

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

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, MICROESTRUTURAL E DE
BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE CARTILAGENS AURICULARES DE
BOVINO TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA**

Kamilla Dias Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloisio ScallaVulcani

GOIÂNIA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Kamilla Dias Ferreira

3. Título do trabalho

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, MICROESTRUTURAL E DE BIOCMPATIBILIDADE IN VIVO DE
CARTILAGENS AURICULARES DE BOVINO TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹



Documento assinado eletronicamente por **Valcinir Aloísio Scalla Vulcani, Professor do Magistério Superior**, em 29/03/2021, às 15:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **KAMILA DIAS FERREIRA, Discente**, em 29/03/2021, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no [site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1972308** e o código CRC **239B406B**.

KAMILLA DIAS FERREIRA

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, MICROESTRUTURAL E DE
BIOCOMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE CARTILAGENS AURICULARES DE
BOVINO TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora 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 S.Vulcani
-UFJ/Jataí

Comitê de Orientação:

Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva-
UFG

Prof.^a Dr^a Vanessa de Sousa Cruz-UFG

GOIÂNIA

2021

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

Ferreira, Kamilla Dias

Avaliação histológica, microestrutural e de biocompatibilidade in vivo de cartilagens auriculares de bovino tratadas em solução alcalina. [manuscrito] / Kamilla Dias Ferreira. - 2021.

xvii, 67 f.

Orientador: Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani; co-orientador Dr. Luiz Antônio Franco da Silva; co-orientador Vanessa de Souza Cruz.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui lista de figuras, lista de tabelas.

1. Biomateriais. 2. Cartilagem auricular. 3. Descelularização. 4. Osteoindução. 5. Tratamento alcalino. I. Vulcani, Valcinir Aloisio Scalla, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 311 da sessão de Defesa de Tese de **Kamilla Dias Ferreira** que confere o título de Doutor(a) em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica**.

Aos cinco dias do mês de março de dois mil e vinte e um a partir da(s) 13h30min, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, ESTRUTURAL E DE BIOCAMPATIBILIDADE IN VIVO DE CARTILAGENS ELÁSTICAS DE BOVINO”**. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), **Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani (PPGCA/UFJ)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Apóstolo Ferreira Martins (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof.ª Dr.ª Kellen de Sousa Oliveira (EVZ/UFG)** membro titular externo ao programa; **Prof. Dr. Danilo Conrado Silva (UEG)**, membro titular externo; **Prof.ª Dr.ª Vanessa Sobué Franzo (UFMT)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho, conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) **Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos cinco dias do mês de março de dois mil e vinte e um.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA, MICROESTRUTURAL E DE BIOCAMPATIBILIDADE IN VIVO DE CARTILAGENS AURICULARES DE BOVINO TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA



Documento assinado eletronicamente por **Valcinir Aloisio Scalla Vulcani, Professor do Magistério Superior**, em 05/03/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Conrado Silva, Usuário Externo**, em 07/03/2021, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Apóstolo Ferreira Martins, Médico Veterinário**, em 08/03/2021, às 08:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **VANESSA SOBUE FRANZO, Usuário Externo**, em 08/03/2021, às 11:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kellen De Sousa Oliveira, Professora do Magistério Superior**, em 08/03/2021, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Dedico este trabalho aos animais, seres evoluídos
que tanto me inspiram nessa jornada diária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa etapa prestes a ser concluída!! Muitos percalços e incertezas surgiram nesta caminhada, mas com paciência e fé Ele me permitiu seguir adiante e chegar até aqui.

Agradeço imensamente a minha família, que sempre foi e será o meu melhor e maior apoio, cada degrau conquistado devo a vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Valcinir Aloisio Scalla Vulcani, agradeço pela paciência, compreensão, auxílio e disponibilidade em suas orientações. Agradeço imensamente por tê-lo como orientador. Sem dúvidas, se tornou uma grande referência profissional para mim, da qual me espelho no caminho da docência que busco trilhar.

Aos meus coorientadores Profa. Dra. Vanessa de Souza Cruz e Prof. Dr. Luiz Antônio Franco da Silva, professores que tenho profunda admiração. Grata por todos os ensinamentos, palavras de apoio e auxílios ao longo desta caminhada.

A todos os membros da equipe experimental, pela disposição e auxílios prestados, que foram fundamentais para a realização deste projeto.

À Escola de Veterinária e Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal de Goiás, responsáveis pela minha formação acadêmica, desde a graduação. Agradeço por tudo que aprendi e vivenciei, todos esses anos. Em breve, encerro mais um ciclo, com a sensação de dever cumprido.

Aos pesquisadores do Laboratório de Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, USP-São Carlos, que viabilizaram a realização deste estudo com o preparo do processamento das cartilagens.

Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (CNPq/MCTIC)- LMN - Laboratório de Materiais Nano estruturados e DSF-LD – Laboratório de Dispositivos e Sistemas Funcionais, que possibilitaram o contato com as técnicas e a realização das análises de microtomografia computadorizada e perfilometria do material.

À CAPES pela concessão da bolsa de fomento e auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos coelhos, que com as suas valiosas vidas contribuíram com a pesquisa e com a nossa capacitação pessoal e profissional.

“Não sabendo que era impossível, ele foi lá e fez.”

Jean Cocteau.”

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Biomateriais e sua aplicabilidade	3
2.2 Telas de polipropileno no reparo tecidual	5
2.3 Cartilagens elásticas no reparo tecidual.....	6
2.4 Biocompatibilidade dos biomateriais	8
REFERÊNCIAS	12
3. JUSTIFICATIVA	19
4. OBJETIVOS.....	20
CAPÍTULO 2 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CARTILAGENS ELÁSTICAS DE BOVINOS TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA	
RESUMO	21
ABSTRACT	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CONCLUSÕES	33
REFERENCIAS	33
CAPÍTULO 3- ANÁLISE HISTOLÓGICA DE CARTILAGENS ELÁSTICAS TRATADAS EM SOLUÇÃO ALCALINA	
RESUMO	38
ABSTRACT	38
INTRODUÇÃO.....	38

MATERIAL E MÉTODOS.....	38	
RESULTADOS	42	
DISCUSSÃO	42	
CONCLUSÕES.....	43	
REFERÊNCIAS	43	
CAPÍTULO 4- COMPARAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DE CARTILAGEM ELÁSTICA TRATADA EM SOLUÇÃO ALCALINA E TELA DE POLIPROPILENO EM COELHOS (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)		
RESUMO	44	
ABSTRACT	44	
INTRODUÇÃO.....	45	
MATERIAL E MÉTODOS.....	47	
RESULTADOS	51	
DISCUSSÃO	55	
CONCLUSÕES.....	58	
REFERENCIAS	59	
CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS		64
ANEXOS.....	66	

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1 Esquema representativo descrevendo as etapas no processo de produção de biomateriais. Caracterizado desde a escolha, obtenção e desenvolvimento da matéria-prima que originará o biomaterial, que deve passar por testes específicos *in vitro* e *in vivo*, para determinar falhas e melhorias ao serem utilizados, em diversas finalidades, em animais e humanos.....3

CAPÍTULO 2

FIGURA 1 Gráfico de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da cartilagem elástica não tratada CAN (linha azul) e cartilagem tratada em solução alcalina CA72 (linha preta). A cartilagem não tratada apresenta temperatura de desnaturação próxima de 72,0°C (seta azul) e a cartilagem tratada em solução alcalina, em torno de 68,0°C. A proximidade dos valores das temperaturas de desnaturação refletem que o tratamento alcalino não alterou significativamente o colágeno presente na amostra.....25

FIGURA 2 Gráfico de curvas termogravimétricas (TGA) da cartilagem elástica não tratada CAN (linha azul) e cartilagem tratada em solução alcalina CA72 (linha preta). Primeira etapa de perda de massa referente à água presente no material (25-200°C). Segunda etapa devido à decomposição dos biopolímeros (200-450°C). Terceira etapa em função da carbonização do material orgânico (450-800°C). A massa residual da terceira etapa corresponde à composição mineral, estável até 800°C.....26

FIGURA 3 Imagens de Microtomografia em reconstrução 2D de CA72 (software – DataViwer). Observa-se em A, a região central da cartilagem que apresenta maior densidade (ponto de partida da seta amarela). Em B, nota-se a diferença de densidade da região central, na qual a cor azul representa o tecido de maior densidade e as cores rosa e amarela, as regiões de menores densidades respectivamente (ponta da seta amarela). Ainda em B, observa-se dentro do círculo branco, fibras de colágeno do tipo I do pericôndrio. * escala de coloração relativa à densidade – de baixo para cima reflete aumento da densidade.....28

FIGURA 4 Imagens de Microtomografia em reconstrução 3D de CA72 (software – CTVOX). Em A eixo Y (vertical), em B eixo Y oblíquo, em C eixo X (horizontal) e em D eixo Z. Observa-se que a microtomografia destaca a diferença entre os tecidos. Com aspecto mais escuro o tecido conjuntivo propriamente dito compondo o pericôndrio que reveste a cartilagem em ambos os lados. Ao centro, mais clara e compactada a cartilagem elástica.....28

FIGURA 5 Imagens de microtomografia da cartilagem elástica tratada em solução alcalina. A coloração branca é relativa à matriz extracelular e a coloração preta são espaços preenchidos por ar. Em A, destaque para a área delimitada pelo retângulo vermelho demonstrando lacunas sem a presença de condrócitos. São espaços arredondados que seguem o formato das células que foram retiradas com o tratamento alcalino. Em B, destacam-se os espaços entre as fibras de colágeno, mais amplos que as lacunas. Observa-se, também, lacunas parcialmente fechadas, como apontado pela seta.....42

FIGURA 6 Perfilometria de scanner a laser (LSM – 2D e 3D) de cartilagem elástica tratada em solução alcalina. Em A, imagem 2D demonstrando a rugosidade presente na cartilagem. Em B, imagem 3D (Optica + Laser) onde cores em amarelo determinam pontos de maior elevação e cores em azul pontos de menor elevação, relacionados a rugosidade presente na cartilagem tratada em solução alcalina.....44

CAPITULO 4

FIGURA 1 Registros fotográficos do local de implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em A, exposição do tecido subcutâneo e da musculatura, deixando evidenciar o interior da cavidade abdominal. Em B, fixação do implante de cartilagem elástica tratada em solução alcalina no peritônio parietal. Em C aproximação dos planos musculares com fio de poliglecaprone 2-0. Em D, realizado dermorrafia com fio náilon 3-0 em sutura padrão simples.....49

FIGURA 2 Registros fotográficos do local de implantação da cartilagem elástica tratada em solução alcalina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em

A, exposição do tecido subcutâneo e da musculatura, deixando evidenciar o interior da cavidade abdominal. Em B, fixação do implante de cartilagem elástica tratada em solução alcalina no peritônio parietal. Em C aproximação dos planos musculares com fio de poliglecaprone 2-0. Em D, realizado dermorráfia com fio náilon 3-0 em sutura padrão simples.....49

FIGURA3 Gráfico do ranqueamento da população de células polimorfonucleares (PMN) para o grupo tela de polipropileno (TP) e cartilagem elástica (CA). Nota-se aumento entre grupos e dias, sendo no 7ª dia seguido por rápido declínio. Diferença estatística dos grupos no mesmo período (*).52

FIGURA4 Fotomicrografias de cartilagens elásticas de bovinos e tela de polipropileno em diferentes períodos pós-operatório, após a implantação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em A, infiltrado inflamatório PMN (asterisco) na região periférica de cartilagem elástica tratada em solução alcalina (CA), aos sete dias pós-implantação. HE, objetiva 10x. Em B, infiltrado inflamatório na região periférica de (CA), demonstrando a presença de células gigantes (seta), aos sete dias pós-implantação. HE, objetiva 10x. Em C, infiltrado inflamatório mononuclear ao redor de CA (asterisco), aos 35 dias pós-implantação. HE, objetiva 10x. Em D, infiltrado inflamatório (asterisco) ao redor da tela de polipropileno (TP), aos 35 dias pós-implantação. HE, objetiva 5x.....53

FIGURA 5 Fotomicrografias de cartilagens elásticas de bovinos e tela de polipropileno em diferentes períodos pós-operatório, após a implantação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em A, tela de polipropileno (TP) envolvida por cápsula fibrosa (asterisco), aos 35 dias pós-implantação. HE, objetiva 5x. Em B, presença de calcificação (seta), ao redor da cartilagem alcalina, sete dias pós-implantação. CA – cartilagem; P-pericôndrio. HE, objetiva 2,5x. Em C, presença de calcificação (seta) ao redor do implante de cartilagem alcalina, sete dias pós-implantação, com formações trabeculares. HE, objetiva 5x. Em D, presença de osteoblastos em tecidos ao redor da cartilagem alcalina, 35 dias pós-implantação. HE, objetiva 5x.....55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Temperatura de decomposição (T_{onset} , °C), porcentagem de água e material inorgânico residual para as matrizes de cartilagem auricular bovina26

Tabela 2. Diâmetro dos poros do pericôndrio e da cartilagem elástica tratados em solução alcalina por 72 horas.....43

Tabela 3. Valores de rugosidade das amostras CA72 obtidas por microscopia de scanner a laser confocal.....44

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Comparativo das alterações macroscópicas observadas no período pós operatório dos animais dos grupos cartilagem elástica alcalina (CA) e tela de polipropileno (TP), dispostos em valores absolutos, relativos e valores de p , do teste de Fischer.....51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D - formato bidimensional

3D - formato tridimensional

DSC-Calorimetria Exploratória Diferencial

MEC- Matriz Extracelular

MEV- Microscopia Eletrônica de Varredura

Micro-Ct - Microtomografia computadorizada

TGA-Análise Termogravimétrica

Td- Temperatura de desnaturação

RESUMO

Com o avanço de técnicas para a correção de defeitos ou perdas teciduais, busca-se a utilização de biomateriais que promovam o reparo com o mínimo de resposta inflamatória. Estudos anteriores realizados utilizaram diferentes meios de preparo e obtenção de cartilagens auriculares de bovinos, visando o uso como biomaterial. Entretanto, um dos grandes desafios relacionados ao uso dessas membranas, refere-se na ocorrência de reações imunogênicas indesejadas, no local de implantação. Este estudo objetivou caracterizar as propriedades físico-químicas, microestruturais e histológicas de cartilagens auriculares de bovinos tratadas em solução alcalina e sua biocompatibilidade *in vivo*. Para tanto, foram realizadas análises físico-químicas para a caracterização deste material. As análises térmicas realizadas, Termogravimetria (TGA) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), verificaram as possíveis alterações do material frente as variações de temperatura em que foi submetido. As curvas da TGA demonstraram a variação da massa de cartilagens elásticas tratadas e não tratadas em função da temperatura e na DSC foi avaliado a temperatura de desnaturação do colágeno das amostras de cartilagem. As análises demonstraram que a cartilagem tratada apresentou características físico-químicas similares a cartilagem não tratada. Nas avaliações microestruturais, foi realizado a Microtomografia computadorizada 2D e 3D e a Microscopia de scanner a laser confocal. Na Micro-Ct bidimensional evidenciou que a região da cartilagem apresentou maior densidade em relação ao pericôndrio, e o tratamento alcalino foi efetivo na descelularização, pela presença de lacunas observadas na matriz extracelular entremeadas a estrutura do colágeno. A Micro-Ct tridimensional demonstrou que a cartilagem apresenta menor porosidade e poros com maior diâmetro e na Microscopia de scanner a laser notou-se que a cartilagem tratada apresenta uma rugosidade considerável, fatores que podem contribuir com a proliferação e adesão celular. Neste estudo também foram feitos o processamento histológico da cartilagem, demonstrando que o tratamento alcalino promoveu a descelularização tecidual, com a manutenção da arquitetura da matriz extracelular e da estrutura das fibras elásticas e de colágeno. Concluiu-se que o tratamento alcalino foi eficiente para promover a descelularização na cartilagem elástica. A última etapa do estudo consistiu em avaliar a biocompatibilidade *in vivo* de implantes de cartilagens elásticas tratadas com solução alcalina (CA) comparadas a tela de polipropileno (TP) em coelhos. Foi verificado que o grupo (CA) apresentou processo inflamatório menos intenso que o grupo (TP), no qual foi observado a formação de cápsula fibrosa ao redor dos implantes. Notou-se no grupo (CA) a presença de calcificação promovida pela osteoindução de osteoblastos em decorrência do processamento alcalino, o que pode ser considerado um viés de interesse para estudos posteriores, envolvendo a regeneração de tecidos ósseos, em que a aplicabilidade de tipo celular observado é viável.

Palavras-chave: biomaterial, cartilagem auricular, descelularização, osteoindução, tratamento alcalino

ABSTRACT

With the advancement of techniques for the correction of tissue defects or losses, the use of biomaterials that promote repair with a minimum of inflammatory response is sought. Previous studies carried out used different means of preparing and obtaining elastic bovine cartilage, aiming at the use as biomaterial. However, one of the major challenges related to the use of these membranes, refers to the occurrence of unwanted immunogenic reactions at the implantation site. This study aimed to characterize the physical-chemical, microstructural and histological properties of elastic bovine cartilages treated in alkaline solution and their biocompatibility *in vivo*. Therefore, physical-chemical analyzes were carried out to characterize this material. The thermal analyzes performed, Thermogravimetry (TGA) and Differential Exploratory Calorimetry (DSC), verified the possible changes in the material in view of the temperature variations in which it was submitted. The TGA curves showed the variation in the mass of treated and untreated auricular cartilages as a function of temperature and in the DSC the temperature of the collagen denaturation of the cartilage samples was evaluated. The analyzes showed that the treated cartilage had physicochemical characteristics similar to untreated cartilage. In the microstructural evaluations, 2D and 3D computed microtomography and confocal laser scanner microscopy were performed. Two-dimensional Micro-Ct showed that the cartilage region showed higher density in relation to the perichondrium, and the alkaline treatment was effective in decellularization, due to the presence of gaps observed in the extracellular matrix interspersed with the collagen structure. The three-dimensional Micro-Ct showed that the cartilage has less porosity and pores with a larger diameter and in the laser scanner microscopy it was noted that the treated cartilage has considerable roughness, factors that can contribute to cell proliferation and adhesion. In this study, histological processing of cartilage was also performed, demonstrating that the alkaline treatment promoted tissue decellularization, with the maintenance of the architecture of the extracellular matrix and the structure of elastic and collagen fibers. It was concluded that the alkaline treatment was efficient to promote decellularization in the auricular cartilage. The last stage of the study consisted of evaluating the *in vivo* biocompatibility of elastic cartilage implants treated with alkaline solution (CA) compared to polypropylene (TP) mesh in rabbits. It was found that the group (CA) had a less intense inflammatory process than the group (TP), in which the formation of a fibrous capsule around the implants was observed. It was noted in the group (CA) the presence of calcification promoted by osteoinduction of osteoblasts due to alkaline processing, which can be considered a bias of interest for further studies, involving the regeneration of bone tissues, in which the cell-type applicability observed is feasible.

Keywords: Biomaterials, auricular cartilage, decellularization, osteoinduction, alkaline treatment.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Na busca pelo aprimoramento de biomateriais originados de tecidos animais, estudos têm sido desenvolvidos para melhor adequação de implantes oriundos de membranas ao sítio receptor¹. Por definição, um biomaterial é destinado a fazer interface com sistemas biológicos no intuito de tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo^{1,2}. A utilização de biomateriais requer conhecimentos de suas propriedades e das respostas teciduais envolvidas³.

Com o intuito de reduzir as respostas antigênicas manifestadas pós-implantação, o desenvolvimento de materiais poliméricos biodegradáveis para aplicações biomédicas avançou significativamente⁴. O colágeno é o principal elemento estrutural que confere resistência ao tecido. Sabe-se que além da função de suporte, participa na diferenciação, adesão, migração e proliferação celular, exercendo também atividade antigênica^{5,6}. Dentre os biomateriais compostos por colágeno, as cartilagens elásticas, encontradas no pavilhão auricular de bovinos, são utilizadas em procedimentos de reparo tecidual⁶.

Diante deste contexto, obteve-se o método de descelularização dessas membranas elásticas em solução alcalina⁷. Esse processo é caracterizado pela remoção de células que potencializam a resposta inflamatória tecidual ao implante⁸. Desta forma, o processamento em solução alcalina busca reduzir as propriedades antigênicas, responsáveis pelo reconhecimento do material implantado como estranho ao sítio de implantação, visando a biocompatibilidade^{8,9}.

Para compreender as propriedades específicas da cartilagem auricular tratada em solução alcalina, são realizadas as caracterizações físico-químicas¹⁰. Dentre essas caracterizações destacam-se as análises termogravimétricas (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC). Ambas consistem em termoanálises com resultados expressos em gráficos que possibilitam compreender propriedades específicas frente às variações de temperatura em que o material é submetido^{11,12}. Além disso, podem ser realizadas as caracterizações microestruturais do material com a utilização da Microtomografia computadorizada (micro-Ct) e a Microscopia confocal de scanner a laser, que permitem identificar aspectos relacionados a porosidade e rugosidades do

material^{13,14}. A avaliação destes parâmetros é relevante para verificar se o tratamento alcalino interfere no diâmetro e quantidade de poros e na rugosidade do tecido.

Estudos anteriores demonstraram que a cartilagem auricular de bovinos descelularizada apresentou uma estimulação reduzida do processo inflamatório no sítio de implantação^{15,16}. Acredita-se que pelo fato da cartilagem ser um material natural composto por elastina e colágeno, ao ser submetida ao processamento alcalino, apresenta melhor adaptação quando implantada¹⁷. Entretanto, a presença de células inflamatórias e a variação dos graus de intensidade da reação tecidual é um fator a ser considerado, principalmente, quando comparado aos implantes sintéticos, como a tela de polipropileno^{18,19}.

Diante disso, existe a necessidade da realização de estudos que busquem descrever as propriedades relacionadas à cartilagem elástica tratada em solução alcalina, utilizadas como implantes, principalmente, compreendendo as modificações estruturais e celulares ocorridas em decorrência da descelularização na cartilagem elástica, bem como as reações envolvidas em decorrência da sua implantação. Com esta finalidade, foram realizadas avaliações específicas, como ensaios físico-químicos, microestruturais e avaliação da biocompatibilidade *in vivo*, demonstrando não somente as modificações estruturais sofridas nas cartilagens tratadas com solução alcalina, mas também os benefícios promovidos pelo tratamento. Para estruturar os demais artigos aqui apresentados, foi realizado uma revisão bibliográfica contemplando a aplicabilidade dos biomateriais, destacando a biocompatibilidade bem como os métodos realizados para a caracterização físico-química e microestrutural de materiais a base de colágeno e elastina a serem utilizados como implantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomateriais e sua aplicabilidade

A necessidade por materiais que possam reconstituir ou substituir tecidos e funções corpóreas, sem causar dano ao hospedeiro, proporcionou o crescimento da área de engenharia dos tecidos²⁰. Os biomateriais estão inseridos neste contexto, sendo estes dispositivos utilizados em diversas aplicações e funcionalidades^{2,20}. São definidos como uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias, utilizadas para aprimorar ou substituir, parcial ou integralmente, tecidos^{3,21}. O uso de biomateriais data-se dos primórdios do Antigo Egito (2.000 A.C.), percorrendo os séculos até chegar aos tempos atuais^{20,21}. O aprimoramento dos biomateriais é constante, sendo que o seu uso atual envolve desde o desenvolvimento de dispositivos subdérmicos para liberação de medicamentos aos bioimplantes substitutos de tecidos²².

Os quesitos observados, de um modo geral, ao desenvolver um novo biomaterial, ou aprimorar um já existente, vão desde a escolha da matéria prima, passando pela fabricação até o seu uso clínico^{2,21} (Figura 1).

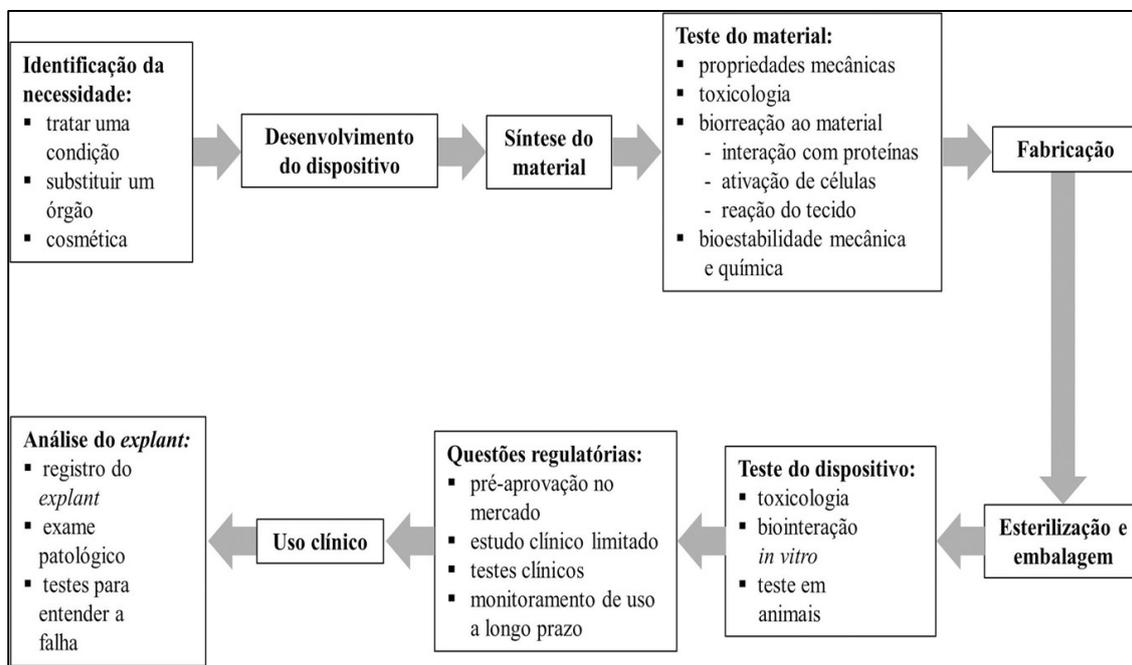


FIGURA 1: Esquema representativo descrevendo as etapas no processo de produção de biomateriais. Caracterizado desde a escolha, obtenção e desenvolvimento da matéria-prima que originará o biomaterial, que deve passar por testes específicos *in vitro* e *in vivo*, para determinar falhas e melhorias ao serem utilizados, em diversas finalidades, em animais e humanos.

