

DIEGO PEREIRA DE ARAÚJO

**Biocompatibilidade *in vivo* de cartilagens elásticas
tratadas em solução alcalina**

Jataí – GO

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

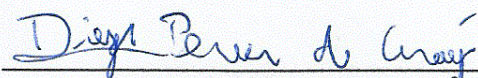
Nome completo do autor: Diego Pereira de Araújo

Título do trabalho: Biocompatibilidade in vivo de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina

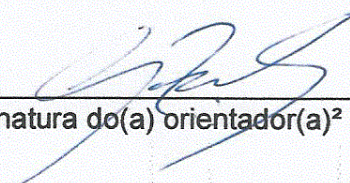
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 07 / 03 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Versão atualizada em setembro de 2017.

² A assinatura deve ser escaneada.

DIEGO PEREIRA DE ARAÚJO

**BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE CARTILAGENS ELÁSTICAS TRATADAS EM
SOLUÇÃO ALCALINA**

PROF. DR. GUSTAVO HENRIQUE MARQUES ARAÚJO

Dissertação apresentada ao Programa de
Biodiversidade Animal da Universidade Federal de
Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Biodiversidade Animal.

JATAÍ - GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

ARAÚJO, DIEGO PEREIRA DE ARAÚJO

Biocompatibilidade in vivo de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina [manuscrito] / DIEGO PEREIRA DE ARAÚJO ARAÚJO, GUSTAVO HENRRIQUE MARQUES ARAUJO ARAUJO, VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI VULCANI. - 2019.

34, XXXIV f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gustavo Henrique Marques de Araujo Araujo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Biociência, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. BIOMATERIAL. 2. CARTILAGEM ALCALINA. 3. XENOENXERTO. I. ARAUJO, GUSTAVO HENRRIQUE MARQUES ARAUJO. II. VULCANI, VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI. III. Araujo, Gustavo Henrique Marques de Araujo, orient. IV. Título.

CDU 639.09



Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

Linha de Pesquisa: Saúde e Produção Animal

Ano de Ingresso: 2017

Ao décimo oitavo dia do mês de fevereiro de 2019, às 13:30 horas, no prédio da Pós-graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do candidato **DIEGO PEREIRA DE ARAÚJO** com o trabalho intitulado **“Biocompatibilidade in vivo de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina”**. A Banca Examinadora, constituída pelos(as) membros: Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo (Presidente/Orientador), Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani (Membro Externo) e Dr. Didier Quevedo Cagnini (Membro Externo), considerou o candidato, Diego Pereira de Araújo: **APROVADO** (X) **REPROVADO** ().

Foi concedido um prazo de 21 dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.



Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo

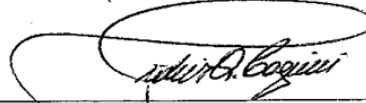
Orientador/Presidente



Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani

Membro Externo

UFG/REGIONAL JATAÍ



Prof. Dr. Didier Quevedo Cagnini

Membro Externo

UFG/REGIONAL JATAÍ

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Geraldo Pereira dos Santos e Maria Aparecida Araújo dos Santos pelo apoio, companheirismo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e suas manifestações nesse mundo por estarem sempre junto a mim nessa caminhada como um bom e terno guia, confidente e amigo.

Agradeço aos meus queridos pais, Geraldo Pereira dos Santos e Maria Aparecida Araújo dos Santos, pelo grande apoio, companheirismo e compreensão a qual eu sempre poderei contar e me inspirar! Obrigado, também, pela paciência que tem comigo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo, pela orientação nesse projeto, pelos conselhos profissionais e pessoais de grande valor, pelas nossas animadas e reflexivas conversas e pela confiança sendo mais que um orientador e, sim, um bom amigo e companheiro de profissão.

Agradeço ao Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani, um grande amigo, que sempre acreditou no meu potencial acadêmico e que me estendeu a mão em um momento em que eu sinceramente já não acreditava mais no meu potencial. Vou levar para sempre o conhecimento e conselhos que me deu, além da eterna admiração pelo seu trabalho a qual me inspira a ser um bom profissional e pessoa.

Agradeço a Barbara, Joaquim Adorno e toda sua família pelo grande apoio, compreensão e atenção que me deram incondicionalmente no início do meu mestrado a qual vou sempre lembrar com grande consideração e carinho.

Agradeço a XX e XXI Turmas de Medicina Veterinária da UFG-Regional Jataí pela troca de ensinamentos que tivemos ao longo desses dois anos através das aulas e monitorias que acompanhei e, também, pelos laços de amizades e companheirismos que fizemos. Espero ter ajudado no desenvolvimento profissional de vocês pois, certamente, vocês me ajudaram muito!

Agradeço aos professores e meus colegas da I e II turma de Mestrado do Programa de Biociência Animal da UFG- Regional Jataí pela nossa riquíssima troca de experiência e conhecimento em várias áreas e pelo grande companheirismo e amizade.

Agradeço aos meus amigos Clarissa de Jesus, Ariely Rodrigues, Hoanderson Rocha, Luis Felipe, Juliano Terra, Ana Claudia e Paola Santos pelo enorme apoio, carinho e pelas boas risadas ao longo desses anos que certamente foram a base para me manter firme durante toda essa caminhada.

Agradeço profundamente a todos os moradores e agregados da “Casa do papai urso” – Aduino, Jean Carlos, João Paulo, Sidney, Guilherme, Alan, Jade, Eduardo, Lucas Assis, Apolo (não dá pra esquecer esse!)... Que, do jeito de cada um, criaram um ambiente acolhedor a qual eu lembro com carinho como meu lar em Jataí.

Agradeço a Leiny Paula e Guilherme Pinheiros por me ajudarem durante a execução do meu projeto e pelos conselhos.

Quero agradecer aos professores, técnicos e alunos do Biotério do Instituto de Patologia e Doenças Tropicais da UFG – “IPTSP-UFG”, ao Laboratório de Patologia Veterinária da UnB – “LPV/UnB”, Biotério Do Centro Universitário de Mineiros – “UNIFIMES” pelo auxílio vital durante a execução do projeto.

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG pelo fomento na forma de bolsa de mestrado que me ajudou muito a desenvolver esse projeto de pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer profundamente à Karla Cristina, Rafaela Schäfer, Yuri Anthony, Paulo Neto e ao Prof. Aloisio por me ajudarem muito nesses últimos dois anos, principalmente em momentos que eu achei que não ia conseguir ou que a depressão bateu em minha porta. Vocês, da forma particular de cada um, me ajudaram muito a seguir em frente e eu sou eternamente grato pelo companheirismo e amizade!

Não te deixes vencer do mal, mas vence
o mal com o bem. - **Romanos 12:21**

RESUMO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Embora o uso de cartilagem elástica de origem animal, como xenoenxerto, seja conhecido na rotina veterinária, suas propriedades e as reações que provocam no organismo do animal ainda são pouco conhecidas, principalmente quando tratadas em solução alcalina. O conhecimento dessas particularidades poderá possibilitar maior segurança no desenvolvimento de novos biomateriais para a rotina clínica e cirúrgica humana e veterinária. Desta forma, este estudo teve como objetivo principal analisar comparativamente a biocompatibilidade entre as cartilagens elásticas bovinas tratada em solução alcalina e as cartilagens não tratadas, implantadas em ratos Wistar. As cartilagens foram obtidas de orelhas bovinas e, metade destas foram tratadas em solução alcalina e a outra metade não foram tratadas. Independente do tratamento, as cartilagens foram esterilizadas em óxido de etileno. As cartilagens foram implantadas no subcutâneo da região dorsal, entre as escápulas em ratos (N=50) sendo que GE (N=25) receberam cartilagens tratadas e GC (N=25) receberam cartilagens não tratadas. Para a retiradas dos implantes foram eutanasiados cinco animais de cada grupo nos dias 3, 7, 14, 21 e 42 sendo que as características macroscópicas desencadeadas pelo implante foram avaliadas e estadiadas como fibroses, coágulos e infecções. Foram realizadas avaliações histopatológicas para verificar a reação tecidual, qualificando e quantificando-se o processo inflamatório e da proliferação do tecido conjuntivo. Os resultados mostram que GE possui menor quantidade de infiltrado inflamatório e melhor organização do tecido conjuntivo em relação a GC. Os padrões de degradação da cartilagem em GE mostraram diminuição na matriz cartilaginosa em relação a GC e não houve diferença significativa do processo de neovascularização entre os grupos. Concluiu-se que o tratamento alcalino proporcionou melhor biocompatibilidade para a cartilagem elástica quando implantada no subcutâneo de ratos.

Palavras-Chave: biomaterial, cartilagem elástica, xenoenxerto

1

2

ABSTRACT

3 Although the use of elastic cartilage of animal origin, as xenograft, is known in the veterinary routine, its
4 properties and the reactions that provoke in the organism of the animal are still little known, especially
5 when treated in alkaline solution. Knowledge of these particularities may allow greater safety in the
6 development of new biomaterials for routine human and veterinary clinical and surgical procedures.
7 Thus, the main objective of this study was to analyze the biocompatibility between bovine elastic
8 cartilage treated with alkaline solution and untreated cartilage implanted in Wistar rats. Cartilages were
9 obtained from bovine ears and half of them were treated in alkaline solution and the other half were not
10 treated. Regardless of the treatment, the cartilages were sterilized in ethylene oxide. Cartilages were
11 implanted in the subcutaneous region of the dorsal region, between the scapulae in rats (N = 50), and
12 SG (N = 25) received treated cartilages and CG (N = 25) received untreated cartilages. Five animals
13 from each group were euthanized on days 3, 7, 14, 21 and 42 and the macroscopic characteristics
14 triggered by the implant were evaluated and staged as fibroses, clots and infections. Histopathological
15 evaluations were performed to verify the tissue reaction, qualifying and quantifying the inflammatory
16 process. The results show that SG has a smaller amount of inflammatory infiltrate and better
17 organization of the connective tissue in relation to CG. Cartilage degradation patterns in SG showed a
18 decrease in the cartilage matrix in relation to CG and there was no significant difference in the
19 neovascularization process between the groups. It was concluded that the alkaline treatment provided
20 better biocompatibility for the elastic cartilage when implanted in the subcutaneous of rats.

21 **Keyword:** biomaterial, elastic cartilage, xenograft

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

SUMÁRIO

1		
2		
3		
4		Página
5		
6	CAPITULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL.....	01
7	CAPITULO 2 –ARTIGO.....	03
8	ABSTRACT.....	03
9	RESUMO.....	03
10	INTRODUÇÃO.....	04
11	MATERIAIS E MÉTODOS.....	04
12	Obtenção e preparo das cartilagens.....	04
13	Implantação e retirada da cartilagem.....	04
14	Caracterização macroscópicas e histopatológica.....	05
15	Analise estatística.....	05
16	RESULTADOS.....	06
17	DISCUSSÃO.....	07
18	CONCLUSÕES.....	09
19	AGRADECIMENTOS.....	09
20	REFERÊNCIAS.....	09
21	LISTA DE FIGURAS.....	17
22	CAPITULO 3: CONCLUSÕES GERAIS.....	23
23	Referências.....	24
24	ANEXOS.....	26
25	Anexo I – Normas pela PBV	
26	Anexo II - Aprovação no Comitê de Ética	
27	Anexo III - Extrato do projeto de pesquisa	
28		
29		
30		

1 **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL**

2
3 A definição de “biomateriais” é bastante complexa, devido à diversidade
4 de materiais usadas nesse campo. No entanto, WILLIAMS, (2009), definiu
5 “biomaterial” como substâncias projetadas com uma forma específica para
6 servir isoladamente ou como parte de um sistema mais complexo, auxiliando
7 o curso de um procedimento terapêutico ou de diagnóstico, controlando e/ou
8 interagindo com componentes dos sistemas vivos, tanto em medicina, quanto
9 em veterinária.

10 Apesar de serem usados de forma empírica, desde a antiguidade,
11 somente a partir do século XX os biomateriais começaram a ser estudados de
12 forma sistemática e a serem produzidos com materiais sintéticos (HUEBSCH;
13 MOONEY, 2009). Atualmente é um campo que envolve diversas áreas que
14 vão além do campo médico, como o legal, o ético, o industrial e o
15 governamental (RATNER; BRYANT, 2004).

16 Um dos grandes desafios na aplicação dos biomateriais é que esses
17 sejam mecanicamente e biologicamente compatíveis (TIBBITT et. al 2015).
18 Diante desses desafios, as pesquisas na área devem se atentar a fatores
19 como biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade desses materiais.

20 A biocompatibilidade é uma das propriedades mais buscadas em um
21 material, pois se trata da relação entre o organismo hospedeiro e o material
22 implantado, de forma que um não prejudique o outro. Entretanto, é um
23 conceito muito debatido, pois não se trata apenas de uma característica
24 inerente ao material, mas o resultado de uma complexa interação entre
25 material e organismo (WILLIAMS, 2014).

26 Outro ponto de interesse na busca de um biomaterial é sua bioatividade,
27 definida como a capacidade do material de interagir ou não com o organismo
28 (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2006). Materiais considerados bioativos
29 estão sendo cada vez mais requisitados principalmente aqueles que auxiliam
30 na regeneração tecidual (TIBBITT et. al., 2015). Já a biodegradabilidade é a
31 capacidade do material ser degradado e substituído *in vivo*, evitando a
32 necessidade de remoção deste por uma segunda cirurgia (ORÉFICE;
33 PEREIRA; MANSUR, 2006).

