

# TECIDO SUBCUTÂNEO MURINO COMO MODELO NORMALIZADO PARA ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DE XENOENXERTOS

**Maria Janaína Paula Gomes<sup>1</sup>; Francisco Fábio Pereira de Souza<sup>2</sup>; Fábio Lima Cavalcante<sup>3</sup>; Morsyleide de Freitas Rosa<sup>4</sup>; Men de Sá Moreira de Souza Filho<sup>5</sup>; Igor Iuco Castro-Silva<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Mestrado em Biotecnologia – PPGB – UFC Sobral; janainagomes@outlook.com, <sup>2</sup>Estudante do Curso de Doutorado em Biotecnologia de Recursos Naturais – PPGBRN – UFC Fortaleza; fabiosouzawin@live.com, <sup>3</sup>Estudante do Curso de Doutorado em Química – PPGQ – UFC Fortaleza; fabiolima2008@hotmail.com, <sup>4</sup>Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CNPAT; morsyleide.rosa@embrapa.br, <sup>5</sup>Pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA/CNPAT; men.souza@embrapa.br, <sup>6</sup>Docente/Orientador do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – FAMED – UFC Sobral; igor.iuco@sobral.ufc.br

**Resumo:** Avaliação da biocompatibilidade é etapa de caracterização biológica fundamental para validação e segurança pré-clínica de um novo biomaterial. Xenoenxertos ósseos têm sido amplamente utilizados em tratamentos cirúrgicos médico-odontológicos e fontes sustentáveis são buscadas para reduzir o impacto ambiental da indústria agropecuária. O objetivo desse estudo foi a caracterização da biocompatibilidade de hidrogéis provenientes de subprodutos avícolas. Baseado na norma 10993-6, foram utilizados 60 camundongos machos adultos jovens, sendo criadas na região troncodorsal bilateralmente 2 bolsas subdérmicas para implantação dos materiais-teste (hidrogéis a base de colágeno, queratina e apatita) e usados como controle contralateral o próprio coágulo sanguíneo e uma membrana colágena xenógena comercial. Após os tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas, foi realizada eutanásia dos animais, necropsias excisionais das áreas de enxerto e análise histopatológica descritiva permitiu acompanhar os fenômenos inflamatórios, de reparo e biodegradação. A praticabilidade e rápida obtenção de resultados biológicos tornam este modelo experimental indicado para testes *in vivo* preliminares de novos biomateriais xenógenos para futura aplicação em seres humanos.

**Palavras-Chave:** Teste de Materiais. Tela Subcutânea. Xenoenxertos.

## INTRODUÇÃO

A indústria avícola no Brasil vem avançando cada vez mais no cenário mundial e o hoje o país já está entre os maiores produtores, exportadores e consumidores de carne de frango. Segundo o Relatório Anual de 2018 da Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango, destinando 4,3 milhões de toneladas para fora do país e o segundo maior produtor mundial, produzindo 13,05 milhões de toneladas de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos. Esses valores apontam para a grande relevância econômica deste setor para o Brasil. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2018).

Na indústria avícola há geração de resíduos e subprodutos em grande volume, sendo importante a busca de estratégias de gestão que impactem positivamente na economia e no meio ambiente (JAYATHILAKAN et al., 2012). Penas, vísceras, cabeças, pés, carcaças, peles e ossos são descartados, entretanto tais resíduos representam fontes de proteínas, lipídeos e minerais com potencial de exploração para a produção de biomateriais xenógenos enxertáveis aplicados à Medicina e Odontologia (WANG et al., 2017; CASTRO-SILVA; LIMA; GRANJEIRO, 2013).

A biocompatibilidade de um material pode ser definida como “uma expressão de benignidade da relação entre um material e seu ambiente biológico” (SAKAGUCHI; POWERS, 2012). O principal objetivo da avaliação da biocompatibilidade é a determinação de efeitos tóxicos ou respostas que poderão causar danos ou efeitos adversos no organismo hospedeiro (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007). As três principais respostas que devem ser levadas em consideração nos testes de biocompatibilidade são as reações inflamatórias, cicatrização de ferimentos e reações de imunotoxicidade (SAKAGUCHI; POWERS, 2012).

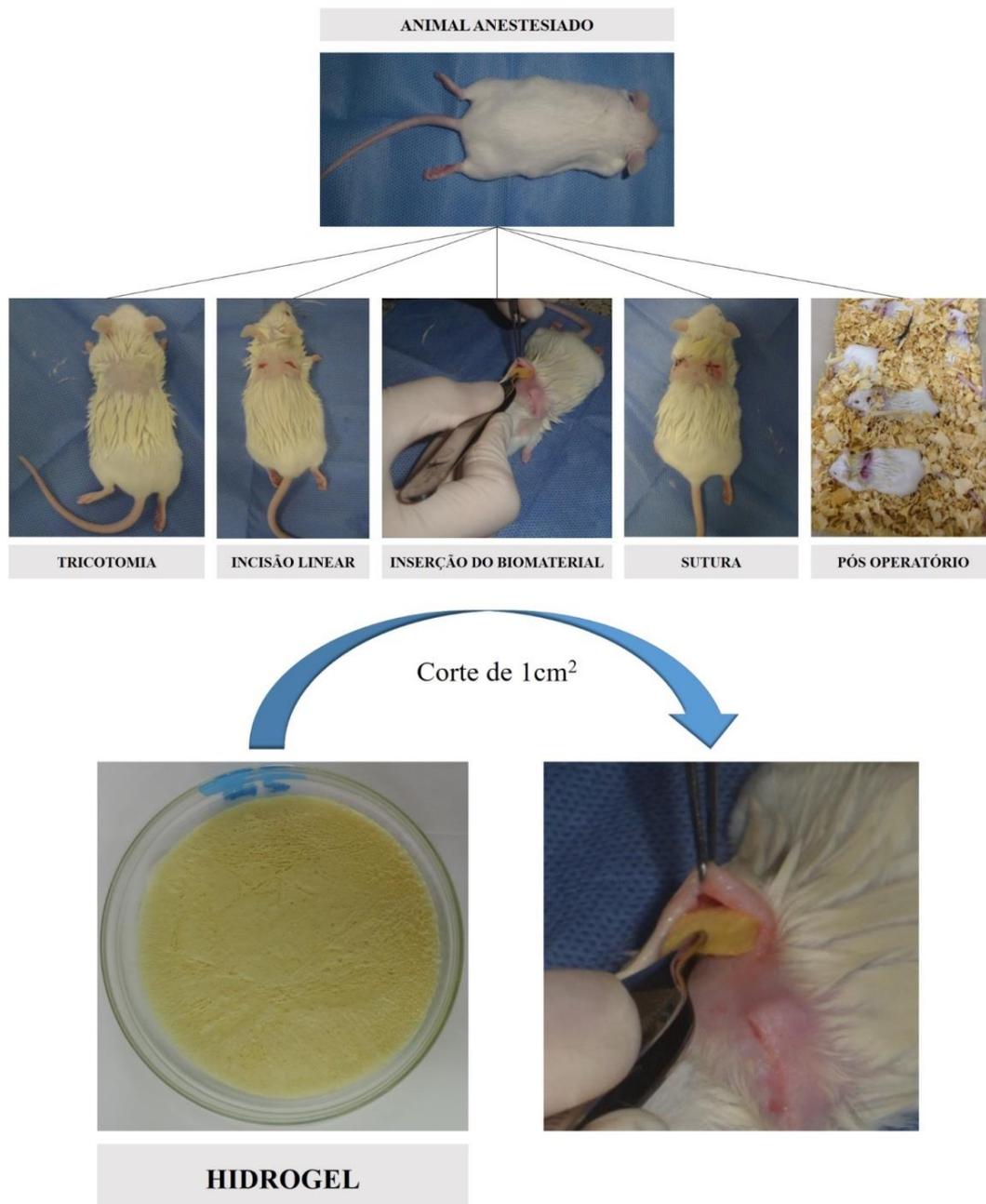
O objetivo desse trabalho foi descrever o teste de biocompatibilidade normalizado em tecido subcutâneo murino que dispõe sobre a avaliação de efeitos locais após implantação de dispositivos médicos, como parte de pesquisa corrente visando a análise histopatológica *in vivo* de biomateriais xenógenos derivados da indústria avícola.

## METODOLOGIA

Este trabalho original integra uma dissertação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC), *Campus* de Sobral, intitulada “Caracterização da biocompatibilidade de hidrogéis compostos de colágeno, nanoqueratina e bioapatita derivados da indústria avícola”, com previsão de defesa em fevereiro de 2019, e teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFC (protocolo n. 04/2017).

O modelo experimental foi constituído por camundongos albinos da espécie *Mus musculus*, variedade Swiss, adultos e do sexo masculino, pesando entre 30 e 40 gramas. Os animais foram anestesiados por meio de aplicação intramuscular de solução anestésica, composta por 100mg/kg de ketamina e 12mg/kg de xilasina, com duração de efeito entre 30 e 40 minutos. A região dorsal dos animais foi tricotomizada mecanicamente e degermada com clorexidina 0,5%. Em cada espécime, foram realizadas duas incisões lineares na região dorsal, com cerca de 1cm de comprimento cada, onde foram criadas as bolsas subcutâneas para a inserção dos materiais-teste.

Todos os materiais-teste foram produzidos por meio de subprodutos da indústria avícola (ossos, pele e penas) e caracterizados previamente através de análises físico-químicas pela EMBRAPA-CNPAT (Fortaleza, CE, Brasil). Quatro grupos de hidrogéis foram utilizados nos testes: 1) 100% colágeno; 2) 90% colágeno + 10% apatita; 3) 90% colágeno + 10% queratina; e 4) 90% colágeno + 5% hidroxiapatita + 5% queratina. Como controles positivos, foram enxertadas membrana colágena comercial de origem bovina (Criteria, SP, Brasil) ou osso mineralizado comercial de origem bovina (Criteria, SP, Brasil). Em seguida, foi realizada a sutura com fio nylon 4.0. As etapas do procedimento cirúrgico podem ser observadas na **Figura 1**.

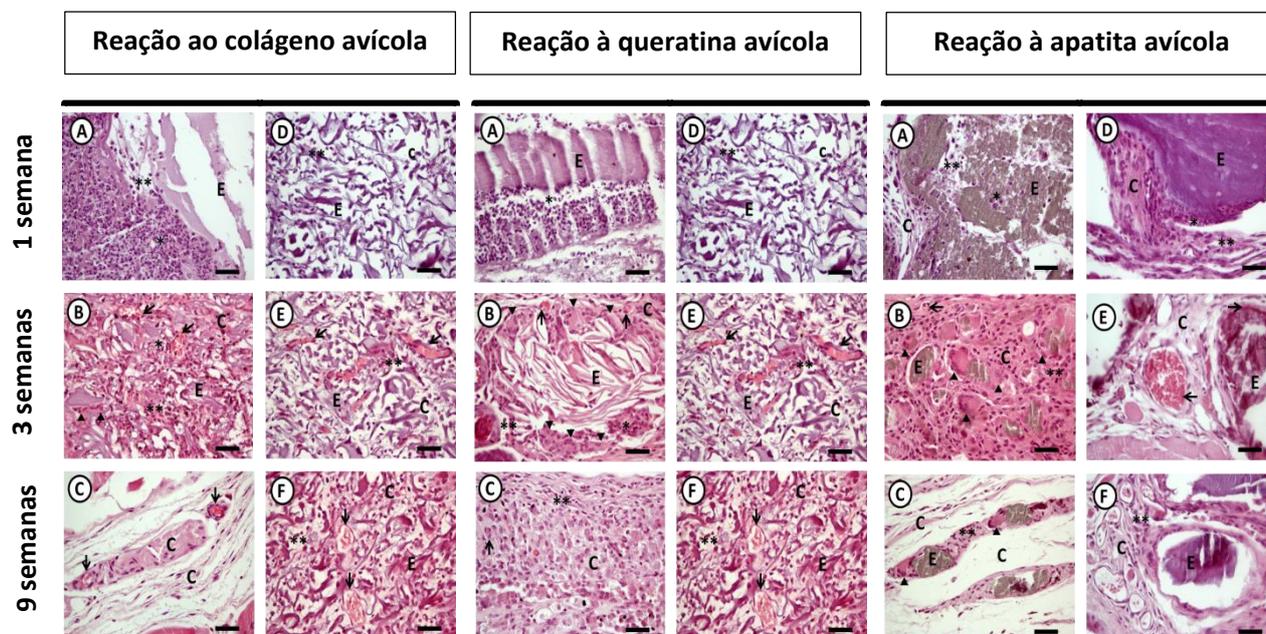


**Figura 1** – Teste ectópico de biomaterial em tecido subcutâneo de camundongos. Fonte: própria.

Os animais foram eutanasiados através da sobredose anestésica, onde foi administrado um volume 5 vezes maior do que a dose usual por meio de via intraperitoneal, nos tempos experimentais de 1, 3 e 9 semanas após o procedimento cirúrgico, de acordo com a ISO 10993-6. Constatada a morte do animal, foi realizada a necropsia excisional, contendo a área onde foi feito o enxerto. Cada amostra seguiu para processamento histológico, permitindo avaliações semiquantitativas dos processos gerais de inflamação, reparo e persistência do enxerto nas diferentes condições experimentais, baseados na norma ISO 10993-6 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007).

## RESULTADOS PARCIAIS E DISCUSSÃO

O padrão histológico obtido nos grupos experimentais e controles, com ênfase em suas composições de derivações xenógenas, é demonstrado na **Figura 2** e confirma, através da observação da reação inflamatória, de reparo e biodegradação ao longo do período experimental, a validade desse modelo *in vivo* para teste de biomateriais.



**Figura 2** –Análise histopatológica do tecido subcutâneo de camundongos com enxerto de materiais-teste de colágeno, queratina e bioapatita (A, 1 semana, B, 3 semanas e C, 9 semanas) e seus respectivos controles (D, 1 semana, E, 3 semanas e F, 9 semanas). Infiltrado inflamatório neutrofílico (\*) ou linfocítico (\*\*), células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho (▶), vasos sanguíneos (→) e fibroblastos ou matriz extracelular conjuntiva (C) e enxerto (E). Coloração: Hematoxilina-Eosina, Aumento: 400x. Barra de escala: 200µm.

Na interpretação da resposta tecidual após implantação de um biomaterial, considera-se que o material foi responsivo se houve resposta inflamatória exuberante persistente e ausência de reparo, ao passo que o material é inerte ou biocompatível quando a resposta inflamatória é mínima ou ausente e o reparo fibrovascular é estável ao fim do período experimental (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007).

A resposta dos materiais com composição de colágeno e queratina (incorporada ao colágeno) avícolas se assemelhou à rápida resolução dos fenômenos inflamatórios e ao reparo fibroso encontrados em colágeno de origem suína (JARDELINO et al., 2010; SANTANA et al., 2009), e divergiu dos resultados de um material aloplástico a base de alginato-capsul, onde o fenômeno inflamatório foi persistente e houve degradação mais lenta (JARDELINO et al., 2012). Este trabalho corrobora os achados de Wang et al. (2017) que testaram especificamente a queratina avícola e observaram biocompatibilidade e estímulo ao reparo de tecido conjuntivo local.

A resposta dos materiais com composição de apatita (incorporada ao colágeno) avícola se assemelhou à rápida resolução dos fenômenos inflamatórios em comparação a materiais mistos de colágeno-hidroxiapatita de origem bovina (BITTENCOURT et al., 2014) ou de origem aloplástica, como observado com hidroxiapatita dopada com zinco (GIORNO et al., 2014), cerâmica bifásica (LOMELINO et al., 2012), sulfato de cálcio (FERNANDES et al., 2010), biovidro a base de nióbio (LIMA et al., 2011) ou silicato de wollastonita-cianoacrilato (SENA et al., 2014) e divergiu dos resultados de outros autores, pela não formação de matriz osteóide adjacente a xenoinxerto bovino (BITTENCOURT et al., 2014) ou de matriz condroide de entorno à cerâmica bifásica de  $\beta$ TCP-HA (LOMELINO et al., 2012), sendo ambos fenômenos incomuns de diferenciação *in situ*.

A Norma ISO 10993-6 engloba diretrizes internacionais preconizadas por laboratórios acreditados para nortear o delineamento experimental e os critérios de análise da biocompatibilidade de um determinado material implantável. Para esses testes, os animais de pequeno porte como camundongos, ratos, hamster ou coelhos são preferíveis, e o tempo de duração é de poucas semanas, fatores que aumentam a viabilidade desse modelo de caracterização *in vivo*. A aceitabilidade clínica em seres humanos dependerá dos resultados preliminares alcançados com a resposta apresentada pelo biomaterial testado em animais. (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2007).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste de biocompatibilidade em tecido subcutâneo é essencial para pesquisa de biomateriais, pois possibilita o conhecimento sobre seu comportamento ao contato direto com um sistema biológico. Os resultados histológicos favoráveis de xenoinxertos derivados da indústria avícola, sem inflamação significativa, com reparo e integridade moderada a médio prazo os tornam elegíveis à continuidade de testes biológicos visando sua certificação pré-clínica.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral, por meio do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Grupo de Estudos em Morfologia, por viabilizar esta pesquisa de mestrado. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-CNPAT) pela parceria técnico-científica. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa de mestrado CAPES-DS), ao Governo do Estado do Ceará e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (bolsa de produtividade FUNCAP-BPI processo n. BP3-0139-00270.01.00/18) pelo financiamento desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **2018: Relatório anual**. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>. Acesso em: 07 set. 2018.
- BITTENCOURT, R. C. et al. Avaliação pré-clínica de um material substituto ósseo xenógeno a base de hidroxiapatita/colágeno. **Revista Odonto Ciência**, v. 29, n. 1, p. 6-13, 2014.
- CASTRO-SILVA, I. I.; LIMA, F. M. S.; GRANJEIRO, J. M. Enxertos ósseos na Odontologia brasileira: cenário, desafios e perspectivas na visão da Gestão em Saúde. **Revista Fluminense de Odontologia**, v. 1, n. 39, p. 63-71, 2013.
- FERNANDES, G. V. O. et al. Procedimentos normatizados para a caracterização de biomateriais: sulfato de cálcio como estudo de caso. **Implant News**, v. 7, p. 45-53, 2010.
- GIORNO, B. et al. Comparative in vivo study of biocompatibility of apatites incorporated with 1% zinc or lead ions versus stoichiometric hydroxyapatite. **Journal of Biomimetics, Biomaterials, and Tissue Engineering**, v. 19, p. 109-120, 2014.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Part 6: Tests for local effects after implantations. In: **Biological Evaluation of Medical Devices**. 2. ed. Switzerland, 2007.
- JARDELINO, C. et al. Biocompatibility analysis of a novel reabsorbable alloplastic membrane composed of alginate-Capsul. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 60, n. 4, p. 419-423, 2012.
- JARDELINO, C. et al. Porcine peritoneum as source of biocompatible collagen in mice. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 25, n. 4, p. 332-336, 2010.
- JAYATHILAKAN, K. et al. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 3, p. 278-293, 2012.
- LIMA, C. J. et al. Resposta do tecido subcutâneo de camundongos à implantação de um novo biovidro à base de óxido de nióbio. **Matéria (UFRJ)**, v. 16, n. 1, p. 574-582, 2011.
- LOMELINO, R. O. et al. The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate ( $\beta$ TCP/HA 70:30) granules increases bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, n. 3, p. 781-788, 2012.
- SAKAGUCHI, R. L.; POWERS, J. M. Biocompatibilidade e reação tecidual a biomateriais. In: **CRAIG Materiais dentários restauradores**. 13. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, p. 117-144, 2012.
- SANTANA, R. B. et al. Análise da resposta cicatricial da esponja Hemospon implantada em tecido conjuntivo de rato. **Revista Brasileira de Implantodontia**, v. 15, p. 15-18, 2009.
- SENA, L. A. et al. Biocompatibility of wollastonite-poly(N-butyl-2-cyanoacrylate) composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 102, n. 6, p. 1121-1129, 2014.
- WANG, J. et al. Feather keratin hydrogel for wound repair: Preparation, healing effect and biocompatibility evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 341-350, 2017.