam explicar a baixa osteocondutividade obtida.

Como pode ser observado no grupo do coágulo sanguíneo/C(-), quando um defeito crítico não é tratado com um material que favoreça a formação de osso novo, o defeito é preenchido com tecido conjuntivo que invade a área do defeito, impede a adesão e proliferação de células osteoprogenitoras e reduz a quantidade geral de osso neoformado (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Os resultados também demonstram que os todos os materiais testados aumentaram significativamente a formação de tecido conjuntivo em relação ao osso autógeno/C(+) em 1 mês e 3 meses. Isto indica que os hidrogéis foram pouco eficazes em impedir a invasão do tecido mole circundante, evitando a proliferação de células osteogênicas na área do defeito (DIMITRIOU *et al.*, 2012), o que também ajuda a explicar a baixa osteocondutividade dos materiais.

Oliveira e colaboradores (2008), ao caracterizarem uma matriz óssea bovina desmineralizada, material composto por porção orgânica, obtiveram presença de 91% de tecido conjuntivo em 1 mês. Já compósitos à base de membranas de colágeno com HA, β -TCP, β -TCMP relatados por Costa e colaboradores (2016) mostraram em 1 mês de 35% a 44% de tecido conjuntivo em análise por histomorfometria. Ainda, Paulo e colaboradores (2011) usando um compósito de Col/HA (1:3) obtiveram resultados mais favoráveis, diminuindo a formação de tecido conjuntivo para 17% em 1 mês. A comparação desses três estudos pode sugerir um sinergismo entre colágeno e apatitas, onde a porção mineral seria o tipo de componente mais eficaz para impedir a invasão do tecido conjuntivo no defeito crítico.

Interessantemente, na média porcentual de tecido conjuntivo, não foi observada redução deste parâmetro para G2 frente aos demais grupos experimentais ou ao longo do tempo, mesmo em 3 meses exibindo maior quantidade de osso novo; os valores de tecido conjuntivo apenas mantiveram-se estáveis, discordando das evidências científicas anteriores.

A respeito da presença do material nos diferentes tempos experimentais, só G2 esteve ainda presente após 3 meses do processo de implantação, porém representando apenas 2,1%

da área do defeito. Assim, se evidenciou que os hidrogéis de colágeno usados nesta pesquisa foram facilmente degradados e a HA poderia justificar um maior tempo de degradação no grupo G2.

Ao serem delineadas as propriedades de um material osteocondutor, a degradabilidade é um fator essencial a ser discutido, pois é necessário que ele seja suficientemente estável para permitir a neoformação de osso sobre sua superfície (NISHIKAWA *et al.*, 2005). Os materiais usados como substitutos ósseos devem degradar-se dentro de um período de tempo comparável aos processos de cicatrização tecidual, variando de semanas a alguns meses. O tempo de reabsorção deve ser compatível com o tempo requerido para formação óssea; nem tão curto que possibilite invasão de tecido conjuntivo e torne o material inadequado como enxerto ósseo ou membrana, porém nem tão longo que interfira na substituição do material pelo osso neoformado (LYU; UNTEREKER, 2009).

Com base na Tabela 4, é possível observar que cerâmicas e biovidros são mais resistentes à biodegradação (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SPIN *et al.*, 2015) em relação aos biomateriais compósitos (BITTENCOURT *et al.*, 2014, COSTA *et al.*, 2016; PAULO *et al.*, 2011). As membranas de colágeno são geralmente degradáveis entre 2 a 8 semanas, dependendo da técnica empregada no processo de fabricação (AN *et al.*, 2017). Hidrogéis de colágeno com um alto grau de reticulação demoram mais tempo para serem completamente reabsorvidos em relação a outros materiais menos reticulados (OZEKI; TABATA, 2005).

Em comparação com hidrogel apenas com Col avícola (G1), a presença de HA ou Q também não conseguiu inibir a degradabilidade acentuada dos hidrogéis compósitos (G2, G3 e G4). Os compósitos de HA geralmente apresentam bons tempos de biodegradabilidade compatíveis com o reparo ósseo, dependendo das características físico-químicas da HA (SHAVANDI *et al.*, 2015). Por outro lado, os estudos que têm investigado as propriedades *in vivo* de substitutos ósseos com base na queratina ainda são incipientes (DIAS *et al.*, 2010). Dias e colaboradores (2017), ao pesquisarem compósitos de Q/HA sem colágeno, reportaram maiores tempo de reabsorção em relação a materiais a base de Col, sendo possível detectar os biomateriais de Q/HA após 1 e 3 meses de implantação. Estes resultados indicaram que concentrações maiores de HA e Q aumentam o tempo de reabsorção, especialmente devido à HA, coincidindo parcialmente com os resultados encontrados na presente pesquisa ao ser o grupo G2 com maior teor de HA o único material avícola ainda presente em 3 meses. Isto também sugere que a uma concentração final do 10% de Q o biomaterial é mais rapidamente degradável em relação com a HA.

A avaliação por histomorfometria de outros parâmetros pouco reportados na literatura

temática, como são o osso antigo e outras estruturas, se justifica pela preocupação em evitar falsos positivos (contagens maiores de osso novo, distinguindo-o de osso antigo), e falsos negativos (contagem maiores de tecido conjuntivo, distinguindo-o de outras estruturas de contagem, tais como espaço sem a amostra biológica na lâmina, derme e anexos cutâneos sobre o defeito). Assim, a avaliação destes parâmetros permitiu comparar a homogeneidade de todas as condições experimentais, usando como controle interno parâmetros que se seriam afetados igualmente em todas as condições experimentais, o que pôde ser observado na presente pesquisa. A literatura temática citada na Tabela 4 pouco explora esses parâmetros e são raras as exceções que demonstram a mesma preocupação de usar um controle interno para garantir a acurácia do método de contagem (BITTENCOURT *et al.*, 2014; PAULO *et al.*, 2011).

Todos os materiais de origem avícola caracterizados neste trabalho podem classificar-se como biodegradáveis, portanto, não são adequados para uso como enxertos ósseos. Entretanto, G2 apresentou a menor taxa de biodegradabilidade, o que sugere um potencial uso como membrana para regeneração óssea guiada, apesar de não impedir completamente a infiltração do tecido conjuntivo.

Os materiais caracterizados neste estudo tiveram baixas concentrações de HA e Q, apenas entre 5 a 10%. Isso sugere, para geração de membranas de regeneração óssea guiada, que seja preferível reformular as composições para atingir um teor de HA nos hidrogéis de Col, com objetivo de manter por mais tempo sua necessária estabilidade dimensional, reduzir quantidade de tecido conjuntivo e aumentar as suas propriedades osteocondutivas, assim garantindo maior efetividade para o tratamento de perdas ósseas.

8 CONCLUSÃO

Os subprodutos da indústria avícola subsidiaram a síntese de hidrogéis a base de colágeno, hidroxiapatita e queratina biocompatíveis, aplicáveis experimentalmente como barreiras de membrana no tratamento de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos.

Os hidrogéis, compostos predominantemente a base de colágeno avícola, apresentaram alta biodegradabilidade acompanhada de baixa osteocondutividade. A incorporação de hidroxiapatita mostrou ser o componente chave para atingir a melhor resposta biológica, enquanto a queratina não contribuiu significativamente na performance geral dos hidrogéis.

Como perspectivas para o refinamento destes biomateriais de procedência avícola, sugere-se que novas formulações e condições de processamento dos biomateriais possam ser realizadas. Um futuro protocolo experimental poderia incluir o aumento da concentração mais próxima da biomimética e a distribuição uniforme de hidroxiapatita nos hidrogéis, bem como melhoria no controle da interconectividade e do diâmetro de poros durante a síntese dos materiais. Dessa forma, esses biomateriais poderiam exibir um período de estabilidade mais longo e serem mais atrativos como barreiras de membrana no uso clínico, ou ainda mesmo exibirem potencial biotecnológico como arcabouços osteocondutores para enxertia óssea.

REFERÊNCIAS

- AHO, O. *et al.* The mechanism of action of induced membranes in bone repair. **JBJS**, v. 95, n. 7, p. 597-604, 2013.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular Biology of The Cell**. Ney York: Garland Science, 2010.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal**, v. 10, n. 2, p. S96-S101, 2001.
- ALLON, I.; ANAVI, Y.; ALLON, D. M.; Topical Simvastatin Improves the Pro-Angiogenic and Pro-Osteogenic Properties of Bioglass Putty in the Rat Calvaria Critical-Size Model. **Journal of Oral Implantology**, v. 40, n. 3, p. 251-258, 2014.
- AMINI, A.; LAURENCIN, C.; NUKAVARAPU, S. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 40, n. 5, 2012.
- AN, Y.Z. *et al.* Dehydrothermally Cross-Linked Collagen Membrane with a Bone Graft Improves Bone Regeneration in a Rat Calvarial Defect Model. **Materials**, v. 10, n. 8, p. 1-12, 2017.
- APARICIO, C.; GINEBRA, M. **Biom mineralization and biomaterials: fundamentals and applications**. Woodhead Publishing, 2015.
- ARNAUD, E. Advances in cranioplasty with osteoinductive biomaterials: summary of experimental studies and clinical prospects. **Child's Nervous System**, v. 16, n. 10-11, p. 659-668, 2000.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual de 2018**. 2018.
- AYBAR, A.; TERRITORIALE, E.; MISSANA, L. An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. **Acta odontologica latinoamericana: AOL**, v. 18, n. 2, p. 63-67, 2005.
- BARON, R. "MDText.com." **Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling**. 13 de maio de 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279149/> (acesso em 28 de novembro de 2017).
- BITTENCOURT, R. C. *et al.* Preclinical evaluation of a xenogenic hydroxyapatite/collagen-based bone substitute material. **Journal of Dental Science**. v. 29, n. 1, p. 6-13, 2014.
- BLUM, J. *et al.* In vivo evaluation of gene therapy vectors in ex vivo-derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model. **Human gene therapy**, v. 14, n. 18, p. 1689-1701, 2003.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.