1 Diversas classes de matérias têm sido pesquisadas e utilizadas no
2 desenvolvimento de novos biomateriais como metais, cerâmicas, polímeros e
3 compósitos. Dentre estes, os polímeros, principalmente os naturais como o
4 colágeno, estão mostrando grandes benefícios. O colágeno é extraído de
5 tecidos animais, ou pode estar na composição da matriz extracelular de
6 tecidos conjuntivos descelularizados como xenoenxertos (FERREIRA, 2017).

7 O uso direto de cartilagens como material de implante, sem tratamento
8 descelularizante prévio, provoca imediata resposta inflamatória mediada por
9 linfócitos T do tecido hospedeiro contra o implante, independente desse
10 material ser de animais da mesma espécie ou xenógena (Filho 2015). Esta
11 reação inflamatória pode comprometer a biocompatibilidade do biomaterial,
12 acelerando a degradação ou gerando resultados insatisfatórios devido a
13 intensa inflamação (Keane et al. 2012; Wong, Griffiths 2014)

14 Para evitar essa reação intensa, a cartilagem deve passar por tratamento
15 descelularizante para redução da antigenicidade e estímulo de processo
16 inflamatório (Anna&Yang 2017). Porém, os métodos de descelularização são
17 variados e podem influenciar na biocompatibilidade da cartilagem (Vulcani et
18 al., 2013).

19 Alguns trabalhos demonstraram a eficácia da técnica de
20 descelularização por solução alcalina principalmente em avaliações de
21 aplicações clínico-cirúrgicas (Mendoza-Novelo et al. 2011, Vulcani et al. 2013,
22 Sengyoku et al. 2018), porém, não há informações sobre as interações
23 básicas da cartilagem tratada com o organismo vivo e nem mesmo
24 informações a comparando com a cartilagem não tratada.

25 Nesse contexto faz-se necessário novos estudos para avaliar a
26 biocompatibilidade de materiais descelularizados pela solução alcalina, tanto
27 sobre seus aspectos macroscópicos e microscópicos quanto em relação a
28 reposta material-hospedeiro.

29 Este estudo objetivou analisar comparativamente a biocompatibilidade
30 entre cartilagens elásticas de origem bovina, tratadas em solução alcalina com
31 a não tratada, sendo ambas implantadas em ratos da raça Wistar.

CAPÍTULO 2: ARTIGO

Biocompatibilidade *in vivo* de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina¹

Araújo D.P.;^{2*} Araujo G.H.M.;³, Vulcani V.A.S.;⁴

ABSTRACT.- Vulcani V. A. S.; Araujo G. H. M.; & Araújo D.P. 2018 [**Biocompatibility of Bovine Elastic Cartilages treated in Alkaline Solution in Rats**] Biocompatibilidade de Cartilagens Elásticas Bovinas tratadas em Solução Alcalina em Ratos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Coordenação de Biociência Animal. Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí (UFG-REJ). BR 364, km 195, nº 3800, CEP 75801-615, Prédio da Pós-Graduação, Campus Cidade Universitária, Jataí, GO. Brazil. E-mail: diegoaraujomv@outlook.com

This study verified the *in vivo* biocompatibility of decellularized bovine elastic cartilage with alkaline solution in relation to non-decellularized cartilage implanted in rats. Fifty Wistar rats were divided into two groups and the experimental group (SG) received subcutaneous implants of cartilage treated in alkaline solution and the control group (CG) received subcutaneous implants of untreated cartilage. In both groups the implants were removed on days 3, 7, 14, 21 and 42 with the preparation of histological slides made on the Hematoxylin and Eosin technique (H & E) for the quantification of cells inflammatory cells, fibroblasts, angiogenesis and cartilage degradation. The results show that SG has better biocompatibility than GC mainly related to the amount of inflammatory infiltrate, lower in SG; and better organization of fibroblasts. The patterns of cartilage degradation in GE showed a decrease in cartilaginous matrix relative to CG. The patterns of angiogenesis were not significant between the groups analyzed. It was concluded that the alkaline treatment provided better biocompatibility for the elastic cartilage when implanted in the subcutaneous of rats.

INDEX TERMS: Biomaterial, cartilage, collagen, alkaline solution

RESUMO.- Este estudo verificou a biocompatibilidade *in vivo* de cartilagem elástica bovina descelularizada em comparação com cartilagem não descelularizada. Para a descelularização tratou-se a cartilagem em três lavagens sucessivas com solução alcalina por 72 horas cada. As amostras tratadas e não tratadas foram implantadas no tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 50 ratos da linhagem Wistar divididos em dois grupos homogêneos, sendo que os animais grupo experimental (GE) receberam implantes de cartilagem tratada e os animais do grupo controle (GC) receberam implantes de cartilagem não tratada. Em ambos os grupos os implantes foram retirados nos dias 3, 7, 14, 21 e 42 pós implantação para a confecção de lâminas histológicas coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) para a quantificação de células inflamatórias, fibroblastos, neovascularização e observação da degradação da cartilagem. Os resultados mostram que o GE possui melhor biocompatibilidade do que GC principalmente relacionado à menor quantidade de infiltrado inflamatório e melhor organização dos fibroblastos. Os padrões de degradação da cartilagem em GE mostraram diminuição na matriz cartilaginosa em relação a GC. O padrões de neovascularização não foram significativos entre os grupos analisados. Concluiu-se que o tratamento alcalino proporcionou melhor biocompatibilidade para a cartilagem elástica quando implantada no subcutâneo de ratos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Biomaterial, cartilagem, colágeno, solução alcalina

INTRODUÇÃO

O uso de cartilagem animal, como fonte de colágeno e elastina, tem despertado o interesse de pesquisadores devido à disponibilidade desse material, principalmente de origem bovina e suína; e pelo fato do tecido cartilaginoso ser bastante resistente a autólise (Vaes et al. 2013, Schwarz et al. 2015, Silvipriya et al. 2015, Shin et al. 2018). O tecido cartilaginoso já vem sendo usado por diversos pesquisadores na medicina e na veterinária com bons resultados em relação a outros biomateriais como o polipropileno (Vulcani et al. 2013, Ferreira 2017, Calabrese et al. 2017).

O uso direto da cartilagem, sem tratamento descelularizante prévio, provoca imediata resposta inflamatória mediada por linfócitos T do tecido hospedeiro contra o implante, independente desse material

ser de animais da mesma espécie ou xenógena (Filho 2015). Essa reação inflamatória pode comprometer a biocompatibilidade do biomaterial, acelerar a degradação ou gerar resultados insatisfatórios devido a intensa inflamação (Keane et al. 2012, Wong & Griffiths 2014).

Para evitar essas reações intensas, a cartilagem deve passar por tratamento descelularizante para redução da antigenicidade e do estímulo do processo inflamatório (Anna & Yang 2017). A matriz cartilaginosa descelularizada, implantada em animais, pode garantir melhor biocompatibilidade fazendo com que essa possa gerar novos dispositivos médicos tais como veículos farmacológicos ou servindo como matriz para que células inseridas ou do próprio hospedeiro possam se aderir, proliferar, diferenciar e reocupar o espaço tecidual perdido (Schwarz et al. 2015, Huang et al. 2017, Nürnberger et al. 2019).

Dentre os métodos químicos de descelularização pode-se citar o uso de soluções alcalinas. Essas soluções são, de forma geral, constituídas a base de diferentes concentrações de diversos compostos alcalinos tais como amônio, sulfeto de sódio e hidróxido de sódio. O alto pH resultante dessa solução é capaz de solubilizar os componentes celulares tais como membranas plasmáticas, organelas e ácidos nucleicos (Keane et al. 2015).

A utilização da técnica de descelularização por solução alcalina tem mostrado resultados satisfatórios em diversos tecidos como pericárdio, fígado e tendão mostrando boa biocompatibilidade se comparado com outros métodos como detergentes e glicerina a 98% (Mendoza-Novelo et al. 2011, Vulcani et al. 2013, Sengyoku et al. 2018).

Este estudo objetivou analisar comparativamente a biocompatibilidade entre cartilagens elásticas de origem bovina, tratadas em solução alcalina e cartilagem não tratadas em ratos da raça Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparo das cartilagens. As orelhas bovinas foram obtidas de frigoríficos inspecionados da região de Jataí, sendo todas da raça Nelore. Essas foram encaminhadas para o Setor de Anatomia da UFG-Regional Jataí onde foram dissecadas para a extração da cartilaginosa auricular e cortadas em pequenos fragmentos quadrados de 1,5 cm. Em seguida, os fragmentos de cartilagens foram lavadas em solução fisiológica, guardadas em sacos plásticos e congeladas.

Metade dos fragmentos de cartilagem (N=25), foram encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica e Biomateriais (Instituto de Química da USP – São Carlos, SP), onde foram descongeladas e imersas em solução alcalina contendo dimetilsulfóxido (DMSO) e sais (cloretos e sulfatos) de sódio, potássio e cálcio por 72 horas para garantir a máxima solubilização dos condrocitos sem grandes danos a matriz cartilaginosa (Vulcani et al. 2008). Os sais residuais foram removidos por três lavagens sucessivas com H₃BO₃ 3% e EDTA 3% e as cartilagens congeladas gradativamente, em temperatura de 15°C por 12 horas e -15°C por 12 horas e liofilizadas até apresentarem massas constantes. A outra metade dos fragmentos de cartilagem (N=25) não foram submetidas ao tratamento alcalino (Horn et al. 2009).

Por fim, todas as cartilagens (tratadas ou não em solução alcalina) foram acondicionadas em embalagens individuais e submetidas à esterilização em óxido de etileno.

Implantação e retirada da cartilagem. Foram utilizados 50 ratos da raça Wistar, do sexo masculino, com cerca de 10 semanas de idade e pesando aproximadamente 400 g, todos adquiridos do Biotério central da UFG/Goiânia e alocados no Biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG (IPTSP). O uso dos ratos foi devidamente autorizado pela Comitê de ética da UFG-Regional Jataí, protocolo N^o. 019/2017.

Os 50 ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (N=25) de acordo com o biomaterial a ser implantado. Os animais alocados em GE (Grupo experimental) receberam os implantes de cartilagem tratada em solução alcalina e os distribuídos em GC (Grupo Controle) o implante de cartilagem não tratada.

Para a implantação das cartilagens nos ratos, esses foram anestesiados por uma associação entre Xilazina e Cetamina (8mg/kg e 60 mg/kg respectivamente). Com os ratos devidamente anestesiados foi realizada tricotomia na região dorsal entre as escapulas e a assepsia da região foi feita com solução alcoólica de clorexidina (0,5%). Na área tricotomizada foi realizada uma incisão cirúrgica linear sobre a pele e o tecido subcutâneo foi divulsionado cranialmente a incisão para dar espaço para a implementação do implante cartilaginoso sendo que o cirurgião teve a atenção de colocar esse implante o mais distante possível da incisão cirúrgica (ISO 10993-6 - 2007). A incisão foi suturada com fios de nylon em ponto simples separado e a analgesia pós-cirúrgica foi feita com tramadol (1 ampola com 100mg diluído em 500 ml de água).

Após a implementação das cartilagens os grupos GC e GE ainda foram divididos cada um em 5 subgrupos (N=5) de acordo com o período de retirada da cartilagem que foram realizadas no 3^o, 7^o, 14^o, 21^o e 42^o dia após a implantação. Para a retirada dos implantes foram realizados os mesmos procedimentos

anestésicos e cirúrgicos, considerando que houve um aprofundamento da anestesia e a eutanásia foi realizada por deslocamento cervical.

Caracterização macroscópicas e microscópica. Os fragmentos de cartilagem foram retirados e fixados em solução de formalina (10%), tamponada com fosfato (pH 7,2) por 24 horas e depois relocados em álcool 70%. Esses fragmentos foram levados para o setor de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (UnB) onde as foram confeccionadas as lâminas na coloração Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picro-Sirius Red.

As análises e o escore macroscópico foram realizadas no momento da retirada dos implantes seguindo um modelo modificado da normatização ISO 10993-6 (2007) onde foram avaliadas características como neovascularização, aderência da cartilagem a planos profundos, encapsulamento e mudança na coloração da cartilagem sendo essas estadiadas de acordo com a intensidade dessas lesões em graus I, II, III e ausente. Outras características que possivelmente fossem encontradas também eram anotadas tais como coágulos, exsudato, transudato, fibrose, ou qualquer outro tipo de alteração.

As análises morfológicas, dos tecidos corados em H&E e Picro-Sirius Red, foram realizadas em microscópio Leica DFC-280 (*Leica Microsystem Wetzlar, Alemanha*) sendo que, para Picro-Sirius Red, foi adicionado uma lente polarizadora.

As análises quantitativas em H&E da população de mononucleares (MN), polimorfonucleares (PN) e tecido conjuntivo adjacente (TCA) foram analisadas seguindo os modelos modificados de Garros et al. (2006) e Neto et al. (2006) no qual foram avaliadas cinco campos aleatórios, com aumento de 400x, na região da interface entre cartilagem e tecido subcutâneo de cada uma das 50 amostras coletadas. As avaliações tanto em H&E quanto em Picrosirus Red foram realizadas as cegas e por um único avaliador.

O ranqueamento para verificar a quantidade de tipos celulares foi estabelecido em Escore 0, 1, 2 e 3 onde o "0" foi utilizado para ausência de células inflamatórias e do conjuntivo; o escore "1" possuía quantidade discreta de células e sem formar grandes aglomerados; o escore "2" possuía moderada quantidade de células formando agregados pouco concentrados; já o escore "3" possuía acentuada quantidade de células formando agregados muito concentrados e coalescentes em grande parte do tecido avaliado (modificado de Garros et al, 2006 e Neto et al, 2006). A avaliação da formação de vasos seguiu o modelo prescrito pela normatização "ISO 10993-6. (2007)".

Nos tecidos corados com Picro-Sirius Red analisou-se cinco campos aleatórios de grande aumento (400x) seguindo o mesmo princípio analisado em H&E. As imagens foram captadas pela câmera Sony® NEX-3 e analisadas em programa software "Imagem J®", versão 1.3.1 com a utilização do plug-in "**Threshold Colour**" para a caracterização das fibras vermelhas (colágeno do tipo I) e fibras amarelas e verdes (colágeno do tipo II).

Análise estatística. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 7.04 (San Diego, CA, USA). Para a comparação entre os grupos controle e experimental, nos diferentes períodos de tempo, foram verificadas as distribuições dos dados pelo teste Shapiro-Wilk. Em função do não atendimento à distribuição gaussiana, empregou-se o teste Mann-Whitney, $p < 0,05$. Em relação aos dados referentes a concentração de colágeno vermelho (Tipo I) ou verde/amarelo (Tipo III), esses foram comparados dentro de cada grupo, ou seja, só entre os grupos de colágeno tipo I (GC+GE) e outro só para os grupos de colágeno do Tipo-III (GC+GE) sendo empregado o teste de Shapiro-Wilk. Em função do não atendimento à distribuição gaussiana, empregou-se o teste de Holm-Sidak, $p < 0,005$.

RESULTADOS

Durante a experimentação nenhum animal morreu ou teve complicações clínicas relacionadas a cirurgia ou implantação do biomaterial tais como edema significativo, formação de algum tipo de exsudato, transudato ou deiscência de sutura (Figura 1).

Os resultados macroscópicos (Quadro 1), obtidos durante a retirada dos implantes, não demonstraram diferença significativa entre GE e GC e nem entre os dias de observação quanto ao encapsulamento do implante que foi recoberto por uma fina capsula de tecido conjuntivo (Figura 1). Em relação a neovascularização e aderência do biomaterial a planos profundos, não foi encontrada diferença entre os grupos e sim entre os dias sendo maior a partir do 14º dia (Quadro 1). Ainda é possível observar que o GE começa a ganhar uma coloração mais avermelhada a partir do 14ª dia.

Em relação aos resultados microscópicos, notou-se diferença significativa na quantidade de população inflamatória. Constatou-se grande concentração de células Polimorfonucleares (PMN) no 3º dia tanto em GE quanto em GC, com acentuada diminuição na concentração nos dias seguintes. Mesmo o número de PMN sendo alto em ambos os grupos, em GC esse ainda era significativamente maior (Figura 2). Os neutrófilos são as principais PMN visualizadas ao terceiro dia e, praticamente, desaparecem nos dias subsequentes; já os mastócitos são vistos ocasionalmente principalmente na face epidérmica do implante.

Notou-se, também, que os neutrófilos estavam limítrofes à superfície da cartilagem, em contato direto com a superfície pericondrial e suas camadas mais externas, seguidos por macrófagos (Figura 3).

Em relação as células mononucleares, notou-se diferença significativa entre os grupos e os dias de tratamento a partir do 7º dia e que se mantém até o 42º (Figura 4). Observa-se, principalmente, populações de macrófagos se destacando no 7º dia. As populações de linfócitos e plasmócitos se destacam a partir do 14º dia. As células gigantes aparecem em discreta quantidade a partir do 7º dia e não mudam sua concentração durante todos os dias subsequentes da observação. Todos os grupos de células tiveram suas populações bem maiores no GC (Figura 5).

Sobre a disposição das células inflamatórias, notou-se que a superfície das margens superior e inferior da cartilagem, que corresponderia ao seu pericôndrio, atraíram grande concentração de infiltrado inflamatório (PMN ou MN), porém, em ambos os grupos, essas não penetraram profundamente entre as camadas pericondriais de tal forma que não alcançaram a matriz cartilaginosa em nenhum momento da observação. Nas laterais, onde a matriz cartilaginosa está exposta ao organismo do animal, também há forte reação inflamatória, principalmente no GC onde as células mais visualizadas foram linfócitos e plasmócitos (Figura 6). Notou-se que a inflamação, em geral, é menor e multifocal no GE tanto, para PN quanto para PMN; ao contrário do GC onde a inflamação é mais intensa e difusa.

Em relação ao tecido conjuntivo adjacente ao implante, observou-se diferença significativa entre os grupos e os dias no 3º e 21º dia, principalmente pela quantidade de fibroblastos sendo maior no GC (Figura 6). Qualitativamente foi possível observar que os fibroblastos do GE, desde o 3º dia, estavam melhores organizados uma vez que encontravam-se paralelamente ao redor da cartilagem; mais concentrados e possuindo uma baixa quantidade de células inflamatórias entremeadas em um padrão que se manteve até o fim das observações, no 42º dia. Em GC foi possível observar que os fibroblastos, embora margeando toda a extensão da cartilagem, não estavam paralelos e muitas vezes distribuídos de formas aleatória ou tentando formar múltiplos granulomas não caseosos ao longo da cartilagem; suas fibras não estavam compactadas e sim mais distantes umas das outras com células inflamatórias entremeadas.

No 21º dia foi possível observar, em GC que há uma tentativa de encapsular toda cartilagem e os vários granulomas em uma única grande capsula fibrosa (Figura 7). Porém, no 42º é possível notar no GC que há um remodelamento dos fibroblastos com menos granulomas e com esses sendo observados mais paralelamente a cartilagem.

Sobre as análises de formação de novos vasos, observa-se macroscopicamente que não há diferença entre os grupos e sim entre os dias sendo que no 14º dia de observação há um aumento nas quantidade de vasos visualizados. Porém, na avaliação microscópica, foi possível observar um discreto aumento em GC apenas no 14º dia (Figura 8)

Em relação a matriz cartilaginosa, é possível notar tanto em GE quanto em GC que essa vai perdendo a intensidade de sua coloração basofílica no sentido borda-centro já a partir do 7º dia, intensificando-se no 21º ao ponto de que no 42º dia algumas cartilagens estão 100% sem basofilia na região da matriz possuindo apenas finas e desconexas fibras eosinofílicas possivelmente de colágeno e elastina.

No GC é possível notar que os condrócitos da matriz cartilaginosa vão desaparecendo, deixando apenas lacunas, no sentido borda-centro começando no 14º dia a tal ponto que no 42º dia já não existe mais condrócitos na cartilagem (Figura 09).

Em relação a quantificação das fibras colágenas houve diferença significativa na tipificação das áreas de colágeno Tipo I apresentando diferenças entre os grupos e os dias no 3º ao 21º dia (Figura 10) sendo que no GC houve uma maior concentração desse. Em relação ao colágeno Tipo III também houve diferença entre os grupos e os dias 3º, 7º e 21º novamente com o GC possuindo maior concentração de área (Figura 11).

As fibras de colágeno tipo I, estavam mais concentradas na forma de cordões que circundavam a cartilagem sendo que em GC essas eram mais desorganizadas e fragmentadas. As fibras de colágeno tipo III eram mais comumente encontradas próximas as fibras do tipo I normalmente possuindo tamanhos e formas variadas (Figura 12).

DISCUSSÃO

A não ocorrência de mortes, complicações relacionadas ao ato cirúrgico ou a reação exacerbada do biomaterial, tais como fibrose, exsudato e transudato excessivos; já são importantes fatores macroscópico de avaliação da biocompatibilidade de ambos os materiais (ISO 10993-6, 2007, Modulevsky et al. 2016).

A inflamação, vista em diferentes intensidades tanto em GE quanto em GC, pode estar relacionado primeiramente devido ao caráter xenogênico do enxerto uma vez que esses ainda podem conter antígenos

proteicos de origem animal que são responsáveis por gerar respostas imunológicas do hospedeiro (Almine et al. 2013).

A inflamação e substituição da população de células inflamatórias, ao longo dos dias de experimentação, é comumente associadas à própria reação do sistema imune inato com a presença de corpo estranho, reação essa conhecida como “reação ao corpo estranho”, comum em implantação de materiais (Onuki et al. 2008, Griesemer et al. 2014, Trindade et al. 2014, Kar et al. 2016). Tais reações, visualizadas em ambos grupos, podem ser induzidas devido a um processo imune desencadeado em resposta a adsorção do biomaterial não dependendo da presença ou ausência de condrócito e sim de fatores em comuns que ambas as cartilagens compartilham como, por exemplo, proteínas presentes do pericôndrio (Thevenot et al. 2008, Nair et al. 2008, Wong & Griffiths 2014).

A diferença entre as concentrações de células inflamatórias que pode-se observar entre os grupos GE e GC está ligada a menor concentração de antígeno xenógenos do GE que foi descelularizado com solução alcalina o fazendo perder a maioria dos antígenos derivados dos condrócitos e, conseqüentemente, possuindo menor quantidade de componentes antigênicos presentes (Wong & Griffiths 2014). Sabe-se que os antígenos dos condrócitos, podem desencadear respostas do complexo de imunohistocompatibilidade I e II atraindo diversas células PMN e MN (Osiecka-Iwan et al. 2018). A baixa concentração de células inflamatórias e sua redução ao longo do tempo de observação pode ser considerado um bom indicador da biocompatibilidade do GE (Silveira et al. 2011).

A forte reação inflamatória vista nas bordas laterais da cartilagem, evidenciada com mais intensidade em GC, está relacionada principalmente à exposição dos condrócitos do biomaterial ao organismo hospedeiro estimulando seu sistema imune. Esse fator é observado inclusive se o tecido for alogênico (Moskalewski et al. 2002; Osiecka-Iwan 2018). Em GE a resposta ainda existe, porém é menor pelo fato dessas cartilagens poderem conter alguns resquícios celulares derivados dos condrócitos que podem ter ficado presos a cartilagem, mesmo após as sucessivas lavagens em H3BO3 3% e EDTA 3%.

A continuação, ao longo do tempo, de pequena quantidade de células inflamatórias vista tanto em GE quanto GC, é comum ao processo de degradação continua dos biomateriais biocompatíveis (Gillitzer & Goebeler 2001). Em uma extensa revisão (Wong & Griffiths 2014) também evidenciaram o potencial inflamatório em diversos níveis que materiais descelularizados ainda podem ocasionar, devido à características do próprio implante, ambiente da implantação, duração do implante e de epitopos não correlacionados as células, mas sim a matriz extracelular. Diante disso é necessário mais estudos principalmente em nível molecular para compreender o processo global de inflamação.

As células gigantes estão presentes em quantidades semelhantes entre os dois grupos, assim como é relatado em outros trabalhos com biomateriais poliméricos ou não e isso pode estar relacionado à uma serie de citocinas liberadas na área enxertada e de tentativas de fagocitose do material (Boennelycke et al. 2011, Castañeda et al. 2011, Aguilar et al. 2012, Subramanian et al. 2013). Al-Maawi et al. (2018), trabalhando com implantação de tendões bovinos, sugerem que a presença moderada de células gigantes possam não ser um fator patológico e sim uma reação normal e esperada do organismo perante a um biomaterial.

Em relação a perda de basofilia da matriz cartilaginosa e dos condrócitos do GC no sentido borda-centro, pode-se relacionar a possíveis fatores antigênicos presentes na matriz como os proteoglicanos, glicosaminoglicanos e os próprios condrócitos que foram expostos ao sistema imune do animal hospedeiro, na região de interface da borda cartilaginosa, fato esse que pode ter induzido a ativação sistema de histocompatibilidade Tipo-I e também o Tipo-II (Baxter et al. 1972, Osiecka-Iwan et al. 2018). Como a perda da basofilia e de condrócitos foi seguindo no sentido borda-centro sem que houvesse visualização de células inflamatórias dentro da matriz cartilaginosa, suspeita-se que esse processo tenha sido através de ação humoral e do sistema complemento, porém mais estudos são necessários para compreender melhor esse processo.

Essas reações não são vistas com grande intensidade em GE primeiramente por que o processo de descelularização em solução alcalina além de degradar os condrócitos também retira boa parte da substancia fundamental amorfa da matriz cartilaginosa o que a torna menos propensa a atrair reação do sistema imune. Porém, devido ao fato de ainda pode haver resquícios de condrócitos nessas cartilagens e por essa ser uma cartilagem de uma outra espécie de animal (Bovinos) é possível que resquícios de antígenos heterólogos e condrocitários possam ser capazes de ainda assim provocar uma reação imune, porém, menos intensa (Sugahara et al. 1979; Fernandes. 2017, Osiecka-Iwan et al. 2018).

Em relação aos fibroblastos, embora haja diferença significativa entre os grupos e os dias no 3^a e 21^o dia, nos outros dias não há diferença e as quantidades são relativamente iguais. Isso se deve ao fato de que

a cartilagem possui alguns fatores pro-fibroblásticos que não estão associados aos antígenos dos condrócitos e sim ao próprio material cartilaginoso (Creagh et al. 2006, Meneghin et al. 2007), ou a fatores associados a implantação cirúrgica como fator de crescimento transformadores liberados por plaquetas (Sinno & hogaboam 2013), presença ativa de elastina (Almine et al. 2013) e fibronectina (Zhu 2010).

O formato mais desorganizado da fibrose visto em GC com formação de múltiplos granulomas não caseosos e uma tentativa de “encapsular” todos esses granulomas mais a cartilagem, pode estar relacionado com a intensa estimulação imune provocada pelos antígenos xenogênicos dos condrócitos. Esse tipo de antígeno atrai células inflamatórias tais como neutrófilos, macrófagos e linfócitos conhecidos por liberarem citocinas que estimulam a atração e diferenciação dos fibroblastos, gerando maior fibrose em volta dessa inflamação (Stramer et al. 2007, Chambers 2008; McLarren et al. 2011, Ma et al. 2013).

A remodelação fibroblástica, vista principalmente em GC, pode estar relacionada primeiramente a fatores induzidos por macrófagos a qual podem liberar fatores de degradação e remodelação fibroblásticas (Valentin et al. 2009, Brown et al. 2012). A própria natureza do biomaterial, normalmente pelos compostos da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina, podem ajudar a melhorar a fixação e comunicação molecular ajudando na remodelação (Swinehart & Badylak 2016).

A boa orientação das fibras colágenas do grupo GE é relevante até mesmo se comparado com outros polímeros considerados controle positivo de biocompatibilidade, como os tubos de polietilenos vazios (Mori et al. 2014).

A concentração de colágeno do tipo I e III no GC e GE, observado já nos primeiros dias de retirada do implante (3º dia), é alta se comparada com um rato adulto normal (Cheung et al, 1990). Essa alta concentração de colágeno tipo I e III nos dois grupos indicam que há fatores pro-fibroblásticos comuns que podem estar relacionados não somente a antigenicidade dos condrócitos como, também, de outros componentes da matriz extracelular da cartilagem e sua superfície. Esses fatores podem ser não relacionados a composição do biomaterial como fatores liberados devido ao ato cirúrgico (Creagh et al. 2006; Meneghin et al. 2007, Zhu 2010, Thevenot et al. 2010, Almine et al. 2013). Sabe-se que as células inflamatórias, tais como monócitos e macrófagos, podem liberar fatores, como o TGF- β 1 e PDGF, que podem estimular os fibroblastos e miofibroblastos a produzir colágeno, principalmente o do tipo - III (Jabs et al. 2005, Luttikhuisen et al. 2006, Ploeger et al, 2013).

Em GC a presença marcante dos antígenos derivados dos condrócitos podem, indiretamente, ter contribuído para a grande concentração de colágeno visto nesse, uma vez que esses antígenos podem induzir a repostas inflamatórias agudas e crônicas e isso pode induzir a secreção de colágeno, principalmente do Tipo - III (Akilbekova et al. 2005).

A maior concentração de colágeno tanto do tipo I quanto do tipo III no GC pode induzir a uma formação desorganizada da matriz extracelular e conseqüentemente, formação da capsula fibrosa que tende a ser mais densa e desorganizada, conforme foi constatado no GC (Luttikhuisen et al. 2006).

A menor concentração de colágeno e tecido conjuntivo associado pode ser um bom fator de biocompatibilidade do GE uma vez que um excesso de capsula fibrosa poderia inutilizar ou diminuir as futuras funções desse material como, por exemplo, liberação de fármacos.

A neovascularização visualizada em ambos os grupos pode estar relacionado com os componentes da própria matriz cartilaginosa, principalmente da elastina cujas sequencias proteicas podem auxiliar na adesão e proliferação angiogênica (Staubli et a. 2017). Outros fatores podem auxiliar na formação de novos vasos como o aparecimento de macrófagos que liberam fatores pró-angiogênicos precoces (Spiler et al. 2014, Zhao et al. 2018). A fibronectina produzida pelos fibroblasto e pela própria ferida cirúrgica também possuem sequencias peptídicas específicas que estimulam a produção de vasos (Mitsi et al. 2006).

CONCLUSÕES

As cartilagens elástica bovinas descelularizadas em solução alcalina quando comparadas com as não tratadas, demonstraram baixa capacidade de atração de células inflamatórias, formação de cápsula fibrosa com fibras colágenas bem organizadas, além de não induzirem necrose, edema e seroma. Desta forma, o tratamento alcalino foi efetivo na descelularização e redução da antigenicidade, demonstrando biocompatibilidade aceitável em relação ao material não tratado.

Assim avaliando a dinâmica do processo inflamatório da cartilagem elástica bovina tratada em solução alcalina, demonstra o potencial da técnica associada a um tecido biológico cartilaginoso para a obtenção de um biomaterial para ser empregado na engenharia tecidual.

AGRADECIMENTOS

À equipe do Biotério do “Instituto de Patologia e Doenças da Universidade Federal de Goiás – IPTSP/UFG pelo apoio com a alocação dos animais do experimento; ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade de Brasília – LPV/UnB pela confecção das laminas em H&E; e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG pela fomento concedido ao bolsista de mestrado.

REFERÊNCIAS

- Aguilar F.G., Roberti-Garcia L.F. & Panzeri Pires-de-Souza F.C. 2012. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). *J Endod.* 38(3):367-71
- Akilbekova D, BRATLIE K.M. 2015. Quantitative Characterization of Collagen in the Fibrotic Capsule Surrounding Implanted Polymeric Microparticles through Second Harmonic Generation Imaging. *PLoS One.* 10(6):e0130386
- Al-Maawi S, Vorakulpipat C., Orłowska A., Zrnc T.A., Sader RA., Kirkpatrick CJ. & Ghanaati S. 2018. In vivo Implantation of a Bovine-Derived Collagen Membrane Leads to Changes in the Physiological Cellular Pattern of Wound Healing by the Induction of Multinucleated Giant Cells: An Adverse Reaction?. 6(104):1-13
- Almine J.F., Wise S.G., Hiob M., Singh N.K., Tiwari K.K., Vali S., Abbasi T. & Weiss A.S. 2013 Elastin sequences trigger transient proinflammatory responses by human dermal fibroblasts. *FASEB J.* 27(9): 3455–3465
- Anna G. & Yang Y. 2017. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int.* 2017: 9831534
- Baxter E., MUIR H. 1972. The antigenicity of cartilage proteoglycans: The relationship of the antigenic determinants present in Smith degraded and intact proteoglycans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2(15): 276-281
- Boennelycke M., Christensen L., Nielsen L.F., Everland H. & Lose G. 2010. Tissue response to a new type of biomaterial implanted subcutaneously in rats. *Int Urogynecol J.* 22(2):191-6.
- Brown B.N., Londono R., Tottey S., Zhang L., Kukla K.A., Wolf M.T., Daly K.A., Reing J.E. & Badylak S.F. 2012. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. *Acta Biomater* 8:978–987.
- Calabrese G., Gulino R., Giuffrida R., Forte S., Figallo E., Fabbi C., Salvatorelli L., Memeo L., Gulisano M. & Parenti R. 2017. *In Vivo* Evaluation of Biocompatibility and Chondrogenic Potential of a Cell-Free Collagen-Based Scaffold. *Front Physiol.* 8: 984.
- Castañeda E. R., Silva L. A.B., Gatón-Hernández P., Consolaro A., Rodríguez E.G., Silva R.A.B., Queiroz A.M. & Nelson-Filho P. 2011. Filtek™ Silorane and Filtek™ Supreme XT resins: tissue reaction after subcutaneous implantation in isogenic mice. *Braz. Dent. J.* 22(2):105-10.
- Chambers R.C. 2008. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention?. *Br J Pharmacol.* 153:367-378
- Cheung D.T, Benya P.D, Perelman N, DiCesare P.E, Ninmi M.E. 1990. A highly specific and quantitative method for determining type III/I collagen ratios in tissues. *Matrix.* 10: 164–71.
- Creagh E. & O’Neil L.A. 2006. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity. *Trends Immunol.* 27:352-357
- FERREIRA, Kamila Dias. 2017. Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina: avaliação histológica pré-implantação e termográfica pós-implantação na parede abdominal de coelhos (*oryctolagus cuniculus*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. GO. 68p.

- Filho N.P.R. 2015. Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ ou laserterapia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Campus Jaboticabal, SP. 66p.
- GARROS I.C., CAMPOS A.C.L., TÂMBARA E.M., TENÓRIO S.B., TORRES O.J.M., AGULHAM, M.A., ARAÚJO, A.C.F., SANTIS-ISOLAN P.M.B., OLIVEIRA R.M., ARRUDA E.C.M. 2006. Extract from *Passiflora edulis* on the healing of open wounds in rats: morphometric and histological study. 21:55–65
- Griesemer A., Yamada K. & Sykes M. 2014 Xenotransplantation: immunological hurdles and progress toward tolerance. *Immunol Rev.* 258(1):241-58
- GILLITZER R., GOEBELER M. 2001. Chemokines in cutaneous wound healing. *J Leukoc Biol.* 69(4):513-521
- HORN M.M., MARTINS V.C.A. & PLEPIS A.M.G. 2009. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers.* 77(2):239-243
- Huang Z., Godkin O., Schulze-Tanzil G. 2017. The Challenge in Using Mesenchymal Stromal Cells for Recellularization of Decellularized Cartilage. *Stem Cell Rev.* 13(1):50-67
- ISO 10993-6. 2007. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation. International Standard. 2:1-19
- Jabs A, Moncada GA, Nichols CE, Waller EK, Wilcox JN. 2005. Peripheral blood mononuclear cells acquire myofibroblast characteristics in granulation tissue. *J Vasc Res.* 42(2):174-180
- Kar M., Vernon-Shih Y.R., Velez D.O., Cabrales P. & Varghese S. 2016. Poly(ethylene glycol) hydrogels with cell cleavable groups for autonomous cell delivery. *Biomaterials.* 77: 186–97
- Keane T.J., Londono R., Turner N.J. & Badylak S.F. 2012. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. *Biomaterials.* 33(6):1771-81
- Keane T.J., Swinehart I. & Badylack S.F. 2015 Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 84:25-34
- Luttikhuisen D.I.T, Harmsen M.C, Luyn M.J.A.V. 2006. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. *Tissue Engineering.* 12(7):1955-1970.
- Ma Y., Yabluchanskiy A. & Lindsey ML. 2013. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 6:11
- McLarren K.W., Cole A.E., Weisser S.B., Voglmaier N.S., Conlin V.S., Jacobson K., Popescu O., Boucher J.L. & Sly L.M. 2011. Ship-deficient mice develop spontaneous intestinal inflammation and arginase-dependent fibrosis. *Am J Pathol.* 179: 180-188
- Mendoza-Novelo B., Avila E.E., Cauich-Rodríguez J.V., Jorge-Herrero E., Rojo F.J., Guinea G.V. & Mata-Mata J.L. 2011. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. *Acta Biomater.* 7(3):1241-8
- Meneghin A. & Hogaboam C.M. 2007. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest.* 117: 530-538.
- Mitsi M., Hong Z., Costello C.E. & Nugent M.A. 2006. Heparin-mediated conformational changes in fibronectin expose vascular endothelial growth factor binding sites. *Biochemistry.* 45(34):10319-28
- Modulevsky D.J. & Cuerrier C.M. 2016. Biocompatibility of Subcutaneously Implanted Plant-Derived Cellulose Biomaterials. 11(6):e0157894
- Mori G.G., Teixeira L.M., Oliveira D.L., Jacomini L.M. & Silva S.R. 2014. Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. *J Endod.* 40(9):1485-8