Fonte: Adaptado de Ratner et al.,²¹

A aplicação biológica que determinado biomaterial se destina, é o ponto inicial para a sua escolha, tendo em vista a sua integração ao tecido receptor⁵. A interação dos tecidos ao bioimplante, associada com o tipo de resposta do receptor à presença do material, é um constante desafio no desenvolvimento de biomateriais^{3,4,23}. Essa interação é o que caracteriza o biomaterial como sendo bioinerte, bioativo e biodegradável^{8,24}.

Com relação à classificação, os biomateriais são designados de acordo com a sua composição em metais, cerâmicas, polímeros e compósitos²⁵. Além disso, podem ser classificados de acordo com a sua origem, em naturais ou sintéticos, aplicados com a finalidade de reparo e substituição de tecidos^{25,26}.

Com relação às propriedades funcionais observa-se que os biomateriais de origem sintética não apresentam agrupamentos químicos favoráveis para interação celular, liberando subprodutos tóxicos na corrente sanguínea durante sua degradação, ocasionando reações inflamatórias no receptor^{20,26}. A degradação destes materiais está relacionada com as ligações químicas instáveis de seus grupos funcionais, como os ésteres e amidas, presentes na cadeia principal do polímero sintético²⁷. Situação diferente é observada nos biomateriais de origem natural, que possuem grupamentos carboxílicos e hidroxilas, que possibilitam modificações químicas e enzimáticas, viabilizando a obtenção de uma ampla variedade de produtos com propriedades adaptáveis^{21,23,28}.

Devido à essas modificações, além da facilidade na obtenção, os polímeros naturais se destacam para a produção de biomateriais com aplicações envolvendo, principalmente, o reparo e substituição tecidual^{5,24,29}. Considera-se também características relacionadas a biocompatibilidade e biodegradabilidade, sendo que a sua degradação envolve processos enzimáticos que possibilitam uma maior propensão dos biomateriais oriundos de polímeros naturais, como o colágeno, de serem metabolizados pelo organismo do receptor, ressaltando que a taxa de degradação pode variar de acordo com cada organismo^{5,30}.

Os biomateriais naturais são originados, principalmente, de tecidos animais compostos por colágeno e elastina, como o peritônio, a cartilagem auricular e polissacarídeos, como a quitosana, sendo que essas membranas são utilizadas principalmente no reparo e substituição de tecidos^{6,17,31}. São caracterizados por apresentarem propriedades mecânicas e estruturais que possibilitam aplicações específicas e melhor adequação quando processados para posterior implantação *in vivo*^{6,24,30}.

O colágeno é o principal componente da matriz extracelular, sintetizado a partir dos fibroblastos, considerado um substrato natural para a estimulação e proliferação de células no reparo tecidual^{6,8,17}. É encontrado em abundância nas fases proliferativa e de remodelação, no intuito de reparo tecidual¹⁷. Além disso, a sua estrutura molecular tridimensional, permite aplicações para a produção de biomateriais, como biomembranas, fios de sutura, géis e esponjas^{5,17,25}. As propriedades do colágeno se diferem de acordo com o tipo de organização de suas fibras³¹. Dentre os diversos tipos de colágeno existentes, o do tipo I é o mais abundante e capaz de formar fibras espessas e organizadas que conferem resistência aos tecidos^{31,32}. Diferentemente, o colágeno do tipo III, ou imaturo, possui fibras desorganizadas, sendo este substituído pelo colágeno do tipo I, durante o processo de remodelação tecidual^{17,32}.

2.2 Telas de polipropileno no reparo tecidual

Os biomateriais poliméricos são utilizados na engenharia tecidual em *scaffolds* tridimensionais e em aplicações farmacológicas, como veículos para liberação controlada de fármacos^{1,9,16}. Além disso, são empregados *in vivo* para o restabelecimento de tecidos, tanto em animais quanto em humanos^{17,32}. Dos materiais poliméricos sintéticos utilizados para esta finalidade, destacam-se as telas de polipropileno²⁶. As propriedades inerentes as telas de polipropileno são caracterizadas pelo tamanho dos poros, resistência, gramatura do material, biocompatibilidade, resistência e deformação³³. O tamanho do poro, sendo este micro ou macroporoso, associadas a gramatura da tela, sendo alto (entre 80 g/m²-100g/m²), médio (entre 50-80 g/m²) e baixo (50 g/m²), são considerados uma das principais propriedades para desenvolver telas com respostas satisfatórias quando implantadas³⁸.

As primeiras telas confeccionadas foram as de poliamida, para o reparo de defeitos da parede abdominal. Porém, devido ao material sofrer degradação hidrolítica, apresentava facilidade de perda da força tensil, após ser implantado^{33,34}. A tela de polipropileno surgiu como um material sintético mais aprimorado substituindo as telas de poliamida, ao apresentarem respostas satisfatórias quando utilizadas no reparo de defeitos herniários³⁵. Ainda continua sendo um dos materiais sintéticos mais utilizados em diversos tipos de correções cirúrgicas, em especial nas cirurgias reconstrutivas³³.

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^{33, 34,36}. 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^{37,38}. 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^{33,35}.

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^{33,38}. Os resultados obtidos com o uso da tela de polipropileno dependem da interação com o tecido receptor que são influenciados diretamente pelas propriedades biomecânicas da tela^{33,34,38}. A caracterização dessas propriedades permite compreender o comportamento específico deste tipo de material quando destinado ao uso como implante^{17,20,35}. No intuito de reduzir essas variações na adaptação entre o material implantado e tecido tem-se utilizado telas revestidas com gel de colágeno, quitosana e pericárdio bovino³⁶.

Essas características foram avaliadas em estudo utilizando tela de polipropileno, com e sem revestimento de colágeno, implantadas para correção de defeitos na parede abdominal em ratos. Observou-se que houve considerável redução de aderências no grupo avaliado com o uso da tela com colágeno em relação ao grupo controle, que recebeu implante da tela de polipropileno sem colágeno. Os grupos foram reavaliados após 30 dias, sendo que ocorreu maior incorporação da tela de polipropileno com colágeno em relação ao grupo controle³⁹.

2.3 Cartilagens auriculares no reparo tecidual

Buscando respostas antigênicas satisfatórias, com a implantação de biomateriais, observa-se um constante crescimento nas pesquisas utilizando membranas de origem natural^{9,16, 40}. A cartilagem auricular de bovinos se adequa neste contexto, por se tratar de um tecido de consistência rígida sendo a sua matriz extracelular composta por colágeno e elastina associados à moléculas de proteoglicanos. Além disso, apresenta em sua matriz, fibras colágenas e elásticas^{9,40}.

Devido às diversas propriedades, como reduzida antigenicidade e biocompatibilidade satisfatória, as membranas com o colágeno em sua composição são utilizadas como biomaterial^{9,41}, demonstrando promover um suporte para a proliferação celular estimulando a reparação tecidual e estabilidade mecânica do tecido lesionado^{42,43}. Outra vantagem na utilização de tecidos cartilagosos que possuem o colágeno em sua composição é o fato de sua estrutura permitir que ocorra modificações químicas, gerando materiais com diferentes propriedades^{17,40}. Uma característica relevante é a presença de sequências de suas cadeias moleculares que permanecem inalteradas quando realizados os processamentos enzimáticos ou químicos no tecido cartilaginoso^{9,13,41}. As fibras elásticas também estão presentes na cartilagem auricular de bovinos, sendo um componente essencial da matriz extracelular. Um dos principais constituintes dessas fibras é a elastina, que promove a elasticidade do tecido⁴².

Os substitutos de tecidos e órgãos, passam pelo processo de descclularização^{9,45}, que consiste na remoção de componentes celulares e resíduos antigênicos, sem alterar a matriz extracelular remanescente⁴⁶. A descclularização é realizada através de métodos específicos de tratamentos^{45,47}. Dentre esses, destacam-se os métodos físicos, químicos e enzimáticos⁵¹. Neste contexto, o tratamento alcalino realizado nas cartilagens elásticas de bovinos busca diminuir a antigenicidade e, conseqüentemente, as respostas teciduais exacerbadas, decorrentes da implantação de biomateriais^{9,48}.

O tratamento alcalino consiste em um processamento químico, no qual a membrana é submetida a imersão em solução alcalinizada, depH13, por 72 horas, seguidas de lavagens, congelamento e liofilização^{7,9,48}. Como resultado, obtêm-se a retirada de condrócitos, presentes na matriz extracelular e de componentes imunogênicos, reconhecidos como estranhos ao tecido receptor^{7,9,49}. Desta forma, com a membrana descclularizada, é esperado que as células do tecido receptor *in vivo* migrem, promovendo a adesão e proliferação no tecido implantado^{48,49}.

Ressalta-se que o sucesso no processo de implantação da biomembrana somente ocorrerá se o processo de descclularização for eficaz na remoção de células e de resíduos antigênicos, favorecendo a biocompatibilidade *in vivo*^{9,50}. Caso isso não ocorra, será deflagrado uma reação imunomediada exacerbada por parte do sítio receptor⁵¹. Portanto, o indicado é que nas biomembranas originadas de tecidos animais, com finalidade de utilização para implantes, realize o processamento com substâncias

químicas ou enzimáticas que promovam a descelularização tecidual no intuito de reduzir a antigenicidade^{52,53}.

2.4 Biocompatibilidade dos biomateriais

Características relacionadas à biocompatibilidade são fundamentais para a escolha de um biomaterial. A biocompatibilidade permite compreender se o material desenvolvido é apropriado para exercer sua função com reações inflamatórias compatíveis ao sítio de implantação^{6,17,54}. Para utilização de um biomaterial é indispensável o conhecimento das suas características estruturais e das consequências da sua implantação, de modo que a avaliação *in vitro* é um estágio primordial para posteriores estudos *in vivo*^{38,55}. A biocompatibilidade envolve a interação e respostas teciduais promovidas pelo implante no tecido receptor. Entende-se por biocompatibilidade, a característica de um biomaterial de não causar reações indesejáveis, afetando a integridade dos tecidos, executando a função almejada^{8,56}.

De um modo geral, os tecidos comportam-se de forma diferenciada, quando em contato com o implante, desencadeiam respostas imunológicas adversas, que muitas vezes resultam na rejeição do mesmo, motivo pelo qual a seleção e o preparo do biomaterial deve ser criteriosa^{53,57}. Os parâmetros relacionados à avaliação da biocompatibilidade de biomateriais se tornaram vigentes com a criação do documento ISO 10993-6, composto por uma série de normas e testes estabelecidas para o uso de um determinado biomaterial⁵⁸.

2.5 Caracterizações físico-químicas e microestruturais dos biomateriais

As propriedades físico-químicas e microestruturais dos biomateriais devem ser consideradas no momento da sua escolha, visto que a avaliação dessas propriedades irá auxiliar na compreensão do comportamento *in vivo* do biomaterial quando implantado^{10,11,60}. A análise térmica é uma técnica analítica na qual é capaz de avaliar as propriedades térmicas e estrutural dos materiais⁶¹. Essas avaliações consistem em acompanhar as variações térmicas, estruturais e subprodutos da reação de uma amostra submetida a uma programação controlada de temperatura⁶².

As análises físico-químicas são representadas pela análise Termogravimétrica (TGA) e pela Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), que são utilizadas para verificar possíveis modificações estruturais em diferentes

temperaturas^{11,61}. Na TGA, da sigla em inglês *Thermo Gravimetric Analysis*, são analisados as alterações da massa do material quando sujeito a uma variação constante de temperatura^{10,60}, ou seja, são obtidas informações relacionadas à composição e estabilidade térmica do material⁶². A técnica consiste em mensurar a massa da amostra em função da variação de temperatura e do tempo em condições controladas de aquecimento com fluxo de gases em vazão determinada ou sem fluxo⁶³.

A análise pela Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) permite determinar a temperatura de desnaturação (Td) do colágeno⁶⁴. A desnaturação em si, consiste na perda da estrutura tridimensional com o seu desnovelamento, sendo que os efeitos do aquecimento podem ser reversíveis ou irreversíveis⁶⁶. Os resultados das análises térmicas são expressos por curvas em gráficos, que demonstram as modificações obtidas pelo material de acordo com as variações de temperatura em que foi submetido⁶⁵. Nesta técnica, mensura-se a diferença de energia fornecida à substância termicamente inerte e a um material referência, submetidos a uma programação controlada de temperatura^{64,65}.

A microtomografia computadorizada (micro-Ct) 2D e 3D e Microscopia com scanner a laser confocal, também conhecida como microscopia confocal, são utilizadas na caracterização microestrutural do material conduzidas através da captação de diversos ângulos de visualização de até 360 graus, no qual é possível reconstruir em três dimensões uma imagem da amostra a ser analisada. A microtomografia possibilita inspecionar características como a espessura, volume e densidade da amostra^{66,67}. O exame microtomográfico utiliza a atenuação de raios X para a formação das imagens sendo aplicado na avaliação de pequenas amostras. Além disso, permite a obtenção de imagens da estrutura interna dos mais variados tipos de amostras que são escaneadas⁶⁷. Dentre as vantagens com a utilização desta técnica incluem a necessidade de preparações da amostra que são mínimas e a possibilidade de realização de escaneamentos seriados sem alterações no material^{67,68}.

Na Microscopia de scanner a laser é possível observar a presença de rugosidades e deformações presentes no tecido. Essa técnica ultrapassa as limitações da microscopia convencional devido a geração de imagens com qualidade e por utilizar uma técnica não destrutiva⁶⁹. Aliados à alta precisão e grande velocidade na geração destas imagens uma das grandes vantagens na execução da microscopia confocal é a sua capacidade para obter secções óticas da amostra em diferentes profundidades⁷⁰.

2.5 Avaliação da resposta tecidual aos implantes de biomateriais

A resposta tecidual ao biomaterial pós-implantação, dependerá de características relacionadas ao material como a sua composição, porosidade, forma, e também de fatores inerentes ao procedimento de implantação, como o tamanho da incisão cirúrgica e posicionamento dos implantes^{17,44,71}. É relevante pontuar que, mesmo sendo mínima a antigenicidade promovida por determinado material implantado, sempre ocorrerá o processo inflamatório, para à formação de tecido cicatricial⁷¹. Para verificar a biocompatibilidade de determinado material aspectos macroscópicos são considerados.

A avaliação macroscópica é realizada para quantificar possíveis complicações relacionadas ao procedimento de implantação, analisando a integridade do enxerto, observando a presença e intensidade de parâmetros como deiscência, evisceração, presença de infecção e formação de aderências^{71,72}. Em estudo realizado em ratos, foram avaliadas a formação de aderências com a implantação de dois tipos distintos de biomateriais, a tela de polipropileno e a membrana de submucosa de intestino delgado para reparo da parede abdominal. As aderências foram observadas entre o conteúdo intra-abdominal e a face interna do implante, sendo graduadas em escores, de acordo com a intensidade apresentada. Constatou-se que as aderências foram menores nas membranas de submucosa de intestino delgado em relação à tela de polipropileno⁷³.

Aliado a avaliação macroscópica realiza-se a análise histológica, considerada um dos principais métodos para avaliar a resposta tecidual frente aos componentes dos diferentes biomateriais utilizados como implantes⁷⁴. Deste modo, é possível avaliar a viabilidade e biocompatibilidade do implante diante do comportamento tissular apresentado em resposta a esse processo^{3,75}. Com a utilização da coloração, como Hematoxilina e Eosina (HE), a técnica possibilita analisar e descrever tipos celulares pelas respostas apresentados pelo tecido aos diferentes tipos de biomateriais utilizados, correlacionando-as fases do processo inflamatório^{74,75}.

Isso ocorre por serem evidenciados indicadores, que caracterizam cada fase desse processo, como edema intersticial, necrose, deposição de fibrina, infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica, angiogênese, processo granulomatoso e fibrose⁷⁵. A intensidade da reação inflamatória é observada pelo predomínio de eventos exsudativos^{43,76}. Na fase inflamatória o processo inicia-se no momento da implantação do biomaterial, se estendendo por período de, aproximadamente, dois a quatro dias^{10,77}. Nessa fase o tecido lesionado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado a fim de

promover o reparo tecidual. São observados também o predomínio de células inflamatórias como polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos, além da produção de proteínas de fase aguda e alterações microvasculares, no qual o predomínio de determinado tipo celular auxiliará na caracterização do processo inflamatório como agudo ou crônico⁷⁶⁻⁷⁹.

A fase proliferativa se caracteriza por intensa neoformação capilar, proliferação fibroblástica e produção de matriz de colágeno, responsáveis pela formação de tecido de granulação⁷⁸. A neovascularização é observada nos primeiros dias após a implantação do biomaterial^{5,14,76}. A matriz extracelular, que é sintetizada pelos fibroblastos, tem papel fundamental nesta fase do reparo^{3,11}. Isso se deve ao fato da matriz extracelular (MEC) ser um complexo de macromoléculas que, além do suporte estrutural para os tecidos, também modula várias funções dos componentes celulares, tais como a proliferação e a diferenciação celular^{11,80}.

A última fase consiste na remodelação tecidual, caracterizada pela substituição de tecido de granulação por tecido conjuntivo denso e pela reorganização e deposição de colágeno mais intensa^{5,80}. O processo inflamatório persistente é característico da implantação de biomateriais que estimulam reações de corpo estranho, desencadeando reações bioquímicas, celulares e imunológicas exarcebadas⁸¹. Esse processo é mediado pela ação dos linfócitos T e dos antígenos do complexo de histocompatibilidade maior (MHC)⁸².

O uso de membranas descelularizadas obtidas de tecidos de animais promove a redução de respostas antigênicas, características do processo de implantação⁸¹⁻⁸³. Ressalta-se ainda que qualquer implante, seja de origem sintética ou natural, induzirá a resposta tecidual⁷⁷. Deste modo, o uso de biomembranas descelularizadas visa reduzir a intensidade desta resposta inflamatória, observada frequentemente, nos materiais disponíveis que são utilizados para o uso como biomateriais.

O desenvolvimento e caracterizações físico-químicas, microestruturais e biológicas de biomateriais é uma ciência interdisciplinar e complexa, cujo intuito é analisar e prever os mecanismos moleculares da composição dos materiais e correlacionar com a biocompatibilidade. Neste contexto, os materiais naturais, principalmente derivados de origem animal, como o colágeno, tem apresentado biocompatibilidade superior em relação aos materiais sintéticos. Sua associação com outros materiais para a obtenção de compósitos é importante, pois agrega propriedades de matérias-primas diferentes, otimizando a bioatividade do implante.

REFERÊNCIAS

1. Hossain A, Roy S, Guin PS. The Importance of Advance Biomaterials in Modern Technology: A Review. *Asian Journal of Research in Chemistry*. 2017; 10(4):441-53.
2. Vig K, Chaudhari A, Tripathi S, et al. Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4):789-792.
3. Shafiee A, Atala A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu Rev Med*. 2017;68:29-40.
4. Bruzauskaite, I; Bironaite, D; Bagdonas,E; Bernotienė; E. Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*. 2016;68(3):355–369.
5. Rocha LB, Goissis G, Rossi MA. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. *Biomaterials*. 2002; 23(2):449-56.
6. Vulcani VAS, Rabelo,RE, Rabbers, AS, Ferreira,K.D, Pinheiro G.Cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina avaliação e potencial para aplicação como biomaterial. *Investigação*.2016; 1(16): 50-52.
7. Goissis,G; Parreira,DR; Suzigan, S. A study on the biocompatibility and integration of acellular polyanionic collagen:elastin matrices by soft tissue. *Rev. Bras. Eng. Bioméd*. 2003; 19(3), p.167-173.
8. Horn, M.M.; Martins,VCA.; Plepis, AMG. Interaction of anionic collagen with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*. 2009; 77(2), p. 239-243.
9. Bet, MR; Goissis,G; Lacerda, C.A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxyamide side chains. *Biomacromol*. 2001; 2:1074–1079.
10. Sripriya R, Kumar R, Balaji S, Kumar MS, Sehgal PK. Characterizations of polyanionic collagen prepared by linking additional carboxylic groups. *React Funct Polym*. 2011;71:62-69.
11. Ungureanu DN, Angelesei N, Bacinschi Z, Stoian EV, Rizeseu CZ. Thermal stability of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowders. *International Journal of Biology and Biomedical Engineering*. 2011; 5(2): 57-64.
12. Wang, L.; Liang, Q.; Wang, Z.; Xu, J.; Liu,Y.; Ma,H. Preparation and characterization of type I collagens from skin of Amur sturgeon. *Food Chem.*, v.148, p.410-414, 2014.

13. Bartos, M.; Suchy, T.; Tonar, Z.; Foltán, R.; Kalbacva, M.A. Micro-CT in tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application. *Ceramics-Silikáty*. 2018; v 62 (2), 194-199.
14. Attik, G. N., Gritsch, K., Colon, P., Grosogeat, B. Confocal Time Lapse Imaging as an Efficient Method for the Cytocompatibility Evaluation of Dental Composites. *J. Vis. Exp.* 2014; (93), e51949.
15. Vulcani, V.A.S.; Macoris, D.G.; Plepis, A.M.G., et al. Implantação de biomembrana de colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede abdominal de equinos. *Ciência Rural*. 2013. v.43, n 8, p.1422-1428.
16. Rosa, F.P.; Lia, R.C.; Souza, K.O.; Goissis, G.; Junior, E.M. Tissue response to polyanionic collagen: elastin matrices implanted in rat calvária. *Biomaterials*. 2003; v. 24, p. 207-212.
17. Rabbers, A.S., Rabelo, R.E., Oliveira, L.P., Ribeiro, M., Martins, V.C.A., Plepis, A.M.G., Vulcani, V.A.S. Efeito aditivo do óleo de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na biocompatibilidade de membranas de colágeno e gelatina em implantes subcutâneos. *Arq. Bras. Med. Veterinário. Zootec.* 2019; 71 (3), 811-818.
18. Klink CD, Junge K, Binnebosel M, Alizai HP, Otto J, Neumann UP, et al. Comparison of long-term biocompatibility of PVDF and PP meshes. *J Invest Surg.* 2011; 24(6):292-9.
19. Anderson, J.M. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001; (31); p.81.
20. Stoop R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury.* 2008; (39) Suppl 1:S77-S87.
21. Ratner B D, Hoffman, A. S.; Schoen, F. J.; Lemons, J.E. *Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine*. 2013; 3(8).
22. Xu, Y. et al. Biomaterials for stem cell engineering and biomanufacturing. *Bioactive Materials.* 2019; (4), p.366-379.
23. Gretzer, C.; Emanuelsson, L.; Liljensten, E.; Thomsen, P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2006; 17(6):669-87
24. Horn, M.M.; Martins, V.C.A.; Fernandes, Y.O.M.; Vulcani, V.A.S.; Plepis, A.M.G. Development and characterization of collagen/gelatin films and gels incorporated with pequi oil. 2018; *Journal of Applied Polymer Science*.
25. Santos, G. G.; Marinho, S.; MIGUEL, F. B. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas.* 2013; (12), n. 3, p. 367-373.

26. Miserez, M; Jairam,AP; Boersema, GSA; Bayon, Y. Resorbable synthetic meshes for abdominal wall defects in preclinical setting: a literature review. *J Surg Res.* 2019; 237:67–75.
27. Deeken CR, Lake SP. Mechanical properties of the abdominal wall and biomaterials utilized for hernia repair. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2017;(74):411-27
28. Horn, M.M.; Martins, V.C.A.; Plepis, A.M.G. Influence of collagen addition on the thermal and morphological properties of chitosan/xanthan hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2015;(80), p.225-230.
29. Chattopadhyay, S.; Raines, R. T. Collagen-based biomaterials for wound healing. *Biopolymers.* 2014. (101), n. 8, p. 821-833
30. Buchaim, R.L. et al. Biocompatibility of anionic collagen matrices and its influence on the orientation of cellular growth. *Brazilian Dental Science,* (10); n.3, p.12-20, 2007.
31. Iacob, A-T; et al. Preparation, Characterization and Wound Healing Effects of New Membranes Based on Chitosan, Hyaluronic Acid and Arginine Derivatives. *Polymers.* 2018; (10).607.
32. Campbell, J.J. et al. Development of three-dimensional collagen scaffolds with controlled architecture for cell migration studies using breast cancer cell lines. *Biomaterials.* 2017;(114), p.34-43.
33. Biondo-Simões ML, Schiel WA, Arantes M, Silveira TD, Robes RR, Tomasich FD. Comparison between polypropylene and polypropylene with poliglecaprone meshes on intraperitoneal adhesion formation. *Rev Col Bras Cir.* 2016;43(6):416-23.
34. Bilsel, Y.; ABCI, I. The search for ideal hernia repair; mesh materials and types. *Int J Surg.* 2012; (10) 6, p. 317-321.
35. Coda, A.; Lamberti, R.; Martorana, S. Classification of prosthetics used in hernia repair based on weight and biomaterial. *Hernia.* 2012; (16); 1, p. 9-20, 2012.
36. Jacob DA, Schug-Pass C, Sommerer F, Tannapfel A, Lippert H, Kockerling F. Comparison of a lightweight polypropylene mesh and a large-pore knitted PTFE mesh. Biocompatibility in a standardized endoscopic extraperitoneal hernia model. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397(2):283-9
37. 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.* 2013; (150); n. 1, p. 52-59.
38. Utrabo, Cal; Czczko,NG; Busato, CR; Lipinski,MR; Malafaia,O. Estudo tensiométrico de telas utilizadas na correção de defeito na parede abdominal ventral de ratos. *ABCD.* São Paulo. 2017; 30(3), 165-168.

39. Riet M V, Burger JW, Bonthuis F, Jeekel J, Bonjer HJ. Prevention of adhesion formation to polypropylene mesh by collagen coating: a randomized controlled study in a rat model of ventral hernia repair. *Surg Endosc.* 2004;18(4):681-5.
40. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, Wei J. Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: a review. *Polymers.* 2016;8:115
41. Vulcani, VAS, Macoris DG, Plepis AMG. Biomateriais para reparação cirúrgica da parede abdominal em animais domésticos revisão. *Arq. Ciênc. Vet. Zool.* 2009; 12(2): 141-147.
42. Karsdal, M.A. *Biochemistry of Collagens, Laminins, and Elastin: Structure, Function, and Biomarkers.* Elsevier Academic Press, London, 2016, 238p.
43. Meyer, M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMed Eng OnLine.* 2019;18:24.
44. Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, et al. Cartilage tissue engineering: molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. *Biochim Biophys Acta.* 2014; (2):38.
45. Chen YC, Chen RN, Jhan HJ, et al. Development and Characterization of Acellular Extracellular Matrix Scaffolds from Porcine Menisci for Use in Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015;21(9):971-986.
46. Crapo, PM; Gilbert, TW; Badylak, SF. Uma visão geral dos processos de descellularização de tecidos e órgãos inteiros. *Biomateriais.* 2011; (32): 3233-3243
47. Petrella, G.; Buonomo, O. C.; Mattei, M.; Orlandi, A. Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.* 2017; (78); 420-426,
48. Goissis, G. et al. Preparation and characterization of collagen-elastin matrices from blood vessels intended as small diameter vascular grafts. *Artificial Organs.* 2000; v (24); 3, p.217-223
49. Cunha, M.R; Santos, A.R; Goissis, G; Genaria, S.C, et al. Characterization of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic collagen scaffolds in ovariectomized rats. *Mat.Res.* 2010; (13);.2; 239-244.
50. Gilbert, T. W.; Sellaro, T. L; Badylak, S. F. Descellularization of tissues and organs. *Biomaterials.* 2006;27(19):3675- 83,.
51. Shin S.C., Park H.Y., Shin N., Jung D., Kwon H., Kim J. M., Wang S., Lee J., Sung E., Park G.C. & Lee B. 2018. Evaluation of decellularized xenogenic porcine auricular cartilage as a novel biocompatible filler. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2018; 106(7):2708-2715.

52. Boekema, B.K.H.L. et al. Effect of pore size and cross-linking of a novel collagen-elastin dermal substitute on wound healing. *Journal Materials Science: Materials in Medicine*. 2014; (25), p.423-433.
53. Chan, E.C. et al. Three Dimensional Collagen Scaffold Promotes Intrinsic Vascularisation for Tissue Engineering Applications. *PLoS ONE*. 2016; (11); 2.
54. Onuki Y., Bhardwaj U., Papadimitrakopoulos F.; Burgess D.J. A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *J diabetes Sci Technol*. 2008; 2: 1003–1015.
55. Grover, C.N.; Cameron, R.E; Best, S.M. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2012; (10); 62-74.
56. Grigore, M. E. Biomaterials for cartilage tissue engineering. *Journal of Tissue Science & Engineering*. 2017; (8), n. 1, p. 1-6.
57. Keane TJ, Badylak SF. Biomaterials for tissue engineering applications. *Semin Pediatr Surg*. 2014;23(3):112-118.
58. ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects after implantation. *International Standard*. 2007;2:1-19.
59. Naveh, G. R.; Brumfeld, V.; Dean, M.; Shahar, R.; Weiner, S. Direct microCT imaging of non-mineralized connective tissues at high resolution. *Connective Tissue Research*. 2014; (55); 1;52-60.
60. Horn, M.M.; Martins, V.C.A.; Plepis, A.M.G. Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. *Carbohydrate Polymers*. 2009. (77); 2; 239-243.
61. Denari, G.B.; Cavalheiro, E.T.G. Princípios e aplicações de análise térmica. São Carlos: IQSC/USP, 2012. Ionashiro, G.M. Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria diferencial exploratória diferencial. Araraquara: Giz editorial; 2004.
62. Daskalova, A. et al. Controlling the porosity of collagen, gelatin and elastin biomaterials by ultrashort laser pulses. *Applied Surface Science*. 2014; (292); 367-377.
63. Lucas, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E., *Caracterização de Polímeros – Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica*, Editora e-Papers, 2001.
64. Zidek, J V L,; Abdel-Mohsen AM, Chmelik J, Zikmund T, Brtnikova J, Jakubicek R, et al. Accurate micro-computed tomography imaging of pore spaces in collagen-based scaffold. *J Mater Sci Mater Med*. 2016; 27:110.
65. Bogner, A. et al. A history of scanning electron microscopy developments: towards wet-stem imaging. *Micron*, New York. 2007; (38); 4; 390-401.

66. Costa BD, Moraes AN, Camargo NH, Oleskovicz N, Gava A, Dallabrida AL., Regalin D. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 2015;35(2):177-187.
67. Plessis A, Broeckhoven C, Guelpa A, Le Roux SG. Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. *GigaScience.* 2017; 6:1–11.
68. Redemann S, Muller-Reichert T. Correlative light and electron microscopy for the analysis of cell division. *J Microsc.* 2013;251:109-12.
69. S. Wang, I.V. Larina. High-resolution imaging techniques in tissue engineering. *Monitoring and Evaluation of Biomaterials and their Performance In Vivo.* Woodhead Publishing, 2017, 393p.
70. Daculsi, G.; Legeros, R. Z.; Deudon, C. Scanning and transmission electron microscopy, and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. *Osseo-coalescence versus osseo-integration. Scanning Microscopy,* 1990. (4); 309–314.
71. Figueiredo A, Coimbra P, Cabrita A, Guerra F, Figueiredo M. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physicochemical characteristics and in vivo inflammatory response. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;1;33(6):3506-13.
72. Meyer, M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *BioMed Eng OnLine.*2019;18:24.
73. Soiderer EE, Lantz GC, Kazacos EA, Hodde J P, Wiegand RE. Morphologic study of three collagen materials for body wall repair. *Journal of Surgical Research.* 2004;118 (2): 161-175.
74. Franz S, Rammelt S, Scharnweber D, Simon JC. Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. *Biomaterials.* 2011; 2(28):6692-709.
75. Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008. (29) 20, p. 2941-2953, 2008.
76. Morais JM, Papadimitrakopoulou F, Burgess DJ. Biomaterials tissue interactions: possible solutions to overcome foreign body response. *AAPS J.* 2010;12(2): 188-196.
77. Yang W, Lee S, Jo YH, et al. Effects of natural cartilaginous extracellular matrix on chondrogenic potential for cartilage cell transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(4):1247-1250
78. Mizutani N, Kageyama S, Yamada M, Hasegawa M, Miyamoto K, Horiuchi T. The behavior of ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. *J Artif Organs.* 2014. 17:50–59

79. Anderson, JM. Biological responses to materials. *Annu Rev Mater Res.* 2001;31(2):81-110.
80. Kiradzhyska DD, Mantcheva RD. Overview of Biocompatible Materials and Their Use in Medicine. *Folia Med (Plovdiv).* 2019;61(1):34-40.
81. 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,* 2005;11(2):25-29.
82. Eunju, O. Roles of major histocompatibility complex class II in inducing protective immune responses to influenza vaccination. *Journal of virology.* 2014; 88;7764-7775.
83. Kew SJ, Gwynne JH, Enea D, et al. Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials. *Acta Biomater.* 2011;7(9):3237-3247

3. JUSTIFICATIVA

Diferentes tipos de materiais são utilizados para a obtenção de biomateriais. A cartilagem auricular tratada em solução alcalina possui um potencial irrefutável como biomaterial, porém ainda necessita de estudos que possam respaldar o seu uso em outras espécies animais e em humanos. Neste contexto, as análises propostas e realizadas no presente estudo são justificáveis, pois ao reconhecer as capacidades de um determinado material é uma forma de compreender o desempenho e possíveis respostas teciduais deflagradas com o seu uso, podendo ser favoráveis ou inesperadas. Além disso, até o presente momento, não foram realizados estudos sobre a caracterização físico-química e a microestrutura da cartilagem auricular tratada em solução alcalina. Acrescenta-se ainda que não há registros de pesquisas relacionadas ao estudo da biocompatibilidade *in vivo* desse material implantado em coelhos sendo comparado com a tela de polipropileno. Deste modo, acredita-se que o presente estudo possa contribuir positivamente com demais pesquisas que serão realizadas futuramente, ao buscar elucidar algumas dúvidas relacionadas as características do material e das respostas teciduais atribuídas às cartilagens auriculares de bovino tratadas em solução alcalina quando implantadas em coelhos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar as propriedades físico-químicas, microestruturais e histológicas de cartilagens auriculares de bovinos tratadas em solução alcalina e sua biocompatibilidade *in vivo*.

4.1.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a cartilagem auricular de bovinos tratada em solução alcalina por análises físico-químicas e microestruturais
- Analisar a cartilagem auricular tratada de bovinos tratada em solução alcalina por avaliação histológica
- Avaliar a biocompatibilidade *in vivo* da cartilagem auricular bovina tratada em solução alcalina comparada a tela de polipropileno.

1 **CAPÍTULO 2**

3 **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROESTRUTURAL DE** 4 **CARTILAGENS AURICULARES DE BOVINOS TRATADAS EM SOLUÇÃO** 5 **ALCALINA**

6 [Physical-chemical and micro-structural characterization of auricular cartilage cattle
7 treated in alkaline solution]

8 **K.D. Ferreira^{1*}, V.A.S. Vulcani²**

9 ¹Aluna de pós-graduação – Escola de Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de
10 Goiás - Goiânia, GO

11 ²Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Jataí -
12 Jataí, GO

13 Manuscrito formatado conforme as normas para publicação.

15 **RESUMO**

17 A cartilagem auricular bovina é constituída por colágeno e elastina, o que potencializa o
18 seu uso como biomaterial. A caracterização físico-química e microestrutural é importante
19 para compreender aspectos da sua composição, bem como compreender seu
20 comportamento quando em contato com células ou tecidos animais. O objetivo deste
21 estudo foi caracterizar a cartilagem auricular de bovinos tratada em solução alcalina por
22 meio de análises físico-químicas e microestruturais. Foi realizada Análise Térmica de
23 cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina de pH 13 por 72 horas (CA72) e de
24 cartilagens não tratadas (CAN), empregando-se calorimetria exploratória diferencial
25 (DSC) e análise termogravimétrica (TGA). A análise microestrutural foi realizada para
26 amostras de (CAN) empregando-se microtomografia computadorizada (Micro- Ct), e
27 microscopia de scanner a laser. As análises da TGA e DSC demonstraram que o
28 tratamento alcalino por 72 horas, realizado na cartilagem auricular, não interferiu
29 significativamente nas características físico-químicas do material. Nas avaliações
30 microestruturais, a Micro- Ct bidimensional evidenciou que a região da cartilagem
31 apresenta maior densidade em relação ao pericôndrio, e o tratamento alcalino promoveu
32 a descellularização, pela presença de lacunas na matriz extracelular entremeadas a
33 estrutura do colágeno. A Micro- Ct tridimensional demonstrou que a cartilagem apresenta
34 menor porosidade e poros com maior diâmetro e na microscopia de scanner a laser notou-
35 se que a cartilagem tratada apresenta uma rugosidade considerável, fatores que podem
36 contribuir com a proliferação e adesão celular. Conclui-se que a cartilagem tratada
37 apresentou características físico-químicas similares a cartilagem não tratada e
38 microestruturais que favorecem a proliferação e adesão de células, como condroblastos e
39 osteoblastos.

41 **Palavras-chave:** biomaterial, cartilagem, colágeno, caracterização, tratamento alcalino.

43 **ABSTRACT**

44 Bovine auricular cartilage is composed of collagen and elastin, which enhances its use as
45 biomaterial. Physical-chemical and microstructural characterization is important to
46 understand aspects of its composition, as well as to understand its behavior when in
47 contact with animal cells or tissues. The objective of this study was to characterize the
48 bovine auricular cartilage treated in alkaline solution by means of physical-chemical and

49 microstructural analyzes. Thermal analysis of auricular cartilages treated in alkaline
50 solution for 72 hours of pH 13 (CA72) and untreated cartilages (CAN) was performed
51 using differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetric analysis (TGA).
52 Microstructural analysis was performed for (CAN) samples using computerized
53 microtomography (Micro-Ct) and laser scanning microscopy. Analyzes of TGA and DSC
54 showed that the alkaline treatment for 72 hours, performed on elastic cartilage, did not
55 significantly interfere with the physical and chemical characteristics of the material. In
56 microstructural evaluations, the two-dimensional Micro-Ct showed that the cartilage
57 region has greater density in relation to the perichondrium, and the alkaline treatment
58 promoted decellularization, due to the presence of gaps in the extracellular matrix
59 interspersed with the collagen structure. The three-dimensional Micro-Ct demonstrated
60 that the cartilage has less porosity and pores with a larger diameter and in the laser scanner
61 microscopy it was noted that the treated cartilage has considerable roughness, factors that
62 can contribute to cell proliferation and adhesion. It is concluded that the treated cartilage
63 showed physicochemical characteristics similar to untreated cartilage and
64 microstructurals that favor the proliferation and adhesion of cells, such as chondroblasts
65 and osteoblasts.

66 **Keywords:** biomaterial, cartilage, characterization, alkaline treatment.

67 1.INTRODUÇÃO

68
69
70 Os biomateriais que atuam como suporte estrutural e estimuladores de
71 crescimento tecidual, denominados de matrizes ou *scaffolds*, tem sido amplamente
72 estudado nas últimas décadas. Estes materiais podem ser aplicados *in vitro*, para a
73 proliferação e diferenciação celular ou diretamente implantados em humanos e animais
74 como meio para a colonização de células e desenvolvimento tecidual (O'Brien, 2011;
75 Jafari et al., 2017)

76 As características desejáveis para estas matrizes incluem biocompatibilidade;
77 atoxicidade; estabilidade mecânica adequada ao local do implante; estrutura
78 tridimensional com rede de poros interconectadas e com dimensões variáveis de acordo
79 com o tipo de célula que irá se desenvolver. Diversos materiais sintéticos e naturais são
80 empregados para a construção destes biomateriais, dentre eles os tecidos cartilagosos
81 descelularizados (Zhao et al., 2018; Walter et al., 2019).

82 A cartilagem auricular é uma variedade do tecido cartilaginoso, encontrado na
83 orelha externa, aparelho auditivo, partes da laringe e epiglote e composta pelos
84 condroblastos, condrócitos e matriz extracelular (MEC) que contém, entre outros
85 elementos, elastina e colágeno do tipo II. O local onde estão inseridas as células na matriz
86 da cartilagem é denominado de lacuna. A cartilagem auricular é revestida pelo
87 pericôndrio, um tecido conjuntivo denso modelado, bastante aderido a ela e responsável
88 por sua proteção e nutrição (Khan e Khan, 2013; Chiu et al., 2017)

89 A cartilagem auricular descelularizada pode ser obtida por métodos físicos,
90 químicos e enzimáticos, em diferentes protocolos. No entanto, existem vantagens e
91 desvantagens em cada um, pois é necessário que haja alto nível de descelularização para
92 aumentar a biocompatibilidade, associado com a manutenção das características das
93 proteínas fibrosas como o colágeno e a elastina, na matriz extracelular. A desorganização
94 estrutural, desnaturação e reações químicas podem alterar a microestrutura, porosidade e
95 superfícies, fazendo com que o estímulo celular não seja adequado (Chen et al.,
96 2015;Keane et al., 2015).

97 Desta forma, independentemente do método e protocolo utilizados para
98 descelularizar tecidos biológicos como a cartilagem elástica, é necessário caracterizar o
99 material para verificar possíveis alterações na composição e microestrutura para poder
100 correlacionar com efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*. A Calorimetria Exploratória
101 Diferencial e a Análise Termogravimétrica são métodos de análises térmicas amplamente
102 utilizadas verificar a modificação na estrutura de biopolímeros (Mancilla et al. 2016).

103 A Calorimetria Exploratória Diferencial, também conhecida como DSC, sigla do
104 termo em inglês *Differential Scanning Calorimetry*, é uma técnica
105 que mede as temperaturas e o fluxo de calor associados com as transições dos materiais
106 em função da temperatura e do tempo. Tais medidas fornecem informações
107 qualitativas e quantitativas sobre mudanças físicas e químicas que envolvem processos
108 endotérmicos, exotérmicos ou mudanças de capacidade calorífica. Em relação ao
109 colágeno é possível verificar se as moléculas estavam íntegras ou sofreram transição
110 determinando-se a temperatura de desnaturação da amostra. Quanto menor a temperatura
111 de desnaturação, em relação à faixa considerada normal para o tipo de colágeno, menor a
112 quantidade de moléculas íntegras havia na amostra (Mancilla et al., 2016; Garcia et al.,
113 2020).

114 A Análise Termogravimétrica, reconhecida pela sigla TGA, do
115 inglês *Thermogravimetric analysis* é uma técnica na qual se monitora a variação da
116 massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo em um ambiente de
117 temperatura e atmosfera controladas. Aplicando-se a biomateriais é possível analisar os
118 estágios de degradação em função da temperatura e compreender sua composição físico-
119 química (Mancilla et al., 2016; Samouillan et al., 2011).

120 A caracterização microestrutural também é realizada para verificar aspectos do
121 material que influenciam diretamente o comportamento das células do receptor do
122 implante. Dentre as diversas técnicas que podem ser aplicadas, a microtomografia

123 computadorizada (micro-Ct) vem ganhando espaço, pois permite a captação de imagens
124 bi e tridimensional para avaliar a microarquitetura do material, bem como analisar a
125 existência, diâmetro e concentração de poros, que influenciam diretamente. A adesão e
126 proliferação celular no tecido implantado (Mizutania et al, 2012; Bartos et al., 2018)

127 A microscopia confocal permite formar imagens em representação
128 tridimensionais por varredura a laser de um material biológico normalmente tratado ou
129 marcado com compostos fluorescentes. A principal vantagem desse método é a sua
130 capacidade para obter secções óticas da amostra em diferentes profundidades de forma
131 não destrutiva (Roessner et al., 2012).

132 Desta forma, este estudo objetivou obter cartilagens elásticas descelularizadas em
133 solução alcalina, caracterizar por análise térmica as cartilagens tratadas e não tratadas
134 para verificar possíveis alterações da matriz extracelular, principalmente do colágeno.
135 Além disso, realizou-se a caracterização microestrutural das cartilagens tratadas em
136 solução alcalina por microtomografia e microscopia de scanner a laser confocal 2D e 3D
137 para verificar porosidade e rugosidade que possam influenciar na sua utilização como
138 biomaterial.

139 2. MATERIAL E MÉTODOS

140
141 O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG),
142 protocolo nº. 094/18. As cartilagens auriculares foram obtidas da orelha externa de
143 bovinos adultos, adquiridas do descarte de subprodutos do abate, em frigoríficos sob
144 inspeção federal. Realizou-se a dissecação das 20 peças adquiridas, para retirada da pele
145 e tecido subcutâneo, com auxílio de bisturi, pinças e tesouras. Esta quantidade foi definida
146 para preparar cartilagens suficientes para as análises propostas neste trabalho e também
147 para a caracterização biológica a ser realizada posteriormente. Em seguida, as cartilagens
148 foram limpas com solução salina 0,9% e água deionizada. Das 20 cartilagens, dez foram
149 liofilizadas e estocadas a 25°C, obtendo-se cartilagem auricular *in natura*, denominada de
150 matriz CAN.

151 As outras dez cartilagens foram tratadas em solução alcalina por 72 horas em
152 temperatura não superior a 25°C. A solução alcalina foi preparada por sais, contendo
153 sulfatos, cloretos e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, conforme
154 procedimento usual do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de
155 São Carlos – USP. Após as 72 horas de preparo, as cartilagens foram neutralizadas em

156 uma segunda solução, também contendo sulfatos e cloretos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , por
157 um período de seis horas.

158 O excesso de sais foi removido por uma série de três lavagens, com intervalos de
159 seis horas, em 3% de solução de ácido bórico, solução de EDTA 0,3% e água deionizada.
160 Na sequência, as cartilagens foram mantidas por um período de 24 horas para serem
161 estabilizadas em solução tampão fosfato salino, para manterem constante o valor de pH
162 de 7,4. O processo foi finalizado com última lavagem das cartilagens em água deionizada
163 seguido do processo de liofilização e estocadas a 25°C, obtendo-se cartilagem auricular
164 com tratamento alcalino de 72h, denominada de CA72 (Goissis et al., 2003; Horn et al.,
165 2009).

166 A caracterização das cartilagens foi dividida em duas etapas, sendo a primeira
167 realizada por análises térmicas (DSC e TGA) para cartilagens tratadas e não tratadas no
168 Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo (IQSC- USP). Na
169 segunda etapa foram empregadas as técnicas de microtomografia e microscopia de scanner
170 a laser confocal 2D e 3D somente para as amostras de cartilagem tratadas, no Laboratório
171 de Materiais Nanoestruturados e a perfilometria a laser no Laboratório de Dispositivos e
172 Sistemas Funcionais, do Laboratório Nacional de Nanotecnologia. (CNPEM/MCTIC).

173 A técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial foi realizada em equipamento
174 DSC Mod 2010 (TA Instruments). Utilizou-se aproximadamente 20 mg de amostra de
175 CAN e de CA72 em um suporte de alumínio hermético, sob fluxo de N_2 de 80 mL min^{-1} ,
176 com razão de aquecimento de 10°C min^{-1} , com variação de temperatura de 5 – 120 °C. A
177 temperatura de desnaturação do colágeno (Td) foi calculada a partir do ponto médio da
178 inflexão da curva DSC.

179 As análises termogravimétricas foram realizadas em equipamento TGA Q50 (TA
180 Instruments), utilizando-se amostras de 10mg de CAN e 10 mg de CA72 em atmosfera
181 de ar sintético, com variação de temperatura de 25 a 800°C e razão de aquecimento de
182 10°C min^{-1} .

183 Na segunda etapa as cartilagens tratadas foram caracterizadas por
184 microtomografia computadorizada realizada em microtomógrafo Bruker™ CT Scanner
185 modelo Skyscan 1272®. Foram analisadas duas amostras de 9cm² foram fixadas em um
186 *template* circular, em alinhamento vertical e as imagens obtidas pela rotação da câmera
187 de captação em 360 graus, em uma resolução de voxel de 3 μm, 200 μA de corrente e
188 voltagem de 50 kV. A câmera com detector do tipo Charged Coupled Device (CCD) de
189 16 megapixels dos detectores foi configurada para adquirir projeções de 2452 x 1640

190 pixels, resultando em uma resolução final 6 μm por voxel. O período de varredura foi de
 191 quatro horas para cada amostra. As imagens capturadas foram utilizadas nos softwares,
 192 DataViewer, CTvox, CTan e CTvol. Em seguida foi realizada a reconstrução das imagens
 193 em formato bidimensional (2D) e tridimensional (3D).

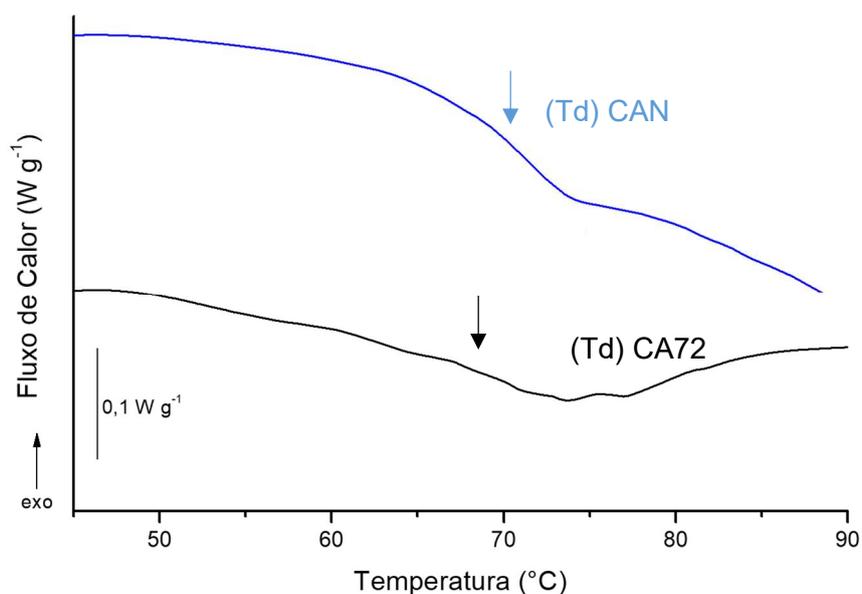
194 A Microscopia de scanner a laser confocal 2D e 3D foi realizada em equipamento
 195 LSCM 3D VK-X200[®] – Keyence, por meio da emissão de feixe de laser de varredura X-
 196 Y e Z, na superfície da amostra. Após o escaneamento os dados foram submetidos ao
 197 *Software-VK Analyzer* para reconstrução das imagens 2D (laser e óptica), reconstrução
 198 3D e obtenção dos valores de rugosidade.

199

200 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

201

202 Para a matriz CAN foi obtida a T_d em 71,7°C enquanto que para a CA72 em
 203 68,0°C (Fig.1).



204

205 Figura 1. Gráfico de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) da cartilagem
 206 elástica não tratada CAN (linha azul) e cartilagem tratada em solução alcalina CA72
 207 (linha preta). A cartilagem não tratada apresenta temperatura de desnaturação
 208 próxima de 72,0°C (seta azul) e a cartilagem tratada em solução alcalina, em torno
 209 de 68,0°C. A proximidade dos valores das temperaturas de desnaturação refletem
 210 que o tratamento alcalino não alterou significativamente o colágeno presente na
 211 amostra.

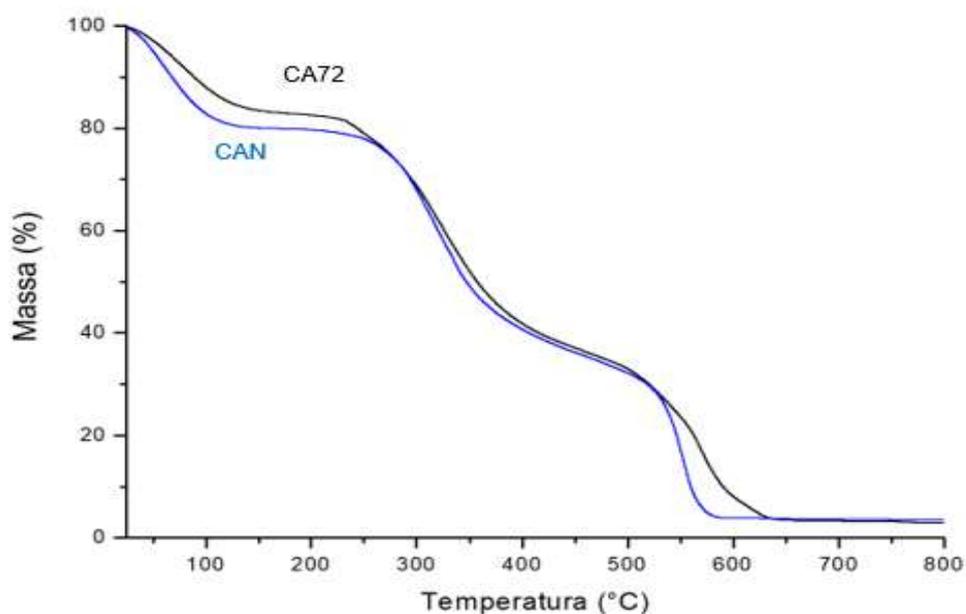
212

213 Esta diminuição da temperatura de desnaturação das amostras tratadas em solução
 214 alcalina está relacionada ao rompimento das ligações cruzadas entre moléculas de
 215 tropocolágeno, ao aumento do número de cargas negativas na molécula de colágeno e à
 216 desorganização da estrutura fibrilar da matriz colagênica (Cunha et al., 2010). A molécula

217 do colágeno é constituída de três cadeias polipeptídicas (duas $\alpha 1$ e uma $\alpha 2$) cuja estrutura
218 contém cerca de 30 % de glicina, 12 % de prolina, 11 % de alanina, 10 % de
219 hidroxiprolina, 1 % de hidroxilisina e pequenas quantidades de aminoácidos polares e
220 carregados. A estabilidade térmica do colágeno está relacionada com seu conteúdo de
221 aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) (Meyer, 2019).

222 Quanto mais elevado o conteúdo de aminoácidos maior é a estabilidade das
223 hélices. No entanto, as moléculas de colágeno quando submetidas a tratamentos ácidos
224 ou alcalinos podem sofrer hidrólise e alteração da tripla hélice e transição para gelatina.
225 Menores temperaturas de desnaturação indicam menor estabilidade e este é um dos
226 fatores que afetaria a aplicação posterior destes colágenos. Se a quantidade de hidrólise
227 for considerável, pode ser que não haja possibilidade de observar picos no gráfico de DSC
228 e a quantidade de gelatina é maior do que de colágeno (Wang et al., 2014). No entanto,
229 neste trabalho, a alteração em quatro graus centígrados da temperatura de desnaturação
230 refletem que pouco do colágeno presente na cartilagem tratada foi alterado, mantendo as
231 características físico-químicas do material.

232 As curvas da TGA demonstraram a variação da massa de cartilagens elásticas
233 tratadas e não tratadas em função da temperatura (Fig.2).



234

235 Figura 2. Gráfico de curvas termogravimétricas (TGA) da cartilagem elástica não tratada CAN
236 (linha azul) e cartilagem tratada em solução alcalina CA72 (linha preta). Primeira etapa de perda
237 de massa referente à água presente no material (25-200°C). Segunda etapa devido à
238 decomposição dos biopolímeros (200-450°C). Terceira etapa em função da carbonização do
239 material orgânico (450-800°C). A massa residual da terceira etapa corresponde à composição
240 mineral, estável até 800°C.

241

242 A análise consistiu em três etapas, sendo que a primeira demonstrou a variação de
 243 massa relacionada à água presente no material (25-200°C). Uma segunda etapa de
 244 variação de massa ocorreu devido ao início da degradação térmica das cadeias
 245 poliméricas do colágeno (200-450°C) e a terceira, e última, etapa consistiu no final da
 246 decomposição térmica, com a carbonização do material orgânico (450-800°C). A Tab.1
 247 demonstra Temperatura de decomposição (T_{onset} , °C), porcentagem de água e material
 248 inorgânico residual para cartilagem tratada e não tratada.

249

250 Tabela 1 – Temperatura de decomposição (T_{onset} , °C), porcentagem de água e material
 251 inorgânico residual para CAN e CA72

Matriz	% água (25-200°C)	%Resíduo (800°C)	$T_{decomposição}$ (°C)
CAN	17,2	2,9	265
CA72	20,3	3,4	275

252 Fonte: da autora (2021)

253

254 É importante ressaltar que na terceira etapa de degradação, relativa à carbonização
 255 do material orgânico (450-800°C), observou-se massa residual para ambas as amostras.
 256 Isto pode ser facilmente explicado pela presença de material inorgânico estável até a
 257 temperatura máxima da análise, de 800°C.

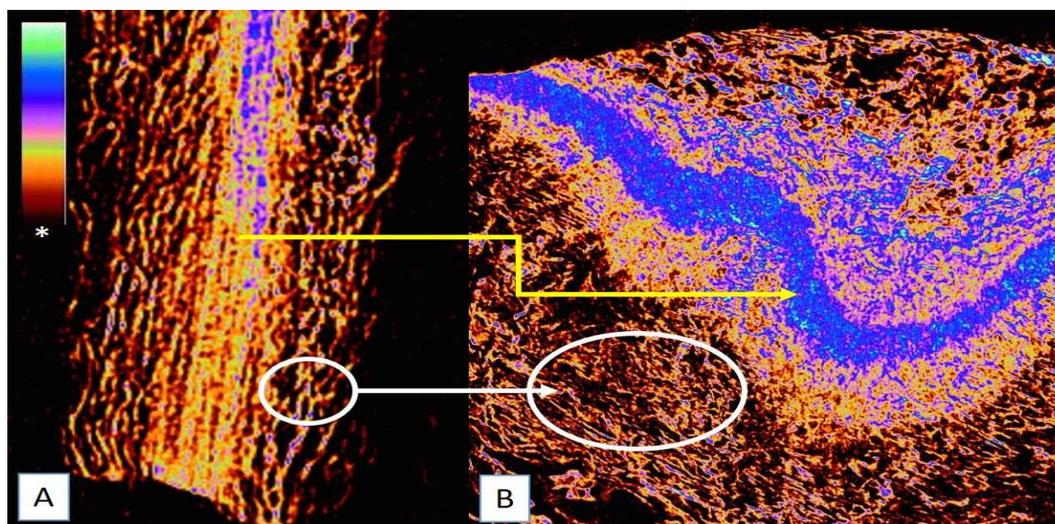
258 Em relação aos perfis de degradação das amostras CAN e CA72, observou-se que
 259 foram parecidos, ocorrendo em três estágios definidos por temperaturas próximas,
 260 incluindo a temperatura de degradação. Este fato também foi relatado por Pedroso (2009),
 261 em estudo realizado com tendão bovino tratado em solução alcalina por 24 e 96 horas. A
 262 comparação de amostras tratadas e não tratadas revelaram três estágios, em temperaturas
 263 aproximadas.

264 O comportamento térmico observado pela análise por TGA, no presente trabalho,
 265 reforça os resultados da análise por DSC de que o tratamento alcalino por 72 horas da
 266 cartilagem elástica não alterou significativamente as características físico-químicas do
 267 material. Alterações da matriz extracelular, principalmente das proteínas fibrosas como o
 268 colágeno gerariam perfis termogravimétricos discrepantes (Meyer, 2019).

269 Em relação à segunda etapa de caracterização, relativas às amostras de cartilagem
 270 elástica tratada em solução alcalina por 72 horas foi possível a reconstrução de imagens
 271 bi e tridimensionais da amostra.

272 Na avaliação microtomográfica bidimensional a escala colorimétrica indicou as
 273 diferenças de densidade da região da cartilagem e do pericôndrio em função da atenuação
 274 de raios-X. As cores marrom e amarela representaram regiões de menor atenuação,
 275 caracterizando menor densidade. Já as cores rosa, azul e verde claro as regiões de maior
 276 atenuação de raios-X e, conseqüentemente, maior densidade. Desta forma, evidenciou-se
 277 que a região da cartilagem elástica apresentou maior densidade em relação a região do
 278 pericôndrio, com menor densidade (Fig. 3).

279



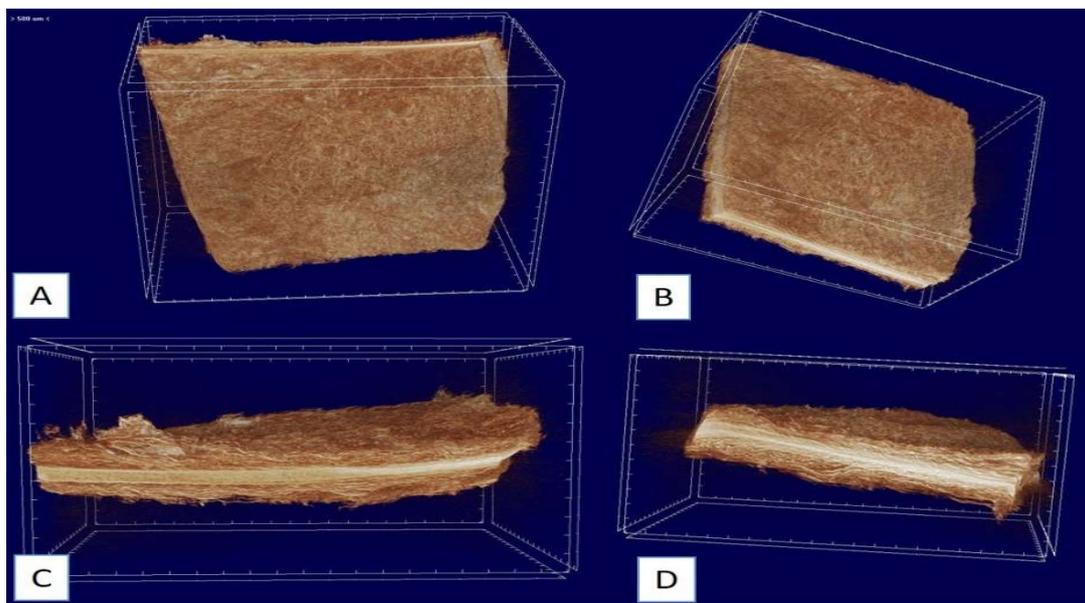
280

281 Figura 3. Imagens de Microtomografia em reconstrução 2D de CA72 (software – DataViwer).
 282 Observa-se em A, o a região central da cartilagem que apresenta maior densidade (ponto de partida
 283 da seta amarela). Em B, nota-se a diferença de densidade da região central, na qual a cor azul
 284 representa o tecido de maior densidade e as cores rosa e amarela, as regiões de menores densidades
 285 respectivamente (ponta da seta amarela). Ainda em B, observa-se dentro do círculo branco, fibras
 286 de colágeno do tipo I do pericôndrio. * escala de coloração relativa à densidade – de baixo para cima
 287 reflete aumento da densidade.

288

289 Isto pode ser explicado pela diferença de composição dos tecidos. O pericôndrio
 290 é composto por tecido conjuntivo propriamente dito, formado fibras do colágeno do tipo
 291 I, entrelaçadas em elementos não fibrosos que compõem a matriz extracelular
 292 (Chattopadhyay et al., 2014; Naveh et al., 2014). Já a cartilagem elástica é composta por
 293 matriz extracelular com proteínas não fibrosas, como proteoglicanas,
 294 glicosaminoglicanas e glicoproteínas de adesão-condronectina e por proteínas fibrosas
 295 como o colágeno do tipo II e fibras elásticas (Karsdal et al., 2016).

296 Esta composição mais elaborada da matriz extracelular confere à cartilagem
297 capacidade de aprisionar mais moléculas de água, tornando-se menos fluida que o tecido
298 conjuntivo do pericôndrio. Desta forma, este agregado molecular favorece a composição
299 mais densa (Grigore, 2017). Na Fig. 4, com a reconstrução em 3D é possível verificar a
300 diferença entre a cartilagem elástica e o pericôndrio que a recobre em ambos os lados.
301

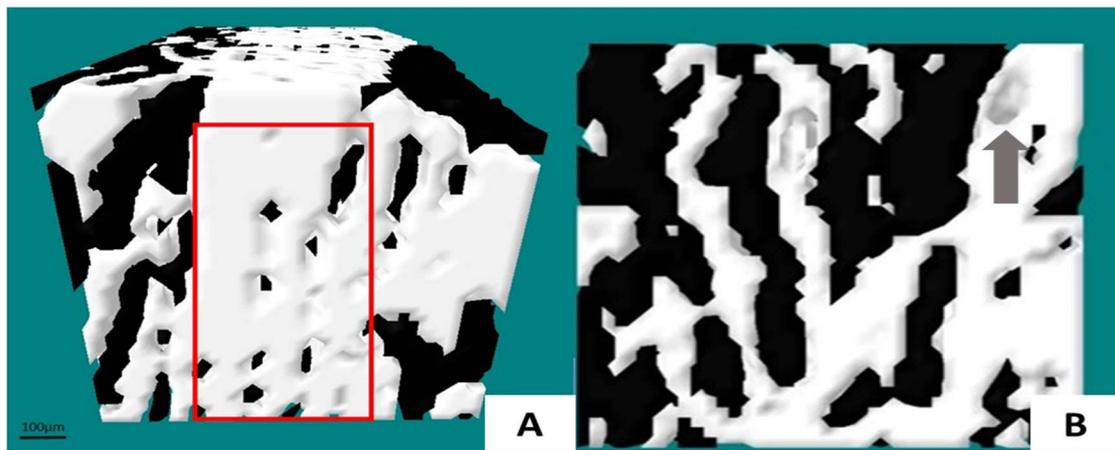


302
303 Figura 4. Imagens de Microtomografia em reconstrução 3D de CA72 (software –CTVOX). Em A eixo
304 Y (vertical), em B eixo Y oblíquo, em C eixo X (horizontal) e em D eixo Z. Observa-se que a
305 microtomografia destaca a diferença entre os tecidos. Com aspecto mais escuro o tecido conjuntivo
306 propriamente dito compondo o pericôndrio que reveste a cartilagem em ambos os lados. Ao centro, mais
307 clara e compactada a cartilagem elástica.

308

309 A estrutura da cartilagem apresenta-se mais densa (como visto na reconstrução
310 2D), com aspecto mais compacto que o pericôndrio (menos denso). A microtomografia
311 também permitiu a observação da estrutura do colágeno em rede e lacunas na matriz
312 extracelular sem a presença de condrócitos (Fig. 5), demonstrando que o tratamento em
313 solução alcalina promoveu descelularização, conforme já observado por microscopia
314 óptica em trabalho anterior (Ferreira et al., 2020).

315



316

317 Figura 5. Imagens de microtomografia da cartilagem elástica tratada em solução alcalina. A coloração
 318 branca é relativa à matriz extracelular e a coloração preta são espaços preenchidos por ar. Em A, destaque
 319 para a área delimitada pelo retângulo vermelho demonstrando lacunas sem a presença de condrócitos. São
 320 espaços arredondados que seguem o formato das células que foram retiradas com o tratamento alcalino.
 321 Em B, destacam-se os espaços entre as fibras de colágeno, mais amplos que as lacunas. Observa-se,
 322 também, lacunas parcialmente fechadas, como apontado pela seta.
 323

324 A microtomografia tridimensional também possibilitou a avaliação da porosidade
 325 presente no pericôndrio e na cartilagem. O pericôndrio, região de menor densidade,
 326 apresentou maior valor percentual de porosidade (74,39%), enquanto que a região da
 327 cartilagem, de maior densidade, menor valor de porosidade (45,77%). É importante
 328 ressaltar que a porosidade inclui as aberturas que existem naturalmente entre as moléculas
 329 de colágeno na matriz extracelular, bem como as lacunas sem células, obtidas pelo
 330 tratamento alcalino. Em relação aos diâmetros dos poros, foram detectados 12 µm, 36
 331 µm, 60 µm e 84 µm, como observado na Tab.2. Constatou-se que na região do pericôndrio
 332 predominam poros de 12µm (56,23%), enquanto na cartilagem elástica predominam os
 333 de 36µm (49,93%) seguidos dos de 12µm, 60µm e 84µm.

334 As propriedades como diâmetro do poro, porosidade e interconectividade entre os
 335 poros possuem papel importante na funcionalidade do biomaterial como matriz para
 336 reparação tecidual e crescimento celular. O tamanho dos poros influencia diretamente na
 337 migração e diferenciação celular e também na difusão de fatores de crescimento da matriz
 338 (Sultana, 2018). Desta forma, é necessário considerar que a predominância de poros com
 339 maior diâmetro na cartilagem pode ser favorável para o desenvolvimento e proliferação
 340 de condroblastos, podendo, portanto, o material servir como matriz para a regeneração de
 341 tecido cartilaginoso (Oh et al., 2006).

342 Outro fator favorável, observado pela microtomografia foi a manutenção da
 343 estrutura do colágeno, proporcionando poros interconectados. De acordo com Kujala et
 344 al., (2003) implantes porosos devem apresentar fenestrações interconectadas, de modo

345 que tanto a presença de poros abertos como de canais interconectados entre esses poros
 346 sejam de dimensão suficiente para permitir a infiltração de células que promovem a
 347 formação da matriz tecidual no interior dos poros.

348

Tabela 2. Diâmetro dos poros do pericôndrio e a região central da cartilagem elástica tratada em solução alcalina por 72 horas.

Região	Diâmetro dos poros			
	12 μm	36 μm	60 μm	84 μm
Pericôndrio	56.23 %	36.49%	18.95 %	3.36 %
Cartilagem	27.75 %	49.93%	18.96 %	3.36 %

349 Fonte: da autora (2021)

350

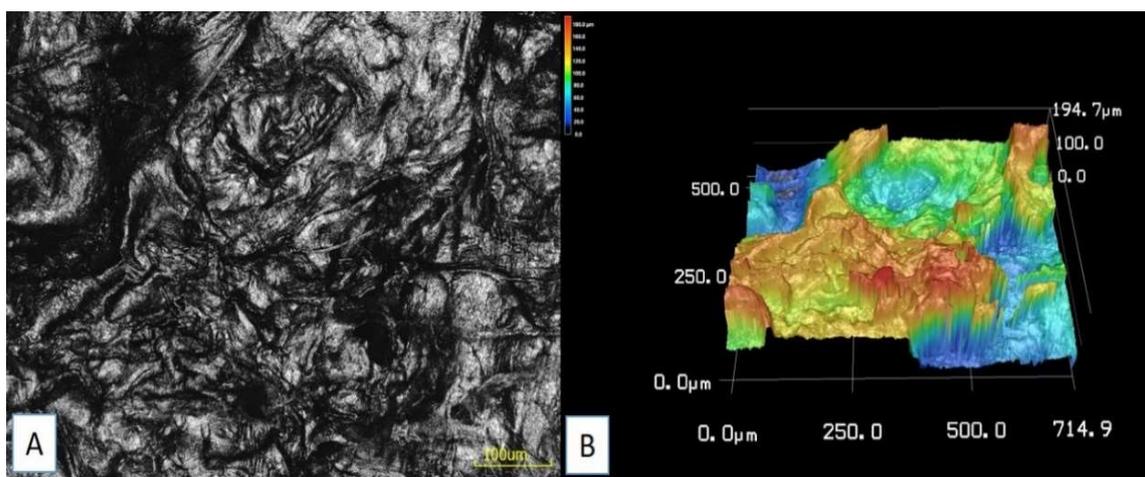
351 A microscopia de scanner a laser confocal permitiu a verificação da rugosidade
 352 de CA72, cujos valores estão expressos na Tab. 3 e as imagens na Fig.7.

353

Tabela 3. Valores de rugosidade das amostras CA72 obtidas por microscopia de scanner a laser confocal

	Rugosidades				
	Rp	Rv	Rz	Ra	Rq
Valores (μm)	94,0699 μm	100,5866 μm	194,6565 μm	33,9621 μm	40,8121 μm

Rp – representa a altura máxima do pico mais elevado da rugosidade, situado acima da linha média; **Rv** – a máxima profundidade do vale mais profundo da rugosidade, situado abaixo da linha média; **Rz** – a média dos picos mais elevados, que representa a altura entre os pontos máximo e mínimo do perfil e **Ra** – rugosidade aritmética, que representa a média de todos os pontos. A rugosidade **Rq** é o desvio médio quadrático, que aumenta o efeito das irregularidades que se afastam da média.



354

355 Figura 6. Perfilometria de scanner a laser (LSM – 2D e 3D) de cartilagem elástica tratada em
 356 solução alcalina. Em A, imagem 2D demonstrando a rugosidade presente na cartilagem. Em B, imagem 3D
 357 (Optica + Laser) onde cores em amarelo determinam pontos de maior elevação e cores em azul pontos de
 358 menor elevação, relacionados a rugosidade presente na cartilagem tratada em solução alcalina.

359

360 A rugosidade da cartilagem elástica tratada em solução alcalina é evidenciada com
361 os valores de Ra e Rq obtidos na perfilometria de *scanner* a laser. Nota-se que a
362 cartilagem elástica apresentou valores expressivos de rugosidade, fator que contribui com
363 a adesão celular. De acordo com Brett et al., (2004) as superfícies consideradas lisas
364 apresentam rugosidade média (Ra) variando de 0,10 μ m a 1 μ m e as consideradas rugosa
365 quando o nível de Ra for entre 1-10 μ m. Bhatt et al., (2012) acrescentam ainda que
366 determinados perfis de superfícies nanométricas atuam de forma importante na adsorção
367 de proteínas e adesão de células osteoblásticas, visto que em *scaffolds* alguns tratamentos
368 químicos realizados tornam a reprodutibilidade da rugosidade em escala nanométrica
369 inviável.

370

371 4. CONCLUSÃO

372

373 Concluiu-se que o tratamento alcalino da cartilagem elástica gerou matrizes com
374 características físico-químicas semelhantes às cartilagens não tratadas, como observado
375 pela análise térmica. Além disso, a cartilagem tratada apresentou rugosidade e poros
376 interconectados com dimensões que sugerem serem favoráveis ao cultivo e proliferação
377 de condroblastos e osteoblastos que tornam o material propício para utilização em
378 contato com células *in vitro* e *in vivo*.

379

380 AGRADECIMENTOS

381 Os autores agradecem ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP),
382 campus São Carlos/SP, por desenvolver e fornecer o biomaterial, além de possibilitar a
383 realização das análises térmicas. Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia
384 (CNPEM/MCTIC)-LMN - Laboratório de Materiais Nano estruturados e DSF-LD –
385 Laboratório de Dispositivos e Sistemas Funcionais, que possibilitaram o contato com as
386 técnica e a realização das análises de microtomografia computadorizada e perfilometria.
387 À CAPES, pelo apoio financeiro.

388

389 REFERENCIAS

390

391 BARTOS,M; SUCHY, T; TONAR, Z; FOLTÁN, R; KALBACVA, MA. Micro-ct in
392 tissue engineering scaffolds designed for bone regeneration: principles and application.
393 **Ceramics-Silikáty**. v 62 (2), 194-199, 2018.

394

395 BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone Graft Substitutes. **Hand Clin**.v. 28, p. 457-
396 468, 2012

397

- 398 BRETT, P. M.; HARLE, J.; SALIH, V.; MIHOC, R.; OLSEN, I.; JONES, F. H.
399 Roughness response genes in osteoblastos. **Bone**, v. 35, pp. 124-133, 2004
400
- 401 CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R.T. Review Collagen-Based Biomaterials for
402 Wound Healing. **Biopolymers**. v.101, n.8, p.821-833, 2014.
403
- 404 CHEN YC, CHEN RN, JHAN HJ, LIU DZ, HO HO, MAO Y, KOHN J, SHEU MT.
405 Development and Characterization of Acellular Extracellular Matrix Scaffolds from
406 Porcine Menisci for Use in Cartilage Tissue Engineering. **Tissue Eng Part C Methods**.
407 v 21(9):971-86, 2015.
408
- 409 CHIU, L.L.Y. et al. Comparisons of auricular cartilage tissues from different species.
410 **Annals of Otology, Rhinology & Laryngology**.v.126, n.12, p.819-828, 2017.
411
- 412 CUNHA, M.R; SANTOS, A.R; GOISSIS, G; GENARIA, S.C, ET AL. Characterization
413 of the physical and mechanical properties of femoral bone defects filled with polyanionic
414 collagen scaffolds in ovariectomized rats. **Mat.Res**.v.13, n.2. p.239-244, 2010.
415
- 416 FERREIRA, KD; CARDOSO, L D; OLIVEIRA,LP; FRANZO, VS; PANCOTTI, A;
417 MIGUEL, MP; SILVA, LAF; VULCANI, VAS. Histological analysis of elastic
418 cartilages treated with alkaline solution. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.3, p.647-
419 654, 2020.
420
- 421 GARCIA, CF, MARTINS, VCA E PLEPIS, AMG. Effects of grape seed extract on
422 properties of type I collagen scaffolds. **International Journal of Advances in Medical**
423 **Biotechnology**. v 2(2), 02-10, 2020.
424
- 425 GOISSIS,G; PARREIRA, DR; SUZIGAN, S. A study on the biocompatibility and
426 integration of acellular polyanionic collagen:elastin matrices by soft tissue. **Rev. Bras.**
427 **Eng. Biomed.**, vol.19, n3, p.167-173, 2003.
428
- 429 GRIGORE, M. E. Biomaterials for cartilage tissue engineering. **Journal of Tissue**
430 **Science e Engineering**. v. 8, n. 1, p. 1-6, 2017.
431
- 432 HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Interaction of anionic collagen
433 with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate**
434 **Polymers**. v.77, n.2, p.239-243, 2009.
435
- 436 JAFARI, M.; PAKNEJAD, Z.; RAD, M.R.; MOTAMEDIAN, S.R.; EGHBAL, M.J.;
437 NADJMI, N.; KHOJASTEH, A. Polymeric scaffolds in tissue engineering: A literature
438 review. **J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater**. 105, 431–459, 2017.
439
- 440 KAHN, R.; KAHN, M.H. Use of collagen as a biomaterial: an update. **J. Indian. Soc.**
441 **Periodontol**. v.17, p.539-542, 2013.
442
- 443 KARSDAL, M.A. Biochemistry of Collagens, Laminins, and Elastin: Structure,
444 Function, and Biomarkers. **Elsevier Academic Press**, London, v2, 238p., 2016.
445

- 446 KEANE TJ, SWINEHART IT, BADYLAK SF. Methods of tissue decellularization
447 used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. **Methods**. v84:25-34,
448 2015.
- 449
- 450 KUJALA, S; RYHANEN, J; DANILOV, A; TUUKKANEN, J. Effect of porosity on
451 the osteointegration and bone ingrowth of a weight-bearing nickel titanium bone graft
452 substitute. **Biomaterials**. Vol. 24, n 25, p. 4691-4697, 2013.
- 453
- 454 NAVEH, G. R.; BRUMFELD, V.; DEAN, M.; SHAHAR, R.; WEINER, S. Direct
455 microCT imaging of non-mineralized connective tissues at high resolution. **Connective
456 Tissue Research**, v. 55, n. 1, p. 52-60, 2014.
- 457
- 458 MANCILLA, L B., TÉLLEZ, A M., FLORES, J; PIÑA, B M. Physico-chemical
459 characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. **Journal of Applied
460 Research and Technology**. v 14(1).01.2016.
- 461
- 462 MEYER, M. Processing of collagen based biomaterials and the resultant materials
463 properties. **BioMed Eng OnLine**. v 18, 24, 2019.
- 464
- 465 MIZUTANIA, R., SUZUKIB, Y. "X-ray microtomography in biology". **Micron**. v.43,
466 p. 104-115. 2012.
- 467
- 468 O'BRIEN, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Mater**.14, 88–95, 2011.
- 469
- 470 OH SH, PARK IK, KIM JM, LEE JH. In vitro and in vivo characteristics of PCL
471 scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method.
472 **Biomaterials**.28(9):1664-71, 2006.
- 473
- 474 PEDROSO, M.G.V. Estudo comparativo de colágeno hidrolisado e comercial com
475 adição de PVA. **Dissertação**. Universidade de São Paulo. 2009.
- 476
- 477 ROESSNER ED, VITACOLONNA M, HOHENBERGER P. Confocal Laser Scanning
478 Microscopy Evaluation of an Acellular Dermis Tissue Transplant (Epiflex®). **PLoS
479 ONE** 7 (10): e45991, 2012.
- 480
- 481 SAMOUILLAN, V; DELAUNAY, F; DANDURAND, J; MERBAHI, N; GARDOU,
482 JP. The use of thermal techniques for the characterization and selection of natural
483 biomaterials **J. Funct. Biomater**. 2, 230-248, 2011.
- 484
- 485 SULTANA MJ. Porous Biomaterials: Classification, Fabrication and Its Applications in
486 Advanced Medical Science. **American Journal of Nanosciences** 4(2):16, 2018.
- 487
- 488 WALTER, S.G.; OSSENDORFF, R.; SCHILDBERG, F.A. Articular cartilage
489 regeneration and tissue engineering models: A systematic review. **Arch. Orthop.
490 Trauma Surg**. 139, 305–316, 2019.
- 491
- 492 WANG, L.; LIANG, Q.; WANG, Z.; XU, J.; LIU, Y.; MA, H. Preparation and
493 characterization of type I collagens from skin of Amur sturgeon. **Food Chem.**, v.148,
494 p.410-414, 2014.
- 495

496 ZHAO, P.; GU, H.; MI, H.; RAO, C.; FU, J.; TURNG, L. Fabrication of scaffolds in
497 tissue engineering: A review. **Front. Mech. Eng.**13, 107–119, 2018.

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

CAPÍTULO 3:

Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.72, n.3, p.647-654, 2020

Histological analysis of elastic cartilages treated with alkaline solution

[Análise histológica de cartilagens elásticas tratadas com solução alcalina]

K.D. Ferreira¹, L.D. Cardoso², L.P. Oliveira¹, V.S. Franzo³,
A. Pancotti⁴, M.P. Miguel⁵, L.A.F. Silva⁶, V.A.S. Vulcani^{6,7*}

¹Aluna de pós-graduação – Escola de Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO

²Aluna de pós-graduação – Universidade Federal de Jataí - Jataí, GO

³Universidade Federal do Mato Grosso - Cuiabá, MT

⁴Universidade Federal de Jataí – Jataí, GO

⁵Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO

⁶Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO

⁷Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Jataí - Jataí, GO

ABSTRACT

The elastic cartilage is composed by chondroblasts and chondrocytes, extracellular matrix and surrounded by perichondrium. It has a low regeneration capacity and is a challenge in surgical repair. One of obstacles in engineering a structurally sound and long-lasting tissue is selecting the most appropriate scaffold material. One of the techniques for obtaining biomaterials from animal tissues is the decellularization that decreases antigenicity. In this work, alkaline solution was used in bovine ear elastic cartilages to evaluate the decellularization and the architecture of the extracellular matrix. The cartilages were treated in alkaline solution (pH13) for 72 hours and lyophilized to be compared with untreated cartilages by histological analysis (hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Verhoeff slides). Areas of interest for cell counting and elastic fiber quantification were delineated, and the distribution of collagen and elastic fibers and the presence of non-fibrous proteins were observed. The results demonstrated that the alkaline solution caused 90% decellularization in the middle and 13% in the peripheral region, and maintenance of the histological characteristics of the collagen and elastic fibers and non-fibrous protein removal. It was concluded that the alkaline solution was efficient in the decellularization and removal of non-fibrous proteins from the elastic cartilages of the bovine ear.

Keywords: cartilage, tissue engineering, surgery, biocompatibility, antigen

RESUMO

A cartilagem elástica é composta por condroblastos e condrocitos, matriz extracelular e envolta por pericôndrio. Possui uma baixa capacidade de regeneração e é um desafio em reparos cirúrgicos. Um dos obstáculos na engenharia de tecido estruturalmente sólido e de longa duração é a seleção do material de arcabouço mais adequado. Uma das técnicas para obtenção de biomateriais oriundos de tecidos animais é a descclularização, que diminui a antigenicidade. Neste trabalho, foi utilizada solução alcalina em cartilagem elástica auricular bovina para avaliar a descclularização e a arquitetura da matriz extracelular. As cartilagens foram tratadas em solução alcalina (pH13) durante 72 horas e liofilizadas, e comparadas com cartilagens não tratadas por análise histológica (hematoxilina-eosina, tricrômio de Masson e Verhoeff). Foram determinadas as áreas de interesse para contagem celular e quantificação de fibras elásticas, observada a distribuição de colágeno e fibras elásticas e a presença de proteínas não fibrosas. Os resultados demonstraram que a solução alcalina causou 90% de descclularização na região central e 13% na região periférica, manutenção das características histológicas do colágeno e fibras elásticas e remoção das proteínas não fibrosas. Concluiu-se que a solução alcalina foi eficiente na descclularização e retirada de proteínas não fibrosas de cartilagens elásticas da orelha de bovinos.

Palavras-chave: cartilagem, engenharia de tecidos, cirurgia, biocompatibilidade, antígeno

INTRODUCTION

Elastic cartilage is a yellowish flexible cartilage occurring chiefly in the external ear, auditory tube, and some cartilages of the larynx and epiglottis. It is surrounded by perichondrium and characterized by the presence of chondrocytes immersed in an extracellular matrix (ECM) rich in elastic and type II collagen fibers and proteoglycans (Mills, 2012). The three-dimensional organization of ECM molecules confers elasticity, flexibility and resistance to tensile and compression to the elastic cartilage (Gaut and Sugaya, 2015; Mescher, 2015). Elastic cartilage has a limited capacity to regenerate, and plastic and reconstructive surgical treatment is still challenging. Therefore, an effective treatment for the reconstruction of tissues and organs composed of elastic cartilage is still needed (García-Martínez *et al.*, 2017). Moreover, in human and veterinary medicine there is constant need for resistant biomaterials to be used as substitutes or helpers in several extensive tissue loss. In such circumstances, the biomaterial can be found not only as a bioimplant with an anatomical impact but also as a substitute for a regenerative process (Vega-Ruiz *et al.*, 2017).

Tissue engineering offers the possibility to generate different kinds of tissues or organs by using cells, biomaterials and growth factors (Silva *et al.*, 2013). Several biomaterials have been used in cartilage tissue engineering, and it is currently accepted that these biomaterials should be biodegradable, biocompatible, nontoxic and mechanically stable. In addition, these biomaterials should allow chondrocytes to proliferate, migrate, differentiate and finally become integrated *in vivo* (García-Martínez *et al.*, 2017; Nayyer *et al.*, 2012). In cartilage tissue engineering, scaffolds can provide three-dimensional structure for cartilage cells and mediate cell-cell signaling and interaction. For this, the physical and biochemical properties of the ears, the material was taken to the laboratory to continue processing.

One of obstacles in engineering a structurally sound and long-lasting cartilage is selecting the most appropriate scaffold material, which should provide a proper environment for cell repopulation and function, however, an optimal scaffold still remains elusive. For this unmet need, decellularization that involves extracting cellular material from tissues to generate a structurally intact extracellular matrix (ECM) has been performed to generate scaffolds for use in tissue engineering. The ECM may serve as an ideal natural scaffold material because it retains functional proteins of the original tissue that stimulates cell growth (Graham *et al.*, 2016).

Various methods, including physical, chemical, and biological techniques are used throughout the process of decellularization.

Using chemical methods facilitates decellularization and includes chemical agents, acid and bases, detergents, alcohols, hypotonic and hypertonic solutions (Zahmati *et al.*, 2017). In Brazil, researchers developed an alkaline solution (pH 13), used it in animal tissues and reported the capacity of decellularization with maintenance of the architecture of the extracellular matrix (Goissis *et al.*, 2000; Horn *et al.*, 2009). However, although the solution has been used in elastic cartilage, there are no quantitative histological descriptions of the decellularization capacity and of characteristics of the extracellular matrix, after treatment for this type of tissue. Thus, this work aimed to treat elastic cartilages of the bovine ear in alkaline solution for 72 hours and to evaluate the histological alterations, mainly the capacity of decellularization and modifications in the extracellular matrix.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted after approval by the ethics Committee on the Use of Animals. Twenty elastic cartilage samples obtained from the external ear of adult bovine slaughtered under federal inspection were used. The cartilage was dissected, cleaned, and submerged in saline solution for an hour. Ten pieces of cartilage were fixed in a 10% formalin solution – Control Group (CG) and the remaining were packed separately in plastic bags, frozen at - 15°C, and sent to the Laboratory of Biochemistry and Biomaterials at the Chemistry Institute of the São Paulo University (USP) - São Carlos, to be subjected to alkaline treatment – Alkaline Group (AG). In the laboratory, the material was defrosted and immersed in a 0.9% sodium chloride solution for four hours, and the solution was changed every hour. Subsequently, the cartilage was treated in an alkaline solution containing salts (chlorides and AG cartilages were fixed in a 10% formalin solution and the AG and CG samples were subjected to dehydration by immersing in solutions containing increasing concentrations of alcohol (70 to 100%) for four hours. On completion of this step, diaphanization, inclusion, microtomy and staining by hematoxylin and eosin (HE), Masson's Trichrome and Verhoeff (Behmer and Tolosa, 2003). The CG samples were standard for cell counts, amount of elastic fibers and characteristics of the extracellular matrix amorphous substance.

HE slides were analyzed in light microscopy (400x magnification) for chondrocyte count. Two distinct regions of the sample were defined for the selection of the fields to be analyzed: middle region of the cartilage and the peripheral region, close to perichondrium. For count, intact cells with nucleus were considered. Six regions of interest (ROI = 399.22 X 299.22µm²) of each slide were

captured. Because the peripheral region is present on both sides of the cartilage, three random fields near the lower perichondrium and three random fields near the upper perichondrium were collected. Then, the cell

densities of the middle region (CD_{mr}) and peripheral region (CD_{pr}) were calculated by dividing total number of chondrocytes counted in each region by total area analyzed in the sample, according to equations 1 and 2 (XU *et al.*,2017).

$$\text{Equation 1} - CD_{mr} = \frac{\text{Total chondrocytes in the middle region}}{\text{Total area of the middle region}}$$

$$\text{Equation 2} - CD_{pr} = \frac{\text{Total chondrocytes in the peripheral region}}{\text{Total area of the peripheral region}}$$

The elastic fibers were checked in Verhoeff slides for distribution around the chondrocytes, network arrangement in the extracellular matrix and their continuity and fragmentation. For fiber quantification six random fields of mean region (ROI = 399.22 X 299.22 μm^2) of each slidewere

captured, as described in the cell counting method. The images were treated in the ImageJ software for increased sharpness of elastic fibers. Total area of fibers and elastic fibers density (EFD) were calculated by mean of the captured images area according to Equation 3:

$$\text{Equation 3} - EFD = \frac{\text{Total elasticfibers}}{\text{Total area of the middle region}}$$

For Masson's Trichrome, CG and AG slides were evaluated for the presence or absence of fibrous proteins of extracellular matrix and tinctorial affinity in the peripheral and central regions. The slides were observed under 100X magnification to verify differences in colorations among the regions and then under 400X to verify the regions near the cells and the matrix between them. The classification was qualitative, verifying the intensity of staining, in comparison to the control group. For statistical analysis, total cell counts and total area of elastic fibers values were tested by Shapiro-Wilk normality test. The treatments were compared by Holm-Sidak test, with a significance level of 5%.

middle region and reduction of cell density by 20% in the peripheral region and 99.3% in the middle region.

It was simple to visualize elastic fibers in GA slides because the alkaline treatment removed the non-fibrous proteins of extracellular matrix. The fibers had good tinctorial affinity, resembling the coloration of CG (Figure 4). In CG and AG elastic fibers were distributed as a mesh around chondrocytes and emitted finer filaments in the extracellular matrix according to the natural characteristics of the elastic cartilage (Daamen *et al.*,2007).

RESULTS

The total area of the regions of interest (ROI) was 716,727.65 μm^2 (0.716mm²), resulting from captured images in 40X objective in six fields [(399.22 x 299.22) x 6]. The histological images of elastic cartilage in peripheral and middle regions are shown in Figure 1. The total counts and cell densities in the peripheral and middle regions are compiled in Figures 2 and 3. In the peripheral region cell count CG presented mean of 50.91 \pm 5.24 and AG of 43.83b \pm 6.52. For middle region CG presented mean of 38.41 \pm 5.58 and AG of 0.33 \pm 1.65. There was significant difference for both regions (P< 0.05).

The mean of CD_{pr} was 843.63a \pm 17.00 for CG and 675,60b \pm 27.04 for AG. The mean of CD_{mr} was 644.41 \pm 14.93 for CG and 4.23 \pm 1.90 for AG. (P< 0.05). There was significant difference for both regions (P< 0.05). Considering CG as a parameter for the total number of cells and cell density for AG, there was a 13% reduction of cells in the peripheral region and 99.1% in the

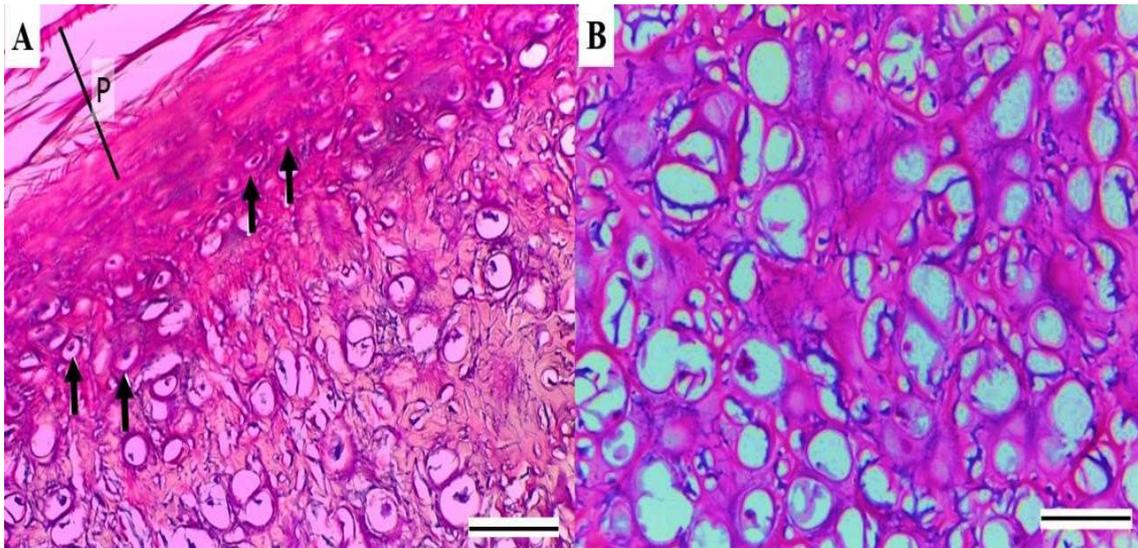


Figure 1. Histological images of bovine elastic cartilage treated in alkaline solution. In A, peripheral region with intact cells (arrows) and perichondrium (P). In B, the middle region without cells. H.E. 400x. Bar – 50 μ m.

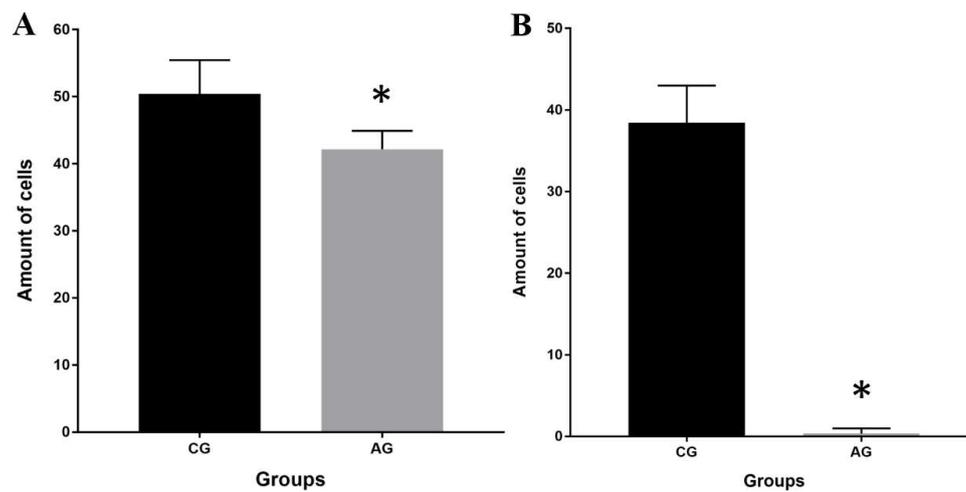


Figure 2. Number of cells in peripheral (A) and middle (B) regions for CG and AG. Asterisk - significant difference ($P < 0.05$).

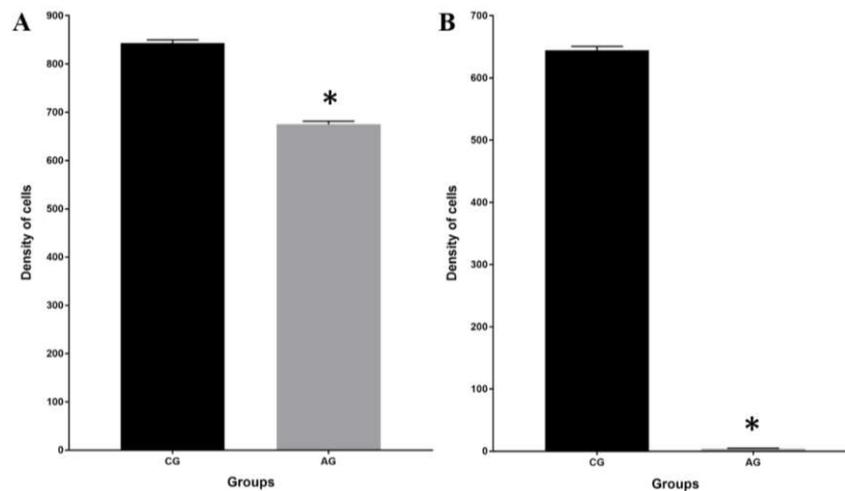


Figure 3. Cell densities in peripheral (A) and middle (B) regions for CG and AG. Asterisk - significant difference ($P < 0.05$)

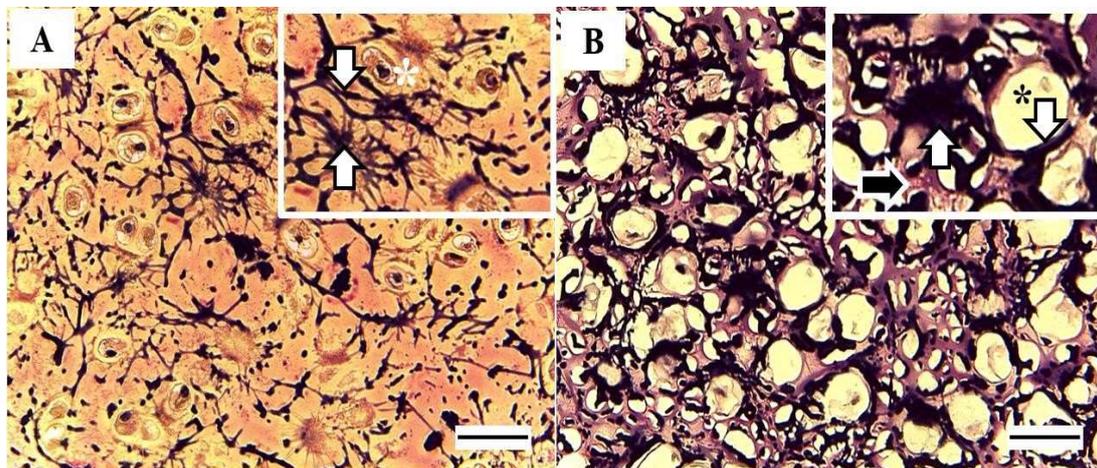


Figure 4. Histological images of bovine elastic cartilage. A - Untreated cartilage (CG). In highlighted square, chondrocyte (white asterisk) with elastic fibers around (down arrow) and elastic fibers filaments between cells (Up arrow). B - Treated cartilage (AG). In highlighted square gap (black asterisk) with elastic fibers around (down arrow) and elastic fibers filaments between cells (Up arrow) and collagen fibers (black arrow). HE and Verhoeff, 400X. Bar – 50 μ m.

Although the visualization of the fibers was easier in AG, the quantification of elastic fibers showed that there is no significant difference for total amount of fibers per area and in the density of fibers by the region of interest in relation of

the CG (Table 1). The absence of non-fibrous proteins is verified in AG HE and Verhoeff stained slides (Figure 4B) with exposed collagen fibers. This is also visible in AG Masson's Trichrome stained slides (Figure 5).

Table 1. Area (mean and standard deviation) and density of elastic fibers in the regions of interest

Group	Total area	Density
CG	95,506.39 ^a ±620.03	0.79
AG	85,652.55 ^a ±1,776.91	0.71

Means with the same letter in the same line do not differ significantly.

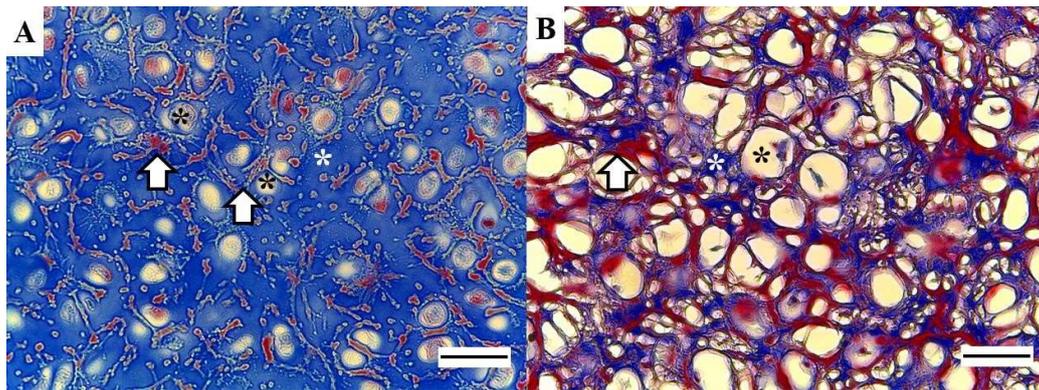


Figure 5. Histological image of bovine elastic cartilage. A - Untreated cartilage (CG), chondrocyte (black asterisk), extracellular matrix (white asterisk) with elastic fibers around and elastic fibers filaments between cells (arrows). B - Treated cartilage (AG), gap (black asterisk), elastic fibers (arrow) and collagen fibers (white asterisk). Masson's Trichrome, 400X. Bar –50µm.

DISCUSSION

The knowledge of the structural characteristics of biomaterials is crucial in the design of new biomaterials before their use in the clinical setting. Ideally, an implant should provide mechanical properties matching those of the tissue to be substituted and promote cell proliferation (Badylak and Gilbert, 2008). Among animal tissues selected for biomedical applications, bovine elastic cartilage has some particularly favorable features. Two inseparable biologic surfaces are detectable in the bovine elastic cartilage: the fibrous dense connective tissue (perichondrium) and the cartilaginous layer. The perichondrium is composed mostly of fibroblasts and collagen fibers, while the cartilage is composed of chondroblasts, chondrocytes, collagen and elastic fibers and non-fibrous proteins (Liu *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016). The ability to preserve the extracellular matrix structure after decellularization plays a pivotal role to maintain a suitable microenvironment for facilitating cell growth (Brown and Badylak, 2014). Therefore, the use of decellularized bovine elastic cartilage appears to be particularly suitable for the treatment of multiple pathological conditions.

Here we present unprecedented results of bovine elastic cartilage decellularization in alkaline solution developed by Brazilian researchers. This protocol is efficient for decellularizing animal tissues and maintaining the structure of extracellular matrix fibrous proteins such as collagen and elastin (Horn *et al.*, 2009). For this

study, the histological structure of decellularized bovine elastic cartilage was investigated in comparison with a non-treated one, that is a typical practice in the study of biological tissue in order to define its potential application in the biomedical field (Bielli *et al.*, 2018; Cebotari *et al.*, 2010). The results of alkaline solution decellularization demonstrated efficiency of 90% in the middle region and 13% in the peripheral region of elastic cartilage. Tissue decellularization decreases antigenicity because it reduces the amount of cell membrane antigens, such as the oligosaccharide galactose- α (1.3)- galactose (α -gal) epitope “Gal epitope” and the histocompatibility complex (MHC) molecule cells. The Gal is found in high density as a cell surface molecule in most species with exceptions of humans and OldWorld monkeys and promotes hyperacute rejection. The MHC molecules represent the most critical mediator of chronic rejection. The MHC I molecule, equivalent to human leukocyte antigen (HLA) I in non-human species, is located in the cell membrane of all nucleated cells. The MHC II molecule is found on specialized antigen presenting cells of the immune system (Wong and Griffiths, 2014).

The alkaline solution utilized for AG did not modify the histologic characteristics of collagen and elastic fibers, similar to the observed by BET *et al.* (2001). Bielli *et al.* (2018) used hypertonic solution followed by alkaline and neutralizing solutions, bacteriostatic solutions and radiation in bovine pericardium. For these authors, the analysis of histochemical staining by Masson's Trichrome and Verhoeff-Van Gieson confirmed

the maintenance of the morphological appearance of both collagen and elastic fibers, like in this work. In addition, previous work demonstrated by thermal analysis and SDS polyacrylamide gel electrophoresis the maintenance of collagen structure in bovine pericardium after treatment in alkaline solution for 72 hours (BET *et al.*, 2001). Regarding the elastic fibers, it was expected that alkaline treatment at pH13 would not alter the distribution characteristics, like in the CG slides. While most proteins are easily denatured (and solubilized) under heat and extreme conditions of pH, elastin survives because of its unique chemical composition and highly cross-linked nature. Crosslinking results in mature elastin which is insoluble and extremely stable (Mecham,2008).

The preservation of morphology, collagen and elastic fiber alignment and thermal stability of ECM structure, it is possible that the xenogeneic scaffold be identify as self. In turn, foreign body response and subsequent fibrous encapsulation of the graft may be avoided (Wong *et al.*, 2016).

In addition to decellularization, the alkaline solution resulted in the removal of non-fibrous proteins from the extracellular matrix. There is still a large debate regarding the importance of spatial relationships between ECM components and complete ECM composition to determine the ultimate utility of a biomaterial (AAMODT and Grainger, 2016). The maintenance of these non-fibrous proteins may be important for questions related to structure and mechanical resistance but may act as antigens and provoke reactions at the implant receptor (Badylak *et al.*, 2011). In this work, the information obtained by the histological analysis corroborates previous works and demonstrates that the technique is promising for obtaining cartilaginous biomaterials to be applied in tissueengineering.

CONCLUSIONS

It was concluded that the alkaline solution used for 72 hours provided almost complete decellularization of bovine ear elastic cartilage, removal of non-fibrous proteins and preservation of extracellular matrix fibrous proteins. It is suggested that new studies be carried out for the physical-chemical characterization and the biocompatibility of the treated material.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

REFERENCES

- AAMODT, J.M.; GRAINGER, D.W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*, v.86, p.68-82, 2016.
- BADYLAK, S.F.; GILBERT, T.W. Immune response to biologic scaffold materials. *Semin: Immunol.*, v.20, p.109-116, 2008.
- BADYLAK, S.F.; TAYLOR, D.; UYGUN, K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, v.13, p.27-53,2011.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M. C. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. Barueri: Manole, 2003. 341p.
- BET, M.R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C.A. Characterization of polyanionic collagen prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains. *Biomacromolecules*, v.2, p.1074-1079,2001.
- BIELLI, A.; BERNARDINI, R.; VARVARAS, D. *et al.* Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, v.78, p.420-426,2017.
- BROWN, B.N.; BADYLAK, S.F. Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Transl. Res.*, v.163, p.268-285, 2014.
- CAO, Z.; DOU, C.; DONG, S. Scaffolding biomaterials for cartilage regeneration. *J. Nanomater.*, v.2014, 8p., 2014.
- CEBOTARI, S.; TUDORACHE, I.; JAEKEL, T. *et al.* Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif. Organs.*, v.34, p.206-210, 2010.
- DAAMEN, W.F.; VEERKAMP, J.H.; VAN HEST, J.C.M. *et al.* Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*, v.28, p.4378-4398, 2007.

1 **CAPÍTULO 4-**

2 **COMPARAÇÃO DA BIOCAMPATIBILIDADE *IN VIVO* DE CARTILAGEM** 3 **AURICULAR DE BOVINOS TRATADA EM SOLUÇÃO ALCALINA E TELA DE** 4 **POLIPROPILENO EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*)**

5 [Comparison in vivo biocompatibility of auricular cartilage of the bovine treated in
6 alkaline solution and polypropylene mesh in rabbits(*Oryctolagus cuniculus*)]

7 **K.D. Ferreira^{1*}, S.H.A. Filho¹, E.V.S. Silva¹, L.A.F. Silva², V.A.S. Vulcani³**

8 ¹Alunos de pós-graduação – Escola de Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal
9 de Goiás - Goiânia, GO

10 ²Escola de Veterinária e Zootecnia – Universidade Federal de Goiás - Goiânia, GO

11 ³Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias – Universidade Federal de Jataí -
12 Jataí, GO

13 Manuscrito formatado conforme as normas para publicação.
14

15 **RESUMO**

16 O tecido cartilaginoso é amplamente utilizado em procedimentos de reparo tecidual por
17 possuir características favoráveis, como a maleabilidade e antigenicidade reduzida.
18 visando reduzir as respostas imunogênicas, tratamentos químicos e enzimáticos são
19 realizados em tecidos para serem utilizadas como biomateriais. O presente estudo
20 objetivou avaliar a resposta biológica *in vivo* de cartilagens auriculares de bovinos
21 tratadas em solução alcalina e da tela de polipropileno, quando implantadas na parede
22 abdominal de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Foram utilizados 24 animais, separados
23 de forma aleatória e homogênea no grupo controle (TP) no qual foram implantadas tela
24 de polipropileno, e no grupo experimental (CA), no qual foram utilizados implantes de
25 cartilagem elástica bovina tratada em solução alcalina. Os procedimentos cirúrgicos e as
26 eutanásias foram realizados nos períodos de avaliações estabelecidos, em sete e 35 dias,
27 para ambos os grupos. As avaliações macroscópicas demonstraram formação de fibrina e
28 aderências em ambos os grupos, sendo que no grupo (TP) notou-se aderências de grau 3
29 nos períodos de avaliação. Os materiais obtidos na necropsia foram processados e
30 analisados por avaliação histológica em HE. Dos parâmetros analisados, o processo
31 inflamatório apresentou-se em menor intensidade no grupo (CA). Notou-se ainda a
32 formação de capsula fibrosa no grupo (TP), diferentemente do observado no grupo (CA),
33 caracterizado pela presença de calcificação promovida pela osteoindução de osteoblastos
34 em decorrência do processamento alcalino.
35

36 **PALAVRAS-CHAVE:** Biomateriais, cartilagem auricular, descelularização, resposta
37 inflamatória, tratamento alcalino.
38

39 **SUMMARY**

40
41 Cartilaginous tissue is widely used in tissue repair procedures because it has favorable
42 characteristics, such as malleability and reduced antigenicity. in order to reduce
43 immunogenic responses, chemical and enzymatic treatments are performed on tissues to
44 be used as biomaterials. The present study aimed to evaluate the in vivo biological

45 response of auricular bovine cartilages treated in alkaline solution and polypropylene
46 mesh, when implanted in the abdominal wall of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Twenty-
47 four animals were used, separated at random and homogeneously in the control group
48 (TP) in which polypropylene mesh was implanted, and in the experimental group (CA),
49 in which bovine elastic cartilage implants treated in alkaline solution were used. Surgical
50 procedures and euthanasias were performed during the established evaluation periods, in
51 seven and 35 days, for both groups. Macroscopic evaluations showed fibrin formation
52 and adhesions in both groups, and in the group (TP) grade 3 adhesions were noted in the
53 evaluation periods. The materials obtained at necropsy were processed and analyzed by
54 histological evaluation in HE. Of the analyzed parameters, the inflammatory process was
55 less intense in the group (AC). It was also noted the formation of fibrous capsules in the
56 group (TP), differently from what was observed in the group (CA), characterized by the
57 presence of calcification promoted by osteoinduction of osteoblasts due to alkaline
58 processing.

59
60 **KEYWORDS:** Biomaterials, auricular cartilage, decellularization, inflammatory
61 response, alkaline treatment

62 63 **INTRODUÇÃO**

64 Materiais empregados como implantes devem possuir, dentre outras
65 características, atoxicidade, reprodutibilidade e biocompatibilidade. Neste sentido,
66 diversos estudos são realizados para melhorar as condições dos materiais, sejam de
67 origem natural ou sintética, para serem empregados como biomateriais (Chattopadhyay e
68 Raines, 2014; Stoppel et al., 2015; Vig et al., 2017; Kiradzhyska, 2019).

69 O uso de materiais sintéticos, como a tela de polipropileno em modelos
70 experimentais busca compreender o comportamento do material, no intuito de reduzir as
71 respostas de corpo estranho. As propriedades inerentes as telas de polipropileno são
72 caracterizadas pelo tamanho dos poros, resistência, gramatura do material,
73 biocompatibilidade, resistência e deformação (Biondo-Simões et al., 2018). O tamanho
74 do poro, sendo este micro ou macroporoso, associadas a gramatura da tela, sendo alto
75 (entre 80 g/m²-100 g/m²), médio (entre 50-80 g/m²) e baixo (50 g/ m²), são considerados
76 uma das principais propriedades para desenvolver telas com respostas satisfatórias
77 quando implantadas (Utrabo et al., 2017).

78 Os materiais poliméricos naturais, que possuem em sua composição o colágeno e
79 a elastina, presentes nas cartilagens elásticas de bovinos, destacam-se por suas
80 características biodegradáveis e biocompatíveis (Ling et al., 2018; Rabbers et al., 2019).

81 O tecido cartilaginoso é amplamente utilizado em procedimentos de reparo
82 tecidual por possuir características favoráveis, como a maleabilidade e antigenicidade
83 reduzida (Nimeskern et al., 2015; Huang et al., 2018). Estudos realizados com a

84 cartilagem *in natura* preservadas em meios de conservação, como o glutaraldeído,
85 demonstraram o potencial desta biomembrana como implante, por apresentar adaptação
86 satisfatória ao tecido do receptor (Vulcani et al., 2013; Bariani et al., 2014; Oliveira et al.,
87 2015). Entretanto, as reações inflamatórias observados pós implantação são pontos que
88 devem ser considerados, pois refletem a biocompatibilidade limitada do biomaterial
89 (Figueiredo et al., 2013). Neste contexto, visando reduzir as respostas imunogênicas,
90 tratamentos químicos e enzimáticos são realizados em tecidos para serem utilizadas como
91 biomateriais (Schwarz et al., 2012; Bielli et al., 2017).

92 O tratamento alcalino é um método químico, realizado com a imersão da
93 cartilagem elástica em solução alcalina em pH 13, por um período que varia de acordo
94 com o tecido utilizado. Em decorrência deste tratamento, é possível reduzir as respostas
95 celulares exacerbadas com a implantação do material, devido à descelularização
96 promovida pelo processamento. Além disso, estudos anteriores demonstraram que o
97 tratamento alcalino não afeta a estrutura tridimensional das fibras da matriz extracelular,
98 o que favorece sua utilização para o estímulo e proliferação celular (Bet et al., 2001; Horn,
99 2009; Rabbers et al., 2019).

100 A biocompatibilidade de um material está estreitamente relacionada ao
101 comportamento das células em contato com a superfície, especialmente à adesão celular
102 (Kiradzhyska e Mantcheva, 2019). É validada após a realização de testes *in vitro* e *in*
103 *vivo*, de acordo com as normas da (ISO 10993-6). Os testes *in vitro* são realizados com o
104 material em contato com culturas celulares e visam compreender as reações celulares
105 quando em contato com o material (Mizutani et al., 2014; Bruzauskaite et al., 2016; Xu
106 et al., 2019). Entretanto, mesmo reduzindo o impacto do uso de animais, os testes *in*
107 *vivo* ainda são uma etapa fundamental para a determinação das respostas celulares em
108 decorrência a implantação do biomaterial em um ambiente complexo, com diversos
109 tecidos, tipos celulares e reações bioquímicas (Shin et al., 2018).

110 As respostas celulares são deflagradas com a implantação dos materiais e são
111 constituídas por reação sistêmica de fase aguda, que desencadeiam na ação de células
112 específicas, que atuam para reparar o dano tecidual promovido (Gretzer et al., 2006; Shin
113 et al., 2018). Neste processo são observadas o predomínio de infiltrado polimorfonuclear
114 neutrofílico. Considera-se também a ocorrência do infiltrado mononuclear, que
115 caracteriza a inflamação crônica, havendo o predomínio de macrófagos e linfócitos
116 (Anderson, 2001).

117 O processo de formação capsular, com o uso de implantes, é semelhante tanto em
118 animais quanto em humanos. No entanto, avaliações específicas são necessárias, visto
119 que o organismo de cada animal reage de uma forma específica (Mori et al., 2014).
120 Considera-se, então, que essas respostas vão depender do reconhecimento ao biomaterial
121 como estranho, levando ao processo de fagocitose, na incorporação por células gigantes,
122 inflamação ou isolamento pela fibrose (Modulevsky e Cuerrier, 2016; Kiradzhyska e
123 Mantcheva, 2019).

124 A maioria dos estudos buscaram demonstrar a viabilidade do uso de cartilagens
125 elásticas tratadas em solução alcalina comparadas a outros materiais colagênicos.
126 Entretanto, poucos foram os estudos comparativos entre as cartilagens elásticas tratadas
127 em solução alcalina e da tela de polipropileno, um biomaterial sintético amplamente
128 utilizado no reparo tecidual. Além disso, existe a necessidade de verificar as respostas
129 teciduais da cartilagem elástica em solução alcalina em outras espécies, como os coelhos
130 que apresentam reações teciduais mais intensas frente a um corpo estranho.

131 Dessa forma, este estudo teve como objetivo comparar a biocompatibilidade de
132 cartilagem elástica tratada em solução alcalina com telas de polipropileno implantadas no
133 tecido subcutâneo do abdômen de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), para a utilização
134 como biomaterial.

135

136 MATERIAL E MÉTODOS

137

138 O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais
139 (CEUA/UFG), protocolo nº. 094/18. Foram obtidas 20 cartilagens auriculares de
140 bovinos adultos do descarte de subprodutos do abate, em frigoríficos sob inspeção
141 federal. Realizou-se a dissecação das peças adquiridas, para retirada da pele e tecido
142 subcutâneo, com auxílio de bisturi, pinças e tesouras. Esta quantidade foi definida para
143 preparar cartilagens suficientes para a caracterização biológica deste estudo e para as
144 análises histológicas e microestruturais. Em seguida, as cartilagens foram limpas com
145 solução salina 0,9% e água deionizada. Das 20 cartilagens, dez foram liofilizadas e
146 estocadas a 25°C, obtendo-se cartilagem auricular *in natura*.

147 As outras dez cartilagens foram tratadas em solução alcalina por 72 horas em
148 temperatura não superior a 25°C. A solução alcalina foi preparada por sais, contendo
149 sulfatos, cloretos e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos, conforme
150 procedimento usual do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de

151 São Carlos – USP. Após as 72 horas de preparo, as cartilagens foram neutralizadas em
152 uma segunda solução, também contendo sulfatos e cloretos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , por
153 um período de seis horas.

154 O excesso de sais foi removido por uma série de três lavagens, com intervalos de
155 seis horas, em 3% de solução de ácido bórico, solução de EDTA 0,3% e água deionizada
156 (Horn et al, 2009). Na sequência, as cartilagens foram mantidas por um período de 24
157 horas para serem estabilizadas em solução tampão fosfato salino, para manterem
158 constante o valor de pH de 7,4. O processo foi finalizado com última lavagem das
159 cartilagens em água deionizada seguido do processo de liofilização e estocadas a 25°C,
160 obtendo-se cartilagem auricular com tratamento alcalino de 72h, denominada de CA72
161 (Goissis et al., 2003; Rabbers et al.,2019). A tela de polipropileno Propy-Mesh[®] foi
162 adquirida em loja de produtos hospitalares. Apresentando tamanho 30cm x 30cm,
163 monofilamentar, de média gramatura e sintética, com gramatura de 0,91gr./m², tamanho
164 do poro de 0,200µm e diâmetro do filamento com 180 µm, equivalente ao fio de sutura
165 calibre 2-0 de polipropileno. A tela foi recortada em tamanhos 3cm x 3cm, sendo esses
166 recortes encaminhados, em pacotes individuais, para esterilização e, posteriormente,
167 utilizados para a avaliação da biocompatibilidade após implantação em grupo
168 experimental.

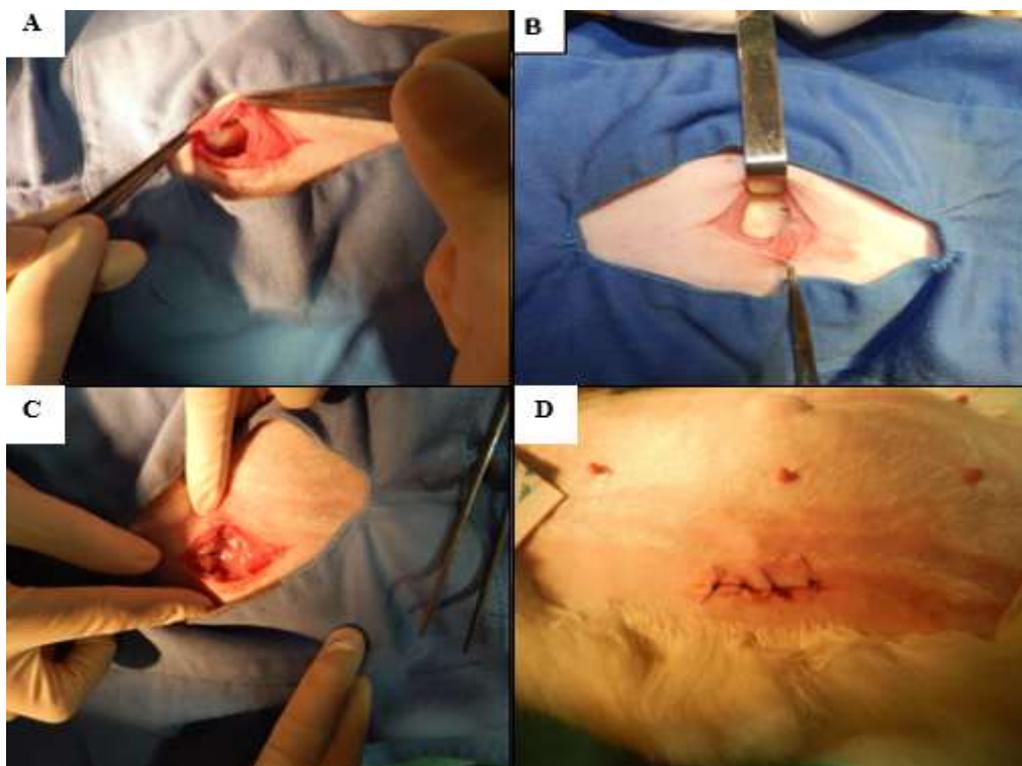
169 O manejo, acondicionamento, procedimentos cirúrgicos e avaliação dos animais
170 ocorreu no Galpão Experimental da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade
171 Federal de Goiás (EVZ/UFG), regidos sob as normas de experimentação animal (Rivera,
172 2014). Foram utilizados 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), machos, da raça Nova
173 Zelândia, saudáveis, com seis meses de idade e, aproximadamente, três quilos e meio de
174 peso corporal, distribuídos em dois grupos experimentais homogêneos com 12 animais
175 (TP e CA). No grupo TP foram alocados os coelhos que receberam a tela de polipropileno
176 e no grupo CA a cartilagem auricular de bovino tratada em solução alcalina por 72 horas.
177 Cada grupo dividiu-se em dois subgrupos, com seis animais cada, equivalentes ao período
178 de avaliações, aos sete e 35 dias pós implantação dos biomateriais.

179 Para a realização dos procedimentos cirúrgicos foi realizada a contenção manual
180 seguida de medicação pré-anestésica empregando associação de cloridrato de cetamina
181 10 mg/kg, midazolam 0,2 mg/kg e xilazina 1,0 mg/kg, por via intramuscular. Dando
182 continuidade, realizou-se a tricotomia e antissepsia da região abdominal, assim como nas
183 faces externas das orelhas para cateterização de veia marginal auricular. A indução

184 anestésica foi realizada com propofol, na dose de 2mg/kg, pela via intravenosa e a
185 manutenção com isoflurano (1-3%) diluído em oxigênio, em aparelho de anestesia
186 inalatória (Massone, 2011). Para melhorar a maleabilidade da cartilagem elástica, esta foi
187 imersa em solução fisiológica por um período de 10 minutos (Vulcani et al., 2013).

188 Deste modo, foi possível remodelar o material no formato elíptico 3x3cm. Para
189 implantar a tela de polipropileno e a cartilagem elástica, foi realizada primeiramente uma
190 incisão na pele do flanco, seguido da exposição do tecido subcutâneo e da musculatura.
191 Por divulsão, os músculos oblíquo abdominal externo, oblíquo abdominal interno e
192 transverso do abdome foram afastados e o peritônio incisado, deixando evidenciar o
193 interior da cavidade abdominal (Fig.1A). Na sequência, os implantes foram fixados intra-
194 abdominal no peritônio parietal, empregando fio de poliglecaprone 2-0 em padrão de
195 sutura simples separado, com quatro pontos cardeais (Fig.1B). A reconstituição dos
196 tecidos iniciou-se com a aproximação dos planos musculares, empregando o mesmo fio
197 e sutura em padrão X (Fig 1C). Por último, realizou-se a dermorrafia com fio náilon 3-0
198 em sutura padrão simples separado (Fig. 1D).

199



200

201 Figura 1: Registros fotográficos do local de implantação da cartilagem elástica tratada em
202 solução alcalina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em A, exposição do tecido subcutâneo e
203 da musculatura, deixando evidenciar o interior da cavidade abdominal. Em B, fixação do
204 implante de cartilagem elástica tratada em solução alcalina no peritônio parietal. Em C
205 aproximação dos planos musculares com fio de poliglecaprone 2-0. Em D, dermorrafia com fio
206 náilon 3-0 em sutura padrão simples.

207

208 A distribuição dos animais e o tempo de avaliação foram iguais em ambos os
209 grupos. Após o procedimento cirúrgico, os animais de ambos os grupos foram
210 monitorados até a recuperação anestésica e em seguida encaminhados ao biotério, e
211 realocados em suas gaiolas. Na analgesia pós-operatória, foi administrado cloridrato de
212 tramadol na dose de 3mg/kg/BID e meloxicam 0,6 mg/kg/SID, por via subcutânea e
213 antibiótico enrofloxacin na dose de 7mg/kg/SID, durante cinco dias (Massone,2011). Ao
214 finalizar o período pós-operatório estabelecido para os grupos, foram realizadas a
215 eutanásia dos animais, no período estabelecido de sete e 35 dias de pós operatório,
216 seguindo o protocolo estabelecido pela Resolução Normativa nº 13, de 20.09.2013, com
217 sobredoses de propofol com a administração de 5,0mL de cloreto de potássio 10%, ambos
218 por via intravenosa.

219 Após a eutanásia dos grupos experimentais, realizou-se a necropsia para avaliação
220 macroscópica da cavidade abdominal, sendo utilizados critérios como ausente e presente
221 dos parâmetros avaliados como presença de fibrina e aderências. As aderências foram
222 classificadas de acordo com score 0- ausente; escore 1- mínima (com separação
223 espontânea); escore 2- moderada (separada por tração); escore 3- intensas (separadas por
224 dissecação) Rossi et al.,(2017). As avaliações microscópicas *post-mortem*, foram colhidas
225 amostras dos implantes e conservados em solução de formalina a 10%, por um período
226 48 horas e depois armazenados em álcool 70%. Os fragmentos de tecidos foram
227 processados e incluídos em blocos de parafina e cortados em micrótomo na espessura de
228 5,0µm e, em seguida, corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE).

229 Nas avaliações microscópicas, considerou-se o método de estudo qualitativo,
230 realizado por um único avaliador às cegas, para verificar as respostas celulares e teciduais
231 decorrentes da presença dos implantes. Foi avaliado a presença de infiltrado
232 polimorfonucleares (PMN) e mononucleares, células gigantes, neovascularização,
233 calcificação e tecido de granulação. A leitura para identificação baseou-se em escores
234 estabelecidos em ausente (0), discreta (+), moderado (++) e acentuado (+++), sendo que
235 para o critério de presença de calcificação, também foi classificada em focal, multifocal
236 e difuso com escores 1, 2 e 3 respectivamente (Jurk et al., 2016).

237 Os dados obtidos nas avaliações macroscópicas foram considerados o total de
238 animais de cada grupo (TP) e (CA), sendo avaliado no período de pós operatório total,
239 realizando o teste exato de Fischer. Nas avaliações microscópicas, as variáveis foram

240 distribuídas utilizando-se o teste de Wilconxon Mann-Whitney, sendo que os valores
 241 obtidos em ambos os testes com $p < 0,05$ foram considerados como de significância
 242 estatística (Sampaio, 2007).

243

244 RESULTADOS

245

246 Durante a fase experimental não ocorreram complicações clínicas ou óbito dos 24
 247 animais utilizados no experimento. As análises macroscópicas, realizadas no período pós-
 248 operatório nos grupos (CA) e (TP) são demonstradas na Tab. 1.

249

250 Tabela 1. Comparativo das alterações macroscópicas observadas no período pós operatório dos
 251 animais dos grupos cartilagem elástica alcalina (CA) e tela de polipropileno (TP),
 252 dispostos em valores absolutos, relativos e valores de p , do teste de Fischer.

253

254

Grupos	Alterações	n° de animais por grupo	%	
TP	Fibrina	10	84%	$p = 0,23$
CA		6	50%	
TP	Aderências	11	92%	$p = 1$
CA		9	75%	

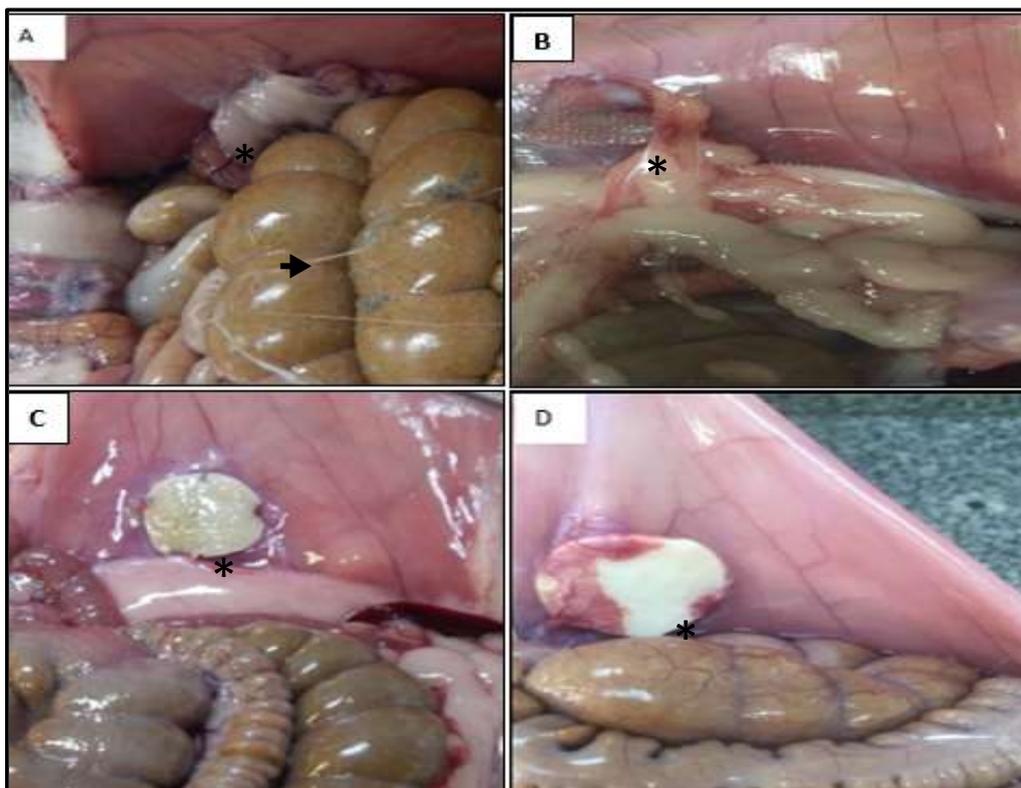
255

Fonte: a autora (2021)

256

257 Nota-se que apesar das alterações observadas não houve diferença estatística entre
 258 os grupos, com valores de $p > 0,05$. A presença de fibrina nos grupos correspondeu a 84%
 259 dos animais no grupo (TP) e 75% dos animais do grupo (CA). Com relação a presença de
 260 aderências foi notada em 92% dos animais do grupo (TP), sendo caracterizadas em escore
 261 grau 3, devido a junção firme dos implantes de tela de polipropileno na musculatura com
 262 a parede abdominal, omento, gordura visceral e intestinos, tanto nos períodos de 7 e de
 263 35 dias de pós operatório, como demonstrado na Fig. 2 A e B. No grupo (CA) as
 264 aderências ocorreram em 75% dos animais, sendo caracterizadas em escore grau 1 devido
 265 a junção leve do implante de cartilagem elástica tratada em solução alcalina com gordura
 266 visceral dos animais deste grupo, tanto nos períodos de 7 e de 35 dias de pós operatório
 267 (Fig. 2C e D).

268



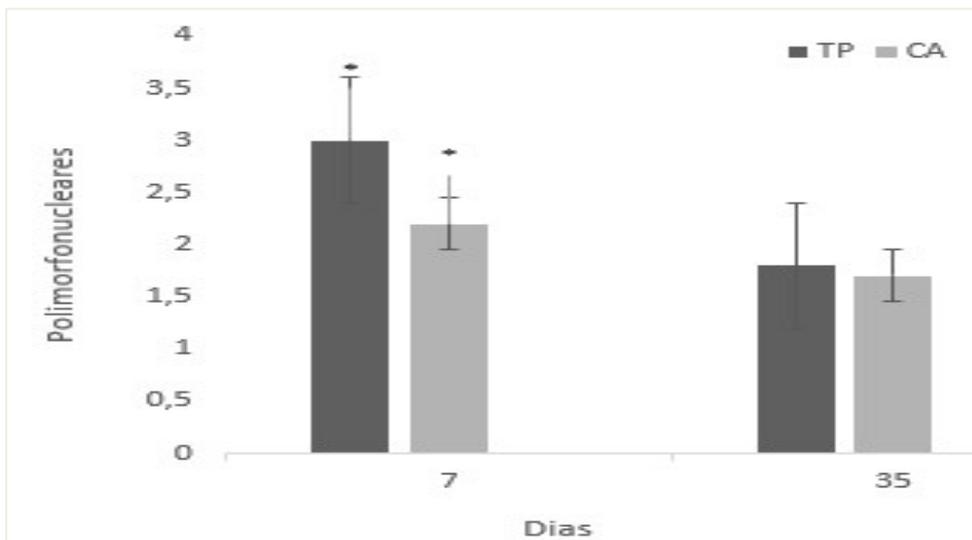
269

270 Figura 2. Registros fotográficos das avaliações macroscópicas *post mortem* realizadas em
 271 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), em diferentes períodos pós-implantação da tela de polipropileno
 272 e da cartilagem elástica tratada em solução alcalina. Em A nota-se presença de fibrina (seta) e de
 273 aderência (*) em porção intestinal aos 7 dias de pós-operatório do implante de tela de
 274 polipropileno. Em B aderência de grau 3(*) com omento, gordura visceral e intestinos, no
 275 período de 35 dias de pós operatório do implante de tela de polipropileno. Em C aderência de
 276 escore grau 1 (*) devido a junção leve do implante de cartilagem elástica tratada em solução
 277 alcalina com gordura visceral aos 7 dias de pós operatório. Em D aderência de escore grau 1 (*)
 278 em porção do intestino ao implante de cartilagem elástica tratada em solução alcalina, aos 35
 279 dias de pós operatório.

280

281 Na avaliação microscópica, com relação à resposta celular constatou-se presença
 282 de infiltrado polimorfonuclear (PMN) nas avaliações do 7º dia, sendo verificada
 283 diferenças entre os tratamentos (TP) e (CA) e entre os períodos de avaliação. Houve maior
 284 infiltrado de polimorfonucleares para o grupo (TP), com predomínio de neutrófilos e
 285 eosinófilos, com relação ao grupo (CA), que apresentou predomínio de eosinófilos,
 286 notando-se diferença ($p < 0,05$) entre os grupos (Fig. 3).

287



288

289 Figura 3. Gráfico do ranqueamento da população de células polimorfonucleares (PMN) para
 290 o grupo tela de polipropileno (TP) e cartilagem elástica (CA). Nota-se aumento entre grupos
 291 e dias, sendo no 7^a dia seguido por rápido declínio. Diferença estatística dos grupos no mesmo
 292 período (*).

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

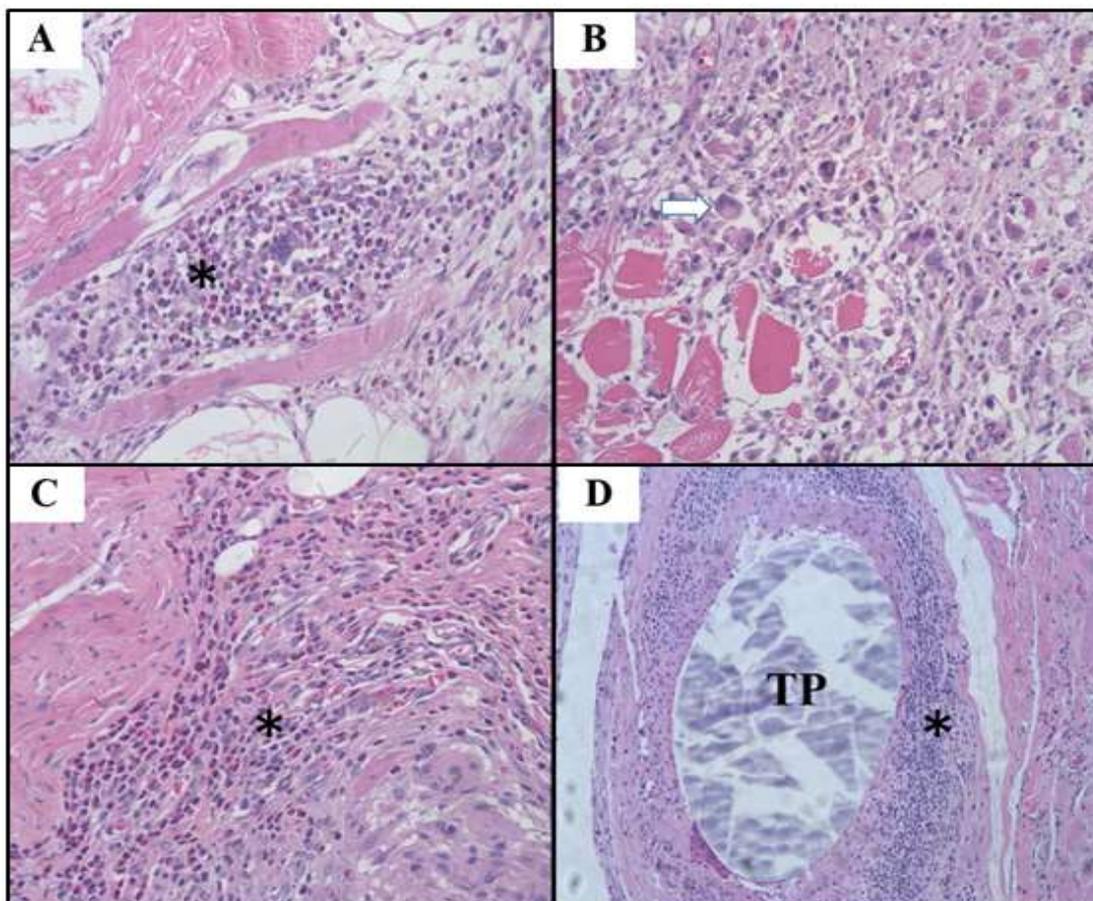
303

304

305

306

Com relação a disposição das células inflamatórias, notou-se que as margens superior e inferior da cartilagem tratada, que corresponderia ao seu pericôndrio (Fig. 4A), concentrou grande quantidade de infiltrado inflamatório polimorfonuclear, sendo que não foi observado um avanço mais profundo de PMN, pois não se notou a presença destes na matriz cartilaginosa. O infiltrado inflamatório PMN, predominante aos 7 dias de avaliação sofreu transição gradual para infiltrado mononuclear caracterizando a instauração do processo inflamatório crônico. Ressalta-se também que em ambos os grupos foi observado reação inflamatória com células gigantes característica de corpo estranho (Fig. 4B). O infiltrado mononuclear foi perceptível aos 35 dias de avaliação com o predomínio de linfócitos e plasmócitos. Nota-se no grupo (CA) uma reação inflamatória com presença do infiltrado mononuclear ao redor do material, indicando o contato da matriz cartilaginosa com o organismo animal (Fig. 4C). O grupo (TP) também apresenta característica semelhante, porém mais intensa e difusa (Fig. 4D).



307

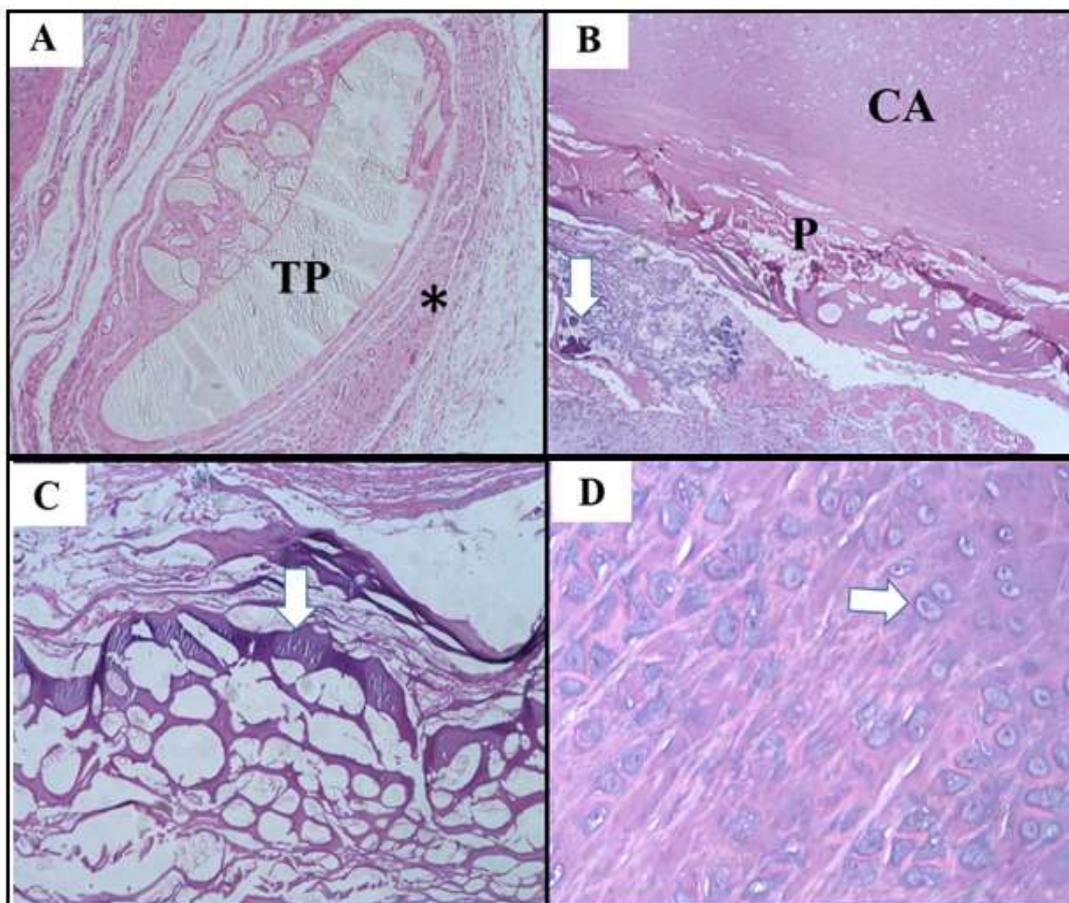
308 Figura 4. Fotomicrografias de cartilagens elásticas de bovinos e tela de polipropileno em diferentes
 309 períodos pós-operatório, após a implantação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em A, infiltrado
 310 inflamatório PMN (asterisco) na região periférica de cartilagem elástica tratada em solução alcalina
 311 (CA), aos sete dias pós-implantação. HE, objetiva 10x. Em B, infiltrado inflamatório na região periférica
 312 de (CA), demonstrando a presença de células gigantes (seta), aos sete dias pós-implantação. HE,
 313 objetiva 10x. Em C, infiltrado inflamatório mononuclear ao redor de CA (asterisco), aos 35 dias pós-
 314 implantação. HE, objetiva 10x. Em D, infiltrado inflamatório (asterisco) ao redor da tela de
 315 polipropileno (TP), aos 35 dias pós-implantação. HE, objetiva 5x.

316

317

A formação de cápsula fibrosa ao redor da tela de polipropileno foi observada em
 318 quatro animais do grupo (TP) aos 35 dias de avaliação (Fig. 5A). No grupo (CA) não
 319 ocorreu a formação de cápsula fibrosa ao redor dos implantes de cartilagem tratada em
 320 solução alcalina. No grupo (CA) verificou-se a presença de calcificação, com a formação
 321 de estruturas trabeculares aos 7 dias de avaliação (Fig. 5B e C), variando em sua
 322 intensidade. Observou-se dois animais com calcificação discreta multifocal, sete animais
 323 com calcificação moderada multifocal e três animais com calcificação acentuada
 324 multifocal. Ainda para o grupo (CA), aos 35º dias notou-se a formação de tecido de
 325 granulação, com a proliferação de osteoblastos (Fig. 5D), sendo verificado três animais
 326 com proliferação de osteoblastos discreta, cinco animais com proliferação de osteoblastos
 327 moderada, e quatro animais com proliferação de osteoblastos acentuada. A

328 neovascularização esteve presente tanto no grupo (TP) como no grupo (CA), com 5
 329 animais apresentando neovascularização discreta e 4 animais neovascularização
 330 moderada aos 35 dias de avaliação, sendo que 3 animais apresentaram neovascularização
 331 acentuada aos 7 dias de avaliação. Não foi observado diferença entre os grupos com
 332 $p>0,05$.



333

334 Figura 5. Fotomicrografias de cartilagens elásticas de bovinos e tela de polipropileno em diferentes
 335 períodos pós-operatório, após a implantação em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). Em A, tela de
 336 polipropileno (TP) envolvida por cápsula fibrosa (asterisco), aos 35 dias pós-implantação. HE,
 337 objetiva 5x. Em B, presença de calcificação (seta), ao redor da cartilagem alcalina, sete dias pós-
 338 implantação. CA – cartilagem; P-pericôndrio. HE, objetiva 2,5x. Em C, presença de calcificação
 339 (seta) ao redor do implante de cartilagem alcalina, sete dias pós-implantação, com formações
 340 trabeculares. HE, objetiva 5x. Em D, presença de osteoblastos em tecidos ao redor da cartilagem
 341 alcalina, 35 dias pós-implantação. HE, objetiva 5x.

342

343 DISCUSSÃO

344

345 As avaliações macroscópicas realizadas em ambos os grupos, permitiram
 346 considerar que as características sintéticas da tela de polipropileno, ocasionaram reações
 347 teciduais mais acentuadas, como a formação de aderências em vísceras de grau 3, ao final
 348 da fase de inflamação aguda. A formação de fibrina ocorreu em ambos os grupos,
 349 podendo ser relacionada ao trauma cirúrgico e a resposta inerente à espécie utilizada.

350 Estudo realizado por Szabo et al., (2016), demonstrou que em coelhos são relatados
351 processo inflamatório mais intenso após a realização de procedimentos cirúrgicos com
352 acesso à cavidade abdominal. Diante disto é possível correlacionar que a presença de
353 fibrina é resultado de fatores relacionados ao animal associados à localização da ferida
354 que intensificam as reações do processo cicatricial próprias de cada material implantado.

355 As aderências resistentes a manipulação de grau 3 observadas no grupo TP pode
356 estar relacionado a utilização de tela de polipropileno microporosa. Achado semelhante
357 foi descrito em estudos realizados por Novitsky et al.,2007; Pascual et al., 2012 que
358 demonstraram que fatores intrínsecos à tela de polipropileno, como porosidade e malha,
359 podem influenciar diretamente no surgimento de aderências quando em contato com
360 vísceras abdominais, como os intestinos.

361 Outros estudos realizados por Aramayo et al., (2013); Pereira-Lucena et al.,
362 (2014), corroboram com essa afirmativa, de modo que a formação de aderências de grau
363 3 com intestinos e omento, nos períodos iniciais de pós-operatório, estaria relacionado a
364 características da tela de polipropileno utilizada. Entretanto, para Utrabo et al., (2017) a
365 formação de aderências de grau 3, observadas com a implantação de telas de
366 polipropileno estaria relacionada a transposição do peritônio a algum ponto de fixação da
367 tela. Ressalta-se ainda que em estudo experimental em coelhos demonstrou que até 40%
368 das telas estruturadas com polipropileno, mesmo revestidas com materiais bioabsorvíveis
369 à base de colágeno, promoveram a formação de aderências (Novitsky et al., 2007).

370 Tanto o grupo tela de polipropileno quanto a cartilagem elástica tratada em
371 solução alcalina, apresentaram polimorfonucleares com intensidade variável, de acordo
372 com o material implantado. Nota-se que o grupo CA apresentou menor quantidade de
373 PMN comparados ao grupo TP provavelmente em decorrência do tratamento químico
374 realizado na cartilagem.

375 Wong e Griffiths (2014) destacam que a descelularização com a solução alcalina
376 promove a retirada da maioria dos antígenos derivados dos condrócitos e, deste modo,
377 apresenta menor quantidade de componentes antigênicos. Deste modo, ao realizar o
378 tratamento alcalino nas cartilagens elásticas reduziu-se as respostas imunogênicas e
379 conseqüentemente a quantidade de PMN. Osiecka-Iwan et al.,(2018) observaram fato
380 semelhante em estudo que avaliou as propriedades antigênicas dos condrócitos,
381 demonstrando que essas células expressam moléculas do complexo principal de

382 histocompatibilidade- MHC de classe I e, em algumas espécies, classe II, consideradas
383 antigênicas.

384 A presença de eosinófilos no grupo CA, observado aos 7 dias de avaliação, pode
385 ser relacionada aos resquícios celulares derivados dos condrócitos, que permaneceram
386 retidos na região periférica da cartilagem, mesmo após a realização de sucessivas
387 lavagens no processo de descelularização. Em estudo realizado por Ferreira et al., (2020)
388 a descelularização em solução alcalina demonstrou ser efetiva na região central da
389 cartilagem, sendo que em região de pericôndrio observou-se a presença desses resquícios
390 celulares. Xu et al., (2017) evidenciaram achado semelhante, porém a descelularização
391 realizada em membrana de tendão de suínos demonstrou ser mais efetivo na região
392 periférica do tecido. Deste modo, a presença desses resquícios de um material
393 descelularizado proveniente de uma espécie diferente dos coelhos, pode ter contribuído
394 para desencadear uma resposta imune de hipersensibilidade nos animais.

395 Outro fator relevante que também deve ser considerado na presença de
396 eosinófilos observado no grupo CA pode estar relacionado a própria espécie escolhida
397 como modelo experimental no presente estudo. Resultado semelhante foi observado por
398 Zimmerman (2007), que evidenciou a presença considerável de eosinófilos em estudo
399 experimental em coelhos que receberam implantes de membrana de látex, não sendo
400 observado o mesmo fenômeno em cães e equinos utilizando o mesmo implante.

401 Alguns autores concordam que a ocorrência de reação granulomatosa com a
402 formação de cápsula fibrosa, como observado no grupo TP, pode ocorrer devido ao alto
403 peso e porosidade da tela. No presente estudo utilizou-se telas de polipropileno
404 microporosa de alta gramatura 80 g/m². Estudo realizado por Orenstein et al.,(2012)
405 demonstraram que as telas macroporosas e de baixo peso, abaixo de 50 g/ m², seriam
406 consideradas satisfatórias na incorporação do implante ao sítio receptor, por induzirem
407 menor quantidade de infiltrado inflamatório e, conseqüentemente, menor reação de corpo
408 estranho. Entretanto para Schulz,et al.,(2009); Pascual et al., (2012), independente do
409 peso e porosidade da tela haverá a formação de cápsula fibrosa ao redor do implante.
410 Bielli et al., (2017); Utrabo (2017) acreditam que para evitar essas reações, a utilização
411 do uso combinado de telas a biopolímeros, como colágeno e quitosana, são eficientes para
412 reduzir essas reações de corpo estranho, apresentando resultados satisfatórios.

413 No presente estudo, também foi evidenciado no grupo CA a redução do processo
414 inflamatório e ausência de encapsulamento do implante de cartilagem. Goissis et

415 al.,(2003) demonstraram que a descelularização realizada em membranas de colágeno
416 bovino contribuíram para a redução do processo inflamatório instaurado com a
417 implantação dessas membranas em subcutâneo de ratos.

418 A calcificação observada em coelhos do grupo CA, com implantes de cartilagem
419 tratada em solução alcalina, é justificável em decorrência da descelularização promovida
420 na cartilagem, que favoreceu a ocorrência da osteoindução. Deste modo, as células
421 adjacentes ao pericôndrio da cartilagem descelularizada se diferenciaram em osteoblastos
422 que, por sua vez, invadiram as lacunas deixadas pelos condrócitos no processamento
423 químico com solução alcalina. De acordo com Petian et al., (2018) a descelularização
424 promove a remoção de condrócitos, sendo formado arca-bouços porosos na matriz
425 cartilaginosa que permitem a invasão dos fibroblastos. Entretanto, no presente estudo
426 realizado foi observado a presença de osteoblastos nessas lacunas, corroborando com os
427 achados de Moreira et al., (2013) que observaram a diferenciação celular osteoblástica
428 em scaffolds de colágeno aniônico preparados a partir de pericárdio bovino com
429 tratamento alcalino, demonstrando que essas membranas colagênicas apresentam
430 potencial osteoindutor. Miguel et al., (2013) e Santos et al., (2019) acrescentam ainda que
431 além do potencial osteoindutor, as matrizes poliméricas ao sofrerem hidrólise alcalina
432 aprimoram a superfície de adesão e o tamanho dos poros das membranas, aumentando
433 assim a capacidade de suporte para o crescimento e proliferação celular, incluindo os
434 osteoblastos.

435

436 **CONCLUSÕES**

437

438 Considerando-se os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que a cartilagem
439 elástica tratada em solução alcalina proporcionou processo inflamatório com intensidade
440 inferior à tela de polipropileno em coelhos. Em contrapartida, a cartilagem elástica tratada
441 em solução alcalina induziu a calcificação e formação de osteoblastos, que pode ser um
442 viés de interesse para estudos envolvendo regeneração de tecidos ósseos, em que a
443 aplicabilidade deste tipo celular é viável, sendo justificáveis novos estudos acerca dessa
444 ocorrência de osteoindução, avaliando-se animais de outras espécies por tempo maior ao
445 atualmente utilizado.

446

447 **AGRADECIMENTOS**

448 À Capes, pelo auxílio financeiro, possibilitando a realização deste estudo.

449 **REFERÊNCIAS**

450

451 ANDERSON, JM. Biological responses to materials. **Annu Rev Mater Res.** v.31; p.81-
452 110. 2001.

453

454 ARAMAYO AL, LOPES FILHO GJ, BARBOSA CA, AMARAL VF, COSTA LA.
455 Abdominal wall healing in incisional hernia using different biomaterials in rabbits. **Acta**
456 **Cir Bras.** 2013;28(4):307-16.

457

458 BARIANI JUNIOR, A. F.; LOPES, G. C.; CRISCI, A. R.; JUNIOR, R. F.;
459 GUIMARÃES, C. S. O.; GUIMARÃES, G. C. Análise morfológica e microbiológica do
460 pericárdio bovino conservado em glicerina, açúcar, mel ou sal. **Veterinária Notícias.** v.
461 20, n. 2, p. 15-24, 2014.

462

463 BET, M.R; GOISSIS, G; LACERDA, C.A. Characterization of polyanionic collagen
464 prepared by selective hydrolysis of asparagine and glutamine carboxamide side chains.
465 **Biomacromol** 2:1074–1079, 2001

466

467 BIELLI, A.; BERNARDINI, R.; VARVARAS, D.; ROSSI, P.; DI BLASI, G.;
468 PETRELLA, G.; BUONOMO, O. C.; MATTEI, M.; ORLANDI, A. Characterization of
469 a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical
470 properties. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials.** v. 78, n. 218,
471 p. 420-426, 2017.

471

472 BIONDO-SIMÕES MLP, CARVALHO LB, PESSINI, VCA; PORTO, PHC; ROBES,
473 RR, et al. Aderências em telas de polipropileno versus telas Sepramesh®: estudo
474 experimental em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgões,** 45(6), e2040,
475 2018.

476

477 BRUZAUSKAITE, I; BIRONAITE, D; BAGDONAS, E; BERNOTIENĖ; E. Scaffolds
478 and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects.
479 **Cytotechnology** 68(3):355–369, 2016.

479

480 CHATTOPADHYAY, S.; RAINES, R. T. Collagen-based biomaterials for wound
481 healing. **Biopolymers.** v. 101, n. 8, p. 821-833, 2014.

482

483 FERREIRA, KD; CARDOSO, L D; OLIVEIRA,LP; FRANZO, VS; PANCOTTI, A;
484 MIGUEL, MP; SILVA, LAF; VULCANI, VAS. Histological analysis of elastic
485 cartilages treated with alkaline solution. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.,** v.72, n.3,
486 p.647-654, 2020.

487

488 FIGUEIREDO A, COIMBRA P, CABRITA A, GUERRA F, FIGUEIREDO M.
489 Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms
490 of physicochemical characteristics and in vivo inflammatory response. **Mater Sci Eng C**
491 **Mater Biol Appl;**33(6):3506-13, 2013.

492

493 GOISSIS,G; PARREIRA, DR; SUZIGAN, S. A study on the biocompatibility and
494 integration of acellular polyanionic collagen:elastin matrices by soft tissue. **Rev. Bras.**
495 **Eng. Bioméd.,** vol.19, n3, p.167-173, 2003.

496

- 497 GRETZER C, EMANUELSSON L, LILJENSTEN E, THOMSEN P. The inflammatory
498 cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous
499 repair around implanted materials. **J Biomater Sci Polym Ed.**;17(6):669-87, 2006.
500
- 501 HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen
502 with chitosan: effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate**
503 **Polymers.** v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009.
504
- 505 HUANG, K; LI,Q; LI,Y; et al. Cartilage Tissue Regeneration: The Roles of Cells,
506 Stimulating Factors and Scaffolds. **Curr Stem Cell Res Ther.**;13(7):547-567, 2018.
507
- 508 ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices - Part 6: Tests for local effects
509 after implantation. **International Standard.** 2:1-19, 2007.
510
- 511 JURK V, KAMPMANN H, IBLHER N, BANNASCH H, GUBISCH W. Long-Term
512 Comparison of Rib and Ear Cartilage Grafts in Autologous and Allogenic Fascia Lata:
513 An Experimental Study in a White Rabbit Model. **Plast Reconstr Surg.** 137(5):1465-
514 1474, 2016.
515
- 516 KIRADZHIYSKA DD; MANTCHEVA RD. Overview of Biocompatible Materials and
517 Their Use in Medicine. **Folia Med (Plovdiv).**;61(1):34-40, 2019.
518
- 519 LING S, CHEN W, FAN Y, et al. Biopolymer nanofibrils: structure, modeling,
520 reparation, and applications. **Prog Polym Sci.**85:1-56, 2018.
521
- 522 MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
523
- 524 MIGUEL FB, BARBOSA AD, DE PAULA FL, BARRETO IC, GOISSIS G, ROSA FP.
525 Regeneration of critical bone defects with anionic collagen matrix as scaffolds. **J Mater**
526 **Sci Mater Med.** 2013; 24: 2567-2575.
527
- 528 MIZUTANI N, KAGEYAMA S, YAMADA M, HASEGAWA M, et al. The behavior of
529 ligament cells cultured on elastin and collagen scaffolds. **J Artif Organs** 17:50–59, 2014.
530
- 531 MORI G.G., TEIXEIRA L.M., OLIVEIRA D.L., JACOMINI L.M.;SILVA S.R.
532 Biocompatibility evaluation of biodentine in subcutaneous tissue of rats. **J Endod.**
533 40(9):1485-8, 2014.
534
- 535 MODULEVSKY D.J.; CUERRIER C.M. Biocompatibility of Subcutaneously Implanted
536 Plant-Derived Cellulose. **Biomaterials.** 11(6):e0157894, 2016.
537
- 538 MOREIRA PL, GENARI SC, GOISSIS G, GALEMBECK F, AN YH, SANTOS AR JR.
539 Bovine osteoblasts cultured on polyanionic collagen scaffolds: an ultrastructural and
540 immunocytochemical study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 101(1):18-
541 27.2013.
542
- 543 NIMESKERN L, UTOMO L, LEHTOVIITA I, FESSEL G, et al. Tissue composition
544 regulates distinct viscoelastic responses in auricular and articular cartilage. **J Biomech**
545 49:344–352, 2016.
546

- 547 NOVITSKY YW, HARRELL AG, CRISTIANO JA, PATON BL, NORTON HJ,
548 PEINDL RD. Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and
549 textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a
550 rabbit. **The Journal of surgical research**.140(1):6-11, 2007.
- 551
- 552 OLIVEIRA, L. L.; BARATA, J. S.; SILVA, A. V. P.; CARVALHO, E. C. Q.; et al.
553 Avaliação histológica da túnica albugínea bovina como biomaterial conservada em
554 glicerina a 98% e em glutaraldeído a 0,625%. **Revista Brasileira de Medicina
555 Veterinária**. v. 37, n. 4, p. 309-315, 2015.
- 556
- 557 ORENSTEIN SB, SABERSKI ER, KREUTZER DL, NOVITSKY YW. Comparative
558 analysis of histopathologic effects of synthetic meshes based on material, weight, and
559 pore size in mice. **J Surg Res**.176(2):423-9, 2012.
- 560
- 561 OSIECKA-IWAN., HYC A., RADOMSKA-LEŚNIEWSKA D. M., RYMARCZYK A.
562 & SKOPINSKI P. Antigenic and immunogenic properties of chondrocytes. Implications
563 for chondrocyte therapeutic transplantation and pathogenesis of inflammatory and
564 degenerative joint diseases. **Centr Eur Immunol**. 43 (1): 209-219, 2018.
- 565
- 566 PASCUAL G, RODRIGUEZ M, SOTOMAYOR S, PEREZ-KÖHLER B, BELLÓN J M.
567 Inflammatory reaction and neotissue maturation in the early host tissue incorporation of
568 polypropylene prostheses. **Hernia**. 16:697-707, 2012.
- 569
- 570 PEREIRA-LUCENA, CG; ARTIGIANI, NR; REZENDE, DT; LOPES-FILHO, GD.
571 Early and late prospective inflammatory and collagen deposition responses in three
572 different meshes: an experimental study in rats. **Hernia**.18(4):563-70, 2014.
- 573
- 574 PETTIAN MS, PLEPIS AMG, MARTINS VCA, DOS SANTOS GR, PINTO CAL,
575 GALDEANO WA, et al. Use of an anionic collagen matrix made from bovine intestinal
576 serosa for in vivo repair of cranial defects. **PLoS ONE**. 13(7): e0197806, 2018.
- 577
- 578 RABBERS, AS, RABELO, RE, OLIVEIRA, LP, RIBEIRO, M., MARTINS, VCA,
579 PLEPIS, AMG, & VULCANI, VAS. Efeito aditivo do óleo de polpa de pequi (Caryocar
580 brasiliense Camb.) na biocompatibilidade de membranas de colágeno e gelatina em
581 implantes subcutâneos. **Arq. Bras. Med. Veterinário. Zootec**. 71 (3), 811-818, 2019.
- 582
- 583 RIVERA, E. A. B Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. 8.ed. Porto
584 Alegre: **EDIPUCRS**, p.267, 2014.
- 585
- 586 ROSSI, LF; TRINDADE, RM; ACAMPORA, AJ; MEURER, L. Aderências peritoneais
587 tipo I e III e colágeno total em telas de polipropileno e revestidas: estudo experimental
588 em ratos. **Arq Bras Cir Dig**.30(2):77-82, 2017.
- 589
- 590 SAMPAIO, I. B. M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte:
591 **FEPMV**, 2007, 221p.
- 592
- 593 SZABO Z, BRADLEY K, CAHALANE AK. Rabbit soft tissue surgery. **Vet Clin Exot
594 Anim**.19:159-88, 2016.

- 595 SHIN S.C., PARK H.Y., SHIN N., JUNG D., KWON H.,M. et al. Evaluation of
596 decellularized xenogenic porcine auricular cartilage as a novel biocompatible filler. *J*
597 **Biomed Mater Res B Appl Biomater.** 106(7):2708-2715. 2018.
598
- 599 SCHWARZ, S.; KOERBER, L.; ELAESSER, A. F.; GOLDBERG-BOCKHORN, E.; et
600 al Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering
601 applications. **Tissue Engineering:Part A.** v. 18, n. 21-22, p. 2195-2209, 2012
602
- 603 STOPPEL, W.L; GHEZZI, C.E; MCNAMARA, S. L. et al. Clinical applications of
604 naturally derived biopolymers-based scaffolds for regenerative medicine. **Ann Biomed**
605 **Eng** 43(3):657–680, 2015.
606
- 607 SANTOS DA, PLEPIS AMG, CONCEIÇÃO AMV, CARDOSO GBC, SANTOS AR JR,
608 IATECOLA A, ANDRADE TN, MONTEIRO FM, CALEGARI ARA, CHACON EL,
609 CUNHA MR. Effects of the combination of low-level laser therapy and anionic polymer
610 membranes on bone repair. *Lasers Med Sci.*;35(4):813-82, 2019.
611
- 612 SCHULZ, DD; CZECHKO, NG; MALAFAIA, O; CZECHKO, LE. Avaliação da
613 cicatrização de materiais protéticos com filme reabsorvível de tela de poliéster e matriz
614 de colágeno elastina/ polipropileno usados em defeitos da parede abdominal de coelhos.
615 **Acta Cirúrgica Brasileira.** 24 (6), 476-483, 2009.
616
- 617 SZABO Z, BRADLEY K, CAHALANE AK. Rabbit soft tissue surgery. **Vet Clin Exot**
618 **Anim.**;19:159-88,2016.
619
- 620 UTRABO, CAL; CZECHKO,NG; BUSATO, CR; LIPINSKI,MR; MALAFAIA,O.
621 Estudo tensiométrico de telas utilizadas na correção de defeito na parede abdominal
622 ventral de ratos. **ABCD.** São Paulo, v30(3), 165-168, 2017.
623
- 624 VIG K, CHAUDHARI A, TRIPATHI S, et al. Advances in Skin Regeneration Using
625 Tissue Engineering. **Int J Mol Sci.**;18(4):789, 2017.
626
- 627 VULCANI VAS, MACORIS DG, PLEPIS AMG. Implantação de biomembrana de
628 colágeno tratada em solução alcalina ou conservada em glicerina a 98% na parede
629 abdominal de equinos. **Ciência Rural.** v.43, n 8, p.1422-1428, 2013.
630
- 631 XU, K.; KUNTZ, L. A.; FOEHR, P.; KUEMPEL, K.; WAGNER, A.; TUEBEL, J.;
632 DEIMLING, C. V.; BURGKART, R. H. Efficient decellularization for tissue engineering
633 of the tendon-bone interface with preservation of biomechanics. **PLoS ONE.** V. 12, n. 2,
634 p. 1-16. 2017.
635
- 636 XU, Y, CHEN C, HELLWARTH PB, BAO X. Biomaterials for stem cell engineering
637 and biomanufacturing. **Bioactive Materials,** v.4, p.366-379, 2019.
638
- 639 WONG M.L. e GRIFFITHS L.G. Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation:
640 Antigen removal versus decellularization. **Acta Biomater.** 10(5): 1806–1816, 2014.
641
- 642 ZIMMERMANN, M. A membrana de látex como implante para correção de defeitos
643 musculares em cães e coelhos. 2007. 78 f. **Dissertação.** Universidade Federal de Santa
644 Maria, Rio Grande do Sul.

CAPÍTULO 5- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas, o crescimento na área da engenharia dos tecidos, permitiu desenvolver estudos sobre biomateriais de diferentes composições, visando promover o mínimo de resposta tecidual possível quando for implantado. O tratamento alcalino demonstrou-se eficaz no processo de descelularização em cartilagens auriculares de bovinos. Além disso, os resultados obtidos com as caracterizações físico-químicas por TGA e DSC demonstraram resultados satisfatórios, quando comparados a cartilagem não tratada. Desta forma pode-se inferir que o tratamento com a solução alcalina não causou danos a estrutura do colágeno, sendo que suas propriedades de desnaturação frente a variações de temperatura se mantiveram semelhantes ao obtido na cartilagem não tratada. Esses resultados podem nortear estudos futuros que pretendam utilizar matrizes colagênicas tratadas em solução alcalina.

O mesmo pode ser atribuído aos resultados obtidos nas avaliações microestruturais pela microtomografia computadorizada e microscopia por scanner a laser. Em virtude dessas análises realizadas, pode-se atribuir pontos satisfatórios à região da cartilagem comparada ao pericôndrio. Ao apresentar alta densidade e baixa porosidade, confere maior resistência ao material, além de diâmetros de poros maiores que permitem o crescimento e a proliferação de células, desempenho observado pelo seu potencial osteindutor. Os valores de rugosidade complementam essas atribuições apresentadas pela cartilagem tratada em solução alcalina, visto que os valores acima dos estabelecidos nos parâmetros de referência para um tecido considerado rugoso apresenta potencial em promover a adesão de células.

Ressalta-se ainda que a na cartilagem auricular demonstrou uma performance inesperada e ao mesmo tempo promissora com a presença de calcificação observada, outro fator que atribui o potencial osteindutor desse tecido nas condições experimentais em que foi executado. Estudos visando novas espécies e diferentes períodos experimentais dos que foram realizados no presente estudo, seriam satisfatórios para compreender melhor os resultados obtidos. Acredita-se que estudos como este podem nortear e demonstrar as vantagens e o potencial do uso da cartilagem auricular tratada em solução alcalina no campo da regeneração óssea.

A pesquisa como um todo foi um grande desafio. O campo da ciência dos materiais é bastante amplo e ter acesso a esse universo com parte da realização experimental em um local de referência na área foi de grande aprendizado. Obviamente, os percalços foram observados durante a trajetória de realização da pesquisa, no qual teve seus reflexos, em parte, atribuídos ao atual momento de pandemia que vivenciamos. Manter a saúde mental também foi um grande desafio neste período, visto que o cumprimento de prazos do pós-graduando é necessário, porém frustrante quando não realizado. O conhecimento adquirido com os animais de experimentação foi um grande aprendizado, pois é uma espécie que exigiu uma rotina de um manejo e cuidados diários. A pós-graduação *strictu sensu* é, sem dúvidas, um grande desafio profissional e pessoal, além de ser uma oportunidade única de aprendizado e de contribuição com a medicina veterinária.

ANEXOS



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



Goiânia, 08 de abril de 2019.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 094/18

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Doutorado

II - Identificação:

- Data de apresentação a CEUA:** 14/11/2018
- Data do atendimento da pendência:** 05/04/19
- Título do projeto:** Estudo da morfologia, resistência mecânica e biocompatibilidade in vivo de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Valcinir Aloisio Scalla Vulcani/Jataí
- Pesquisadores Participantes:** Kamilla Dias Ferreira, Jéssica Fernanda Bertolino, Guilherme Pinheiro Santos, Jaqueline Andrade Ribeiro da Silva
- Médico Veterinário/CRMV:** Kamilla Dias Ferreira/6778
- Unidade onde será realizado:** EVZ

III – Respostas as pendências:

- 1- **Solicitação da CEUA:** Apresentar a justificativa no protocolo de acordo com o projeto e não citar o objetivo como apresentado no termo de atendimento de pendência.

Resposta do Pesquisador Responsável: A execução do projeto se justifica, pois, a cartilagem elástica oriunda da orelha de bovinos é um sub produto do abate com características desejáveis para a obtenção de biomateriais. Biomateriais são utilizados para reparar, repor ou otimizar funções orgânicas animais e humanas. Para classificar um material como biomaterial, algumas características são desejáveis, dentre as quais destaca-se a existência de biocompatibilidade. Dessa forma, a cartilagem, constituída por colágeno do tipo I e II, fibras elásticas e proteínas não fibrosas é passível de ser modificada para a redução da antigenicidade e tornar-se mais biocompatível. Além disso, a cartilagem elástica é um material resistente e resiliente, cuja estrutura mostra-se adequada para a aplicação em tecidos moles, principalmente quando existem tensões ou forças demasiadas sobre os tecidos. Neste caso específico, do projeto de pesquisa, a aplicação em hérnias abdominais é o alvo ideal, já que é possível estudar in loco a biocompatibilidade e comportamento frente ao desafio das forças atuantes sobre o biomaterial, em comparação a um material sintético utilizado amplamente em hérnias, o polipropileno. É importante ressaltar, que a antigenicidade do material será trabalhada, com intuito de redução, utilizando-se de solução alcalina, obtida e patenteada por pesquisadores brasileiros, cujos executores deste projeto tem experiência anterior no desenvolvimento, aplicação e estudos preliminares em animais. Soma-se a isto o fato de que antes de aplicar o biomaterial nos animais, fases preliminares serão realizadas junto ao Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos (USP) para verificar suas características microscópicas e

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFV, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufv@gmail.com



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



ultramicroscópicas, caracterizar suas características de resistência e composição. Assim, o projeto apresenta a utilização de um material de origem biológica a ser tratado em solução patenteada por brasileiros e de forma inédita aplicá-lo em hérnia em coelhos para estudar o seu comportamento e avaliar sua integração e biocompatibilidade.

- 2- **Solicitação da CEUA:** Justificar o número de animais utilizados no projeto de acordo o descrito na literatura ou através de teste estatístico para tal.

Resposta do Pesquisador Responsável: O número de animais a serem utilizados (n=24) foi calculado com base na literatura, considerando artigos científicos que descrevem estudos de biomateriais em hérnias incisionais como: AVITAL S et al. Preventing intra-abdominal adhesions with polylactic acid film: an animal study. *Diseases of Colon & Rectum*, 48(1):153-7, 2005; TOOSIE, K et al. Fibrin glue reduces intra-abdominal adhesions to synthetic mesh in a rat ventral hernia model. *American Surgery*, 66(1):41-5, 2000; ALIMOGU O et al. Prevention of Adhesion Formations following Repair of Abdominal Wall Defects with Prosthetic Materials (An Experimental Study). *Hepato Gastroenterology* 50: 725-728, 2003 e LAMBER, BÁRBARA et al. Pode a tela de poliéster coberta com colágeno diminuir as taxas aderências intraperitoneais na correção de hérnia incisional?. *ABCD, arq. bras. cir. dig.*[online]. 2013, vol.26, n.1 pp.13-17.

- 3- **Solicitação da CEUA:** Adequação do cronograma

Resposta do Pesquisador Responsável: - maio de 2019: período de adaptação dos animais;

- junho/julho/agosto de 2019: realização dos procedimentos cirúrgicos, pós-operatório; - setembro a dezembro de 2019: preparo e avaliação histopatológica; - janeiro a abril de 2020: tabulação dos dados; - maio a outubro: redação científica; - novembro de 2020: qualificação; - fevereiro de 2021: defesa da tese; - março de 2021: publicação de artigos

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, o projeto foi considerado **APROVADO** pela *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás.

Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(s) pesquisador(es) responsável(is) deverá(ão) encaminhar à CEUA-PRPI-UFPG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, a qual está prevista para finalizar suas ações até **31 de março de 2021**.

VII - Data da reunião: 08/04/19.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFPG, Alameda Flamboyant, Qd. K, Edifício K2, 1º andar, Prédio da Agência de Inovação, Parque Tecnológico, sala da CEUA, Campus Samambaia – Goiânia-GO, Fone: (55-62) 3521-1876.

Email: ceua.ufg@gmail.com



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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Estudo da morfologia, resistência mecânica e biocompatibilidade in vivo de cartilagens elásticas tratadas em solução alcalina**", registrada com o protocolo nº094/18, sob a responsabilidade de **Valcinir Aloisio Scalla Vulcani e Kamilla Dias Ferreira** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de **08/04/19**.

- Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 08/04/2019 a 31/03/2021
- Espécie/linhagem/raça: *Oryctolagus cuniculus* Nova Zelândia
- Nº de animais autorizados: 24 animais
- Peso/Idade: 3kg/6 meses
- Sexo: Machos
- Origem (fornecedor): Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, Escola de Veterinária da UFMG


Dra. Marina Pacheco Miguel
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG