UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARTILAGEM AURICULAR DE BOVINOS TRATADA COM SOLUÇÃO ALCALINA: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA PRÉ-IMPLANTAÇÃO E TERMOGRÁFICA PÓS-IMPLANTAÇÃO NA PAREDE ABDOMINAL DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*).

Kamilla Dias Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloisio ScallaVulcani

GOIÂNIA
2017

sistema de bibliotecas ufg

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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: **[X] Dissertação** **[ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

1 Nome completo do autor: Kamilla Dias Ferreira

2 Título do trabalho: Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina:avaliação histológica pré implantação e termográfica pós implantação na parede abdominal de coelhos (Oryctolagus cuniculus).

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

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

Kamilla Dias Ferreira
Assinatura do (a) autor (a) [2]

Data: 30 /03 / 17

[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 disponibilizados durante o período de embargo.

KAMILLA DIAS FERREIRA

CARTILAGEM AURICULAR DE BOVINOS TRATADA COM SOLUÇÃO ALCALINA: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA PRÉ-IMPLANTAÇÃO E TERMOGRÁFICA PÓS-IMPLANTAÇÃO NA PAREDE ABDOMINAL DE COELHOS

(*Oryctolagus cuniculus*).

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Patologia, Clínica e Cirurgia Experimental

Orientador:

Prof. Dr. Valcinir Aloisio ScallaVulcani- UFG/Jataí

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva- EVZ/UFG

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo- EVZ/UFG

GOIÂNIA

2017

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

Dias Ferreira, Kamilla
CARTILAGEM AURICULAR DE BOVINOS TRATADA COM SOLUÇÃO ALCALINA: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA PRÉ-IMPLANTAÇÃO E TERMOGRÁFICA PÓS-IMPLANTAÇÃO NA PAREDE ABDOMINAL DE COELHOS (Oryctolagus cuniculus). [manuscrito] / Kamilla Dias Ferreira. - 2017.
xvi, 68 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloisio ScallaVulcani; co-orientador Luiz Antônio Franco da Silva; co-orientador Eugênio Gonçalves de Araújo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2017.
Bibliografia. Anexos.
Inclui lista de figuras.

1. Biomateriais. 2. Cartilagem elástica . 3. Coelhos. 4. Termografia por Infravermelho. 5. Tratamento alcalino. I. Aloisio ScallaVulcani, Valcinir, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA NÚMERO **464** DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às **14h00min** do dia **06/03/2017**, reuniu-se na sala de defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de Mestrado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Kamilla Dias Ferreira,** intitulada: "***Avaliação termográfica de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina e implantadas na parede abdominal de coelhos (Oryctolagus cuniculus)*** ", apresentado para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de Concentração: **Patologia, Clínica e Cirurgia Animal,** desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Kamilla Dias Ferreira** para exposição em **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani (Orientador (a) Aprovada

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno Aprovada

Dr. Apóstolo Ferreira Martins Aprovada

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Kamilla Dias Ferreira,** habilitada **[(Habilitado(a) ou não Habilitado(a)]** pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

_____

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

Cartilagem auricular de bovinos tratada com solução alcalina: avaliação histológica pré-implantação e termográfica pós-implantação na parede abdominal de coelhos.

Nada mais havendo a tratar, eu **Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani** lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani

Prof. Dr. Adilson Donizeti Damasceno

Dr. Apóstolo Ferreira Martins

Dedico esse trabalho a meus pais **Ana** e **Nelson**,
e as minhas irmãs **Bruna** e **Renata**,
que sempre me motivaram para seguir adiante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas conquistas diárias que me foram concebidas até o presente momento e por colocar pessoas em meu caminho, que de algum modo, me inspiraram e me motivaram para eu chegar até aqui.

Agradeço a meus pais e as minhas queridas irmãs que são meus alicerces...minha vida!!Com o incentivo de vocês, o amor incondicional pelos animais ultrapassou os limites dos muros de casa. Obrigada por acreditarem em mim, em todos os momentos... em tudo!!

Aos amigos, que sempre permanecem presentes mesmo com a minha constante ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani, pelo tempo dedicado em suas orientações, auxiliando sempre no que foi necessário. Mesmo estando um pouco distante, isso não foi empecilho para que realizássemos um bom trabalho. Obrigada pela oportunidade que me foi ofertada por trabalhar com biomateriais, e por ampliar meus conhecimentos sobre essa área tão fascinante! Uma nova etapa nos aguarda em breve!!

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Eugenio Gonçalves de Araújo, obrigada pelos ensinamentos e auxílios prestados; e Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva, que desde os tempos da graduação sempre foi um professor disposto a nos direcionar profissionalmente, se tornando um grande amigo que me impulsiona e acredita no potencial que muitas vezes não consigo enxergar. Entretanto, sabiamente, com sua experiência e paciência, busca sempre a melhor maneira para que eu enxergue esse potencial para eu poder “voar longe”, como sempre diz. Espero, de fato, “voar longe”, e que isso, de alguma maneira, seja uma forma de demonstrar que toda a confiança que um dia creditou em mim, deu certo. Obrigada... sou grata por tudo!!!

Aos amigos da pós- graduação que estão percorrendo caminho semelhante e fizeram desta caminhada menos árdua, Paula Ariza, Jéssica Fernanda, Nara Cristina, Gladston Filho, Damila Caetano e Ana Carolina Veríssimo... obrigada!!

A equipe que auxiliou em toda a fase experimental, não importando se era domingo ou feriado estávamos trabalhando no Hospital Veterinário, Yan Rodrigues, Amanda Ferreira, Lucas Andrade, Daniella Gomes, Heitor Andrade, João Felipe Freire, Matheus Furtado, Ana Paula Vinhal, Yasmin Panzini, Adalberto Vilela, Wanessa Rodrigues, Vinícius Menezes, Daianny Freitas, Leydianne Candeiras, Ricardo Paim, Jannaine Hilbig, Rogério Vieira e em especial Saulo Humberto de Ávila Filho, obrigada por todo auxilio prestado na jornada diária com os animais no biotério.

Agradecimento especial à dona Vilda Maria que com sua competência infinita não nos deixou faltar, em nenhum momento, material necessário para realização dos procedimentos

cirúrgicos. E que sempre bastante solícita forneceu o “combustível”, com os seus almoços, para que nossa equipe trabalhasse por horas seguidas.

Agradecimentos à equipe do Hospital Veterinário pelo auxilio sempre que necessário. Agradecimentos especiais ao diretor Prof. Dr Paulo Henrique Jorge da Cunha e Dr. Apóstolo Ferreira Martins, por disponibilizarem o aparelho termográfico, aquisição do Hospital, nos permitindo a realização de parte desse estudo com o seu uso.

À Escola de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que permitiram a realização deste trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de fomento e auxílio financeiro ao projeto. À empresa Guabi (Anápolis – GO), por fornecer os insumos.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, USP, por terem auxiliado nesta pesquisa.

Aos animais que possibilitaram nosso crescimento profissional e pessoal.

“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória
é o desejo de vencer”
Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS 1

1.INTRODUÇÃO 3

2.CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE BIOMATERIAIS 3

2.1 Biomateriais poliméricos sintéticos 4

2.2.1 Tela de polipropileno 5

2. 2 Biomateriais naturais 6

2.2.1 O colágeno e a elastina no reparo tecidual 7

3. OBTENÇÃO DE BIOMATERIAIS A PARTIR DE TECIDOS ANIMAIS 9

3.2 Métodos de descelularização 10

3.2.1 O tratamento alcalino em biomateriais 12

4. TERMOGRAFIA POR INFRAVERMELHO COMO MÉTODO AUXILIAR DE DIAGNÓSTICO 10

4.1 O aparelho termográfico 11

4.2 Histórico da termografia 12

4.3 Principais aplicações 12

4.4 Ambientação térmica de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) 13

CAPÍTULO 2 – DESCELULARIZAÇÃO DE CARTILAGENS ELÁSTICAS EM SOLUÇÃO ALCALINA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL

RESUMO 1

ABSTRACT 2

INTRODUÇÃO 2

MATERIAL E MÉTODOS 5

RESULTADOS 7

DISCUSSÃO 10

CONCLUSÕES 14

REFERENCIAS 14

CAPÍTULO 3- EXAME TERMOGRÁFICO NA AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CUTANEA DE COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) APÓS IMPLANTES DE CARTILAGEM ELASTICA TRATADA EM SOLUÇÃO ALCALINA E TELA DE POLIPROPILENO

RESUMO 1

ABSTRACT 1

INTRODUÇÃO 2

MATERIAL E MÉTODOS 4

RESULTADOS 7

DISCUSSÃO 9

CONCLUSÕES 12

REFERENCIAS 12

CAPÍTULO 4- CONSIDERAÇÕES FINAIS 15

ANEXOS 16

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1: Cartilagem elástica de bovino após tratamento alcalino para ser implantada como biomaterial. Nota-se em (A), cartilagem remodelada nas dimensões desejadas para ser implantada em tecido subcutâneo de coelhos. Em (B) catilagem sendo implantada em tecido subcutâneo de coelhos.....12

FIGURA 2: Imagem temográfica da aferição de temperatura cutânea de coelhos. Em (A), aferição antes da implantação da cartilagem elástica. Nota-se presença de pêlos que demonstram imagem com cores mais quentes da escala de cores. Em (B) aferição após a implantação da cartilagem; nota-se ausência de pelos, demonstrando cores mais frias detectadas da escala de cores.....13

CAPÍTULO 2

FIGURA 1: Em A e B, cartilagem elástica de orelha de bovino adulto em coloração por Tricrômico de Mallory e aumentos de 100X e 400X, respectivamente. Observa-se em A, a presença de condrócitos (setas claras) e da matriz extracelular (setas escuras). Em B, observa-se, em maior detalhe, a presença dos condrócitos, com núcleos basofílicos e de coloração escura (setas claras), e com as membranas celulares parcialmente retraídas, afastadas das cápsulas pericelulares, revelando suas lacunas (seta escura). Nota-se, ainda, a presença das fibras elásticas ao redor dos condrócitos e na matriz interterritorial, distribuídas em todas as direções, de forma aleatória (cabeças de seta). Em C e D, cartilagem elástica de orelha de bovino adulto tratada em solução alcalina por 72 horas. Em C observa-se a presença das fibras de colágeno eosinofílicas, com coloração rosada (setas claras), mais espessas que as fibras elásticas acidofílicas (setas escuras). Nota-se, ainda, ausência de condrócitos e lacunas vazias (asteriscos). Coloração HE, aumento de 400X. Em D, nota-se a presença de fibras de colágeno, mais espessas e dispostas em todas as direções (setas claras) e o arranjo das fibras elásticas ao redor das lacunas, compondo uma trama, semelhante à colmeias (setas escuras). Observa-se também, ausência de condrócitos e lacunas vazias (asteriscos). Coloração Verhoeff, aumento de 400X.....9

CAPÍTULO 3

FIGURA 1: Imagem temográfica da aferição de temperatura cutânea de coelhos. Em (A), aferição antes da implantação dos biomateriais. Nota-se presença de pêlos que demonstram imagem com tons mais quentes da escala de cores. Em (B) aferição após a implantação da cartilagem; nota-se ausência de pêlos, demonstrando cores mais frias detectadas da escala de cores.....5

FIGURA 2: Cartilagem elástica de bovino após tratamento alcalino para ser implantada como biomaterial. Nota-se em (A), cartilagem remodelada nas dimensões desejadas para

ser implantada em tecido subcutâneo de coelhos. Em (B) cartilagem sendo implantada em tecido subcutâneo de coelhos.....6

FIGURA 3: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de sete dias antes (linha azul) e após a implantação da tela de polipropileno (linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.....8

FIGURA 4: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de 35 dias antes (linha azul) e após a implantação da tela de polipropileno (linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.....9

FIGURA 5: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de sete dias antes (linha azul) e após a implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina(linha vermelha).As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.....9

FIGURA 6: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de 35 dias antes (linha azul) e após a implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina(linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.....10

FIGURA 7: Médias comparativas da temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de sete e 35 dias. Grupo tela apresentando aumento significativo de temperatura (linha azul), quando comparado ao grupo cartilagem (linha cinza).....10

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a viabilidade do processamento de descelularização em tecido cartilaginoso bovino por meio de análises histológicas. Pra tanto, foram utilizadas 20 cartilagens elásticas de bovinos, submetidas à imersão em solução alcalina por 72 horas, seguidos de lavagens, congelamento e liofilização do material. Em seguida foi realizado o processamento histológico para serem feitas as analises. Nas analises histológicas foi observado a descelularização e retirada da substancia amorfa do tecido, porém manteve a estrutura das fibras elásticas e de colágeno. Concluiu-se que o tratamento alcalino foi eficiente
para obtenção de biomaterial a partir de tecido cartilaginoso elástico. Este estudo avaliou também, através do exame termográfico, a viabilidade no uso de implantes com biomateriais obtidos de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina. Foram observados através da variação da temperatura cutânea, a intensidade do processo inflamatório comparando antes e após a implantação dos biomateriais em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Para tanto foram avaliados um total de 24 coelhos, divididos em dois grupos, de 12 animais, de acordo com o biomaterial implantado. Foram realizadas avaliações no período pré-operatório e após o implante dos biomateriais. No grupo (GI) foi implantada a tela de polipropileno e (GII) a cartilagem elástica tratada em solução alcalina, avaliados nos períodos de sete e 35 dias. Dos resultados obtidos, após realização de testes estatísticos, o grupo (GI), obteve temperaturas cutâneas abdominais superiores, comparadas ao grupo cartilagem, fornecendo, subsídios de que a utilização da cartilagem elástica tratada em solução alcalina, promoveu menor intensidade inflamatória devido ao processamento ao qual foi submetida.

Palavras- Chave: Biomateriais, cartilagem elástica, cirurgia, coelhos, tratamento alcalino, termografia

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the viability of the decellularization process in bovine cartilaginous tissue by histological analysis. For this purpose, 20 bovine elastic cartilages were used, immersed in alkaline solution for 72 hours, followed by washing, freezing and lyophilization of this material. Histological processing was then performed to the analyzes. In the histological analyzes with decellularization process was observed that amorphous substance was removed from the tissue, however the structure of elastic fibers and collagen remained. It was concluded that the alkaline treatment was efficient to obtain biomaterial from elastic cartilaginous tissue. This study also evaluated, through thermographic examination, the feasibility of using implants with biomaterials obtained from elastic cartilages treated in alkaline solution. The intensity of the inflammatory process was observed through the variation of cutaneous temperature comparing before and after the implantation of the biomaterials in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). A total of 24 rabbits were evaluated, divided into two groups, of 12 animals each, according to the implanted biomaterial. Evaluations were performed in the preoperative period and after the implantation of biomaterials. In the (GI) group, polypropylene mesh and elastic cartilage (GII) evaluated in the periods of seven and 35 days. From the results obtained, after performing statistical tests, the group (GI) polypropylene mesh, obtained upper abdominal skin temperatures, compared to the cartilage group, providing subsidies that the use of elastic cartilage treated in alkaline solution, promoted lower inflammatory intensity due to the processing to which it was submitted.

Keywords: Biomaterials, elastic cartilage, surgery, rabbits, alkaline treatment, thermography

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Com o avanço das técnicas de correção cirúrgica de defeitos da parede abdominal, busca-se a utilização de biomateriais que promovam a reparação tecidual com o mínimo de resposta inflamatória[1]. O uso mais frequente de membranas derivadas de tecidos animais deve-se, principalmente, à facilidade em sua obtenção, do preparo e esterilização viáveis e ao fato de ocorrer pouca reação tecidual[2]. Embora existam diversos estudos em que foram utilizados biomaterias à base de colágeno[3, 4], ainda são poucos os que elucidaram determinadas propriedades inerentes a cartilagens elásticas, em particular as que são tratadas em solução alcalina, para o uso em implantes[3].

As cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina são submetidas a um processamento diferenciado que modifica a estrutura do material[5]. Trata-se de um processo de descelularização, que consiste na remoção de células, favorecendo a redução de substâncias antigênicas, e consequentemente efetivando a biocompatibilidade do material a ser implantado[6]. O processo de descelularização em solução alcalina não é considerado como um meio de conservação de biomembranas, aos quais os mais comumente utilizados são a glicerina a 98% e a solução de glutaraldeído[6]. O diferencial nesse processo está nas modificações físico-químicas promovidas nos tecidos e pela remoção celular, ao passo que os meios de conservação preservam estruturas celulares e consequentemente, proteínas de membrana que podem atuar como antígenos e provocando reações no organismo receptor[5].

Diante disso, há a necessidade de pesquisas que busquem descrever as propriedades relacionadas à cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina e empregadas como implantes, para compreender as modificações estruturais dos condrócitos e da matriz extracelular. Para este fim, é possível empregar diversas abordagens e técnicas histológicas e ensaios, os quais possuem alta especificidade na tipificação do colágeno presente na cartilagem, com a utilização de marcadores [4,5]. Entretanto, é preciso buscar alternativas avançadas que possam demonstrar não somente as modificações estruturais auferidas ao material tratado, mas os benefícios exercidos pelo tratamento alcalino sobre as cartilagens elásticas que possam ser acompanhados por meio de avaliações clínicas.