- Moskalewski S., Hyc A. & Osiecka-Iwan A. 2002. Immune response by host after allogeneic chondrocyte transplant to the cartilage. *Microsc Res Tech.* 1: 3-13.
- Nair A, Zou L, Bhattacharyya D, Timmons R.B, Tang L. 2008. Species and density of implant surface chemistry affect the extent of foreign body reactions. *Langmuir.* 24(5):2015-2024.
- NETO N.L.C.B., Ribas Filho J.M., Malafaia O., Oliveira Filho M.A. 2006. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cirurgia Brasileira.* 21(2):17-22
- Nürnbergger, S., SCHNEIER, C., Van Osch, G.V.M., KEIBL, C., RIEDER, B., MONFORTE, X., TEUSCHL, A., MUHLEDER, S., HOLNTHONER, W., REDL, H., WOLBANK, S. 2019 Repopulation of an auricular cartilage scaffold, AuriScaff, perforated with an enzyme combination. *Acta Biomater.* 1(86):207-222.
- Onuki Y., Bhardwaj U., Papadimitrakopoulos F. & Burgess D.J. 2008. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J diabetes Sci Technol.* 2: 1003–1015
- Osiecka-Iwan., Hyc A., Radomska-Leśniewska D. M., Rymarczyk A. & Skopinski P. 2018. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and degenerative joint diseases. *Centr Eur Immunol.* 43 (1): 209-219
- Ploeger D.T, Hoper N.A, Schipper M, Koerts J.A, de Rond S, Bank R.A. 2013. Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Commun Signal.* 11(1): 29
- Schwarz S., Elsaesser A.F., Koerber L., Goldberg-Bockhorn E., Seitz A.M., Bermueller C., Dürselen L., Ignatius A., Breiter R. & Rotter N. 2015. Processed xenogenic cartilage as innovative biomatrix for cartilage tissue engineering: effects on chondrocyte differentiation and function. *J Tissue Eng Regen Med.* 9(12):E239-51
- Sengyoku H., Tsuchiya T., Obata T., Doi R., Hashimoto Y., Ishii M., Sakai H., Matsuo N., Taniguchi D., Suematsu T., Lawn M., Matsumoto K., Miyazaki T. & Nagayasu T. 2018. Sodium hydroxide based non-detergent decellularizing solution for rat lung. *Organogenesis.* 14(2):94-106
- Shin S.C., Park H.Y., Shin N., Jung D., Kwon H., Kim J. M., Wang S., Lee J., Sung E., Park G.C. & Lee B. 2018. Evaluation of decellularized xenogenic porcine auricular cartilage as a novel biocompatible filler. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 106(7):2708-2715.
- Silveira C.M., Pinto S.C., Zedebski Rde A., Santos F.A. & Pilatti G.L. 2011. Biocompatibility of four root canal sealers: a histopathological evaluation in rat subcutaneous connective tissue. *Braz Dent J.* 22(1):21–7.
- Silvipriya K.S., Kumar K.K., Bhat A.R., Kumar B.D., John A. & Lakshmanan P. 2015. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *J Apl Phr Sci.* 5 (03):123-127
- Sinno H. & Prakash S. 2013. Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic Surgery Int.* 2013: 146764
- Spiler K.L., Anfang R.R., Spiler K.J., Ng J., Nakazawa K.R., Daulton J.W. & Vunjak-Novakovic G. 2014. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 35(15):4477-88
- Staubli S.M., Cerino G., Gonzalez T., Alonso M., Oertli D., Eckstein F., Glatz K., Rodríguez C.J.C. & Marsano A. 2017. Control of angiogenesis and host response by modulating the cell adhesion properties of an Elastin-Like Recombinamer-based hydrogel. *Biomaterials.* 135:30-41
- Stramer B.M., Mori R. & Martin P. 2007. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *127:1009-107*

- SUGAHARA, K., DORFMAN, A. 1979. Effect of reduction and alkylation on the antigenicity of cartilage proteoglycans. *biochemical and biophysical research communications*. 89(4): 1193-1199
- Subramanian A., Krishnan U.M. & Sethuraman S. 2013. In vivo biocompatibility of PLGA-polyhexylthiophene nanofiber scaffolds in a rat model. *Biomed Res Int*. 2013:390518
- Swinehart I.T. & Badylak SF. 2016. Extracellular matrix bioscaffolds in tissue remodeling and morphogenesis. *Dev Dyn*. 245(3):351-60
- Thevenot P, Hu W, Tang L. 2008. Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current Topics In Medicinal Chemistry*. 8(4):270-280. Aguilar F.G., Roberti-Garcia L.F. & Panzeri Pires-de-Souza F.C. 2012. Biocompatibility of new calcium aluminate cement (EndoBinder). *J Endod*. 38(3):367-71
- Thevenot, paul todd. 2010. Mechanisms of biomaterial mediated fibrotic responses and strategies to improve tissue reactions to biomaterial implants. *Dissertação de Doutorado*. University of Texas at Arlington. 191p.
- Trindade R., Albrektsson T., Tengvall P. & Wennerberg A. 2016. Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res*. 18(1):192-203
- Valentin J.E., Stewart-Akers A.M., Gilbert T.W. & Badylak S.F. 2009. Macrophage participation in the degradation and remodeling of extracellular matrix scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 15:1687-1694.
- VAES, G., HAUSER, P., HUYBRECHT-GODIN, G., PEETERS-JORIS, C. 2013. Cartilage degradation by macrophages, fibroblasts and synovial in culture. An in vitro model suitable for studies on rheumatoid arthritis, p. 115-129. In: Hall,B.K. (Eds), *Cartilage – Biomedical aspects*. V.3, ed. Academic Press, Cambridge
- VULCANI, V.A.S., MACORIS, D.G., PLEPIS, A.M.G. 2008. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em equinos. *Ciência Rural*. 38(5):1329-1334
- VULCANI V.A.S., MACORIS D.G., PLEPSIS A.M.G., MARTINS V.C.A., FRANZO V. S., RABELO R.E. & SANT'ANA F.J.F. 2013. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de equinos. *Ciência Rural*. 43(8):1422-1428
- Wong M.L. & Griffiths L.G. 2014. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal versus decellularization. *Acta Biomater*. 10(5): 1806-1816
- Zhao F., Lei B., Li X., Mo Y., Wang R., Chen D. & Chen X. 2018. Promoting in vivo early angiogenesis with sub-micrometer strontium-contained bioactive microspheres through modulating macrophage phenotypes. *Biomaterials*. 178:36-47
- Zhu J. 2010. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 31:4639-4656.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1. Avaliações Macroscópicas Significativas										
	3 dias		7 dias		14 dias		21 dias		42 dias	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Neo vascularização	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Aderência Cartilagem-subcutaneo	+	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Mudança de coloração da cartilagem	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Encapsulamento	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+



Fig.1. Aspecto macroscópico do local de implantação cirúrgica em rato do grupo experimental de 3 dias. Nota-se que a uma fina e translúcida capa de tecido conjuntivo com formação de vaso aderida a essa. Não há formação de aderências ou vestígios de complicações locais

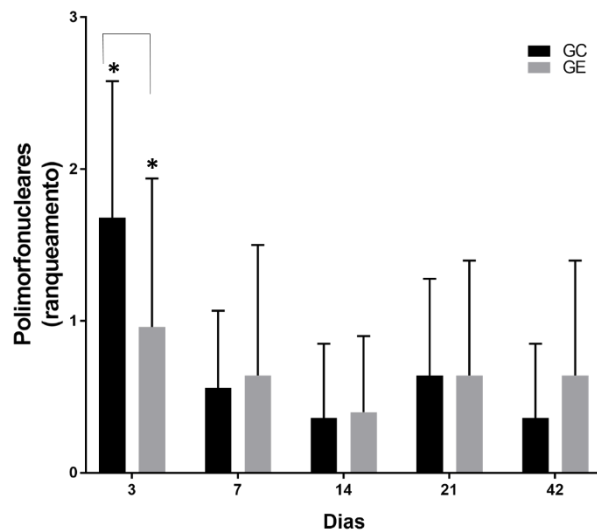


Fig.2. Gráfico do ranqueamento da população de células polimorfonucleares (PMN) para Grupo experimental e Grupo Controle no período estudado. Nota-se aumento significativo entre os grupos e os dias no 3^a dia seguido por rápido declínio. Diferença estatística em relação ao grupo controle no mesmo período (*), $p > 0,05$

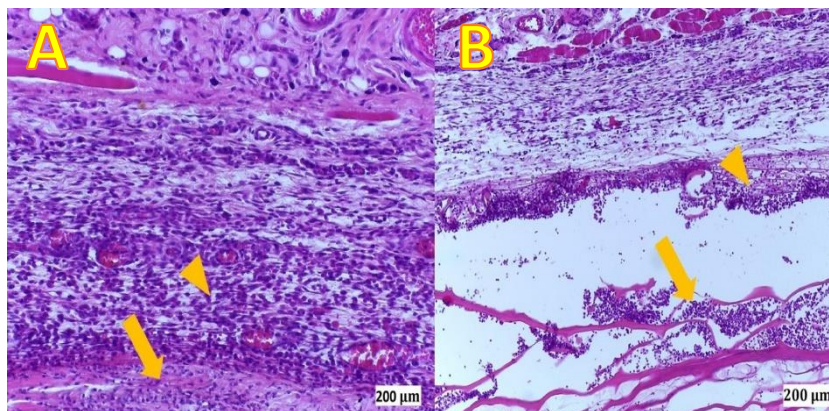


Fig.3. População de células polimorfonucleares no grupo controle (Figura A) e grupo experimental (Figura B) com 3 dias de retirada do implante. Setas = Neutrófilos; Pontas das setas = Macrófagos e Monócitos. Nota-se que os neutrófilos estão entremeados nas camadas pericondriais externas da cartilagem. Coloração H&E, 400x

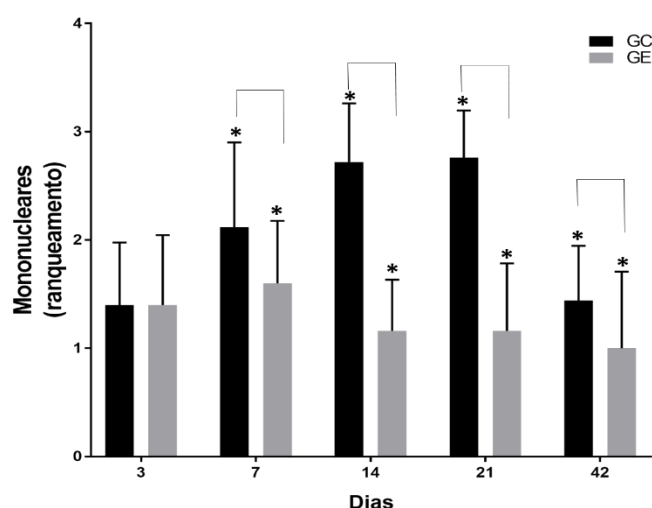


Fig.4. Gráfico do ranqueamento da população das células mononucleares (MN). Nota-se que a população aumenta a partir do 7^o e se mantém até o 42^o dia sendo que no Grupo Controle a maior quantidade dessas células. Diferença estatística em relação ao grupo controle no mesmo período (*), $p > 0,05$

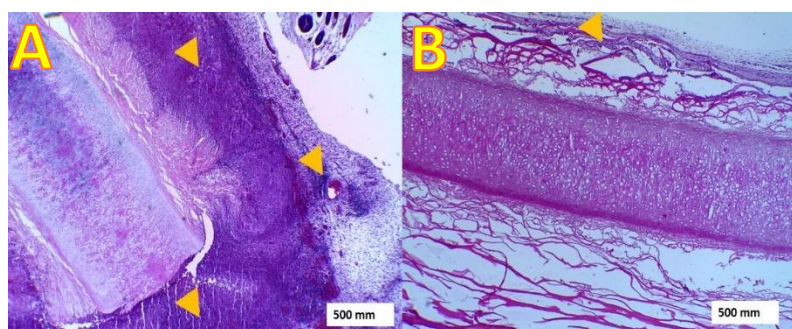


Fig.5. Diferença entre a população de células inflamatórias e sua disposição entre grupo controle (Figura A) e grupo experimental (Figura B) com 14 dias de retirada do implante. Pontas das setas = população de células inflamatórias de maioria Mononucleares. Nota-se que a população de células inflamatórias no grupo controle é acentuadamente maior que no grupo experimental, sendo que as células predominam na margem das camadas mais externas do pericôndrio. Coloração H&E, 40x

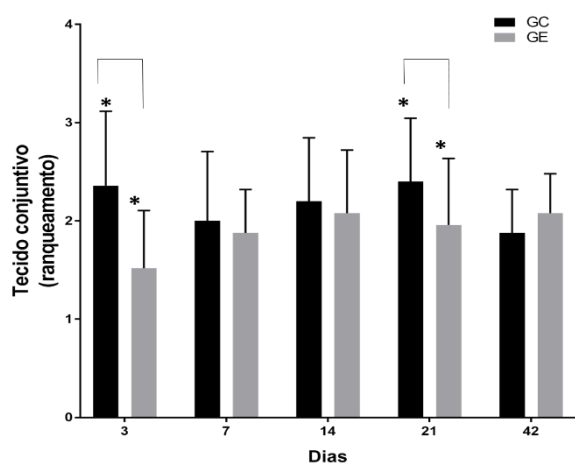


Fig.6. Gráfico do ranqueamento do tecido conjuntivo associado a lesão. Nota-se diferença entre os grupos no 3^o e 21^o dia (*), $p > 0,05$

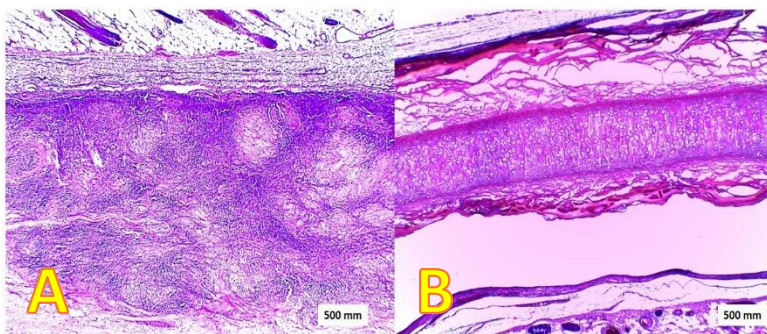


Fig.7. Diferença entre a organização da capsula fibrosa entre grupo controle (Figura A) e grupo experimental (Figura B) analisadas em implantes retirados com 21 dias. Nota-se que no grupo controle a formação de múltiplos granulomas menores, que são englobados por um único granuloma maior. Coloração H&E, 40x

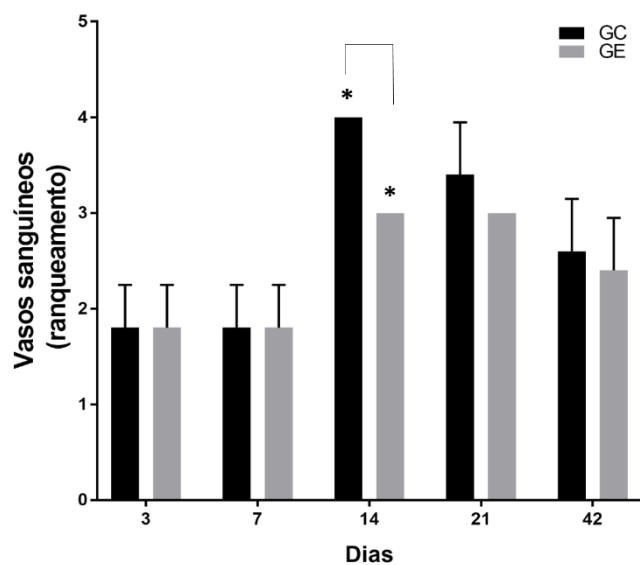


Fig.8. Gráfico do ranqueamento da contagem de vasos sanguíneos. Nota-se diferença apenas no 14^o dia. Diferença estatística em relação ao grupo controle (*) no mesmo período, $p > 0,05$

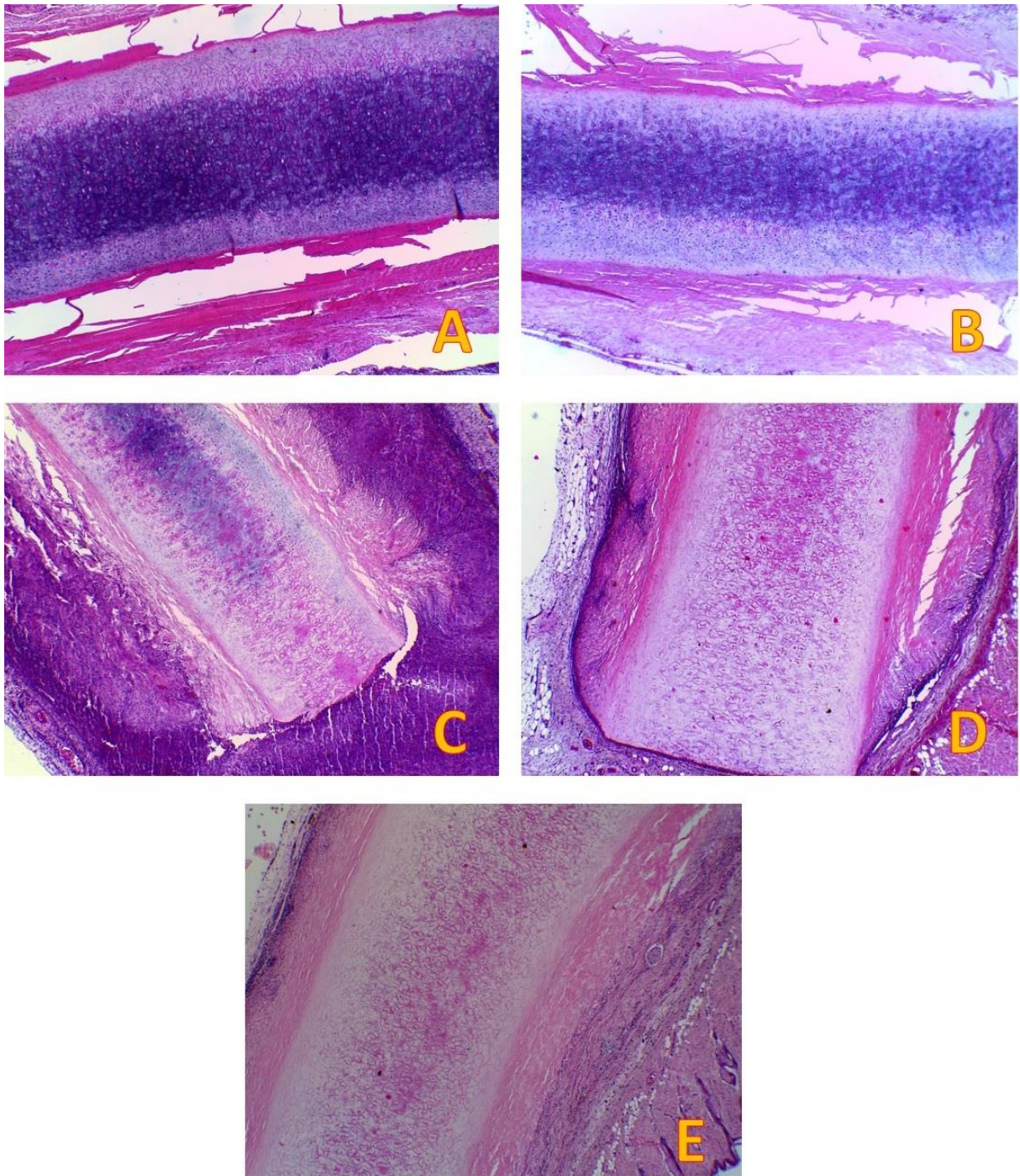


Fig.09. Implante de cartilagem elástica bovina em subcutâneo de ratos. Grupo controle. Diminuição da basofília da matriz cartilaginosa ao longo do experimento. A = 3º dia, B = 7º dia, C = 14º dia, D = 21º dia, E = 41º dia. Coloração H&E, 40x

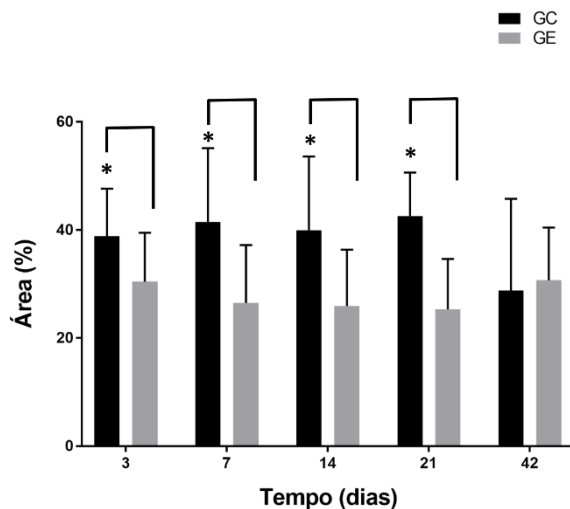


Fig.10. Gráfico da quantificação da porcentagem de área tipificada em vermelho (Colágeno Tipo-I). Diferença estatística em relação ao grupo controle no mesmo período (*), $p > 0,05$

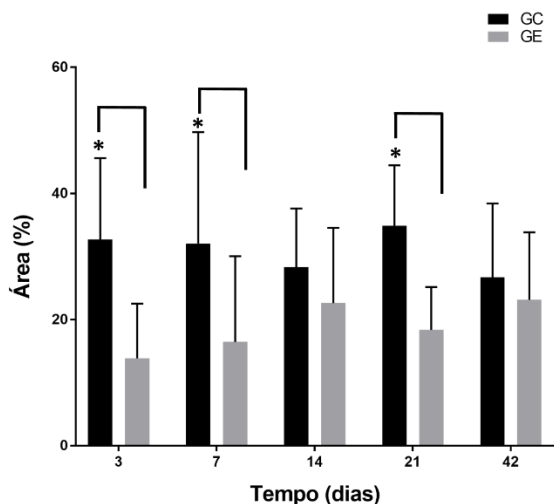


Fig.11. Gráfico da quantificação da porcentagem de área tipificada em verde e amarelo (Colágeno Tipo-III). Diferença estatística em relação ao grupo controle no mesmo período (*), $p > 0,05$

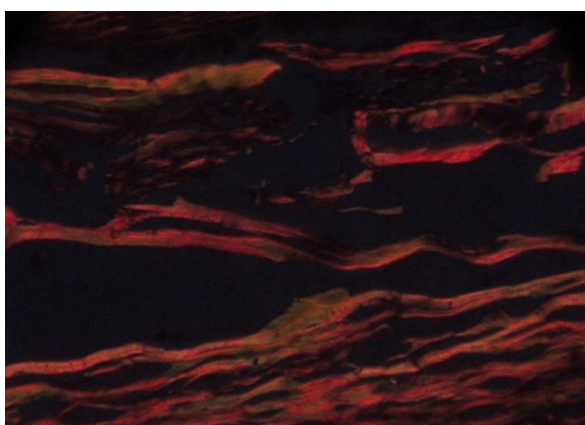


Fig.12. Visualização das fibras de colágeno tipo-I (Vermelho) e tipo-III (Verde e tons de amarelo) em um implante retirado no 14º em um rato do grupo experimental. As fibras de colágeno tipo-I são maiores e contínuas em contraste com as de colágeno tipo-III que normalmente estão margeando as fibras vermelhas e são menores. Coloração Picro-Sirus Red, em luz polarizada. Objetiva de 40x

CAPÍTULO 3: CONCLUSÕES GERAIS

Os biomateriais estão cada vez mais se diversificando e tomando espaço na rotina médica e veterinária, de tal forma que a caracterização físico-química e biológica destes é necessária para compreender melhor sua biocompatibilidade e buscando, assim, a aplicação adequada de cada tipo de material em locais específicos dos organismos vivos.

As cartilagens elástica bovinas, descelularizadas em solução alcalina, demonstraram melhor biocompatibilidade em relação as não tratadas. Fatores como baixa capacidade de atração de células inflamatórias, formação de cápsula fibrosa com fibras colágenas bem orientadas, além de não indução de necrose, edema e seroma foram os principais fatores observados na interface com os tecidos dos animais implantados que permitiram compreender a menor antigenicidade e melhor bioatividade e biocompatibilidade do material tratado.

Esses resultados corroboram para um entendimento mais amplo sobre a ação da cartilagem bovina como um xenoinxerto e nas interações dessa com os tecidos biológicos. Espera-se que esse estudo possa contribuir para a orientação no desenvolvimento e fabricação de futuros materiais baseados nesse tecido como, por exemplo, a fabricação de cartilagens servindo como veículos farmacológicos.

REFERÊNCIAS

- CHEN, G.; KAWAZOE, N.; LU, H. **Decellularization Techniques for Tissue Engineering - Nucleic Acids Structure and Mapping**: Encyclopedia of Analytical Chemistr. 2015. Disponível em: <
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a9472/full> >
 acessado em 28/09/2017.
- FERREIRA, Kamila Dias; **Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina: avaliação histológica pré-implantação e termográfica pós-implantação na parede abdominal de coelhos (*oryctolagus cuniculus*)**. 2017. 68f. Trabalho de conclusão de curso (Tese Mestrado), UFG – Regional Goiânia, 2017.
- Filho, Nazilton de Paula Reis; Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ ou laserterapia. 2015. 66f. Trabalho de conclusão de curso (Tese mestrado), UNESP, Campus Jaboticabal, 2015.
- HUEBSCH, N.; MOONEY, D. J. Inspiration and application in the evolution of biomaterials. **Nature**, London, p. 426-432, v 26, n 462(7272), 2009
- Keane, T.J.; Londono, R.; Turner, N.J.; Badylak S.F. Consequences of ineffective decellularization of biologic scaffolds on the host response. **Biomaterials**, Amsterdam. p. 1771-81, v 3, n 6. 2012
- Mendoza-Novelo, B.; Avila, E.E.; Cauich-Rodríguez, J.V.; Jorge-Herrero, E.; Rojo, F.J.; Guinea, G.V.; Mata-Mata, J.L. 2011. Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content. **Acta Biomaterials**, Amsterdam. p. 1241-8, v 7, n 3. 2011
- ORÉFICE, R. M.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais, Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- Ratner, B. D. & Bryant, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual review of biomedical engineering**, Palo alto, p. 41-75, v. 6. 2004.
- Sengyoku, H.; Tsuchiya, T.; Obata, T.; Doi ,R.; Hashimoto, Y.; Ishii, M.; Sakai, H.; Matsuo, N.; Taniguchi, D.; Suematsu, T.; Lawn, M.; Matsumoto, K.; Miyazaki, T.; Nagayasu, T. Sodium hydroxide based non-detergent decellularizing solution for rat lung. **Organogenesis**, Philadelphia. p.94-106, v 14, n 2. 2018
- TIBBITT, M. W.; RODELL, C. B.; BURDICK, J. A.; ANSETHC, K. S. Progress in material design for biomedical applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, dc., p. 144444-14451, n. 112, v. 47, 2015.
- TIBBITT, M. W.; RODELL, C. B.; BURDICK, J. A.; ANSETHC, K. S. Progress in material design for biomedical applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, dc., p. 144444-14451, n. 112, v. 47, 2015.
- VULCANI, V. A. S.; MACORIS, D. G.; PLEPSIS, A. M. G.; MARTINS, V. C. A.; FRANZO, V. S.; RABELO, R. E.; SANT'ANA, F. J. F. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, p. 1422-1428, v. 43, n.8, 2013.
- WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, p 5897-5909, v. 30, n. 30, 2009.

- WILLIAMS, D. F. There is no such thing as a biocompatible material. **Biomaterials**, Amsterdam, p 10009-10014, v. 35, n. 38, 2014.
- Wong M.L. & Griffiths L.G. 2014. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: Antigen removal versus decellularization. **Acta Biomaterial**, Kidlington. p. 1806-1816, v 10, n 5. 2014

ANEXO I

Normatização pela PBV

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A submissão de artigos à revista “Pesquisa Veterinária Brasileira” (PVB) deve ser feita em Word, através do Sistema ScholarOne, [link https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo](https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo)

A tramitação somente pode ter início se o seu artigo estiver rigorosamente dentro das normas de apresentação da revista, de acordo com as Instruções aos Autores, o modelo no site da revista e os últimos fascículos publicados (www.pvb.com.br). Na verificação de falhas de apresentação, o artigo será devolvido aos autores para as devidas correções.

Os autores podem submeter seus artigos em **Inglês** ou em **Português**, mas sempre com um Resumo em português. No caso de artigos aceitos escritos em **Português**, estes serão traduzidos para o **Inglês** pela Editora Cubo; pois todos os artigos publicados na PVB serão em inglês. Para os artigos já submetidos em **Inglês**, os autores devem apresentar via ScholarOne um Certificado de Tradução de uma empresa habilitada ou de um Tradutor Nativo. **Essa regra vale para artigos submetidos a partir de 1 de janeiro de 2018.**

Os pagamentos da taxa de publicação (*Paper Charge*) serão cobrados na ocasião do envio da comunicação de aceite por e-mail:

(1) Artigos submetidos em inglês, R\$ 1.500,00 (US\$ 480.00) por artigo;

(2) Artigos submetidos em português, R\$ 2.000,00 (US\$ 640.00) por artigo, incluindo as despesas com a tradução.

O **texto** deve ser formatado, em todos os pormenores, de acordo com as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br).

Se o artigo for submetido fora das normas de apresentação, a tramitação somente ocorrerá após as devidas correções feitas pelo autor.

A PVB publica Artigos Originais, Artigos de Revisão Crítica e Tópicos de Interesse Geral; não publica artigos com a denominação de *Short Communications*.

Os Artigos Originais devem conter resultados de pesquisa ainda não publicados ou submetidos para outros periódicos.

Artigos de Revisão de Literatura, submetidos a convite, devem constituir-se de análise crítica, de assuntos na área de experiência dos autores, isto é, quando os autores já tiverem publicado anteriormente artigos sobre o assunto.

Os raros Tópicos de Interesse Geral devem constituir-se de assuntos de grande importância atual baseado na vasta experiência dos autores.

As opiniões e conceitos emitidos nos artigos submetidos são de responsabilidade dos autores. O Conselho Editorial da PVB, com a assistência da Assessoria Científica, pode sugerir ou solicitar modificações. Os artigos submetidos são avaliados pelos pares (*peer review*) e, aceitos para publicação com dois pareceres favoráveis, ou rejeitados por dois pareceres desfavoráveis.

Os direitos autorais dos artigos aceitos para publicação permanecem com os autores.

1. Os artigos devem ser organizados em TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (de preferência os

últimos três separadamente), Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse e REFERÊNCIAS:

a) O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu “nome para publicações científicas”,** como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores.** O autor para correspondência deve ser um autor que garante o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé devem ser mais uma vez elevados (sobrescritos), para aparecerem maiores e mais nítidos.

c) O **Cabeçalho do ABSTRACT** deve conter, além dos nomes dos autores abreviados invertidos, o ano, o **TÍTULO**, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Devem-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias.

d) O **Rodapé da primeira página** deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de “Inserir nota de fim”, do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas).

e) O **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO, mas pode ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de “ADDITIONAL INDEX TERMS”.

f) O **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMS DE INDEXAÇÃO” que incluem termos do título, por não se tratar somente de “TERMS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS”.

g) A **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo.

h) **MATERIAL E MÉTODOS** deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores.

i) Em **RESULTADOS** devem ser apresentados concisamente os dados obtidos.

j) Na **DISCUSSÃO** devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.

k) **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único).

l) Os **Agradecimentos** não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Declaração de conflito de interesse e da Lista de Referências.

m) A **Declaração de conflito de interesse** é obrigatória e deve ser mencionada nos casos positivos ou negativos; deve ser sucinta e colocada imediatamente antes da Lista de Referências.

n) A Lista de **REFERÊNCIAS** deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em

casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de

formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) Fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; página formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras.

b) ABSTRACT e RESUMO serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas.

c) A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal.

d) Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravi*), no início de cada capítulo (**TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, etc.**), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravi*).

e) Nos títulos dos Quadros e nas Legendas das Figuras os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto.

f) No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word.

Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, (P<0,05), 15h; de conveniência quando seguida de letra alta (35 kg ou 35kg, 4 h ou 4h). A abreviação de número é “no” e não “no”; grau Celsius é “oC” e não “oC”.

g) Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto!

h) Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

i) Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso & Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armién et al. 2004).

j) **Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados**; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências.

k) O uso de “comunicação pessoal” e de “dados não publicados” deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal).

l) As **Legendas das Figuras** devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de “Fig.” seguida do número sem espaço,

p.ex. “Fig.8. ...”. Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada “subfigura” em **negrito** com parênteses claros antes do texto correspondente e devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada “subfigura”, em parênteses e claros após o respectivo texto da legenda.)

m) O Título dos **Quadros** devem ser em **negrito**, sem ponto, e a “garganta” (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da “garganta” devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usem o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, com “a” em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista.

n) Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de **Figuras**). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, sem fundo e sem linhas horizontais.

3. Apresentação das Figuras:

a) As imagens devem ser salvas em 300 dpi, arquivo TIF.

b) Numerar cada figura separadamente (1, 2, ...).

c) Figuras com assuntos similares (subfiguras) devem ser agrupadas em pranchas com espaço entre elas de aprox. 1mm. Identifique cada imagem com uma letra maiúscula (A, B, ...) colocada no canto inferior esquerdo, de preferência fonte Arial 14, branca, em um quadro preto sem bordas.

d) Usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; para micrografias ópticas apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.

e) As legendas de Figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda = Fig.1. Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).

4. Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa; na revisão final do artigo pelos autores, antes da submissão, isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).

Exemplos de Referências

☒☒ Artigos publicados em periódicos:

Pavarini S.P., Soares M.P., Bandarra P.M., Gomes D.C., Bandinelli M.B., Cruz C.E.F. & Driemeier D. 2011. Mortes súbitas causadas por *Amorimia exotropica* (Malpighiaceae) no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.* 31(4):291-296.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24. (Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal “&” é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra “Revista” deve ser abreviada como “Revta” em diferença a “Rev.”, do inglês “Review”. Deve-

se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em

extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados “ponto-vírgulas” (;) em lugar de vírgulas. Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

☒☒ Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)

☒☒ Dissertações e Teses:

Silva R.M.M. 2016. Prevalência, identificação e distribuição das lesões abscedativas em caprinos e ovinos abatidos em um matadouro frigorífico no Estado da Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. 56p.

Sant’Ana V.A.C. 2004. Proteinograma do leite de vacas: padrões e variabilidade. Tese de Doutorado, Clínica Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 161p.

(Notem: (1) Deve-se evitar se referir a Dissertações ou Teses em vez de aos artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.

☒☒ Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.2):50-51. (Resumo)

Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)

(Note: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra.

Anexo II - Aprovação no Comitê de Ética



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



- Material utilizado em outros projetos: Não
- Método de eutanásia: Deslocamento cervical após dessensibilização dos sentidos induzido por anestesia (xilazina e cetamina – 8 e 60 mg/kg, respectivamente).

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

- Quanto aos documentos exigidos pela CEUA/UFV: Em concordância.
- Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Em concordância.
- Atendimento das pendências relacionados no parecer inicial: Feito.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação complementar apresentada à CEUA (i.e., “carta de retificação” e “declaração”), consideramos o projeto “ESTUDO DA BIOCAMPATIBILIDADE DE CARTILAGENS ELÁSTICAS BOVINAS TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA EM RATOS”, protocolo 019-17p/2017, **Aprovado**, smj. desta /Comissão.

Solicitamos aos pesquisadores:

- ✓ Todas pendências foram sanadas. Consultar a “Carta de Retificação” e a “Declaração” anexada pelos pesquisadores ao processo inicial.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que a pesquisadora responsável deverá encaminhar à CEUA-Jataí o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até 31 de abril de 2019.



VII - Data da reunião: 24/11/2017.

Dra. Mirian Machado Mendes
Coordenadora da CEUA-Jataí



Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA-JATAÍ
Bloco 5 – sala 23 B, Campus Jataí. Br 364 Km 192, nº. 3.300
Parque Industrial, Jataí (GO) - 75801-615
E-mail: ceujatai@ufv.br

Anexo III - Extrato do projeto de pesquisa

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS Sistema Integrado de Gestão de Atividades Acadêmicas Emitido em 12/09/2018 08:58	
---	---	---

Projeto de Pesquisa

Dados do Projeto Pesquisa		
Código:	PI02803-2017	
Título do Projeto:	BIOCOMPATIBILIDADE DE CARTILAGENS ELÁSTICAS BOVINAS TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA EM RATOS	
Tipo do Projeto:	SEM Financiamento (Projeto Novo)	
Categoria do Projeto:	Pesquisa Científica	
Situação do Projeto:	EM ANDAMENTO	
Unidade:	UNID. ACAD. ESP/CIENCIAS AGRARIAS-JATAI (11.04.05)	
Centro:		
Palavra-Chave:	Biomateriais, cartilagem alcalina, cirurgia experimental	
E-mail:	diegoaraujomv@outlook.com	
Período do Projeto:	24/07/2017 a 24/12/2018	
Áreas de Conhecimento, Grupo e Linha de Pesquisa		
Áreas de Conhecimento:		
Ciências Agrárias - Medicina Veterinária - Clínica e Cirurgia Animal - Clínica Cirúrgica Animal (Área de Avaliação)		
Grupo de Pesquisa:	Linha de Pesquisa:	Morfofisiologia, Clínica e Cirurgia animal
Possui Cooperação Internacional:	Não	
Resumo		
<p>Embora o uso de cartilagens elástica como biomaterial já seja conhecido na rotina veterinária, suas propriedades e as reações que provocam no organismo do animal ainda são pouco conhecidas, principalmente das cartilagens elástica tratadas em solução alcalina. Dessa forma, o conhecimento dessas particularidades poderá possibilitar maior segurança no desenvolvimento de novos produtos para a rotina clínica e cirúrgica humana e veterinária. Esse estudo tem como objetivo principal analisar comparativamente a biocompatibilidade entre as cartilagens elásticas bovinas tratada em solução alcalina e as cartilagens não tratadas em ratos Wistar. As cartilagens serão obtidas de orelhas bovinas e, metade destas serão tratadas em solução alcalina e a outra metade não será tratada. Independente do tratamento ou não, as cartilagens serão esterilizadas em óxido de etileno. As cartilagens serão implantadas no subcutâneo da região dorsal, entre as escápulas em ratos (N=50) sendo que G1 (N=25) receberão cartilagens tratadas e G2 (N=25) receberão cartilagens não tratadas. Serão avaliadas a presença e estadiamento de edema, seroma e secreções purulentas. Para a retiradas dos implantes serão eutanasiados 5 animais de cada grupo nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 sendo que as características macroscópicas desencadeadas pelo implante serão avaliadas e estadiadas como possíveis fibroses, coágulos e infecções. Serão realizadas avaliações histopatológicas para verificar a reação tecidual, qualificando e quantificando-se o processo inflamatório. Os dados obtidos serão analisados e comparados para verificar a eficiência do tratamento alcalino na biocompatibilidade da cartilagem. Dessa forma, uma vez que a cartilagem elástica tratada mostre ser biocompatível e superior em relação a não tratada, esse material poderá servir de modelo para a criação de novos produtos para a utilização na rotina clínica e cirúrgica veterinária e humana.</p>		
Introdução/Justificativa		
(incluindo os benefícios esperados no processo ensino-aprendizagem e o retorno para os cursos e para os professores da UFG em geral)		
<p>O termo biomaterial compreende qualquer substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por qualquer período de tempo, com a finalidade de substituir matéria viva que deixou de ter a sua função, podendo ou não servir como veículo, matriz, suporte ou estimulador para o crescimento de tecido¹. Até a década de 1980, a utilização do colágeno como matriz era restrita à produção de fios cirúrgicos principalmente devido à dificuldade de sua obtenção. A partir de então, a introdução de novos processos de obtenção de componentes da matriz extracelular como colágeno e elastina aumentaram significativamente o uso destas proteínas como biomaterial nas formas de membranas, tubos, pós, esponjas, soluções injetáveis, entre outras^{2,3}. Essas aplicações devem-se principalmente a algumas de suas propriedades importantes como: baixa resposta imunológica; biodegradabilidade; habilidade em promover crescimento celular; propriedades hemostáticas; susceptibilidade a modificações químicas². A biocompatibilidade in vivo de materiais tratados em solução alcalina, principalmente os que tem origem em tecido cartilaginoso foi pouco investigada. Para outros tecidos, alguns relatos demonstram que pericárdio bovino submetido a hidrólise alcalina por 24 e 48 horas e implantadas no subcutâneo de ratos proporcionou a integração tissular em até 180 dias. Essas matrizes tiveram significativa diferença, em relação ao grupo controle, na redução da resposta inflamatória crônica, incluindo a fibrose⁴. Para avaliar estas respostas, o estudo histopatológico é indispensável, especialmente quando se objetiva avaliar a biocompatibilidade de determinado biomaterial. Esta avaliação inclui as determinações da resposta dos tecidos do hospedeiro aos componentes dos diferentes materiais empregados⁵. De modo geral, para a implantação de um biomaterial no hospedeiro é necessário um procedimento cirúrgico. Assim, a resposta ao implante envolve além dos eventos de reparo desencadeados pelo trauma cirúrgico, uma resposta tecidual ao material implantado⁶. A resposta específica ao material frequentemente compreende inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho e sobrepõe aquela produzida pelo trauma⁷.</p> <p>Justificativa: Estudar a biocompatibilidade da cartilagem elástica tratada em solução alcalina poderá abrir caminho para sua utilização e difusão na rotina veterinária, auxiliando nos procedimentos cirúrgicos, na recuperação e cicatrização de tecidos. O uso dessa cartilagem também poderá ser amplificado para outras espécies, como canina, felina e até em seres humanos. Além disso, a confirmação da biocompatibilidade associada a outras características do tecido cartilaginoso, como resistência e flexibilidade, podem gerar um produto passível de aquisição de patente para produção em larga escala.</p>		
Objetivos		
<p>Esse trabalho tem como objetivo geral analisar comparativamente a biocompatibilidade entre cartilagens elásticas de origem bovina, tratada em solução alcalina e cartilagem não tratada em ratos da raça Wistar.</p> <p>Os objetivos específicos deste trabalho, estão listados abaixo:</p> <ul style="list-style-type: none"> Coletar as cartilagens auriculares de bovino em frigoríficos inspecionados; Limpar e separar os tecidos adjacentes, separando as cartilagens; Submeter as cartilagens ao tratamento alcalino; Implantar no subcutâneo de ratos cartilagens não tratadas e tratadas; Monitorar clinicamente as feridas cirúrgicas decorrentes dos implantes; Retirar os implantes e tecidos adjacentes para realizar avaliação histopatológica comparativa das amostras tratadas e não tratadas; Compilar os dados e realizar análise estatística; Discutir os aspectos relevantes e possíveis benefícios do tratamento alcalino para otimizar a biocompatibilidade do tecido cartilaginoso. 		

Metodologia

1) Obtenção e preparo das cartilagens: As orelhas serão obtidas de bovinos, da raça Nelore, abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal. As peças anatômicas serão transportadas, sob refrigeração, até o Laboratório de Patologia da UFG, Campus Jataí, onde ocorrerá a separação da pele da cartilagem auricular, empregando instrumentais como bisturi, tesoura e pinças. As cartilagens serão lavadas em solução fisiológica, acondicionadas em sacos plásticos, e congeladas individualmente. Posteriormente, serão encaminhadas ao Laboratório de Bioquímica e Biomateriais (Instituto de Química da USP - São Carlos, SP), onde metade dessas cartilagens serão descongeladas e imersas em solução alcalina contendo dimetilsulfóxido e sais (cloretos e sulfatos) de sódio, potássio e cálcio. Após 72 horas, os sais residuais serão removidos por três lavagens sucessivas com H₃BO₃ 3% e EDTA 3%, congeladas gradativamente, em temperatura de 15°C por 12 horas e -15°C por 12 horas e liofilizadas até apresentarem massas constantes. Todas as cartilagens (tratadas ou não em solução alcalina) serão acondicionadas em embalagens individuais e submetidas à esterilização em óxido de etileno. Antecedendo ao procedimento cirúrgico, o material será remodelado para as dimensões de 1,5cm x 1,5cm para ser inserido no sítio receptor.

2) Animais e manejo: Todos os procedimentos a serem realizados serão previamente submetidos a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG) e efetuados de acordo com os preceitos éticos estabelecidos para os animais de experimentação. O presente projeto será desenvolvido no Biotério Experimental da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Jataí. Serão utilizados 50 ratos, da raça Wistar, sexo masculino, com cerca de 10 semanas de idade pesando 400 g, adquiridos de criatórios autorizados do estado de Goiás. Após avaliação clínica, os animais serão submetidos a exame físico e alojados em grupos de cinco por gaiola, recebendo água e alimentação específica para a espécie ad libitum. O período de adaptação será de 15 dias, ocasião que serão realizados exames pré-operatórios, visando confirmar a higidez dos mesmos. Animais que apresentarem alguma alteração clínica serão tratados ou descartados, de acordo com os métodos usados pelo biotério em que estão instalados e que sejam devidamente aprovados pelos órgãos reguladores.

3) Delineamento experimental: No estudo serão empregados 50 ratos distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (N=25) de acordo com o biomaterial a ser implantado. Os animais alocados em GI receberão os implantes de cartilagem tratada em solução alcalina e nos distribuídos em GII o implante de cartilagem não tratada. Cada grupo será dividido em 5 subgrupos (N=5) de acordo com o período de avaliação macroscópica e microscópica pós-operatória.

Para a implantação dos materiais, os animais serão submetidos à anestesia geral, por meio da injeção intraperitoneal da associação de xilazina e cetamina (8mg/kg e 60 mg/kg respectivamente). Após tricotomia e antisepsia, será realizada incisão de pele de um centímetro, na região do dorso entre as escápulas. Feito a incisão o subcutâneo será dilacionado para criar espaço para a inserção da amostra. A pele será suturada com fios de nylon usando pontos simples separados e os animais receberão uma dose de antibiótico enrofloxacina a 10% intraperitoneal e pomada de mupirocina 2% no local da ferida cirúrgica. Para analgesia será administrado butorfanol na dose de 0,2mg/Kg por via subcutânea durante dois dias.

Todos os animais serão avaliados sistematicamente a cada 24 horas, verificando-se consumo de água e alimento, comportamento e condições da ferida (presença e estadiamento de edema, seroma e secreção purulenta, considerando graus I, II e III). Para a retirada dos implantes serão realizados os mesmos procedimentos anestésicos e cirúrgicos, considerando que será coletado o material e tecido subcutâneo adjacente. Após aprofundamento da anestesia, os animais serão eutanasiados por deslocamento cervical. Durante a retirada, serão avaliados na interface do implante, a dificuldade de dissecação, presença de edema, coágulos, fibrose, seroma e infecção, com estadiamentos em graus I, II e III. Para fins de descrição histopatológica, as retiradas serão realizadas nos dias 3, 7, 15, 30 e 60 dias após a implantação.

Os fragmentos retirados serão fixados em solução de formalina (10%), tamponada com fosfato (pH 7,2) por pelo menos 24 horas e encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, para o processamento e confecção de lâminas permanentes. Os cortes histológicos obtidos serão corados pela técnica de hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson. A análise histológica será realizada empregando microscópio de luz, sendo considerado como parâmetro principal de indicação da integração dos fragmentos de cartilagem enxertados, a presença de cicatrização nas regiões periférica e central do fragmento. Será verificado o tipo de infiltrado inflamatório, tecido de granulação e neovascularização. Os cortes histológicos também serão submetidos a coloração Picrosirius Red e leitura em microscópio de luz polarizada para verificação da produção de colágeno. Para análise estatística será aplicado teste Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) para $p < 0,05$.

Além disso, de acordo com as possibilidades de execução do projeto, serão realizadas marcações imuno-histoquímicas para macrófagos, linfócitos T e neovascularização para complementar a análise histopatológica. As lâminas serão visualizadas em microscópio com captura de imagens para registro e posterior análise quantitativa no software Image J, para comparação das amostras tratadas e não tratadas. As médias serão submetidas a análise estatística semelhante à descrita para a avaliação histopatológica por coloração convencional.

Resultados Esperados

Por se tratar de um material natural, subproduto do abate de bovinos, com características de resistência e elasticidade compatíveis com as necessidades em cirurgias reconstrutivas, a cartilagem elástica apresenta alto potencial para ser utilizada como biomaterial. Para que isso ocorra, foi proposto neste projeto, o tratamento da cartilagem em solução alcalina, a qual literatura científica demonstra ser descelularizante e modificadora da estrutura antigênica da molécula de colágeno, otimizando a compatibilidade de implantes de tecidos de origem animal. No entanto, apesar de ter sido empregada para tratar diversos tecidos animais, não foram conduzidos estudos demonstrando a biocompatibilidade in vivo da cartilagem elástica da orelha de bovinos tratada em solução alcalina. Desta forma, uma vez que este estudo avalie a biocompatibilidade da cartilagem tratada e alcance resultados positivos, isto é, estabelecendo o material como biocompatível, um novo biomaterial poderá ser aplicado como implante em tecidos moles na rotina cirúrgica de animais e humanos.

Para alcançar os objetivos propostos por esse trabalho serão utilizados os Laboratórios de Patologia Veterinária da UFG, Campus Jataí e também o Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química da USP - São Carlos, SP onde grande parte do material será processada e os dados referentes aos efeitos do experimento serão coletados. Esses resultados darão subsídios para responder as questões referente ao que se foi proposto principalmente em relação a natureza da cartilagem hialina tratada como biomaterial e, somente com esses resultados é que se pode estabelecer uma base sólida para futuras aplicações clínicas e cirúrgicas.

As mensurações obtidas do material serão realizadas através de métodos padrões recomendáveis (preparação de lâminas histológicas, por exemplo), além disso o próprio material usado (cartilagem bovina) é de baixo custo e de fácil disponibilidade sendo que isso facilita a reprodução desse experimento como também a coleta e pesquisa tanto das características quantitativas quanto qualitativas.

Referências

1. Hench L. L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, Guidford, v.19, n. 4/5, p. 419-423, 1998.
2. GOISSIS, G. et al. Surface tension controll of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v.15, p.55-61, 1999.
3. VULCANI, V.A.S.; MACORIS, D.G.; PLEPIS, A.M.G. Membranas biológicas homólogas preservadas em solução alcalina seguida de liofilização, glicerina a 98% e por liofilização para implantação em equinos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.5, p.1329-1334, ago, 2008.
4. Parreira, D.R. Matrizes tridimensionais de colágeno aniônico: elastina como suporte para reconstrução de tecidos moles: um estudo de integração matriz.tecido. 2004. 56f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) Curso de Pós-graduação em Bioengenharia Interunidades, Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, SP.
5. Williams, D. F. *Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery*. Sādhanā, Bangalore, v.28, p.563-574, 2003.
6. Babensee, J. E.; Anderson, J. M.; Mcintire, L. V.; Mikos, A. G. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam, v.33, p.114, 1998.
7. Vasconcelos, A. C. Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais. In: Órefice, R. L.; Pereira, M. M.; Mansur, H. S.; *Biomateriais Fundamentos e aplicações*, 1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 279-280p.
8. F. Massone, *Anestesiologia Veterinária Farmacologia e Técnicas*, 4 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil (2003), p.326.
9. Rabelo, R. E.; Paulo, N. M.; Silva, L. A. F.; Romani, A. F.; Viana P. R. L.; Verissimo, A. C. C. Uso do centro frênico diafragmático na correção de hérnias umbilicais recidivantes em bovinos. *Rev. Bras. Cir. Vet.* Rio de Janeiro, v, 9, n. 1 Supl., p. 269-271, 2002.

10. Montes, G. S.; Junqueira, L. C. U. The use of the picosirius - polarization method for the study of biopathology of collagen. Memória do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.86, p.1-11, 1991.

11. Beets, G. L.; Vanmameren, H.; GO, P. M. N. Y. H. Long-term foreign- body reaction to pre-peritoneal polypropylene mesh in the pig. Hernia, Paris, v.2, p.153-155, 1998.

Membros do Projeto

CPF	Nome	Categoria	CH Dedicada	Tipo de Participação
958.169.921-04	LILIANA BORGES DE MENEZES LEITE	DOCENTE	6	Colaborador
750.326.941-34	LEINY PAULA DE OLIVEIRA	DISCENTE	8	Colaborador
029.531.901-12	DIEGO PEREIRA DE ARAÚJO	DISCENTE	12	Vice-coodernador
278.665.518-80	GUSTAVO HENRIQUE MARQUES ARAUJO	DOCENTE	6	Colaborador
274.416.998-60	VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI	DOCENTE	8	Coordenador

2017

Atividades	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO						
ENVIO A APROVAÇÃO CIAGRA - UFG JATAÍ						
ENVIO AO COMITÊ DE ÉTICA						
AQUISIÇÃO DE ANIMAIS						
FASE EXPERIMENTAL						
ANÁLISE LABORATORIAL						
ANÁLISE DOS DADOS						
ANÁLISE DA ESTATÍSTICA						
REDAÇÃO CIENTIFICA						

2018

Atividades	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO												
ENVIO A APROVAÇÃO CIAGRA - UFG JATAÍ												
ENVIO AO COMITÊ DE ÉTICA												
AQUISIÇÃO DE ANIMAIS												
FASE EXPERIMENTAL												
ANÁLISE LABORATORIAL												
ANÁLISE DOS DADOS												
ANÁLISE DA ESTATÍSTICA												
REDAÇÃO CIENTIFICA												

Histórico do Projeto

Data	Situação	Usuário
25/07/2018	SUBMETIDO	VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI / aloisiosv
25/07/2018	EM ANDAMENTO	LARISSA SANTOS PEREIRA / larissasantos_bio

Relatório Emitido por: VALCINIR ALOISIO SCALLA VULCANI