BRONZINO, J.; WONG, J.; PETERSON, D. *Biomaterials: principles and Practices*. **CRC Press**, 2012.

BRYDONE, A. S.; MEEK, D.; MACLAINE, S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine**, v. 224, n. 12, p. 1329-1343, 2010.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 174, p. 28-42, 1983.

CARDOSO, A. *et al.* Histomorphometric analysis of tissue responses to bioactive glass implants in critical defects in rat calvaria. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 128-137, 2006.

CARIOCA, J. O. B.; BARROS, L. M.; COELHO, A. L. **Biotechnology for the Development of a Green Economy**. Fortaleza, 16th International Biotechnology Symposium and Exhibition, p. 945, 2014.

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.

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

CHEN, L. *et al.* Biomimetic porous collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 134, n. 37, 2017.

COSTA, N. M. F. *et al.* Osteogenic effect of tricalcium phosphate substituted by magnesium associated with Genderm® membrane in rat calvarial defect model. **Materials Science and Engineering C**, v. 61, p. 63-71, 2016.

COWAN, C. *et al.* Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 560, 2004.

CROCKETT, J. *et al.* Bone remodelling at a glance. **Journal Cell Science**, v. 124, n. 7, p. 991-998, 2011.

DENG, H.; LIU, Y. **Current topics in Bone Biology**. London: World Scientific Publisingh, 2005.

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

DIAS, G. *et al.* Biocompatibility and osseointegration of reconstituted keratin in an ovine model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials**, v. 92, n. 2, p. 513-520, 2010.

- DIAS, G. *et al.* Osteoconduction in keratin–hydroxyapatite composite bone-graft substitutes. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 7, p. 2034-2044, 2017.
- DIMITRIOU, R. *et al.* The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. **BMC medicine**, v. 10, n. 1, p. 81, 2012.
- DONOS, N. *et al.* Effect of GBR in combination with deproteinized bovine bone mineral and/or enamel matrix proteins on the healing of critical-size defects. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 1, p. 101-111, 2004.
- DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, 2003.
- EINHORN, T.; GERSTENFELD, L. Fracture healing: mechanisms and interventions. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 45, 2015.
- EL BOUSHY, A. H.; VAN DER POEL, A. **Handbook of poultry feed from waste: processing and use**. Springer Science & Business Media, 2013.
- FERREIRA, J. *et al.* Titanium-enriched hydroxyapatite–gelatin scaffolds with osteogenically differentiated progenitor cell aggregates for calvaria bone regeneration. **Tissue Engineering Part A**, v. 19, n. 15-16, p. 1803-1816, 2013.
- GALLER, K. *et al.* Scaffolds for dental pulp tissue engineering. **Advances in dental research**, v. 23, n. 3, p. 333-339, 2011.
- GARG, P.; MOHANTY, Debajyoti. Mean (standard deviation) or mean (standard error of mean): time to ponder. **World Journal of Surgery**, v. 37, n. 4, p. 932-932, 2013.
- GIANNOUDIS, P.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update. **Injury**, v. 36, n. 3, p. S20-S27, 2005.
- GOLDSMITH, B. **Thermoplastic keratin composition**. U.S. Patent n. 922,692, 25 maio 1999.
- GOSAIN, A. *et al.* Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 106, n. 2, p. 360-371, 2000.
- GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**; v. 33, n. 6, p. 1352-8, 2010.
- GUPTA, A. *et al.* Hydroxyapatite crystals as a bone graft substitute in benign lytic lesions of bone. **Indian journal of orthopaedics**, v. 49, n. 6, p. 649, 2015.
- HIRANO, N., *et al.* Novel approach to calvarial bone transport using a rabbit model. **Neurologia medico-chirurgica**, v. 46, n. 2, p. 69-74, 2006.

- HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 18-23, 2012.
- HONG, S. *et al.* The effect of a fibrin-fibronectin/ β -tricalcium phosphate/recombinant human bone morphogenetic protein-2 system on bone formation in rat calvarial defects. **Biomaterials**, v. 27, n. 20, p. 3810-3816, 2006.
- INODA, H.; YAMAMOTO, G.; HATTORI, T. Histological investigation of osteoinductive properties of rh-BMP2 in a rat calvarial bone defect model. **Journal of cranio-maxillo-facial surgery**, v. 32, n. 6, p. 365-369, 2004.
- JAHANGIR, A. *et al.* Bone-graft substitutes in orthopaedic surgery. **AAOs now**, v. 2, n. 1, p. 35-37, 2008.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- JUNG, R. *et al.* Evaluation of an in situ formed synthetic hydrogel as a biodegradable membrane for guided bone regeneration. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 4, p. 426-433, 2006.
- KANO, M. *et al.* Osteogenic potential of primed periosteum graft in the rat calvarial model. **Annals of plastic surgery**, v. 54, n. 1, p. 71-78, 2005.
- KHOURI, R. *et al.* Repair of calvarial defects with flap tissue: role of bone morphogenetic proteins and competent responding tissues. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 98, n. 1, p. 103-109, 1996.
- KNESER, U. *et al.* Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 1, p. 7-19, 2006.
- KUCHARZ, E. J. Biosynthesis of Collagen. **The Collagens: Biochemistry and Pathophysiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 31-53. 1992.
- KUMAR, P.; VINITHA, B.; FATHIMA, G. Bone grafts in dentistry. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 5, n. Suppl 1, p. S125, 2013.
- LANGER, R.; TIRRELL, D. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487, 2004.
- LEE, J. *et al.* Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. **JBJS**, v. 83, n. 7, p. 1032-1039, 2001.
- LEE, D. J. *et al.* Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. **Journal of Tissue Engineering**, v. 7, p. 1-11, 2016.
- LEPRES, J.; KERSTEN, B.; TANG, Y. **"Gunstream's Anatomy & Physiology"** 104. New York: Mc Graw Hill Education, 2016.

LUTOLF, M. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5413-5418, 2003.

LYU, S.; UNTEREKER, D. Degradability of polymers for implantable biomedical devices. *International journal of molecular sciences*, v. 10, n. 9, p. 4033-4065, 2009.

MAH, J. *et al.* The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. **The European Journal of Orthodontics**, v. 26, n. 5, p. 475-482, 2004.

MANKIN, H.; HORNICEK, F.; RASKIN, K. Infection in massive bone allografts. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 432, p. 210-216, 2005.

MASQUELET, A.; BEGUE, T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. **Orthopedic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 27-37, 2010.

MEDTRONIC, **Bone Graft Options Categorization guide**. USA. 2011. Avaliável em <<http://www.infusebonegraft.com/healthcare-providers/bone-grafting-options/categorization-of-bone-grafts/index.htm> >

MEEKER, D. L.; HAMILTON, C. R. **An overview of the rendering industry. Essentials of Rendering: All About the Animal By-product Industry**. Arlington, VA National Renderers Association (Ed DL Meeker), p. 1-16, 2006.

MESSORA, M. R. *et al.* Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. **Journal of periodontal research**, v. 43, n. 6, p. 723-729, 2008.

MOLINARO, E. *et al.* **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 4. 2009.

NAYAK, S. *et al.* Progress of Regenerative Therapy in Orthopedics. **Current osteoporosis reports**, v. 16, n. 2, p. 169-181, 2018.

NEVES, S.; MANCINI, J.; e WENZEL, E. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**. São Paulo, 2013.

NISHIKAWA, T. *et al.* Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone. **Implant dentistry**, v. 14, n. 3, p. 252-260, 2005.

NUSSENBAUM, B.; RUTHERFORD, R.; KREBSBACH, P. Bone regeneration in cranial defects previously treated with radiation. **The Laryngoscope**, v. 115, n. 7, p. 1170-1177, 2005.

OLIVEIRA, R. C. *et al.* Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clinical Oral Implants Research**, v. 19, p. 749-754, 2008.

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

OZCELIK, D. *et al.* Comparison of accuracy of three-dimensional spiral computed tomography, standard radiography, and direct measurements in evaluating facial fracture healing in a rat model. **Annals of plastic surgery**, v. 53, n. 5, p. 473-480, 2004.

OZEKI, M.; TABATA, Y. *In vivo* degradability of hydrogels prepared from different gelatins by various cross-linking methods. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 16, n. 5, p. 549-561, 2005.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 3, p. 1863-1887, 2010.

PAULO, A. *et al.* Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. **Brazilian dental journal**, v. 22, n. 4, p. 322-328, 2011.

RESEARCH AND MARKETS. **Brazil Market Report for Dental Bone Graft Substitutes - MedCore**. United States. 2017. Disponível em:
<https://www.researchandmarkets.com/research/c9s4xs/brazil_market>

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

ROLVIEN, T. *et al.* Cellular mechanisms responsible for success and failure of bone substitute materials. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 2893, 2018.

ROSS, M.; e PAWLINA, W. **Histología. Correlación con biología celular y molecular**. Barcelona: Wolters Kluwer, 2016.

ROUSE, J.; VAN DYKE, M. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. **Materials**, v. 3, n. 2, p. 999-1014, 2010.

RUTKOVSKIY, A.; STENSLØKKEN, K.; VAAGE, I. Osteoblast differentiation at a glance. **Medical science monitor basic research**, v. 22, p. 95, 2016.

SAÇAK, B. *et al.* Repair of critical size defects using bioactive glass seeded with adipose - derived mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 105, n. 5, p. 1002-1008, 2017.

SALERNITANO, E.; MIGLIARESI, C. Composite materials for biomedical applications: a review. **Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics**, v. 1, n. 1, p. 3-18, 2003.

SALO, J. **Bone resorbing osteoclasts reveal two basal plasma membrane domains and transcytosis of degraded matrix material**. Tesis, Oulu: University of Oulu, 2002.

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

SARTORIS, D. *et al.* Coralline hydroxyapatite bone-graft substitutes in a canine diaphyseal

defect model. RadiographiC–histometric correlation. **Investigative radiology**, v. 22, n. 7, p. 590-596, 1987.

SATO, K.; URIST, M. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 197, p. 301-311, 1985.

SCHLIEPHAKE, H. *et al.* Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. **Clinical oral implants research**, v. 15, n. 1, p. 112-118, 2004.

SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299-308, 1986.

SHARMA, S.; GUPTA, A. Sustainable management of keratin waste biomass: applications and future perspectives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

SHAVANDI, A. *et al.* A review of synthesis methods, properties and use of hydroxyapatite as a substitute of bone. **Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering**, p. 98-117, 2015.

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

SPIN, J. R. *et al.* Histomorphometric evaluation of the association between bioglass and lyophilized bovine bone in the treatment of critical bone defects created on rat calvaria: a pilot study. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 44, n. 1, p. 37-43, 2015.

STAMEGNA, J. *et al.* A unique method for the isolation of nasal olfactory stem cells in living rats. **Stem cell research**, v. 12, n. 3, p. 673-679, 2014.

TAL, H. **Bone Regeneration**. Croatia: InTech, 2012.

TANG, D. *et al.* Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 83, p. 363-382, 2016.

TAVAKOLI-DARESTANI, R. *et al.* Dexamethasone-loaded hydroxyapatite enhances bone regeneration in rat calvarial defects. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 1, p. 423-428, 2014.

TORTORA, G.; DERRICKSON, B.; **Principles of Anatomy & Physiology**. New York: Wiley, 2017.

UMOH, J. *et al.* In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. **Physics in Medicine & Biology**, v. 54, n. 7, p. 2147, 2009.

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

VENKATESAN, J. *et al.* Alginate composites for bone tissue engineering: a review. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 269-281, 2015.

VIDIGAL, G. M. Osteogênese, osteoindução e osteocondução. **ImplantNewsPerio International Journal**, v. 1, p. 616-617, 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.

WÜRZLER, K. K. *et al.* Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 9, n. 2, p. 131-137, 1998.

ZAMBUZZI, W. F. *et al.* Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 4, p. 315-321, 2012.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA)



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Caracterização da biocompatibilidade e osseocondutividade de colágeno, nanoqueratina e bioapatita provenientes de subprodutos da indústria avícola**, registrada com o nº 04/17, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/06/2017.

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

Sobral, 12 de junho de 2017.

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

ANEXO II

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 Janaína Paula Gomes	Universidade Federal do Ceará - Campus de Sobral - Pro

ANEXO III

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

Art. 42º. 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. 55º. A Comissão Examinadora que julgará a dissertação foi 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. 56º. 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.

§ 1º. 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.

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

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

Art. 57º. 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.

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

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

§ 3º. 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.

§ 4º. 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.