A termografia por infravermelho, pode ser pode ser uma alternativa na avaliação da eficiência do uso desse biomaterial[7]. Como o método tem sido usado na identificação de

modificações na temperatura cutânea, acredita-se que poderia auxiliar na detecção de variações no local do implante do material.

A cartilagem elástica assim como outros tecidos animais, tem como característica restritiva a estimulação do processo inflamatório no local a ser implantado, principalmente quando se trata de implantes heterólogos, ou seja, oriundo de outra espécie. No entanto, por se tratar de um material a base de elastina e colágeno, a intensidade da reação inflamatória promovida pela implantação desse material no sítio receptor é menos exacerbada, quando comparado a implantes de material sintético. A variação do grau de resposta inflamatória pode ser observada confrontando as alterações macroscópicas com a temperatura local[2,3].

Esse parâmetro pode ser aferido, diariamente, empregando o aparelho termográfico, que representa através de escala de cores o padrão característico para determinada variação da temperatura cutânea. Argumenta-se que, para complementar as pesquisas referentes às alterações macroscópicas decorrentes da implantação de membranas biológicas os exames microscópicos associados à termografia complementam a avaliação clínica. Logo, pela acurácia do exame, imagina-se que possa ser popularizado na clínica cirúrgica experimental, dos pequenos e dos grandes animais.

Acredita-se que o emprego de cartilagens elásticas em estudos experimentais representa uma inovação nos métodos auxiliares de substituição de tecidos por outros materiais. Um destes materiais seria a cartilagem elástica da orelha externa de bovinos, submetida ao tratamento alcalino [2,3,5]. Portanto, como se trata de um biomaterial de baixo custo e fácil obtenção, que pode ser empregado em alterações clínicas e cirúrgicas dos animais, e com potencial para aplicações em seres humanos, acredita-se que a realização de pesquisas com esse material seja plenamente justificável.

Considerando a relevante importância do uso dos biomateriais, e das alterações nos tecidos biológicos após sua implantação, elaborou-se esse estudo tendo como material a cartilagem elástica de origem bovina tratada em solução alcalina. Como objetivos específicos e para dar suporte aos dois artigos aqui apresentados, foi realizado uma revisão bibliográfica fazendo uma avaliação geral dos implantes biológicos e sintéticos, caracterizando os métodos de descelularização e, abrangendo mais especificamente um desses métodos, com o uso da solução alcalina. Além disso, compilou-se informação acerca do uso da termografia por infravermelho como método auxiliar de diagnóstico e sobre o comportamento térmico de coelhos quando utilizados como modelo experimental.

Deste modo, esta revisão corresponde ao primeiro capítulo dessa dissertação; o tratamento alcalino de cartilagem elástica e as alterações teciduais ao segundo e, o estudo

comparativo por meio de avaliações termográficas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus)* realizadas após implantação de cartilagem auricular tratada em solução alcalina e tela de polipropileno ao terceiro. Devido ao polipropileno ser o material sintético amplamente empregado nos procedimentos de reconstituição tecidual, este biomaterial foi considerado como material de controle e referência para verificar o desempenho da cartilagem elástica de orelha de bovino tratada em solução alcalina. Por último, as considerações finais serão feitas no quarto capitulo.

2. Considerações gerais sobre biomateriais

Diferentes espécies de animais apresentam defeitos na parede abdominal, necessitando de procedimentos cirúrgicos reconstrutivos, como a colocação de implantes, no intuito de reestruturar os planos anatômicos[3], além de estimular o processo de cicatrização e regeneração tecidual[2]. Dentre os materiais utilizados nesses procedimentos se encontram as membranas derivadas de tecidos animais, que possuem como principal constituinte o colágeno e a elastina[4]. Os biomateriais vêm sendo amplamente utilizados na medicina e odontologia em próteses ortopédicas e dentárias[2], e mais recentemente na medicina veterinária, com o uso de biopróteses em cirurgias reparadoras. Isso tem se tornado prática comum, especialmente em função da facilidade de obtenção e menor possibilidade da ocorrência de complicações como a rejeição[3, 4].

Um biomaterial pode ser definido como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, que são utilizados para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos e órgãos[1, 3, 4]. Dentre os biomateriais mais utilizados se destacam os materiais implantáveis, caracterizados pelas placas, substitutos ósseos, telas e válvulas cardíacas[1, 8]. Acrescente-se ainda os dispositivos para a liberação de medicamentos sob o formato de implantes subdérmicos e os órgãos artificiais, que ainda estão mais restritos a área humana[8]. Este materiais podem ser classificados em sintéticos, incluindo os metais, cerâmicas, polímeros sintéticos e materiais compósitos e naturais, incluindo os biopolímeros como colágeno, seda, queratina, polissacarídeos e tecidos naturais [1, 2, 5,8].

Com o propósito de aperfeiçoar a interação entre materiais e tecidos, busca-se, por meio de pesquisas, minimizar o processo inflamatório no local do implante, através de associações entre materiais sintéticos e naturais ou até mesmo com células[2, 8]. A reação ao biomaterial dependerá de características, como a composição química, porosidade, tamanho, forma, carga elétrica e energia livre de superfície e também do tamanho e tipo de lesão criada

para a implantação deste [2,9]. Há de se considerar que, por menor que seja a antigenicidade do material implantado, sempre ocorre o desencadeamento do processo inflamatório, associado à formação de tecido cicatricial ou de baixa intensidade [9].

A resposta ao implante envolve, além dos eventos de reparo desencadeados pelo trauma cirúrgico, uma resposta tecidual ao material implantado[9]. A resposta específica ao material frequentemente compreende uma inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho e sobrepõe aquela produzida pelo trauma[9, 10]. Além da reação inflamatória, outras complicações, como a rejeição, são decorrentes do processo de implantação, devido a alterações nas propriedades biomecânicas do implante ou o emprego de técnica cirúrgica imprópria na colocação do biomaterial, podendo justificar o insucesso da intervenção[10]. Integrando técnicas diferenciadas, advindas da engenharia química e mecânica, têm-se empregado estratégias na confecção de biomembranas para serem utilizadas no reparo tecidual, que proporcione, ao mesmo tempo, maior resistência, menor resposta ao processo inflamatório e menores chances de rejeição [5, 9,10].

2.1 Biomateriais poliméricos sintéticos

Dentre os principais biomateriais destacam-se os polímeros[8], que são utilizados com frequência em cirurgias reconstrutivas em humanos, assim como em animais, para o reparo de estruturas que não se enquadram nos padrões estruturais anatômicos[11]. Dos materiais poliméricos sintéticos utilizados no reparo tecidual se destacam as telas, que apresentam diferentes materiais, gramaturas, tamanhos e espessuras[12]. As telas cirúrgicas sintéticas diferem entre si pelo polímero empregado, assim como pela densidade, elasticidade e espessura de suas fibras, garantindo que o comportamento mecânico e a resposta inflamatória estejam de acordo com o material implantado[11, 13].

As primeiras telas confeccionadas foram as de poliamida, para o reparo de defeitos da parede abdominal[14]. Porém, devido ao material sofrer degradação hidrolítica, apresentava facilidade de perda da força tensil, após ser implantado[10, 15]. Após o constante insucesso com o uso das telas de poliamida surge, em 1954, o polipropileno, material sintético mais aprimorado, com maior eficácia ao ser utilizado, inicialmente, em cirurgias de reparo de defeitos herniários[16]. Atualmente é um dos materiais sintéticos mais utilizados em diversos tipos de correções cirúrgicas, em especial nas cirurgias reconstrutivas[10, 17]. Outros fatores também influenciam na resposta biológica aos materiais sintéticos utilizados em próteses. Dentre esses fatores se inserem a resposta específica e individual de cada organismo, o local

de implantação da prótese, a manobra cirúrgica realizada, bem como a habilidade do cirurgião, conferindo, deste modo, menor injúria tecidual, maior precisão e ausência de contaminação durante o ato cirúrgico[11, 13,15].

As telas utilizadas em cirurgias são compostas por material mono ou multifilamentado e podem adotar diversos formatos como o entrelaçado, tricotado, ou colado[13, 16]. O uso de telas para promover o reparo tecidual, em especial na parede abdominal, consiste no fato de ser utilizada para reforço da estrutura anatômica devido à formação de um tecido cicatricial, mas que pode desencadear, também, reação fibrótica exacerbada, causando dor e desconforto ao paciente[10, 14, 16]. As propriedades inerentes as telas, baseiam-se em características como resistência à tração, tamanho do poro, gramatura do material, biocompatibilidade, elasticidade, constituição das fibras e deformação[10,12]. A grande quantidade de telas sintéticas, utilizadas em procedimentos cirúrgicos demonstra que ainda não existe o material sintético de biocompatibilidade ideal, devido à resposta inflamatória causada após o uso dos mesmos[10, 18].

Dentre as principais complicações advindas da utilização de telas em implantes, independente do material de origem, são as fístulas, as aderências, rejeição tecidual, infecções e deslocamento da prótese [10, 13, 16]. De um modo geral, para ser considerado adequado, e ocasionar o mínimo de resposta tecidual, os materiais ideais devem resistir às exigências mecânicas, não estimular resposta inflamatória persistente, não ser carcinogênico e não alergênico, ser de fácil manuseio e esterilização e de baixo custo[2, 8, 10, 18].

2.2.1 Tela de polipropileno

Dentre os principais polímeros utilizados na confecção das telas cirúrgicas se destaca o polipropileno [15]. As telas de polipropileno são polímeros sintéticos hidrofóbicos, eletrostaticamente neutros, flexíveis, de fácil moldagem, resistente à infecções e é rapidamente integrado pelos tecidos adjacentes[11,15]. São utilizadas com grande frequência na rotina cirúrgica veterinária, em diversas espécies de animais, no intuito de corrigir defeitos anatômicos. A maior frequência na sua utilização é na correção de defeitos na parede abdominal, em especial na correção de defeitos herniarios[11]. A escolha pelo uso de telas sintéticas compostas por polipropileno, para a correção desses defeitos, se deve ao fato desse material produzir um considerável reforço mecânico para a parede abdominal que sofreu uma injúria tecidual, proporcionando um crescimento mais acelerado de tecido conjuntivo[12,19].

Entretanto uma das limitações ao uso das telas de polipropileno é devido à intensa reação inflamatória promovida, que se inicia logo após ser implantada. A reação desencadeada, muitas vezes se torna exacerbada, ocasionando a formação de aderências e fístulas em vísceras adjacentes, fibrose, desconforto e dor no local do implante [15, 20]. Mas de maneira geral, as telas, até o presente momento são utilizadas no reparo de diversos tecidos, em especial devido a grande resistência do material a reforçar ou até mesmo substituir estruturas danificadas. Entretanto com os efeitos promovidos após a implantação desses materiais sintéticos buscou-se a associação das telas de polipropileno a outros biomateriais naturais, como a quitosana, para minimizar tais efeitos[13]. Assim, passou-se a investigar com maior profundidade através de pesquisas a interação entre o biomaterial natural e os componentes teciduais, visando aprimorar a biocompatibilidade dos materiais minimizando as repostas teciduais envolvidas com o uso de implantes[13, 18].

2.2 Biomateriais naturais

Os implantes biológicos são materiais de origem orgânica, constituídos principalmente por colágeno e elastina[4]. As principais utilizações desses biomateriais são em cirurgias reconstrutivas [3,5], crescimento e diferenciação celular [5, 19, 20]. De modo geral, os materiais naturais, apresentam baixa toxicidade e menor reação tecidual por serem constituídas, em quase sua totalidade, por material de origem organica[4]. Dentre estes tecidos animais estudados, a cartilagem elástica já foi descrita em diversas aplicações como na reparação traqueal em cães[21] e na hernioplastia em coelhos[22]. Ao analisar, independente da espécie, materiais biológicos em comparação aos sintéticos, estudos demonstram resultados mais promissores, e com menores intercorrências pós-operatórias, com o uso de materiais biológicos em relação aos sintéticos[17, 21].

Os polímeros naturais que formam a matriz extracelular interagem com receptores específicos na superfície celular, participando ativamente dos processos que regulam a expressão fenotípica da célula e sua remodelagem[5] .Desta forma, o biomaterial deixa de ser apenas uma estrutura suporte para exercer sua bioatividade, que consiste em provocar uma resposta biológica específica[9, 18]. Em estudo comparativo em ratos, em que foram implantados no primeiro grupo biomateriais naturais a base de colágeno derivados de suínos e no segundo grupo biomateriais sintéticos, representado pela tela de polipropileno, verificou-seque as próteses de polipropileno apresentaram resposta inflamatória exacerbada em relação aos implantes de biomateriais naturais[23]. Além disso, o custo é mais elevado na produção de

materiais sintéticos, em relação aos naturais, ao qual dependendo da espécie a ser utilizada, inviabiliza a execução do procedimento[6].

2.2.1. Colágeno e a elastina no reparo tecidual

O colágeno é uma glicoproteína da matriz extracelular, sintetizado a partir dos fibroblastos e está presente nas fases proliferativa e de remodelação da ferida[4, 9]. Possui alto peso molecular, sendo composto principalmente pelos aminoácidos glicina, prolina, hidroxiprolina, que se organizam em três cadeias de polipeptídios em configuração helicoidal. A sequência dos aminoácidos muitas vezes segue o padrão Gly-Pro-X ou Hyp- Gly-X, onde X pode ser qualquer um dos vários outros resíduos de aminoácidos[15].

As propriedades do colágeno se diferem de acordo com o tipo de organização das fibras que o constitui. As fibras colágenas são constituídas por uma presença proteína formada pela polimerização do procolágeno, que no espaço extracelular transforma-se em tropocolágeno[4, 5, 24]. Cada molécula de tropocolágeno é composta por três subunidades ligadas por pontes de hidrogênio. A polimerização da molécula de tropocolágeno forma uma estrutura chamada fibrila colágena, visível apenas ao microscópio eletrônico[4, 24].

Dentre os tipos de colágeno existentes, o do tipo I é o mais abundante e capaz de formar fibras espessas que conferem resistência aos tecidos. O do tipo III é encontrado em tecidos moles como derme, fáscia e tecido degranulação[5, 24]. Durante o processo de cicatrização os tipos de colágeno de maior relevância são os do tipo I e III [9]. O colágeno tipo III aparece primariamente na ferida, sendo caracterizado como colágeno jovem ou imaturo e confere aspecto desorganizado às fibras[4, 9]. Já o colágeno tipo I, maduro, substitui o tipo III em cicatrizes antigas e se caracteriza pela maior organização de suas fibras[9, 24].

A utilização do colágeno como biomaterial aumentou consideravelmente nas mais diversas aplicações, com a introdução de novos processos para a sua obtenção [3,5,19,25] associadas às novas potencialidades de aplicação nas formas de membranas, esponjas, soluções injetáveis, que variam de acordo com a aplicação desejada[2,8]. Pelo fato de organizar-se estruturalmente com propriedades similares das encontradas nos tecidos, esse polímero acaba sendo aplicado quando o objetivo é reparo ou remodelamento de diferentes tecidos, como pele, cartilagem e ossos[7, 23]. Na maioria dos casos, o colágeno é utilizado na sua forma de origem, porém sua estrutura permite que ocorra modificações químicas, gerando materiais com diferentes propriedades[3, 4]. Essa característica das matrizes colagênicas surge como alternativa para aprimorar ou mesmo modificar propriedades naturais do colágeno, sejam elas

mecânicas ou fisíco-químicas, atendendo as necessidades específicas na área de biomateriais[5,19].

A elastina é uma proteína da matriz extracelular com propriedades elásticas. É composta principalmente de resíduos de aminoácidos como glicina, alanina e valina. Na sua composição também podem ser encontrados os aminoácidos prolina, lisina e hidroxiprolina[5,19,20]. As suas fibras são formadas como uma rede tridimensional de polipeptídios, de conformação irregular. Devido à presença de cadeias de lisina, ocorre a formação de ligações cruzadas de desmosina ou isodesmosina. Essa ligação cruzada resulta na distensão característica das fibras de elastina, que mesmo quando aplicado força de estiramento podem-se distender várias vezes o seu comprimento normal, retornando à sua forma original quando ocorre a suspensão da força [4, 19,21,24].

A elastina, presente na cartilagem auricular, também é utilizada como biomaterial [3, 4,21]. É uma importante proteína da matriz extracelular que promove elasticidade a vários órgãos. Uma característica que favorece a utilização da elastina é o fato de que as sequências de suas cadeias moleculares se mantêm inalteradas[3], portanto, se associadas aos processos de descelularização, estes acabam excluindo efeitos deletérios do procedimento de enxertia, acionando a cascata de eventos biológicos adequada para a reparação tecidual, tornando o biomaterial mais biocompatível[19].

3. Obtenção de biomateriais a partir de tecidos animais

Em estudos realizados na busca de processos que proporcionem redução da antigenicidade e da possibilidade de rejeição, decorrentes dos implantes de biomateriais, obteve-se o processo de descelularização. Esse processo consiste na remoção celular do tecido, resultando em uma matriz acelular e inerte imunologicamente, minimizando efeitos adversos na composição, atividade biológica e integridade mecânica na matriz extracelular remanescente, favorecendo a redução da antigenicidade[19,27].

Essa matriz modificada fica apta de ser repovoada *in vitro* por células processadas ou *in vivo* por células do hospedeiro, sendo que nessa matriz ocorrerá a adesão, proliferação e diferenciação celular, que são determinantes ao processo reparativo[19, 28,30].

No momento que ocorre a troca celular, por meio da irrigação e drenagem sanguínea, inicia-se o reconhecimento celular do enxerto através dos linfócitos T e do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) do receptor. Esse mecanismo resulta na ativação do sistema imune[29]. Qualquer tecido implantado que não for autógeno, ou seja, o

doador é o próprio receptor, induz a resposta imune, seja através de uma via direita ou indireta[28].

A via direta é caracterizada pela rejeição imediata aos implantes alógenos, de doadores da mesma espécie, ou xenógenos, de doadores de espécies diferentes a do receptor. Através dessa via, os linfócitos T do doador são ativados e inicia-se o processo de rejeição imunológica, com ativação dos mecanismos celulares inflamatórias e, consequentemente, a degradação do enxerto. Já a via indireta, o processo de rejeição ocorre mais lentamente, quando as células apresentadoras de antígenos do receptor, representadas pelos macrófagos, migram em direção ao enxerto, captam os antígenos do doador e, posteriormente, ativam os linfócitos T do receptor [29].

É válido ressaltar que para promover descelularização apropriada é necessária a combinação de tratamentos químicos e enzimáticos ao tratamento físico, que isoladamente não possui resposta eficaz[30]. Outro ponto a ser ressaltado é que a eficácia do enxerto somente ocorrerá se houver descelularização bem sucedida, ou seja, se houver completa remoção celular [28,30]. Caso isso não ocorra, observa-se a reação imunomediada exacerbada, pela rejeição por parte do hospedeiro, não obtendo, desta forma, a finalidade esperada com esse tipo de modalidade de implante.

3.2 Métodos de descelularização

Para promover o processo de descelularização, são realizados tratamentos com agentes físicos, químicos e enzimáticos. Na maioria das vezes, o tratamento físico é ineficaz não ocorrendo a remoção celular, sendo necessário associação entre os tratamentos químico ou enzimático, ou ambos simultaneamente[28, 29]. Com relação aos mecanismos físicos, utiliza-se o processo de sonicação, que consiste no uso de ondas sonoras causando vibrações e consequentemente geração de tensões mecânicas no fluido, causando a ruptura celular permitindo, deste modo, a interação com outros agentes. Além do processo de sonicação, realiza-se também os processos de congelamento e descongelamento das amostras, que promovem o rompimento da membrana plasmática devido à formação intracelular de cristais de gelo[19, 31].

Existem duas formas de congelamento, que são o lento e o rápido. O congelamento rápido forma pequenos cristais de gelo que não causam lesões teciduais significativas, podendo preservar um número maior de células, já no congelamento lento existe a tentativa de proteção celular por meio de adequação osmótica, culminando em

agrupamento das moléculas de água e formação de grandes cristais de gelo. Esses grandes cristais de gelo lesionam com maior intensidade as membranas celulares. Todavia, se o descongelamento for feito de forma rápida ocasionará a lesão celular devido à modificação instantânea do potencial osmótico celular, acarretando em lise celular [31].

Com relação aos meios químicos utilizam-se principalmente detergentes iônicos e não iônico. Os detergentes iônicos atuam solubilizando as membranas celulares e nucleares. Já os detergentes não iônicos, causam a ruptura de ligações entre lipídeos e de lipídeos com proteínas, de modo que as ligações entre proteínas permanecem intactas. Utilizam-se também os detergentes Zwitteriônicos que atuam assemelhando-se tanto aos detergentes iônicos quanto aos não iônicos[19, 20, 30]. Outros métodos também são utilizados, com o uso de soluções hipotônicas e hipertônicas, que ocasionam um choque osmótico nas células resultando na ruptura das mesmas. Há o uso de agentes quelantes de íons, como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra- acético) e EGTA (ácido tetra-acético etileno- glicol), que ao se ligarem a cátions divalentes, Ca^{2+}, Mg^{2+}, invibializam a sua função [19,20]. São essenciais para a adesão celular à estrutura da matriz extracelular e, dessa maneira, interferem com essa união. Já os agentes enzimáticos podem figurar como mecanismos proteolíticos, além de serem utilizados na hidrólise e degradação de moléculas de DNA e RNA[30].

3.2.1 Tratamento alcalino em tecidos animais

O tratamento alcalino consiste na imersão das biomembranas em solução alcalinizada contendo cloretos e sulfatos de sódio, potássio e cálcio, sendo removidos os sais remanescentes em lavagens sucessivas, seguidas por processos de congelamento e liofilização[5,32,33]. Considerando que ao passarem pelo tratamento alcalino, tanto os materiais compostos por colágeno e pela elastina, como é o caso das cartilagens elásticas, sofrerão modificações em sua arquitetura com a remoção de células e hidrólise de grupos carboxiamidas do colágeno. No entanto, a estrutura tridimensional das fibras da matriz extracelular permanecem intactas, permitindo desta forma menor antigenicidade associada à bioatividade, tornando esses biomateriais apropriados para utilização como implantes[33].

Visando métodos de tratamentos para obtenção de biomembranas colagênicas, Goissis et al[32] utilizaram o tratamento alcalino em pericárdio bovino durante intervalos de 24,48 e 72 horas. O tratamento promoveu alterações na estrutura do colágeno, devido a remoção de células, contribuindo para a redução da antigenicidade tecidual. Isso ocorreu devido à hidrólise dos grupos carboxiamidas, presentes na molécula de colágeno. Em outro

estudo realizado, objetivou-se a obtenção de biomembranas de colágeno tratadas em solução alcalina comparando sua biocompatiblidade. Para tanto, foram utilizados centros tendinosos diafragmáticos de equinos conservados em solução alcalina por períodos de 24, 48, 72, 120 e 144 horas, seguidas de processo de liofilização e avaliação histopatológica. O estudo demonstrou que o tempo de tratamento por 72 horas foi o que proporcionou flexibilidade às amostras, facilitando a manipulação, demonstrando que apesar da flexibilidade observada após o tratamento alcalino, não houve perda da resistência[33].

4- Termografia por infravermelho como método auxiliar de diagnostico

4.1 Aparelho termográfico

O aparelho termográfico é constituído pelo termógrafo, um instrumento de captação da radiação infravermelha que posteriormente converte essa radiação em imagens térmicas com diferentes distribuições de temperatura, designadas de termogramas [34,35]. Os termogramas expressam, através do padrão de cores, a região em que ocorre a alteração térmica. As imagens emitidas aparecem em uma escala de cores multicolorida ou monocromática, de forma que, independente do padrão escolhido, o termograma realizará a mensuração térmica do local de escolha [36,37]. Na escala de cores, as definidas como mais quentes, são em tons de laranja, verde e vermelho representando temperatura mais alta em relação as cores mais frias, representadas pelos tons de azul e roxo.

Com relação ao posicionamento do aparelho termográfico, deve-se obedecer uma distância para a realização do exame. É apropriado observar a distância demarcada na primeira avaliação termográfica realizada, para que a mesma distancia se repita nas próximas avaliações, permitindo dessa forma uma padronização para repetir sempre a mesma distância nas avaliações seguintes[37]. Alterações relacionadas ao posicionamento e distância na obtenção de imagens capturadas pelo aparelho podem comprometer as avaliações conseguintes do paciente[38].

Além do posicionamento do aparelho, é necessário que se faça a preparação do paciente para evitar aferições inadequadas. O local do corpo do paciente que será avaliado deve estar seco, e sem a presença de pomadas ou géis de uso tópico, que interferem diretamente na temperatura local[39]. Se possível, realizar jejum de no mínimo três horas antes do procedimento e introduzir o paciente 15 minutos antes do procedimento para que o animal fique em repouso e a pele entre em equilíbrio térmico com a temperatura do local

ambiente[38,40].

4.2 Histórico da termografia

A termografia surgiu a partir de estudos realizados pelo médico e filósofo grego Hipócrates, ao observar as variações da temperatura existentes em diferentes partes do corpo humano[36, 37, 41]. A mensuração da temperatura consistia na manipulação do dorso das mãos em diferentes partes do corpo de seus pacientes. Utilizava também lama que era espalhada pelo corpo, de modo que no local em que a lama secava com maior rapidez concluía-se que havia aumento de temperatura e, consequentemente, onde se localizava a enfermidade[36].

Tempos depois, a mensuração da temperatura corpórea, era realizada com a utilização de tubos de vidro que se assemelhavam aos termômetros de mercúrio, que surgiram, anos depois, e que atualmente cederam lugar aos aparelhos em versão digital. Já a radiação infravermelha surgiu com a prática de experimentos ópticos realizados por William Herschel, por volta de 1800[40]. Com a utilização de um espectroscópio, foi descoberta a radiação térmica infravermelha emitida pelos raios solares e as diferentes faixas dos espectros que compõem a luz visível. Diferentes abordagens foram realizadas no decorrer de décadas, por outros estudiosos, aprimorando as descobertas feitas inicialmente por Herschel[37].

Após anos sem inovações realizadas na tecnologia de radiação infravermelha surge o emprego do sistema de visão noturna utilizado na Segunda Guerra Mundial, com uso restrito para fins militares. Na área médica, somente em 1970, foi introduzido câmeras que se assemelhavam ao mecanismo dos aparelhos termográficos atuais. Porem, essas câmeras tinham um consumo de energia e custo de produção dispendiosos, além do peso excessivo, dificultando o seu uso [36, 37]. A falta de treinamento e manuseio inadequado do equipamento acarretou em erros de interpretação e diagnósticos errôneos, de modo que o aparelho ficou em desuso, sendo reutilizado na década de1990. As inovações tecnológicas realizadas nesse período permitiram que os aparelhos termográficos passassem a captar, com qualidade, centenas de imagens por segundo, tornando-se um aparelho de grande sensibilidade à variação de temperaturas mínimas além da alta resolução[37, 41,42].

4.3 Principais aplicações

O exame termográfico foi utilizado, a priori, em humanos na área de oncologia, para o diagnostico de tumores mamários, em que eram detectados precocemente devido o

aumento da temperatura no local aferido pelo aparelho[42]. Já no âmbito da medicina veterinária, o uso do aparelho termográfico restringiu-se, inicialmente, a espécie equina, para a detecção precoce de lesões músculo-esqueléticas em cavalos atletas[41]. Com o passar dos anos, a utilização do aparelho termográfico foi sendo expandida para diferentes espécies e diversas aplicações, que variam da ortopedia, odontologia em animais de companhias e no bem estar- animal, nos animais de produção e experimentação[42,43].

Por se tratar de um exame de diagnóstico por imagem, deve ser considerado que durante a execução da técnica tanto a sensibilidade do aparelho como a presença de artefatos, podem prejudicar a captura de imagens e como consequência a análise dos dados obtidos, acarretando em diagnósticos inapropriados [37,42]. Compete ao profissional conhecimento ao manusear o aparelho de forma correta para obtenção dos resultados esperados [43]. Ao executar o procedimento de forma correta a termografia se apresenta como um exame auxiliar relevante, auxiliando o profissional em um diagnóstico mais preciso e precoce de enfermidades [37,38, 43].

4.4 Ambientação térmica de coelhos (O*ryctolagus cuniculus*)

Dentre os fatores relevantes a serem considerados no manejo de coelhos (O*ryctolagus cuniculus*) mantidos em ambientes fechados é o conforto térmico. É importante priorizar instalações que forneçam um ambiente favorável para esses animais[44]. Nos locais com ausência de boa iluminação ou ventilação, é necessário o uso de equipamentos de ar condicionado e exaustores, e manter luminosidade suficiente, obedecendo ao regime claro e escuro, por 12 horas para cada período. A temperatura do ambiente deve permanecer mais próxima da zona de conforto térmico para os animais alojados. A temperatura ideal deve se manter entre 15°C a 22°C, e umidade relativa do ar não ultrapassar 75%, para que o animal possa manter sua homeostase[45,46].A temperatura deve se manter entre 20°Ca 22°C, não ultrapassando a 30°C. Ressalta-se também que deve ser evitado trocas térmicas abruptas, o uso de lâmpadas fluorescentes e não permitir que entre radiação solar no local de realização do exame[47].

Esses cuidados se fazem necessários, pois essa espécie não consegue perder o calor corporal com facilidade, devido a ausência de glândulas sudoríparas. Outros fatores a serem considerados é a exposição a situações estressantes, como o manejo inadequado, principalmente quando há concentração elevada de animais em um mesmo ambiente, provocando desajustes fisiológicos desencadeando no desconforto térmico[48,49].

Em condições fisiológicas normais, os coelhos mantém sua temperatura em 38,5°C, e produzem calor mesmo estando em repouso, devido aos processos metabólicos de atividade de órgãos e músculos involuntários. A zona de conforto térmico varia conforme a idade e o estado fisiológico dos animais e pode ser considerada como a faixa de temperatura ambiente na qual o esforço termorregulatório é mínimo. Nesta faixa de temperatura não há sensação de frio ou calor, e o desempenho do animal é otimizado[48]. Quando os coelhos são expostos ao calor, utilizam mecanismos de resfriamento evaporativo, dependentes de um gradiente de umidade, ficando comprometido quando a umidade relativa do ar é muito elevada [39].

Cunninghan[50], (2004) afirmou que parte da energia absorvida é dissipada por evaporação quando as temperaturas se elevam, como para a produção de calor quando as temperaturas abaixam. O desconforto térmico em coelhos, não relacionados a fatores intrínsecos ao ambiente ou manejo, é perceptível em casos de anormalidades expressas por alguma enfermidade em que o animal seja acometido. O aumento de temperatura corpórea, nestes casos, não é transitório, permanecendo até que o processo seja controlado[38]. O uso do aparelho termográfico por infravermelho abrange as diversas situações em que há o incremento na temperatura corpórea em animais de experimentação. A sua utilização facilita o manejo desses animais nas aferições de temperatura por não haver o contato do aparelho com o corpo do animal, diferenciando-se dos termômetros que necessitam da introdução via retal[40,42]. Levando em consideração os fatores relacionados ao manejo e ambientação térmica, o coelho se apresenta como modelo experimental adequado para uma das propostas realizadas neste estudo, que foi avaliar a temperatura cutânea dos animais com utilização do aparelho termográfico, após implantação de biomateriais.

REFERÊNCIAS

1. Tabata, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. J. R. Soc. Interface, v.6, p.S311-324, 2009.

2. Oréfice RL, Pereira MM, Mansur MS. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006:538.

3.Vulcani, V.A.S.*;* Ms ,D.G.; Plepis, A.M.G; MartinS, V.C.A.; Lapena, M.H. Obtenção, caracterização e aplicação cirúrgica de matrizes de colágeno na parede abdominal de equinos. Ciênc. Anim. Bras., v. 9, p. 778-785.2008

4.Girardi, RCG. Comportamento de matrizes de colágeno utilizadas no tratamento de feridas planas induzidas em pele de rato. Dissertação. Universidade de São Carlos, São Paulo, 2005.

5.Goissis, G.; Piccirilli, L. ; Plepis, A. M. G. ; Das Gupta, D. K. . Preparation and characterization of anionic collagen:P(VDF-TrFE) composites. Polymer Engineering and Science, EUA, v. 39, n. 3, p. 474-482, 1999.

6.Rabelo, R.E.; Tavares, G.A; Paulo,n. M.; Silva, L.A.F.; Damasceno, A.D.; Andrade, M.A.; Martins, F.G.; Romani, A.F.; Silva, O.C.; Trindade, B.R. Características físicas e microbiológicas do centro tendíneo diafragmático bovino conservado em glicerina a 98% e no glutaraldeído a 4%. Ciência Animal Brasileira, v. 5, n. 4, p. 229-238, out./dez. 2004.

7.Arenhart R.. Análise termográfica e histológica de tenorrafias em coelhos pós-mobilização ativa precoce (MAP).Dissertação. Universidade do Estado de Santa Catarina.2010

8. Hench, L.; Polak, J. Third generation biomedical materials. Science, v.295, p.1014-1017, 2002.

9.Vasconcelos, A.C. Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais. In: Órefice, RL.; Pereira, MM.; Mansur, HS.; Biomateriais – Fundamentos e aplicações, 1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 279-280p

10.Bellón, J. M.; Contreras, L. A.; Buján, J.; Pascual, G. Evaluation of the acute scarring response to the implant of different types of biomaterial in the abdominal wall. Journal of Materials Science, v.11, p. 25 - 29, 2005.

11.Mazzini, D. L.; Mantovani, M. Reparo da parede abdominal com afastamento parcial das bordas da aponeurose utilizando sobreposição com telas de vicryl ou marlex em ratos. Acta Cirúrgica Brasileira, v. 14, n.1, 1999

12.Bringman, S.; Conze, J.; Cuccurullo, D.; Deprest, J.; Junge, K.;Klosterhalfen, B.; Parra-Davila, E.; Ramshaw, B.; Schumpelick, V.Hernia repair: the search for ideal meshes. Hernia, v. 14, n. 1, p. 81-87, 2010.

13.Bilsel, Y.; ABCI, I. The search for ideal hernia repair; mesh materials and types. Int J Surg, v. 10, n. 6, p. 317-321, 2012.

14. Coda, A.; Lamberti, R.; Martorana, S. Classification of prosthetics usedin hernia repair based on weight and biomaterial. Hernia, v. 16, n. 1, p. 9-20, 2012.

15.Huber, A.; Boruch, A. V.; Nieponice, A.; Jiang, H.; Medberry, C.;Badylak, S. F. Histopathologic host response to polypropylene-based surgical mesh materials in a rat abdominal wall defect model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, v. 100, n. 3, p. 709-717, 2012.

16.Poussier, M.; Deneve, E.; Blanc, P.; Boulay, E.; Bertrand, M.;Nedelcu, M.; Herrero, A.; Fabre, J. M.; Nocca, D. A review of available prosthetic material for abdominal wall repair. J Visc Surg, v. 150, n. 1, p. 52-59,2013.

17. Ramos, E. J. B. Biocompatibilidade da tela de polipropileno e da submucosa intestinal de porco na correção de defeitos criados na parede abdominal de cães. Estudo comparativo. Dissertação ,Universidade Federal do Paraná, 2002

18.Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. Biomaterials, v. 29,n. 20, p. 2941-2953, 2008.

19. Gilbert, T. W.; Sellaro, T. L; Badylak, S. F. Descellularization of tissues and organs. Biomaterials. 27(19):3675- 83, 2006.

20.Pellegata,A. F ; Asnaghi, M.A; Stefani,I; Maestroni, A; Maestroni, S; Dominioni, T; Zonta, S; Zerbini, G; Mantero, S; Detergent-Enzymatic Decellularization of Swine Blood Vessels: Insight on Mechanical Properties for Vascular Tissue Engineering. BioMed Research International, v. 2013,p.918753, 2013.

21.Contesini, E.A. et al. Reparação traqueal em cães: transplante autógeno vs implante homógeno conservado em glicerina a 98% de cartilagem da pina. Ciência Rural, v.31, n.4, p.633-637, 2001.

22.Silva, LAF., Franco, LG., Menezes, LB., Moura, VMBD., Bernardes, KM., & Souza, MA. Hernioplastia experimental em coelhos por meio de cartilagem auricular bovina conservada em glutaraldeído. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 61(3), 606-612. 2009.

23.Soiderer, E E ; Lantz,G . C., Kazacos,E A ; Hodde,J P ; Wiegand,R E. Morphologic study of three collagen materials for body wall repair. Journal of Surgical Research, New York, v.118, n. 2, p.161-175, 2004.

24.Mayne R.; Bergeson R.E. Structure and function of collagen types. London: Academic Press; 232p.,1987.

25.Gorsline, R.T.; Tangkawattana, P.; Lannutti, J. J.; Yamaguchi, M.; Kaeding, C. C.; Bertone, A. L. Accelerated chondrogenesis in nanofiber polymeric scaffolds embedded with BMP-2 genetically engineered chondrocytes. J. Biomed. Sci.Eng. v. 3, n. 3, p. 908-916, 2010.

26.Plepis, AMG., Goissis ,G., Das Gupta, D.K. Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. Polymer Engineering and Science, 1996.

27.Forti, F. L.; Goissis, G ; Plepis, A. M. G. Modifications on Collagen Structures Promotes by 1,4-Dioxane improve thermal and biological properties of bovine pericardium as a biomaterial. Journal of Biomaterials Applications, Londres, UK, v. 20, p. 267-285, 2006

28.Wollmann, L.C.F.N. de; Laurindo, C.A.H.; Costa, F.D.A. da; Moreno, A.N.; Efeito da criopreservação e / ou da descelularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.; 26 (3): 490-6, 2011.

29.Filho, N.P.R.de; Epitelização de enxertos cutâneos em feridas recentes de coelhos tratados com membrana amniótica canina e/ ou laserterapia. Dissertação, UNESP. 2015.

30. Badylak, SF. Regenerative medicine and developmental biology : The role of the extracellular matrix. , The Anatomical Record, v 287, n 1, p. 36-41, 2005.

31.Ribeiro, G.; Massoco, C.O.; Neto, J.C.L. de; Viabilidade celular da fração mononuclear da medula óssea e fração vascular estromal do tecido adiposo de equinos após o processo de congelamento e descongelamento. Pesq. Vet. Bras. v.32, 118-124, 2012.

32.Goissis G, Lacerda C, Barbosas MP, et al.. Surface tension controll of collagen biomaterials by the selective hydrolysis of internal carboxyamides of the protein matrix. Revista Brasileira de Engenharia Biomédica.15(1):55-61. 1999

33.Vulcani VAS, Macoris DG, Plepis AMG, et al. 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, 2013.

34.Ring, EFJ.The discovery of infrared radiation in 1800.ImagingSci J. 2000; 48 (1): 1-

35.Figueiredo, T;Dzyekanshi, B; Kunz, J; Silveira, AB; Ramos, C.M.G; Michelotto, Júnior PV. A importância do exame termográfico na avaliação do aparato locomotor em equinos atletas. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 2012.

36.Lahiri, B.B.; S. Bagavathiappan;T. Jayakumar. Medical application of infrared thermography: A review. Infrared Physics & Technology, v.55, n.4, p.221- 235, 2012.

37.Turner, T. A.; Eddy, L. Diagnóstico pela termografia. Revista Veterinária, nº 4,p. 17-95, 2001.

38.Loughin, C. A, Marino, D. J. Evaluation of thermographic imaging of the limbs of healthy dogs.American Journal of Veterinary Research, v.68, n.10, p.1064-1069, 2007.

39.Vicari Nogueira, CHF.Termografia por Infravermelho em Cirurgia Plástica - Novos Horizontes. Pan American Journal of Medical Thermology, v. 1, n.2, 2014.

40.Brioschi, M.L; Macedo J.F; Macedo, C.R.A.Termografia cutânea: novos conceitos. Revista Vascular Brasileira 2003; 2 (2): 151-160.

41.Simon, E.L.; Gaughan, E.M.; Epp, T.; Spire, M. Influence of exercise on thermographically determined surface temperatures of thoracic and pelvic limbs in horses.JAm Vet Med Assoc229(12): 1940-1944, 2006.

42.Roberto JVB, Souza BB. 2014. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. Journal Animal BehaviorBiometeorology.2(3):73-84.

43.Odaka K, Takemura K, Sato S. 2013. Investigation of Various Essential Factors for Optimum Infrared Thermography. The Journal of Veterinary Medical Science. 75(10):1349-1353.

44.ViégaS, J.; Brum JR., B. S.; Denardin, I. T.; Hauptli, L.; Everling, K. M.; Raber, M. R.; Fronza, L.; Iora, A. L.; Carvalho, A. A.; Santos, A. C. Desempenho produtivo de coelhos criados em diferentes lotações. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39, 2002. Recife, Brasil. Anais**...** Recife, 2002.

45.Muller P. B. Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos**.** 2ª edição. Porto Alegre, RS, Sulina, p.158, 1982.

46.Mikail, S. Termografia: diagnóstico através da temperatura. Nosso Clínico, v.13, n.74, p.20-24, 2010.

47.Maldague, XP. Advances in pulsed phase thermography.Infrared Physics & Technology, Maryland, v. 43, p. 174-181, 2002.

48.Ferreira, W. M.; Santiago, G. S. Desempenho de coelhos criados em diferentes densidades populacionais. Revista Brasileira Zootecnia**,** Viçosa, MG, v28, p113-117, 1999.

49.De Lima, V.; Piles, M; Rafel, O; Ramón, J; Velarde,A; Dalmau, A. Infrared thermography to assess the influence of high environmental temperature on rabbits. Research in Veterinary Science, v.95, n.2, p.802-810,2013.

50.Cunninghan, J. G**.** Tratado de fisiologia veterinária, 5° ed., Guanabara e Koogan, 2014.

CAPÍTULO 2 –DESCELULARIZAÇÃO DE CARTILAGENS ELÁSTICAS EM SOLUÇÃO ALCALINA PARA A PRODUÇÃO DE BIOMATERIAL

Manuscrito formatado conforme as normas para publicação.

RESUMO

Os tecidos de origem animal constituem-se como matérias primas importantes para serem tratados, descelularizados e transformados, por meio de técnicas físicas e químicas, em membranas e matrizes tridimensionais para aplicação cirúrgica. A solução alcalina tem sido empregada em diversos tecidos animais, cujas caracterizações tem demonstrado hidrólise dos grupos carboxiamida das moléculas de colágeno associada à manutenção da estrutura tridimensional de suas fibras e descelularização. Neste trabalho, cartilagens elásticas da orelha externa de bovinos foram submetidas em solução alcalina por 72 horas, para verificar os efeitos do tratamento sobre o tecido por análise histológica. Para isto, as amostras foram processadas e coradas por H.E. e Verhoeff, para a confecção de lâminas permanentes, observadas sob microscopia óptica e comparadas com amostras não tratadas. Considerou-se, para a análise, a constituição tecidual, presença ou ausencia de condrócitos e de componentes da matriz extracelular, afinidade tintorial de cada componente e integridade das fibras de colágeno e elásticas. Constatou-se que o tratamento alcalino, por 72 horas, ocasionou descelularização e retirada da substância fundamental amorfa das cartilagens elásticas, mas manteve a estrutura das fibras de colágeno e elásticas. Considerando a descelularização, que reduz a quantidade de antígenos presentes em mebranas celulares, organelas e citoplasma, a manutenção da estrutura de fibras da matriz extracelular e a hidrolise seletiva dos grupos carboxiamida das moléculas de colágeno, conluiu-se que o tratamento em solução alcalina é uma alternativa para a redução da antigenicidade e obtenção de biomaterial a partir de cartilagens elásticas.

Palavras- chave: Cicatrização, cirurgia, biomateriais, matriz extracelular

ABSTRACT

The tissues of animal origin constitute important raw materials to be treated, decellularized and transformed, by means of physical and chemical techniques, in membranes and three-dimensional matrices for surgical application. The alkaline solution has been used in several animal tissues, whose characterizations have demonstrated hydrolysis of the carboxamide groups of the collagen molecules associated with the maintenance of the three-dimensional structure of its fibers and decellularization. In this work, bovine external ear elastic cartilages were submitted to alkaline solution for 72 hours to verify the effects of the treatment on the tissue by histological analysis. For this, the samples were processed and stained by H.E. and Verhoeff, for the preparation of permanent slides, observed under light microscopy and compared with untreated samples. The tissue constitution, the presence or absence of chondrocytes and extracellular matrix components, the tinctorial affinity of each component and the integrity of the collagen and elastic fibers were considered for the analysis. It was found that the alkaline treatment, for 72, caused decellularization and removal of the amorphous base substance from the elastic cartilages, but maintained the structure of the collagen and elastic fibers. Considering the decellularization, which reduces the amount of antigens present in cell membranes, organelles and cytoplasm, the maintenance of the extracellular matrix fiber structure and the selective hydrolysis of the carboxamide groups of the collagen molecules, it was concluded that the treatment in alkaline solution is An alternative for reducing antigenicity and obtaining biomaterial from elastic cartilages.

Key words: Healing, surgery, biomaterials, extracellular matrix

INTRODUÇÃO

Na restituição anatômica de tecidos lesionados,por intermédio de cirurgias reconstrutivas, uma das maneiras para o restabelecimento de grandes extensões teciduais, se insere no uso de enxertos.Grande parte dos enxertos utilizados em reparos teciduais são

xenogênicos ou alogênicos, que promovem reação antigênica ao organismo receptor, acarretando em uma resposta inflamatória exacerbada ou até mesmo rejeição do tecido implantado. Deste modo, para otimizar a utilização de implantes teciduais viabilizando a biocompatibilidade dos mesmos, o tecido que dará origem a prótese, é submetido ao processo de descelularização tecidual.(OSÓRIO JUNIOR, 2013).

No processo de descelularização, outros componentes permanecem no tecido, como a matriz extracelular, cuja conformação tridimensional e sequência de aminoácidos são similares entre as espécies, havendo também um certo grau de tolerância, mesmo em destinatários xenogênicos, viabilizando, deste modo, estudos para produção de estruturas descelularizados. Essas estruturas também conhecidas como arcabouços, passam pelo processo de descelularização, assegurando menor ação biológica (WATERHOUSE, 2011).

O intuito de realizar a descelularização em cartilagens elásticas em solução alcalina, para a produção de biomaterial, é promover a remoção efetiva de todo o material celular e nuclear, minimizando quaisquer efeitos adversos na composição das cartilagens, reduzindo as respostas de corpo estranho (da SILVA 2013).

A estrutura do colágeno do tipo II, denominada de tropocolágeno, é composta por três cadeias polipeptidícas helicoidais, denominadas α1. Estas cadeias são formadas pela repetição do triplete glicina-X-Y, em que as posições X e Y são geralmente ocupadas pela prolina e hidroxiprolina, respectivamente. A união das cadeias se dá por meio de pontes de hidrogênio entre os grupos carboxila e amina, além das ligações covalentes. Por suas propriedades mecânicas, estruturais e baixa antigenicidade, o colágeno tem sido amplamente utilizado como biomaterial, de forma isolada ou associado a outros materiais. (DONG & YONGGANG, 2016).

As fibras elásticas são compostas por elastina, uma proteína que apresenta variações da morfologia em função do tecido que compõe. No tendão, a disposição das moléculas e das

fibras está em orientação paralela, enquanto que nos vasos sanguíneos apresenta-se no formato de anéis concêntricos e, na cartilagem elástica, forma uma estrutura semelhante a favo de mel. As moléculas de elastina estão envolvidas por microfibilas compostas por um complexo de diversas moléculas como fibrilinas, fibulinas e glicoproteínas. A elastina apresenta funções na estrutura e elasticidade tecidual, além de ser reguladora do metabolismo celular, o que a torna, também, uma material importante na obtenção de arcabouços (WATERHOUSE, 2011).

O processo de descelularização ocasiona o rompimento da membrana plasmática e as ligações intercelulares e extracelulares. Para que isso ocorra, são realizados tratamentos com agentes físicos, químicos e enzimáticos. Na maioria das vezes, o tratamento físico é ineficaz não ocorrendo à remoção celular, sendo necessária a associação entre os tratamentos químico ou enzimático, ou ambos simultaneamente. No processo físico, utiliza-se a sonicação, a agitação mecânica e o congelamento; os processos químicos consistem no uso de detergentes não iônicos e iônicos, soluções hiper ou hipotônicas e agentes quelantes de íons e os processos enzimáticos promovem a hidrólise e degradação de moléculas de DNA e RNA. (WATERHOUSE, 2011)

Dentre os métodos químicos de tratamento de tecidos animais, foi desenvolvido e patenteado por GOISSIS et al. (1994), uma solução alcalina, com pH 13, com capacidade de descularização tecidual para melhorar a biocompatibilidade. Este tratamento foi realizado em diversos tecidos, como pericárdio, centro tendíneo diafragmático, tendão e pele, oriundos de diferentes espécies animais e analisados *in vivo,* a eficiência dos implantes na reparação tecidual. Foi descrito, também, que a solução alcalina reduz antigenicidade das moléculas de colágeno presente nos materiais, preservando sua estrutura tridimensional (HORN, 2009; VULCANI et al, 2013). No entanto, apesar da eficiência de descelularização, não estão demonstradas na literatura, as alterações histológicas proporcionadas, especialmente de

cartilagens elásticas, que ao serem exploradas, representam, novas perspectivas no estudo da descelularização de cartilagens elásticas em solução alcalina para a produção de biomaterial.

Esse trabalho objetivou tratar cartilagens elásticas da orelha externa de bovinos em solução alcalina por 72 horas e, avaliar a capacidade de descelularização e manutenção dos componentes da matriz extracelular, para a obtenção de arcabouços para utilização como biomateriais.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Histologia da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, após aprovação do projeto pelo CEUA da UFG, protocolo nº098/2015. Na pesquisa utilizaram-se 20 cartilagens elásticas obtidas da orelha externa de bovinos adultos abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal. Após a colheita o material foi conduzido ao laboratório para dar sequência ao processamento.

Dando prosseguimento, empregando-se bisturi, tesoura e pinça anatômica, o material foi dissecado, limpo e submerso em solução fisiológica durante uma hora. Na sequência, as peças foram enxaguadas na mesma solução e secadas em papel toalha. Do total, dez cartilagens foram fixadas em solução de formalina a 10% e as demais foram acondicionadas em embalagens plásticas individuais, congeladas a -15ºC e enviadas ao Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos – USP, para serem submetidas ao tratamento alcalino.

No laboratório, o material foi descongelado e imerso em solução de cloreto de sódio a 0,9%, que foi trocada, a cada uma hora, até completar quatro horas de submersão nessa solução. Posteriormente, as cartilagens foram tratadas em solução alcalina, contendo, cloretos e sulfatos de sódio, potássio e cálcio. Após 72 horas de imersão, os sais residuais foram removidos por três lavagens sucessivas com ácido bórico a 3% e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 3% (GOISSIS, 1994; LACERDA, 1998; HORN, 2009). Dando

continuidade ao processamento, após o tratamento alcalino, o material foi congelado gradativamente, sob temperatura de 15ºC por 12 horas e -15ºC por 12 horas, liofilizadas e acondicionadas em embalagens plásticas.

As dez cartilagens conservadas em formalina e as dez cartilagens tratadas em solução alcalina foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), da Universidade Federal de Goiás, Regional Goiânia, para o processamento histológico. As cartilagens tratadas em solução alcalina foram hidratadas em solução fisiológica, por 20 minutos e então fixadas em solução tamponada de formol a 10%, por 24 horas. Após esse período, as amostras foram submetidas ao processo de desidratação, em soluções de concentrações crescentes de álcool (70 a 100%) durante quatro horas. A seguir, realizou-se a diafanização, inclusão e microtomia do material, obtendo-se cortes de 5 µm para serem corados por Mallorye Verhoeff e adicionalmente hematoxilina e eosina (H.E.) para as amostras tratadas (TOLOSA, 2003).

Para análise descritiva dos materiais, verificou-se inicialmente a qualidade de cada lâmina do material não tratado, em cinco campos aleatórios, nos aumentos de 100, 200 e 400 vezes, a fim de atestar se as etapas de processamento histológico não interferiram na estrutura e composição consideradas normais da cartilagem elástica. Dessa forma, considerou-se como padrão, deste tipo de cartilagem, a presença de condrócitos isolados ou compondo grupos isógenos, apresentando núcleos com afinidade basofílica e citoplasma acidofílico; presença de substância fundamental amorfa, com afinidade tintorial predominantemente acidofílica e com algumas regiões basofílicas; presença de fibras colágenas com afinidade tintorial basofílica, e, presença de fibras elásticas acidófilas compondo uma trama tridimensional, com espaços aproximadamente redondos ou hexagonais repetitivos, semelhante a colméias. As fibras elásticas aparecem, também, na matriz inter territorial, dispostas em diversas direções (EURELL & FRAPPIER, 2012; ANNABI, 2013).

Utilizando o mesmo método, para as amostras tratadas, foram observados cinco campos aleatórios nos aumentos de 100, 200 e 400 vezes, nos quais relatou-se a presença ou ausência de condrócitos, da substância fundamental amorfa e das fibras de colágeno e elásticas. Em seguida, analisou-se qualitativamente a afinidade tintorial dos elementos presentes e a morfologia das fibras colágenas e elásticas. As informações foram compiladas para verificar as possíveis alterações encontradas nas amostras tratadas,com o intuito de relacionar as mudanças estruturais relevantes para a obtenção de um biomaterial a partir de tecido cartilaginoso elástico.

RESULTADOS

Após o tratamento alcalino as cartilagens não apresentaram alterações macroscópicas no aspecto, coloração e flexibilidade em relação às cartilagens não tratadas. Somente após o congelamento e liofilização, as cartilagens tratadas ficaram desidratadas e, consequentemente, perderam a flexibilidade. No entanto, com a reihidratação das amostras, antes do processamento histológico, a flexibilidade voltou ao normal, não sendo possível diferenciar entre amostras tratadas e não tratadas.

A análise microscópica das cartilagens elásticas não tratadas revelou a presença de condrócitos, substância fundamental amorfa e fibras de colágeno e elásticas. Em algumas regiões da matriz extracelular interterritorial houve reação basofílica, apresentando coloração mais intensa, enquanto em outras regiões predominaram reações acidofílicas, obtendo-se colorações de tonalidades mais claras.

Na matriz circunjacente aos condrócitos, denominada de matriz territorial, especificamente na cápsula pericelular, houve reação basofílica, que se apresentou com coloração mais escura, tendendo aos tons de azul. Essas células apresentaram-se parcialmente retraídas, afastadas das cápsulas pericelulares, revelando suas lacunas. Os núcleos exibiram reação basofílica, corados em azul escuro.

As fibras de colágeno apresentaram-se basofílicas, mais espessas em relação às fibras elásticas acidofílicas e dispostas em todas as direções. As fibras elásticas foram observadas ao redor dos condrócitos, compondo uma trama tridimensional e na matriz interterritorial, dispostas em todas as direções, de forma aleatória. (Figura 1 A e B). A observação das lâminas das cartilagens tratadas em solução alcalina revelou ausência da substância fundamental amorfa, porém com a manutenção estrutural e afinidade tintorial normais, das fibras de colágeno e elásticas. Além disso, notou-se ausência de condrócitos, com retirada do citoplasma e núcleo. Em poucos locais constataram-se vestígios de citoplasma nas lacunas. (Figura 1 C e D).

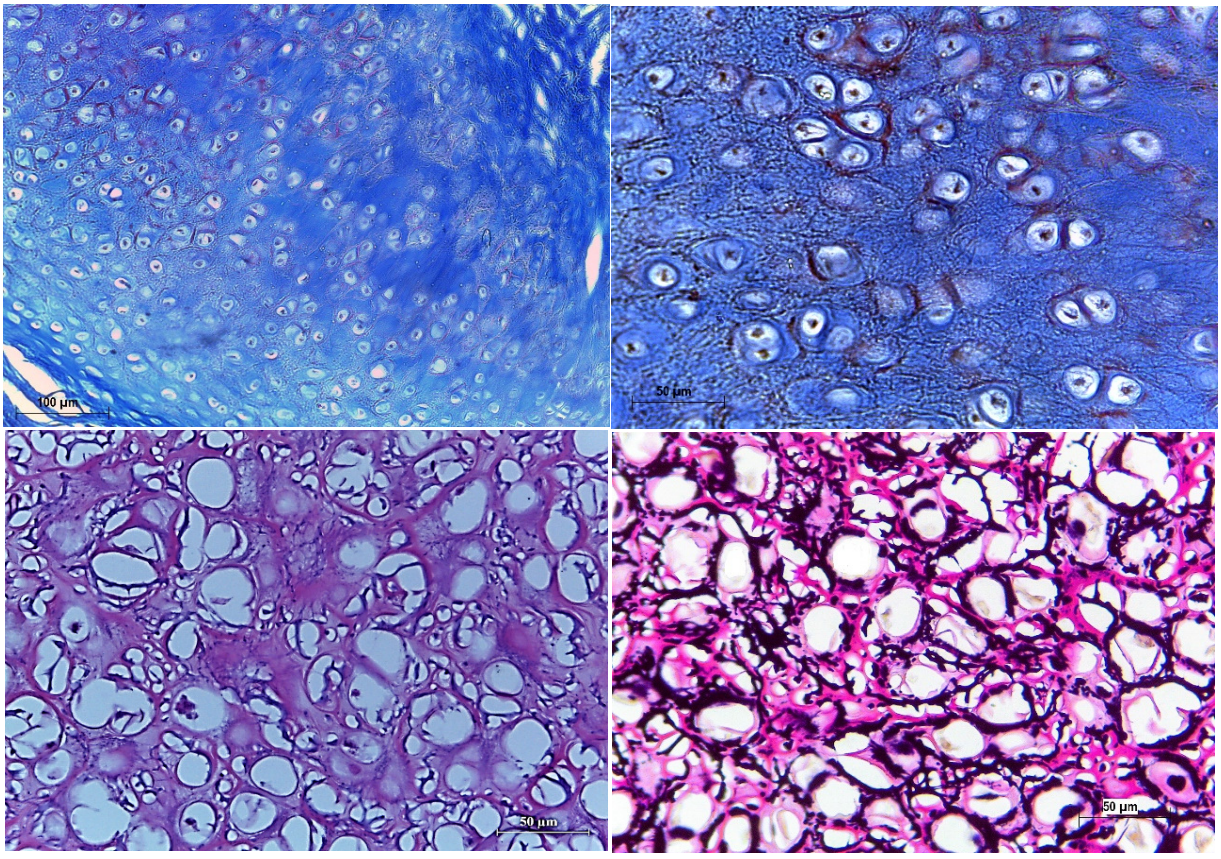

Figura 1. Em A e B, cartilagem elástica de orelha de bovino adulto em coloração por Tricrômico de Mallory e aumentos de 100X e 400X, respectivamente. Observa-se em A, a presença de condrócitos (setas claras) e da matriz extracelular (setas escuras). Em B, observa-se, em maior detalhe, a presença dos condrócitos, com núcleos basofílicos e de coloração escura (setas claras), e com as membranas celulares parcialmente retraídas, afastadas das cápsulas pericelulares, revelando suas lacunas (seta escura). Nota-se, ainda, a presença das fibras elásticas ao redor dos condrócitos e na matriz interterritorial, distribuídas em todas as direções, de

forma aleatória (cabeças de seta). Em C e D, cartilagem elástica de orelha de bovino adulto tratada em solução alcalina por 72 horas. Em C observa-se a presença das fibras de colágeno eosinofílicas, com coloração rosada (setas claras), mais espessas que as fibras elásticas acidofílicas (setas escuras). Nota-se, ainda, ausência de condrócitos e lacunas vazias (asteriscos). Coloração HE, aumento de 400X. Em D, nota-se a presença de fibras de colágeno, mais espessas e dispostas em todas as direções (setas claras) e o arranjo das fibras elásticas ao redor das lacunas, compondo uma trama, semelhante à colmeias (setas escuras). Observa-se também, ausência de condrócitos e lacunas vazias (asteriscos). Coloração Verhoeff, aumento de 400X.

DISCUSSÃO

A presença de todos os componentes da cartilagem elástica, a afinidade tintorial de cada região e a ausência de alterações morfológicas observadas nas amostras não tratadas em solução alcalina, estão de acordo com as descrições histológicas deste tipo de cartilagem e são esperadas quando as etapas de preparação de lâminas permanentes são adequadamente realizadas (EURELL & FRAPPIER, 2012; JUNQUEIRA& CARNEIRO, 2013). Dessa forma, infere-se que a presença de condrócitos, substância fundamental amorfa e fibras de colágeno e elásticas são indicativos que a integridade do material foi mantida.

A coloração azulada observada na matriz extracelular das cartilagens não tratadas e coradas Por Tricrômico de Mallory., deve-se à presença de compostos agrecanos, que são associações de proteoglicanos-hialuranato. Estes compostos estão presentes em grande quantidade na matriz e apresentam-se sulfatadas. A matriz territorial apresenta composição diferente da observada na interterritorial, consistindo em mais proteoglicanos ricos em sulfato e menos colágeno do tipo II. Não é possível distinguir as fibras de colágeno, por apresentarem índice de refração semelhante às das moléculas da substância fundamental amorfa. Contígua ao condrócito, ao redor da membrana celular, há uma área delgada que consiste em substância fundamental e uma fina malha de fibrilas colágenas também basofílica e coloração azulada.

Descrição semelhante foi relatada por outros autores, deduzindo-se que esses achados são comuns quando se usa essa coloração para cartilagens elásticas (SAMUELSON, 2007; EURELL & FRAPPIER, 2012; FREITAS- NETO et al, 2003).A ausência de substância

fundamental amorfa e de condrócitos nas cartilagens tratadas, pode ser explicada pelo processamento químico alcalino, com pH próximo de 13, uma vez que se trata de uma solução descelularizante, mas que mantém as fibras colágenas e elásticas preservadas. A mesma argumentação foi empregada por outros autores para explicar, em parte, a resposta dos tecidos de origem animal ao tratamento alcalino (GOISSIS, 1999).

Considera-se como descelularização eficiente quando há remoção do material celular, incluindo membrana plasmática, citoplasma, organelas e núcleo e, ao mesmo tempo em que há pouco ou nenhum efeito na composição, atividade biológica e integridade a matriz extracelular remanescente (GILBERT et al., 2006). Dessa forma, a descelularização da cartilagem elástica tratada em solução alcalina pode ser apontada como um dos principais benefícios do tratamento, uma vez que os resultados demonstram a retirada dos condrócitos e conservação das fibras da matriz extracelular.

Acredita-se que esse resultado seja importante na obtenção de biomateriais a partir de tecidos animais, pois com a descelularização ocorre redução da antigenicidade e da imunogenicidade, tendo em vista que as membranas celulares, organelas e citoplasma possuem moléculas responsáveis pelo reconhecimento imune e sinalização celular, codificadas por genes específicos e denominadas de complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (EUNJU, 2014).

Estes antígenos MHCs podem ser classificados em classe I e classe II e a expressão e formação destas moléculas são diferentes entre os indivíduos, estimulando reações locais e sistêmicas quando em contato com organismo diferente. Os antígenos de classe I estão presentes na superfície de todas as células nucleadas e plaquetas e os antígenos de classe II são expressos normalmente nas células envolvidas no reconhecimento e na resposta imune, como as células B, macrófagos, monócitos, células apresentadoras de antígenos e algumas células T.(EUNJU, 2014; JUNIOR,2013).

É importante ressaltar que foi descrito por alguns autores que além da descelularização, a solução alcalina aumenta a biocompatibilidade do colágeno, pela hidrólise seletiva de grupos carboxiamida de asparagina e glutamina, considerados antigênicos e possíveis causadores de reações indesejáveis no hospedeiro receptor do implante (HORN, 2009). No entanto, apesar da modificação de parte da estrutura molecular do colágeno, as observações histológicas das amostras tratadas permitiram notar que não houve alteração do arranjo tridimensional de suas fibras. Esta afirmação pode ser respaldada em descrições semelhantes, relatadas por pesquisadores que utilizaram métodos de caracterização físico-químicos de materiais, como a espectroscopia na região do infravermelho, (PEDROSO, 2009), análises termogravimétricas (RODRIGUES, 2010, VULCANI et al., 2013) e calorimetria exploratória diferencial (HIRATA et al , 2015), demonstrando integridade da hélice tripla na composição da molécula do colágeno. Segundo estes mesmos autores, quando há modificação do arranjo tridimensional do colágeno há a transição para gelatina, cujas propriedades mecânicas, físicas e biológicas são alteradas, assim como o modo de interação com as células do tecido em contato com o material.

Outros autores estudaram e reafirmaram a redução da antigenicidade e consequente aumento da biocompatibilidade de matrizes colagênicas tratadas em solução alcalina por meio de avaliações *in vivo.* CUNHA et al., (2008), afirmaram maior eficiência de matrizes de colágeno tratadas em meio alcalino para a consolidação de fraturas ósseas em ratas com osteoporose em relação às matrizes não tratadas. De forma semelhante, matrizes de colágeno aniônico obtidos em solução alcalina foram utilizadas para a regeneração óssea em ratos, verificando biocompatibilidade aceitável, bem como estímulo para o crescimento tecidual reparatório em relação aos animais que não receberam o implante (MIGUEL et al., 2013).

Em tecidos moles, VULCANI et al. (2013) processaram centros tendíneos diafragmáticos equinos em solução alcalina e estudaram a biocompatibilidade *in vivo,* na

parede abdominal na mesma espécie, obtendo implantes que apresentaram menor antigenicidade quando comparados com as membranas conservadas em glicerina a 98% e com membranas não tratadas. Estes autores relataram redução da antigenicidade do material tratado e estímulo para o aumento do número de fibroblastos, otimizando o processo cicatricial. Desta forma, é possível inferir que, o tratamento alcalino por 72 horas, em cartilagens elásticas retirou grupos antigênicos do tecido e conferiu melhores propriedades de biocompatibilidade para implantações cirúrgicas.

Outro aspecto relevante, exercido pelo tratamento alcalino empregado nas cartilagens elásticas é a manutenção da trama de fibras elásticas da matriz extracelular. Estas fibras são compostas por moléculas de elastina e se conectam por ligações cruzadas, compondo um arcabouço tridimensional capaz de estimular a angiogênese e atuar como suporte estrutural para a infiltração, diferenciação e proliferação celular.

Para os autores, DAAMEN et al., 2007; GALDEANO, 2014, a elastina está presente abundantemente em cartilagens elásticas e é uma molécula cuja estrutura se manteve muito semelhante entre as diferentes espécies de mamíferos, sendo aceita quando em contato com organismos diferentes. Isto ocorre em função da presença da sequência de reconhecimento celular arginina - glicina - ácido aspártico presente na elastina, que favorece o desencadeamento da cascata de eventos biológicos necessários para a regeneração tecidual e inibe a formação de fibroses.

Alguns estudos têm demonstrado que matrizes contendo elastina possuem a capacidade de estimular a diferenciação celular de células-tronco mesenquimais, o que torna a elastina um importante material a ser utilizado na produção de biomateriais para a regeneração de diversos tecidos animais. Além disso, com a crescente acessibilidade do precursor de elastina, da tropoelastina e dos materiais derivados de elastina, aumentou-seo

interesse na pesquisa por novas alternativas na medicina regenerativa (WATERHOUSE, 2011;OZSVAR, 2015).

Considerando que o tratamento alcalino de cartilagens elásticas, conforme realizado no presente estudo, resulta na descelularização, hidrólise dos grupos carboxiamida do colágeno e manutenção da estrutura tridimensional das fibras da matriz extracelular, pode-se sugerir que o material se torna menos antigênico e adequado para o uso com biomateriais.

CONCLUSÃO

O tratamento alcalino aplicado em cartilagens elásticas da orelha externa de bovinos é eficiente como método químico de descelularização, preservação das fibras da matriz extracelular e redução da antigenicidade das moléculas de colágeno. Constitui-se como alternativa viável para a obtenção de biomateriais, a partir de tecidos animais, para serem estudados em aplicações biomédicas e arcabouços para proliferação e crescimento celular.

REFERÊNCIAS

ANNABI, N. et al. Elastomeric recombinant protein- based biomaterials. **Biochemical Engineering Journal**. v. 77, p. 110-118, 2013. Disponível em: <http://europepmc.org/articles/PMC3735178>, Acesso em 07 dez, 2016. doi: 10.1016/j.bej.2013.05.006

CUNHA, M R..et al. Implants of polyanionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. **Journal of Materials Science**. v. 19, n. 3, p. 1341-1348, 2008. Disponível em:< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17914639>, Acesso em 07 dez, 2016.

DAAMEN, W.F. et al. Elastin as a biomaterial for tissue engineering. **Biomaterials**., v. 28, n. 30, 4378-4398, 2007. Disponível em :< https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17631957>, Acesso em 07 dez, 2016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.025.

CHANJUAN, D; YONGGANG LV;. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. **Polymers**.v. 8, n.2, p. 42, 2016. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2073-4360/8/2/42/htm>, Acesso em 07 dez, 2016.

EUNJU, O. Roles of major histocompatibility complex class II in inducing protective immune responses to influenza vaccination.Journal of virology. v. 88, n. 14, p. 7764-7775, 2014. Disponível em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24760891>.Acesso em 07 dez, 2016EURELL, J.A. & FRAPPIER, B.L. **Histologia Veterinária de *Dellmann***. São Paulo: Manole, 2012. 6.ed.

FREITAS-NETO, A. G. et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Manole, 2003. 2. ed.

GALDEANO, E.A. et al.; Membrana de elastina derivada da cartilagem auricular em terapias de regeneração óssea. **Anais.** Uberlandia, MG, 2014.Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. p. 213-216,2014.

GILBERT, T. W. et al. Descellularization of tissues and organs. **Biomaterials**. v.27, n. 19, p. 3675-83,2006.Disponível:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206001682>, Acesso em 07 dez, 2016. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.

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,n. 1, p. 55-61,1999.

GOISSIS, G. et al. Processo de extração de colágeno de tecidos animais com auxílio de solventes orgânicos e meio alcalino. **Patent**. BRPI, 9.405.043-0. 1994.

GUIMARÃES GC. et al.. Avaliação histológica de membranas biológicas bovinas conservadas em glicerina e a fresco. **Bioscience Journal**. v.23, n.3, p.120-127, 2007. Disponível em:< http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/issue/view/401>. Acesso em 07 dez, 2016.

HIRATA, H.H. et al. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats.**Injury**.v.46,n.7,p.1215-1222,2015.Disponívelem: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25920373>.Acesso em 07 dez, 2016.

HORN, M.M. et al. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26123817>.Acesso em 07 dez, 2016. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.011

JUNIOR, HAO. **Estudo da descelularização tecidual na produção de arcabouços biológicos para enxertos.** 2013.64f. Dissertação- Mestrado em Saúde Pública, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

JUNQUEIRA, LCU &, CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2013. 12. Ed.

LACERDA, C.A. et al. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 267-71, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421998000300006>, Acesso em: 07 dez, 2016.ISSN 1678-7064

LEWIS, J.S. et al. Materials that harness and modulate the immune system. **MRS Bulletin**. v. 39,n.01,p.25-34,2014.Disponívelem: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4793183/>, Acesso em 07 dez, 2016. doi: 10.1557/mrs.2013.310

MIGUEL, F.B. et al;. Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **Journal of Materials Science**, v. 24, n. 11, p. 2567-2575, 2013.

MITHIEUW, S.M. et al Tropoelastin--a multifaceted naturally smart material. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 65, n. 4, p. 421-428, 2013. Disponível em:

1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22784558>, Acesso em: 07 dez, 2016. doi:
2 10.1016/j.addr.2012.06.009.
3 OZSVAR, J.et al. Elastin-based biomaterials and mesenchymal stem cells. **Biomaterial**
4 **Science.**v.3,p.800-809,2015.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26146549>.doi:
5 10.1039/C5BM00038F.
6 PEDROSO, M. G. V. **Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com**
7 **adição de PVA.** 2009. 71f. Dissertação- Mestrado em química analítica. Universidade de São
8 Paulo.
9 RODRIGUES, F.T. et al. Porcine skin as a source of biodegradable matrices: alkaline
10 treatment and glutaraldehyde crosslinking. **Polímeros**, v. 20, n. 2, p. 92-97, 2010. Disponível
11 em: <http://revistapolimeros.org.br/issues/view/volume/20/issue/2/type/0>, Acesso em 07 dez,
12 2016. doi: http://dx.doi.org/10.1590/S0104-14282010005000013.
13 SAMUELSON, D.A. **Tratado de histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007.1 ed.
14 SILVA, B. S. R.D.; DOLCI, J. E. L. Estudo experimental da utilização de cartilagem auricular
15 com e sem Gelfoam® em dorso nasal em coelhos. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngol**,
16 p. 111-119, 2014. Disponível em: <http://www.redalyc.org/html/3924/392434065006/>, Acesso
17 em 07 dez, 2016. doi: 10.5935/1808-8694.20140025
18 TOLOSA, E. M. C.; et al. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São
19 Paulo: Manole, 2003. 2. ed.
20 VULCANI, VAS. et al. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina
21 ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de equinos. **Ciência Rural**, v.43, n.
22 8,p.1422-1428,2013.Disponível :<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-
23 84782013000800013>, Acesso em 07 dez, 2016. ISSN 1678-4596
24 WATERHOUSE, A. et al. Elastin as a Nonthrombogenic Part B. **Biomaterial. Tissue**
25 **Engineering**.v.17,n.2,p.93-99,2011.

CAPÍTULO 3- EXAME TERMOGRÁFICO NA AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA CUTÂNEA ABDOMINAL DE COELHAS (*Oryctolagus cuniculus*), ANTES E APÓS IMPLANTE DE BIOMATERIAIS

Manuscrito formatado conforme as normas para publicação.

RESUMO

A utilização de biomateriais tem aumentado em procedimentos de cirurgias reconstrutivas em medicina veterinária. Sabe-se que a resposta inflamatória é um dos fenômenos observados após a implantação das biopróteses, gerando calor e aumento da temperatura local. Neste trabalho avaliou-se a temperatura corporal de coelhas fêmeas (***Oryctolagus cuniculus***) da raça Nova Zelândia com seis meses de idade e peso de 3, 5 kg. Foi utilizado aparelho termográfico para as aferições, dividido em duas etapas. Na primeira etapa foram realizadas aferições da temperatura cutânea abdominal dos animais, antes da realização dos procedimentos cirúrgicos. Em seguida, estes animais foram separados de forma aleatória e homogênea em dois grupos experimentais (GI) tela de polipropileno e (GII) cartilagem elástica bovina tratada em solução alcalina. A segunda etapa consistiu nas aferições da temperatura dos animais nos períodos pós-cirúrgicos, após as implantações dos biomateriais. Os períodos de avaliações estabelecidos foram de sete e 35 dias, para ambos os grupos, equivalentes aos períodos de eutanásia dos animais. A partir dos dados das medidas calculou-se as médias para comparação entre os grupos teste T ao nível de 5% de significância. As temperaturas registradas nos animais de GI foram superiores, apesar de não haver diferença estatística significativa. Concluiu-se que o grupo GI, obteve temperaturas cutâneas abdominais superiores, comparadas ao grupo cartilagem.

PALAVRAS- CHAVE: Biomateriais, cirurgia experimental, cirurgia reconstrutiva, exame termográfico, resposta inflamatória

ABSTRACT

The use of biomaterials has increased in reconstructive surgery procedures in veterinary medicine. It is known that the inflammatory response is one of the phenomena observed after the implantation of bioprostheses, generating heat and local temperature increase. This work evaluated the body temperature of six-month-old New Zealand female rabbits (***Oryctolagus cuniculus***) weighing 3.5 kg. A thermographic apparatus was used for measurements, divided into 2 stages. In the first stage, measurements were made of the animals' abdominal skin temperature before performing the surgical procedures. Then, these animals were randomly and homogeneously separated into two experimental groups (GI) polypropylene mesh and

(GII) bovine elastic cartilage treated in alkaline solution. The second stage consisted in the measurements of the temperature of the animals in the postoperative periods, after the implantation of the biomaterials. The established evaluation periods were seven and 35 days, for both groups, equivalent to the periods of euthanasia of the animals. From the data of the measurements the means for comparison between the test groups at the level of 5% of significance was calculated. The temperatures recorded in the GI animals were higher, although there was no significant statistical difference. It was concluded that the GI group had higher abdominal skin temperatures compared to the cartilage group.

KEYWORDS: Biomaterials, experimental surgery, reconstructive surgery, thermographic exam, inflammatory response

INTRODUÇÃO

A termografia infravermelha é um exame não invasivo que pode ser empregado na avaliação e mensuração da temperatura da superfície corporal. O exame consiste na detecção de alterações no fluxo sanguíneo periférico, possibilitando o reconhecimento de eventos fisiológicos nos animais (Moura et al. 2011). Para a avaliação, emprega-se equipamento capaz de captar radiação infravermelha por meio de termógrafos. Na sequência são gerados os termogramas ou mapas térmicos de imagens com diferentes distribuições de temperatura (Roberto e Souza, 2014). Os modelos de câmaras termográficas mais eficientes são as que apresentam grande sensibilidade, detectando pequenas oscilações térmicas e alta resolução (Mikail, 2010).

A técnica pode ser aplicada como alternativa no diagnóstico de enfermidades relacionadas à alteração localizada da temperatura e, a diferença de temperaturas existentes entre dois pontos é visível pelas imagens exibidas pelo aparelho. Cores em tons de azul e roxo indicam temperaturas mais baixas, enquanto que as cores variando do vermelho ao amarelo indicam temperaturas mais elevadas. Alguns fatores externos podem comprometer a aferição da temperatura quando se utiliza o termógrafo. Portanto, antes de se realizar o exame deve-se considerar a preparação e manipulação adequada do paciente, bem como do ambiente onde são realizadas as medidas, a fim de evitar variações da temperatura. (Gomes e Gomes, 2014; Ricarte et al. 2014).

Partindo-se do princípio que alterações fisiológicas no tecido afetam sua temperatura, considera-se que os processos inflamatórios geram calor. Assim, o registro de temperaturas *versus* tempo permite classificar o processo inflamatório em níveis, diretamente proporcionais às variações da temperatura, tornando o método de análise uma ferramenta

importante para avaliação pós-operatória, de tecidos manipulados ou que receberam implantes (Roberto e Souza, 2014).

O procedimento cirúrgico de implantação de biomateriais promove reações teciduais que inevitavelmente ocasionam inflamação e levam ao aumento da temperatura local. Além disso, a biocompatibilidade dos diferentes materiais pode estimular processos inflamatórios mais ou menos intensos e persistir ao longo do tempo, tornando-se crônicos. Dessa forma, o registro termográfico permite, de forma indireta, comparar a reação da interface de diferentes implantes, associando a intensidade do processo inflamatório com os níveis de temperatura. (Arenhart, 2010)

A biocompatibilidade de um material está associada à adequada interação do material com o tecido receptor, promovendo adsorção específica de proteínas e desencadeando processo inflamatório agudo, que culmina em cicatrização ou regeneração. Portanto, para materiais oriundos de tecidos biológicos animais é necessário a redução da antigenicidade, ou sua exclusão completa, quando possível, para que possa ser utilizado como biomaterial para implante ((Dong & Yonggang, 2016).

Tecidos cartilaginosos, cuja matriz extracelular é formada por fibras muito semelhantes entre os animais, a descelularização, torna-se importante para a retirada de antígenos de membranas, organelas e núcleos, para evitar o reconhecimento deste material como não próprio pelo receptor. Existem métodos físicos, químicos e enzimáticos para a descelularização de tecidos animais. O tratamento químico em solução alcalina já foi utilizado em pericárdio, centro tendíneo diafragmático e pele, entre outros, mostrando-se eficiente na obtenção de membranas para implantes (Vulcani et al., 2013).

A cartilagem elástica tratada em solução alcalina, já foi implantada em ovinos e ratos, de forma experimental, porém não em coelhos. Os resultados de estudo da biocompatibilidade destes trabalhos mostraram que a cartilagem é promissora como biomaterial, pois, além da descelularização, ocorre alteração de regiões da molécula de colágeno que atuam como antígenos no organismo receptor dos implantes (Hirata et al, 2015).

No entanto, não foram realizadas avaliações termográficas dos implantes de cartilagem tratada em solução alcalina para associar a temperatura com a biocompatibilidade do material. Além disso, embora tenham sido utilizados coelhos em diversos trabalhos experimentais em cirurgia, não foi realizada a padronização da temperatura de sua superfície corporal, situação que pode comprometer a avaliação das respostas inflamatórias cutâneas nesses animais.

Portanto, acredita-se que o estudo da temperatura da parede abdominal desses animais, pode nortear experimentos e ser empregado em diversas espécies de animais. Para tanto, a temperatura cutânea aferida antes e após a implantação de biomateriais, utilizando o aparelho termográfico, poderá contribuir substancialmente para o entendimento de achados decorrentes do processo inflamatório que culminará na reparação de feridas.

Assim, este estudo objetivou empregar a termografia por infravermelho na avaliação da temperatura da superfície abdominal de coelhas (***Oryctolagus cuniculus***), nos períodos pré e pós-operatórios à implantação de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina e telas de polipropileno.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Biotério Experimental da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG), no período de agosto de 2016 até janeiro de 2017. Todos os procedimentos foram realizados com a autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG), protocolo nº. 098/15. Foram utilizados 24 coelhos (***Oryctolagus cuniculus***), fêmeas, da raça Nova Zelândia, saudáveis, com seis meses de idade e, aproximadamente, três quilos e meio de peso corporal, distribuídos em dois grupos experimentais (GI e GII), compostos por 12 animais cada. Esses mesmos animais foram subdivididos em dois grupos, com seis animais cada, que equivalia ao período de avaliações, de sete e 35 dias . Os animais foram adquiridos de criatório autorizado, no município de Bela Vista, no Estado de Goiás. Em (GI) foram alocados os coelhos que receberam a tela de polipropileno e (GII) cartilagem elástica bovina tratada em solução alcalina.

Todos os animais foram submetidos à avaliação clínica para confirmar a higidez dos mesmos. Na sequência, foram alocados em gaiolas individuais identificadas por etiquetas enumeradas, recebendo água e ração específica para a espécie fornecida *ad libitum.* O período de adaptação foi de 15 dias e os coelhos que apresentaram alguma alteração foram tratados antes de serem submetidos aos procedimentos. O ambiente onde os coelhos foram alojados era climatizado com temperatura média de 22 ^{o}C, aferida por termômetro manual. Adotou-se o regime de luminosidade controlada sendo que 12 horas os animais permaneciam no escuro e 12 horas em iluminação artificial.

As avaliações termográficas foram realizadas em duas etapas. A primeira, antes de realizar implantes abdominais de cartilagem elástica submetida a tratamento alcalino ou tela de polipropileno e a segunda após a realização das intervenções cirúrgicas. Nas duas situações utilizou-se uma sala fechada, localizada no biotério experimental, da EVZ-UFG, com ausência de corrente de ar. O padrão de luminosidade e temperatura local foram os mesmos

adotados para a sala onde eram mantidos os animais. Na primeira etapa do estudo, antecedendo ao início das avaliações termográficas, cerca de 48 horas, foram realizadas as tricotomias da região abdominal a ser avaliada, desde a região do manúbrio até a face medial das coxas. A presença de pêlos causam interferência na imagem obtida, demonstrando uma imagem com escala de cores mais quentes. O contrário é observado, na aferição com a realização da tricotomia na região avaliada (Figura 1 A e B).

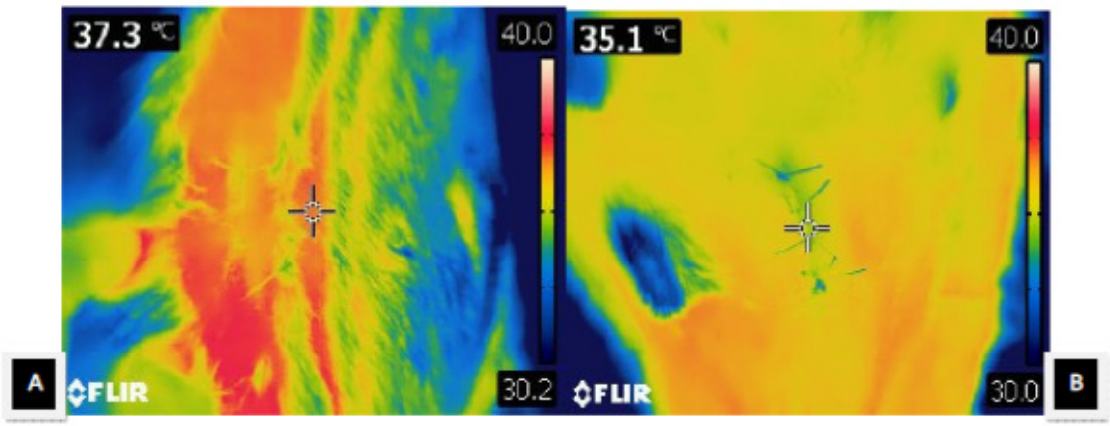

Figura 1: Imagem temográfica da aferição de temperatura cutânea de coelhos. Em (A), aferição antes da implantação dos biomateriais. Nota-se presença de pêlos que demonstram imagem com tons mais quentes da escala de cores. Em (B) aferição após a implantação da cartilagem; nota-se ausência de pêlos, demonstrando cores mais frias detectadas da escala de cores.

Para os exames termográficos utilizou-se a câmera termográfica (Flir®, Modelo T4XX Series, Flir® Systems, Inc. Wilsonville-Oregon-USA) com configuração regulada de acordo com os parâmetros pretendidos.

Os parâmetros foram obtidos após ajustes realizados no padrão de cores, escala térmica, umidade, índice de emissividade e distancia presentes nas configurações do aparelho. Com relação ao padrão de cores, a opção escolhida foi em arco-íris, que consiste em uma variância de sete tonalidades, definidas entre cores quentes e frias. A temperatura ambiente variou em torno de 20ºC, a temperatura refletida de 26ºC e a umidade relativa de 60%, considerada a ideal em temperaturas com variação entre 13°C e 22°C (Siloto et al, 2009). Fixou-se uma taxa de emissividade em 0,98 e a escala térmica de cores variando entre 30ºC e 40ºC. As aferições da temperatura abdominal dos coelhos foram realizadas posicionando a câmera a uma distância de 30 centímetros, perpendicularmente à região lateral do abdômen, local de implantação dos biomateriais (Siloto et al, 2009). Para efetuar as aferições, os coelhos foram imobilizados por meio de contenção manual e em decúbito dorsal sobre mesa de

madeira. A temperatura cutânea foi aferida diariamente, assim como as avaliações clinicas, variando de acordo com o período estipulado de pós-operatório dos grupos, em sete e 35 dias, para verificação de parâmetros do processo inflamatório.

Na sequência, deu-se o início da preparação dos animais para realizar a segunda etapa do estudo. Primeiramente, foi realizada a contenção manual seguida de medicação pré-anestésica empregando associação de cloridrato de cetamina 30 mg/kg e midazolam 2,0 mg/kg, ambos por via intramuscular. Dando continuidade, realizou-se a tricotomia e antissepsia da região abdominal, assim como nas faces externas das orelhas para cateterização de veia marginal auricular. A indução anestésica foi realizada com propofol, na dose de 0,4ml/kg, pela via intravenosa e a manutenção com isoflurano (1-2%) diluído em oxigênio, em aparelho de anestesia inalatória (Massone, 2003).

A implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina foi realizada após incisão e divulsionamento de tecido subcutâneo da parede abdominal, lateralmente, na região do flanco, para exposição da fáscia do músculo oblíquo abdominal, sendo que o ponto de fixação do implante atingia o peritônio. A cartilagem foi remodelada nas dimensões desejadas, fixada com fio de poliglecaprone (Figura 2 A e B). Foram empregados quatro pontos de reparo em padrão tipo Wolff, tendo como finalidade melhorar a adaptação do biomaterial ao sítio receptor. Procedimento semelhante foi empregado nos coelhos para a fixação da tela de polipropileno. A distribuição dos animais e o tempo de avaliação foram iguais em ambos os grupos.

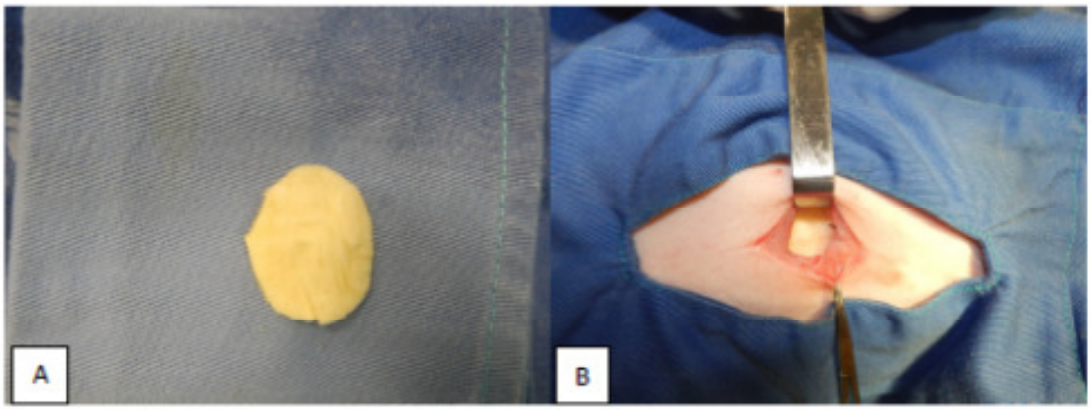

Figura 2: Cartilagem elástica de bovino após tratamento alcalino para ser implantada como biomaterial. Nota-se em (A), cartilagem remodelada nas dimensões desejadas para ser implantada em tecido subcutâneo de coelhos. Em (B) cartilagem sendo implantada em tecido subcutâneo de coelhos.

Após o procedimento cirúrgico os animais de ambos os grupos foram monitorados até a recuperação anestésica e em seguida encaminhados ao biotério, e realocados em suas

gaiolas. Na analgesia pós-operatória, foi administrado cloridrato de tramadol na dose de 4mg/kg na via subcutânea e antibiótico enrofloxacina a 2,5% (Massone, 2003). Em ambos os grupos, no dia subsequente as intervenções cirúrgicas, iniciaram-se as avaliações termográficas diárias.

No período pós-operatório, foram realizadas avaliações clinicam diárias acompanhando a evolução da ferida e presença de processo inflamatório, estabelecidos por parâmetros como presença de edema, hiperemia, hipertermia, dor e sensibilidade à palpação por períodos de sete e 35 dias. Realizaram-se também aferições da temperatura cutânea no local dos implantes, com o uso do aparelho termográfico, seguindo a metodologia adotada na primeira etapa, porém subdividindo-se em duas fases.

Na primeira fase, as avaliações termográficas foram realizadas, diariamente, nos coelhos de ambos os grupos, no período de até sete dias de pós-operatório. Em um segundo momento, seguiu-se a mesma conduta para os animais que foram avaliados até 35 dias do período pós-operatório. Os dados obtidos foram compilados e submetidos à comparação das médias pelo Teste estatístico T, adotando-se nível de significância de 5%, utilizando-se do software Gretl (Core Development Core Team, 2015). Compararam-se as médias de temperatura da superfície abdominal entre os períodos equivalentes a sete e 35 dias dos grupos GI e GII. Para gerar o intervalo de referência da temperatura infravermelha abdominal utilizou-se a média dos desvios padrões (Sampaio, 2007).

RESULTADOS

As médias das aferições realizadas em GI, no período pré e pós-operatório aos sete dias foram, respectivamente 36,48ºC±0,31 e 36,83ºC±0,48, havendo diferença significativa ($P<0,05$). Os dados das medidas diárias pré e pós-cirúrgico até sete dias estão representados na figura (Fig 3), no qual observa-se tendência de temperaturas mais elevadas após a implantação da tela.

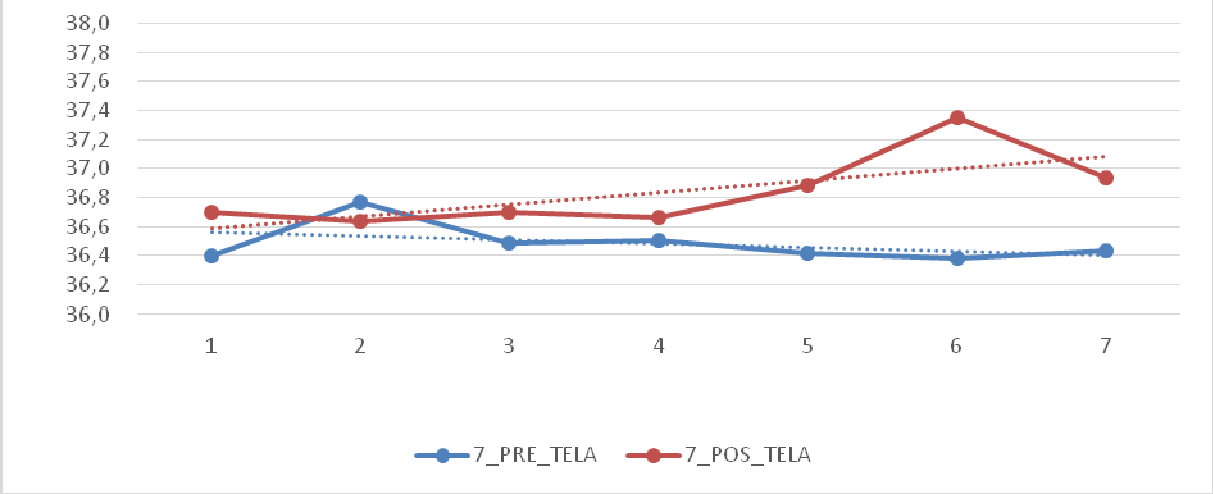

Figura 3: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de sete dias antes (linha azul) e após a implantação da tela de polipropileno (linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.

Em GI, no período 35 dias, encontrou-se média de 36,49ºC±0,39, no pré-operatório e 37,07ºC±0,68, no pós-operatório, com diferença significativa (P<0,05). Os dados estão representados na figura (Fig 4), no qual se observa tendência de temperaturas mais elevadas após a implantação da tela.

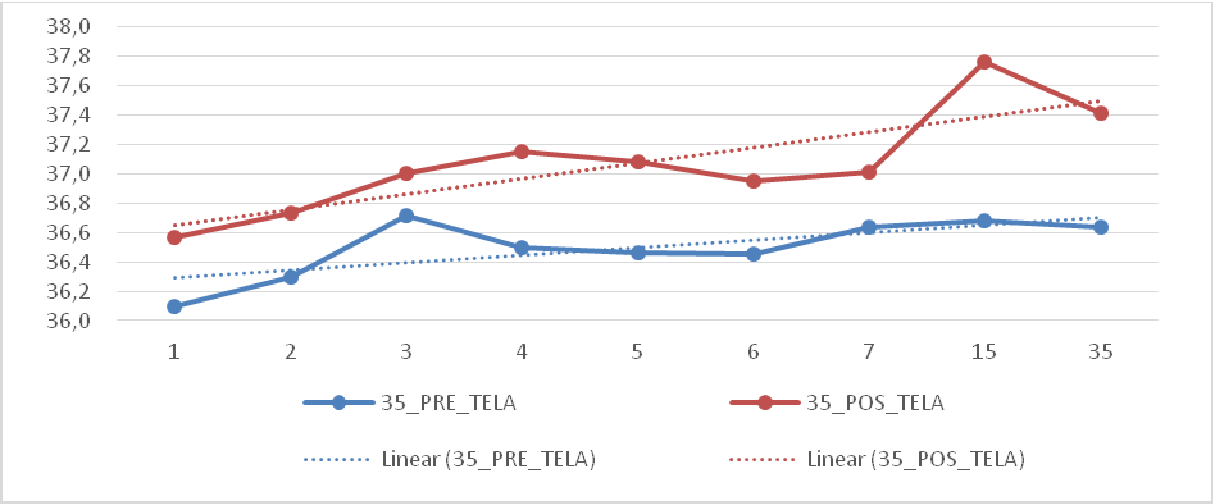

Figura 4: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de 35 dias antes (linha azul) e após a implantação da tela de polipropileno (linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.

Com relação ao grupo GII no período sete dias, pré-operatório, encontrou-se média de 36,53 ºC ± 0,45 e no pós-operatório encontrou-se uma média de 36,58 ºC ± 0,61, no pós-operatório, sem diferença significativa (P>0,05). Os dados estão representados na figura (Fig

5), no qual se observa tendência de temperaturas menos elevadas após a implantação da cartilagem.

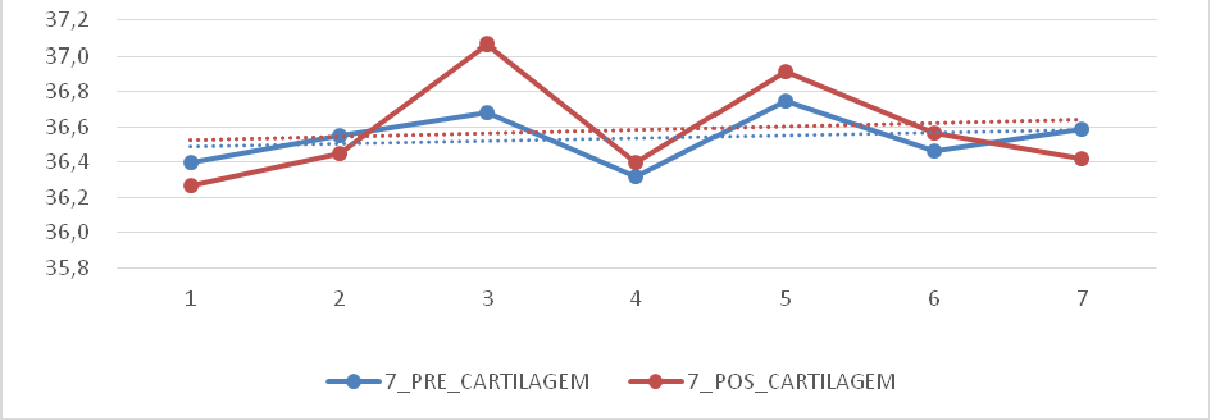

Figura 5: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de sete dias antes (linha azul) e após a implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina (linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.

Ainda no grupo cartilagem (GII), porém no período 35 dias, pré-operatório, encontrou-se uma média de média 36,69 ºC ± 0,71; e no pós-operatório, obteve-se média de 36,78 ºC ± 0,81, sem diferença significativa (P>0,05). Os dados estão representados na figura (Fig. 6), no qual se observa tendência de temperaturas sem elevação após a implantação da cartilagem

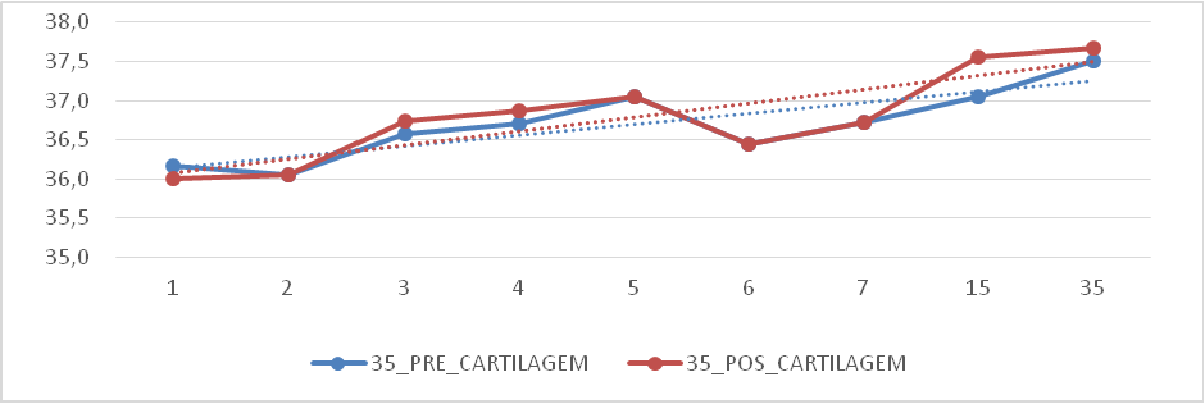

Figura 6: Dados referentes à temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de 35 dias antes (linha azul) e após a implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina (linha vermelha). As linhas pontilhadas representam a tendência de cada análise.

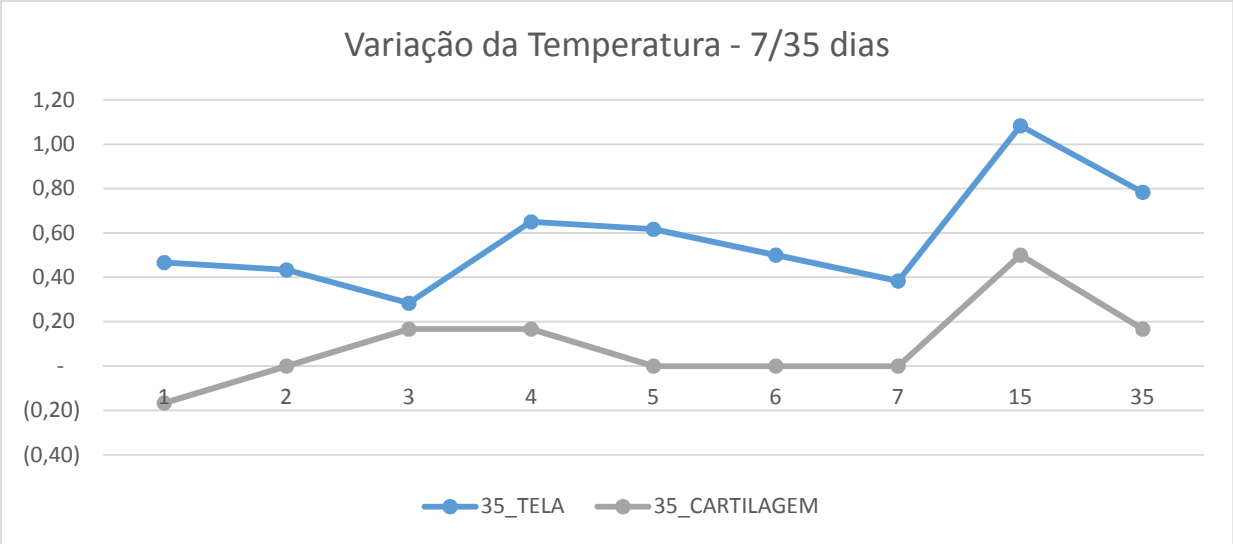

Figura 7: Médias comparativas da temperatura infravermelha da superfície da parede abdominal de coelhos em função do período de avaliação de sete e 35 dias. Grupo tela apresentando aumento significativo de temperatura (linha azul), quando comparado ao grupo cartilagem (linha cinza).

DISCUSSÃO

A solução alcalina foi utilizada para promover descelularização e modificações na matriz extracelular da cartilagem elástica de origem bovina e melhorar sua biocompatibilidade. Os aspectos macroscópicos da cartilagem não são alterados e sua manipulação cirúrgica, após a hidratação, é viável, já que é um material flexível, resistente à sutura e molda-se facilmente à ferida.

A biocompatibilidade dos materiais está diretamente relacionada com sua interação na interface com os tecidos. Dessa forma, o processo inflamatório pode culminar na resolução das alterações teciduais ou tornar-se crônico, persistindo ao longo do tempo. A resposta inflamatória no local do implante é acompanhada por uma resposta sistêmica de fase aguda que se apresenta pelos sinais clássicos como tumor, rubor, dor, calor e perda de função. Dentre os principais fenômenos presentes após a implantação biomateriais, observa-se também, a ativação de células de defesa e produção de proteínas de fase aguda, efeitos citotóxicos generalizados, alterações microvasculares e as respostas celulares específicas do tecido implantado (Vasconcelos, 2006; Brioschi, 2007).

A utilização da termografia para avaliação do processo inflamatório após a implantação de biomateriais apresentou vantagens em relação a outros métodos por não ser invasivo, não emitir calor e radiação ionizante para o paciente e operador. Além disso, é uma técnica que tem sido empregada para o diagnóstico de diversas afecções e em modelos experimentais para o estadiamento de doenças, a partir da variação de temperatura local e

sistêmica (Basile et al, 2010; Nóbrega et al, 2014; Head & Dyson, 2001;). No entanto, são poucas as informações sobre parâmetros, critérios e diferenças entre as espécies para nortear a utilização clínica da termografia.

Neste trabalho, a preparação dos animais envolveu a permanência dos mesmos em sala climatizada antes da realização das medidas termográficas por dez minutos, para haver equilíbrio térmico dos organismos com o ambiente, seguindo a recomendação de outros autores, que ressaltam a importância da ambientação dos animais e da realização do exame em locais protegidos do sol, ausência de fluxo de ar e pouca movimentação dos animais com uso de contenção física no momento da avaliação. (Redaelli et al, 2014) Porém, não há referências na literatura sobre o tempo mínimo e a temperatura ideal, ou a relação destes parâmetros com a superfície e peso corporal em coelhos.

As avaliações termográficas dos animais antes e após a implantação da tela de polipropileno, aos sete e aos 35 dias, demonstraram que houve incremento da temperatura da parede abdominal após a implantação. No entanto, as avaliações dos animais que receberam os implantes de cartilagem elástica tratada em solução alcalina demonstraram discreto aumento da temperatura nos primeiros dias após a implantação, sem diferença significativa e que estabilizou ao longo do tempo. Este fato pode ser explicado, em parte, pelo fato de que o trauma cirúrgico ocasiona processo inflamatório, principalmente nos primeiros dias. Contudo, ao longo do tempo deve haver regressão do processo inflamatório, reorganização dos tecidos e consequentemente redução da temperatura, aos níveis considerados normais para a espécie, como foi observado em GII (Vulcani, 2013).

Em GI, a persistência de temperaturas mais altas até os 35 dias provavelmente está relacionada com a reação tecidual ao polipropileno, cuja biocompatibilidade já foi estudada por outros autores, que relataram que apesar do uso frequente do material, ocorrem muitas complicações pós-cirúrgicas, devido a inflamação instaurada após a sua implantação (Vasconcelos, 2006). O processo inflamatório persistente é característico da implantação de materiais que estimulam reações de corpo estranho, desencadeando reações bioquímicas, celulares e imunológicas que culminarão na inflamação e pode ser verificada pelo aumento da temperatura local. (Nascimento, et al 2012). A intensidade e duração da resposta inflamatória à implantação de biomateriais dependem das características físico-químicas do material de da capacidade de adsorção específica de proteínas na interface com os tecidos receptores (Anderson et al., 2008).

Os implantes de cartilagem elástica tratada em solução alcalina, por outro lado, não estimularam a persistência do processo inflamatório, demonstrando que o tratamento alcalino

foi eficaz em otimizar a biocompatibilidade do material conforme citado por outros autores (Nascimento 2012, Vulcani 2013). Resultado semelhante foi observado por Nóbrega et al., (2014), que utilizou termografia para avaliação da resposta tecidual após implante de polímero a base de poliuretana de mamona em osso III metacarpiano de equinos. Os autores relataram medias mais elevadas de temperatura nos membros receptores dos implantes, em relação aos membros controle, aos sete dias pós-operatório e atribuíram este aumento ao trauma cirúrgico promovendo processo inflamatório agudo. No entanto, houve normalização da temperatura ao longo do tempo, já que não houve reações teciduais ao material implantado.

Além disso, a biocompatibilidade superior dos implantes de cartilagem tratada em solução alcalina em relação às telas de polipropileno foi reafirmada pela avaliação clínica ao longo dos dias. A redução até a ausência de edema, hiperemia, calor, dor e sensibilidade à palpação, no local do implante, demonstraram que o material estava adequadamente integrado à parede abdominal dos animais. Já nos animais que receberam o implante tela de polipropileno, observou-se hiperemia, exsudato, sensibilidade à palpação e deiscência de feridas. Vulcani et al., (2012) comparou a biocompatibilidade de implantes de cartilagem elástica tratada em solução alcalina e telas de polipropileno em ovinos e demonstrou que a tela de polipropileno ocasionou resposta clínicas semelhantes às descritas nos coelhos deste trabalho (Vulcani et al, 2013). Estes resultados também foram reafirmados por Santos et al., 2016, que demonstraram que a cartilagem elástica tratada em solução alcalina se apresentou mais biocompatível às hastes de polipropileno na auriculoplastia em equinos (Vulcani, et al, 2016). Estes autores verificaram que o polipropileno promove reações teciduais que são detectadas pelo exame clínico, enquanto a cartilagem se integra de forma mais adequada aos tecidos circunjacentes e não promove as alterações clínicas inerentes ao processo inflamatório.

No presente trabalho, o tratamento alcalino demonstrou-se eficaz para a produção de biomaterial cartilaginoso, cuja biocompatibilidade em coelhos foi superior em relação às telas de polipropileno, constantemente empregada na reparação tecidual da parede abdominal das espécies domésticas e em humanos. A procura por métodos de obtenção de materiais que sejam biocompatíveis, biofuncionais e ao mesmo tempo sejam viáveis para aplicação em tecidos moles, pode facilitar a reparação dos tecidos da parede abdominal. Estes biomateriais devem promover reações inflamatórias mínimas e adequarem-se ao hospedeiro, ao mesmo tempo em que mantenham a resistência mecânica (Nascimento, et al 2012).

CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados obtidos no presente estudo e as condições em que o mesmo foi realizado, conclui-se que a termografia foi eficiente para comparar a biocompatibilidade entre cartilagem elástica bovina tratada em solução alcalina e telas de polipropileno. A cartilagem tratada apresentou biocompatibilidade superior em relação a tela de polipropileno, quando implantadas na parede abdominal de coelhos.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater* Res. v.31; p.81-110. 2001

ARENHART, R. *Análise termográfica e histológica de tenorrafias em coelhos pós-mobilização ativa precoce (MAP).* 2010. 88f. Dissertação. Universidade do Estado de Santa Catarina.

BABENSEE, JE.; ANDERSON, JM.; MCINTIRE, LV.; MIKOS, AG. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Amsterdam, v.33, p.114, 1998.

BASILE, R.C., BASILE, M.T., ALBERNAZ, R.M., et al. *2010. Guia prático de exames termográficos em equinos. Brazilian Journal of Equine Medicine*. v.31, p. 24-28.

BRIOSCHI, ML YENG, LT; PASTOR, EMH; et.al. Utilização da imagem infravermelha em reumatologia. *Revista Brasileira de Reumatologia*.v.1, p.47. 2007.

CHANJUAN, D; YONGGANG LV;. Application of Collagen Scaffold in Tissue Engineering: Recent Advances and New Perspectives. *Polymers.* v.8, n.2, p.42, 2016;

MASSONE, F; *Anestesiologia veterinária– Farmacologia e Técnicas*, 4 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2003, p.326.

GOMES, RC; GOMES AC. 2014. Utilização da termografia infravermelha na Medicina Veterinária. *Revista Eletrônica de Educação e Ciência*. v.5, n.3, p.01-05.

HEAD M.J.; DYSON S. Talking the temperature of equine thermography. *Veterinary Journal.* v. 162, n 3, p. 166-167. 2001

HIRATA, H. H.; MUNHOZ, M. A. S.; PLEPIS, A. M. G.; et al. Feasibility study of collagen membranes derived from bovine pericardium and intestinal serosa for the repair of cranial defects in ovariectomised rats. *Injury*., v. 46, n. 7, p. 1215-1222, 2015.

MOURA, DJ; MAIA,APA; VERCELLINO, RA. et al. 2011. Uso da termografia infravermelha na análise da termorregulação de cavalo em treinamento. *Engenharia Agrícola Jaboticabal*. v.31, n1, p.23-32.

MIKAIL, S. Termografia: diagnóstico através da temperatura. *Nosso Clínico*, v.13, n.74, p.20-24, 2010.

NASCIMENTO, DL; VULCANI, VAS; MARTINS, VCA; PLEPIS, AMG. Mineralização de matriz derivada de cartilagem auricular. *Anais*. In: Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2012, Natal.

NÓBREGA, F.S; POLETTO, M.F.; LOPES, L.F; et al. Uso da Termografia para avaliação da resposta tecidual após implante de polímero a base de poliuretana de mamona em osso III metacarpiano de equinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. vol. 42, n. 1, 2014, pp. 1-5 Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Brasil

REDAELLI,V.; BERGERO, D.; ZUCCA, E. et al. 2014. Use of thermography techniques in equines: principles and applications. *Journal of Equine Veterinary Science.* v34,n.3,345-350.Disponível <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613004644>. Acessado em 13 dez. 2016.

RICARTE ARF, FAÇANHA DAE, COSTA LLM. Possibilidades na utilização da termografia infravermelha no diagnóstico reprodutivo de caprinos. In: VII Congresso Norte-Nordeste de Reprodução Animal. Mossoró. 2014. *Acta Veterinaria Brasilica*. v8, n2, p.380-384.

ROBERTO JVB, SOUZA BB. 2014. Utilização da termografia de infravermelho na medicina veterinária e na produção animal. *Journal Animal BehaviorBiometeorology*.v.2, n.3, p.73-84.

SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: FEPMV, 1998, 221p.

SILOTO, EV; ZEFERINO, C P; MOURA, ASAMT; et al. Temperatura e enriquecimento ambiental sobre o bem -estar de coelhos em crescimento. *Ciência Rural*; v. 39, p. 528-33, 2009.

VASCONCELOS, AC. Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais. In: ÓREFICE, RL.; PEREIRA, MM.; MANSUR, HS.; *Biomateriais – Fundamentos e aplicações*,1ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 279-280p. 2006.

VULCANI VAS, MACORIS DG, PLEPIS AMG, et al. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de equinos. *Ciência Rural*. v.43, n 8, p.1422-1428, 2013

VULCANI,VAS.; RABELO,R. E.; SANT`ANNA,F J. F., et al. Estudos preliminares da biocompatibilidade de membranas cartilaginosas tratadas em solução alcalina e implantadas na parede abdominal de ovelhas In: I Encontro Acadêmico do Câmpus Jataí da Universidade Federal de Goiás, 2013, Jataí. *Anais*. I Encontro Acadêmico do Câmpus Jataí da Universidade Federal de Goiás, 2013. v. 01. p. 10-11.

VULCANI,V. A.S; RABELO, R. E. ; RABBERS, A. S. et al. Cartilagens Elásticas Tratadas em Solução Alcalina: Avaliação do Potencial para Aplicação como Biomaterial. In: XII Congresso de Cirurgia do CBCAV e II Congresso Internacional do CBCAV, 2016, Águas de Lindóia. *Anais.* XII Congresso de Cirurgia do CBCAV e II Congresso Internacional do CBCAV. 2016, SUPLEMENTO 1. v. 16. p. 50-52.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista as propriedades inerentes da cartilagem elástica tratada em solução alcalina utilizada em implantes, percebe-se que há questionamentos sobre o tema, que vão desde o comportamento deste tecido após modificação em sua arquitetura estrutural, com o processo de descelularização, assim como as reações celulares desencadeadas após a sua implantação. Na busca por um biomaterial que se adeque melhor ao tecido receptor, deve ser analisado, no momento da escolha, os efeitos deletérios gerados pela presença de um determinado biomaterial, assim como os benefícios com a sua utilização. As propriedades inerentes a esses biomateriais são responsáveis pela resposta à longo prazo dos tecidos do hospedeiro,determinando o processo inflamatório instaurado, pois delas, depende a biocompatibilidade do material.

Acredita-se que estudos apresentados, como este que foi realizado, podem nortear e demonstrar as vantagens e no uso de materiais cartilaginosos na reparação tecidual. Diante de necessidade de mais estudos envolvendo essa temática, a avaliação termográfica ofereceu subsídios, com os parâmetros avaliados, para que pudesse encontrar evidencias a respeito da intensidade da reação inflamatória com a implantação de biomateriais, por meio das alterações na temperatura cutânea abdominal de coelhos. Este estudo demonstrou que o uso do aparelho termográfico por infravermelho se mostra eficaz na detecção precoce do processo inflamatório e evidenciou também que a escolha do biomaterial utilizado interfere nesse processo.

ANEXO 1

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

UFG

Goiânia, 14 de dezembro de 2015.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 098/2015

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pesquisa

II - Identificação:

Título do projeto:
Estudo da biocompatibilidade de cartilagens auriculares bovinas tratadas em solução alcalina e tela de polipropileno na correção de defeito abdominal excisional em coelhos (*oryctolagus cuniculus)*.

Pesquisador Responsável/ Unidade:
Valcinir Aloisio Scalla Vulcani–UFG/Jataí

- **Pesquisadores Participantes:**
  Luiz Antonio Franco da Silva EVZ-UFG
  Kamilla Dias Ferreira EVZ-UFG
  Gladston Divino de Sousa Filho EVZ-UFG
  Franciele Alves da Silva de Paula EVZ-UFG
  Vinícius Menezes Maia EVZ-UFG
  Ana Paula de Almeida Vinhal EVZ-UFG

- **Unidade onde será realizado:** EVZ/UFG (Biotério de roedores e lagomorfos da EVZ/UFG)
- **Data de apresentação a CEUA: 02/12/2015**

III - Objetivos e justificativa do projeto:
Analisar comparativamente a biocompatibilidade entre cartilagens auriculares bovinas tratadas em solução alcalina e tela de polipropileno na correção de defeito abdominal excisional em coelhos da raça Nova Zelândia;
Monitorar clinicamente as feridas cirúrgicas decorrentes de implantes de tela de polipropileno e cartilagens auriculares bovinas tratadas em solução alcalina empregadas na correção de defeito abdominal excisional;
Empregar a termografia na avaliação da intensidade do processo inflamatório em coelhos submetidos a implantes de tela de polipropileno e cartilagens auriculares bovinas tratadas em solução alcalina para correção de defeito abdominal excisional em coelhos;
Realizar avaliação histológica de feridas cirúrgicas decorrentes de implantes de tela de polipropileno e cartilagens auriculares bovinas tratadas em solução alcalina para correção de defeito abdominal excisional em coelhos.

IV - Sumário do projeto:

Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:
Não. Pois será avaliado a resposta tecidual após implantação dos biomateriais nos animais.

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

UFG

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG 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, prevista para conclusão em 31/07/2016.

VII - Data da reunião: 14/12/2015

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG