

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

JULIA RISSO PARISI

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO COLÁGENO MARINHO DE
ESPONJAS INCORPORADO NA HIDROXIAPATITA PARA A ENGENHARIA DO
TECIDO ÓSSEO**

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó^{1,2}

Co-orientadores: Profa. Dra. Carla Roberta Tim¹

Profa. Dra Kelly Rossetti Fernandes²

¹Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, SP;

²Departamento de Biociências, Universidade Federal de São Paulo UNIFESP, Baixada Santista, SP;

São Carlos-SP

2019

JULIA RISSO PARISI

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO COLÁGENO MARINHO DE
ESPONJAS INCORPORADO NA HIDROXIAPATITA PARA A ENGENHARIA DO
TECIDO ÓSSEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Muniz
Rennó

São Carlos-SP

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Julia Risso Parisi, realizada em 05/12/2019:

Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Renno
UNIFESP

Prof. Dr. Nivaldo Antonio Parizotto
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Prof. Dr. Hernane da Silva Barud
UNIARA

Profa. Dra. Ticiane Sidorenko de Oliveira Capote
UNESP

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*Dedico esse trabalho aos meus pais
Luis Fernando e Maria de Fátima, a
minha avó **Maria de Lourdes** (in
memoriam), e a toda a minha família
pelo amor, incentivo e apoio.*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pela saúde, proteção, por trilhar meus caminhos e colocar pessoas tão especiais na minha vida.

Agradeço a Profa. Dra. Ana Claudia Muniz Rennó, pela oportunidade, confiança e por todos os ensinamentos compartilhados que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela paciência e por me proporcionar fazer parte de um grupo de pesquisa tão rico e dedicado.

Aos meus pais Maria de Fátima e Luiz Fernando, pelo amor, incentivo e preocupações. Agradeço também a minha avó Maria de Lourdes, minha maior luz, que me guia e me fortalece para sempre persistir nos meus sonhos.

Ao meu irmão Vitor, pela amizade e companheirismo. Aos meus padrinhos José Geraldo, Maria Angélica e Gabriela, onde sempre encontrei conforto e os maiores incentivadores da minha carreira profissional. Agradeço a paciência e por cada conselho ou palavra.

A minha querida Tia Lucia, pelo carinho e incentivo constate aos estudos. Obrigada pela companhia e pelo cuidado que sempre teve comigo, principalmente nos meses que moramos em Santos.

Aos meus tios Fil e Regina, por sempre me ouvirem, apoiarem e torcerem pelas minhas conquistas.

Ao Prof. Marcelo Lourenço, por ter me apresentado a ciência, pelo incentivo e por todos os ensinamentos compartilhados.

Agradeço ao Prof. Dr. Nivaldo Parizotto e ao Prof. Dr Richard Liebano, por abrirem sempre de forma tão gentil as portas do Laboratório de Pesquisa em Recursos Fisioterapêuticos nos primeiros anos de doutorado, assim como também todos os colegas de laboratório com quem tive a sorte de conviver.

A Profa. Renata Neves Granito pela ajuda e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Alberto Fortulan, por me receber na USP em São Carlos e por auxiliar na confecção dos scaffolds.

Aos técnicos e funcionários da UNIFESP, pelo auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, em especial a Maria José.

A minha querida dupla de laboratório Kelly Fernandes. Sou muito grata por tudo que fez por mim e por este trabalho. Obrigada pela paciência, dedicação, apoio, ensinamentos e incentivo. Por deixar toda essa caminhada mais leve e feliz. Pela nossa amizade e pelo sobrinho de coração Pedrinho, que deixou Santos mais alegre.

A minha companheira Patrícia Vassão, por ser uma das melhores pessoas que conheci. Agradeço também a oportunidade de poder fazer uma pequena parte do seu trabalho com as queridas alunas de iniciação científica Jéssica, Thati e Yu.

A todos o meus colegas e amigos que passaram pelo Laboratório de Biomateriais e Engenharia de Tecidos. Aprendi e me diverti muito com vocês durante esses anos.

As minhas queridas amigas Thalita e Ingrid. Agradeço pela amizade, preocupação e pela torcida. Vocês fizeram a diferença nos meus dias!

Aos meninos Alan, Matheus, César e Kido, agradeço pelo apoio durante a realização deste trabalho e por todos os ensinamentos compartilhados

A Giovanna do Vale, por ser meu braço direito durante todo o experimento in vivo. Obrigada pela amizade e pelos momentos que passamos dentro e fora do laboratório.

A minhas amigas Ana Laura e Larissa que estiveram presentes em todos os momentos desde a graduação, sempre me apoiando, incentivando e vibrando com as minhas pequenas conquistas. Vocês são demais!

Ao João Henrique, por estar do meu lado durante este percurso, pelo companheirismo, tranquilidade e apoio.

Meu muito obrigado a todos que contribuíram para execução desse trabalho, de maneira direta ou indireta.

Agradeço a CAPES que viabilizou a execução deste trabalho.

Lista de figuras

Estudo I

- Figura 1:** Massa após incubação em PBS (%) para os *scaffolds* PMMA, HA, HA/SPG 90/10, HA/SPG 70/30). Os valores representam a média de três amostras. Dia 1 e dia 3: # HA vs. HA/SPG90/10, * PMMA vs. HA/SPG70/30, # HA vs HA/SPG 70/30, e π HA/SPG 90/10 vs. HA/SPG 70/30. Dia 7, 14 e 21: * PMMA vs. HA/SPG 70/30, # HA vs. HA/SPG 70/30 e π HA/SPG 90/10 vs HA/SPG 70/30. $p < 0.05$. .50
- Figura 2:** Valores de pH após incubação em PBS para PMMA, HA, HA / SPG 90 /10, HA/SPG 70/30 em diferentes tempos de incubação (1, 3, 7, 14, e 21 dias).51
- Figura 3:** Fotomicrografia de MEV dos *scaffolds* antes de incubação de PBS. Dia 0 (A1-E1), dia 7 (A2-E2) e 21 (A3-E3). Poros (setas). PMMA (triângulo), HA (#), SPG (*) e a degradação do material (+). Escala 200 μm 52
- Figura 4:** Os espectros de FTIR de PMMA, SPG, HA, HA / SPG 90/10, e HA / SPG 70/30. As linhas tracejadas indicam picos associados ao PMMA (flexão das ligações de CH₂, alongamento das ligações de C-O-C e flexão das ligações de C-H), HA (flexão das ligações de PO₄ - 3) e SPG (alongamento das ligações de NH, de CH, OH).54
- Figura 5:** Viabilidade celular para L929 cultivadas em solução contendo extrato de PMMA, HA, HA/SPG 90/10, e HA/SPG 70/30 em diferentes momentos de cultivo (1, 3 e 7 dias). * $p < 0,05$; ** $< 0,01$, e *** $p < 0,0001$55
- Figura 6:** Viabilidade celular para MC3T3 cultivadas em solução contendo extrato de PMMA, HA, HA / SPG 90/10, e HA / SPG 70/30 em diferentes momentos de cultivo (1, 3 e 7 dias). * $p < 0,05$; ** $< 0,01$, e *** $p < 0,0001$56

Estudo II

Figura 1: Teste biomecânico: (A) Instron® Universal Testing Machine, 3342 modelo utilizado no experimento; (B) Tíbia posicionada durante o teste.....	77
Figura 2: Fotomicroscopia de MEV dos materiais em forma de pó HA (A) e SPG (B) e dos scaffolds de HA (C) e HA/SPG (D). A seta (→) representa a presença de poros. Barra de escala: A = 3µm; B = 30 µm; C e D = 200 µm.....	79
Figura 3: Cortes histológicos, GC (A, B); HA (C, D); HA/SPG (E, F), após 2 e 6 semanas, respectivamente. Osso neoformado(*), o tecido de granulação (▲), material (→). Barra representa 200µM. (mag. X 2,5). Hematoxilina e Eosina.....	81
Figura 4: Média e desvio padrão de BV/TV (%) para os grupos: GC, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Teste de Dunn's. * p <0,05.....	82
Figura 5: Média e desvio padrão de Ob.S/BS (%) para os grupos: CG, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Teste de Dunn's. *p <0,05.....	83
Figura 6: Média e desvio padrão de N.Ob/T.Ar (mm ²) para os grupos: GC, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico.....	83
Figura 7: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão de RUNX-2 (seta branca) dos grupos: CG (A;B), HA (C;D) e HA/SPG (E;F) após 2 e 6 semanas do procedimento cirúrgico. 200 µm (mag. X10).....	85
Figura 8: Média e desvio padrão dos escores da imunomarcção de RUNX-2 para os grupos: CG, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após a cirurgia. Teste de Dunn's. *p <0,05.....	86
Figura 9: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão de VEGF (seta branca) para grupos: CG (A;B), HA (C;D) e HA/SPG (E;F) após 2 e 6 semanas do procedimento cirúrgico. 200 µm (mag. X10).....	88
Figura 10: Média e desvio padrão dos escores da imunomarcção de VEGF para os grupos: CG, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após a cirurgia. Teste de Dunn's.....	89

Lista de tabelas

Estudo I

Tabela 1: Grupos experimentais e suas diferentes formulações.....47

Estudo II

Tabela 1: Grupos experimentais e suas diferentes formulações.....71

Table 2: Médias e desvios-padrão da carga máxima, resiliência e tenacidade nos diferentes grupos experimentais.....90

Lista de abreviaturas e símbolos

%	- Porcentagem
<	- Menor
=	- Igual
≤	- Menor ou igual
®	- Marca registrada
°C	- Grau Celsius
μl	- Microlitro
μm	- Mocrômetro
ABNT	- Associação Brasileira de Normas Técnicas
BV/TV	- Volume ósseo pelo volume tecidual
CaP	- Fosfato de cálcio
CAPES	- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEDEME	- Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina
cm/min	- Centímetro pro minuto
CMC	- do inglês: <i>carboxymethyl cellulose</i>
DAB	- diaminobenzidina
DBCA	- Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos
DMEM	- Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetraacético
et al.	- Entre outros
FTIR	- Infravermelho por transformada de Fourier (do inglês: <i>Fourier Transform Infrared spectrometer</i>)
g	- Gramas
G	- Força G
g/cm ³	- Gramas por centímetro cúbico
GC	- Grupo Controle

h	- Hora
HA	- Hidroxiapatita
KeV	- Quiloelétron-volt
L929	- Fibroblastos (murinos)
M	- Molar
MC3T3-E1	- Células pré-osteoblásticas derivadas de calvária de camundongos
MEV	- Microscopia elterônica de varredura
mfin	- Massa final
mg/kg	- Miligrama por quilograma
min	- Minutos
mini	- Massa inicial
ml	- Mililitro
mm	- Milímetro
mM	- Milimolar
mm ²	- Milímetro quadrado
MMA	- do inglês: <i>methyl methacrylate</i>
MPa	- mega pascal
N	- Newton
N.Oc/T.ar	- Número de osteoclastos pela área do tecido
N/mm ²	- Newton por milímetro quadrado
nm	- Nanômetro
Ob.S/BS	- Superfície osteoblástica pela superfície óssea
PBS	- Tampão fosfato-salino (do inglês: <i>phosphate buffered saline</i>)
pH	- Potencial Hidrogeniônico
PMMA	- do inglês: <i>poly (methyl methacrylate)</i>
RUNX-2	- Fator de transcrição relacionado à Runt do tipo 2 (do inglês: <i>runt related transcription factor-2</i>)
SPG	- Espongina
T.Ar	- Área média do tecido
Torr	- Unidade de pressão
VEGF	- Fator de crescimento do endotélio vasculas (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)

Apresentação da tese

A presente tese foi estruturada na forma de artigos e redigida de acordo com as normas metodológicas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Esse trabalho foi estruturado conforme as normas complementares nº 002/2006 do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia (PPGft) que possibilita a apresentação da tese em formato do artigo. Sendo assim, esse trabalho está redigido em 3 partes.

A **primeira parte** é composta pelos elementos pré-textuais com uma breve contextualização atualizada sobre os temas abordados na obra, seguido dos objetivos gerais e específicos da mesma.

Na **segunda parte** são apresentados dois manuscritos, o primeiro já está publicado no periódico *Marine Biotechnology* e o segundo submetido para publicação. Os artigos são intitulados:

- O estudo I aborda a caracterização físico-química e a biocompatibilidade *in vitro* da associação da espongina, extraída da esponja marinha *Aplysina Fulva* associada ou não a hidroxiapatita intitulado de: “*Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongins) into Hydroxyapatite Samples: Characterization and In vitro Biological Evaluation*” publicado no periódico *Marine Biotechnology*.
- O estudo II aborda os efeitos *in vivo* da incorporação da espongina, extraída da esponja marinha *Aplysina Fulva* associada ou não a hidroxiapatita no reparo ósseo: “*Evaluation of the in vivo biological effects of a composite of marine collagen and hydroxyapatite using a tibial bone defect model in rats*”, submetido para publicação no periódico *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.

A **terceira e última parte** desta tese é composta pelas considerações finais e conclusão, perspectivas futuras e anexos.

Sumário

RESUMO	21
ABSTRACT	23
Contextualização.....	25
Objetivos	32
Objetivo Geral	33
Objetivos Específicos.....	33
Referências.....	35
Estudo I.....	40
Resumo.....	42
1.Introdução	43
2. Material e métodos.....	45
2.1. Materiais utilizados.....	45
2.2. Preparação dos <i>scaffolds</i>	46
2.3. Caracterização físico-química	47
2.3.1. Teste de degradação <i>in vitro</i>	47
2.3.2. Avaliação de pH	47
2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	48
2.3.5 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	48
2.3.6 Estudos <i>in vitro</i>	48
2.3.7. Viabilidade celular	49
2.3.8. Análise estatística	49
3. Resultados	50
3.1. Testes de degradação <i>in vitro</i>	50
3.2. Mensuração do pH.....	51
3.3. MEV	51
3.4. FTIR	53

3.5. Estudos <i>in vitro</i>	54
4. Discussão	57
5. Conclusão	60
Agradecimentos	60
Referências.....	60
Estudo II.....	65
Resumo.....	67
1.Introdução	68
2. Material e métodos.....	70
2.1 Materiais	70
2.2 Preparação dos scaffolds.....	71
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	72
2.4 Estudo <i>in vivo</i>	72
2.4.1 Cirurgia	73
2.5 Análise histopatológica e histomorfométrica	74
2.6 Análise Imunoistoquímica	75
2.7 Ensaio Biomecânico.....	76
2.8 Análise estatística	77
3. Resultados	78
3.1 Morfologia dos scaffolds	78
3.2 Análise histopatológica	79
3.3 Análise histomorfométrica.....	82
3.4 Análise Imunoistoquímica	84
3.4.1 RUNX-2.....	84
3.4.2 VEGF	86
3.5 Análise biomecânica	89
4. Discussão	90

5. Conclusão	93
Agradecimentos	94
Referências.....	94
Considerações Finais e Conclusão.....	100
Perpescitivas Futuras.....	102
Anexos	104
ANEXO 1	105
Artigo publicado na revista “Marine Biotechnology”	105
ANEXO II	106
Artigo submetido ao Jornal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine ...	106
Anexo III.....	107
Aprovação da comissão de ética no uso de animais	107

RESUMO

Fraturas com atraso na consolidação e não-união óssea, estão associadas a uma substancial incapacidade física para os indivíduos acometidos e a altos custos sócio-econômicos, constituem um importante desafio à clínica. Dessa maneira, alguns biomateriais vêm sendo investigados com o intuito de potencializar a consolidação de fraturas e serem eficazes para enxertia óssea. Uma das estratégias mais promissoras para melhorar o desempenho biológico de enxertos ósseos é a combinação de diferentes biomateriais. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar através de estudos *in vitro* (estudo I) e *in vivo* (estudo II) os efeitos da incorporação de esponjina (SPG) extraída da esponja marinha *Aplysina fulva* em hidroxiapatita (HA) como uma alternativa promissora para aplicação na engenharia do tecido ósseo. No estudo I, foram produzidos *scaffolds* com diferentes proporções de HA e SPG (HA/SPG 90/10 e HA/SPG 70/30). Os materiais foram avaliados por meio do teste de perda de massa após a incubação, avaliação de pH, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e avaliação da viabilidade celular *in vitro*. No que se refere ao estudo II, os *scaffolds* produzidos (HA e HA/SPG 70/30) foram avaliados através da análise de MEV e experimentos *in vivo*, utilizando o modelo experimental de defeito ósseo em tíbias de ratos, no qual os *scaffolds* foram implantados. Foram realizadas análises histopatológicas, histomorfométricas, imunoistoquímica e biomecânica foram realizadas 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Os resultados do estudo I demonstraram que não houve diferença estatística entre os grupos na análise de pH. Além disso, o grupo HA/SPG 70/30 apresentou em todos os períodos avaliados uma perda de massa mais elevada em comparação com os outros grupos. Nas micrografias representativas (MEV) foi possível verificar a degradação das amostras e observou-se na análise de FTIR os picos característicos dos materiais utilizados. Ainda, o grupo HA/SPG 70/30 apresentaram maior viabilidade celular (L929) em comparação com HA e HA/SPG 90/10 após 7 dias. Como também, o grupo HA/SPG 70/30 apresentaram uma maior viabilidade celular em MC3T3-E1 quando comparado com HA e HA/SPG 90/10 após 1 dia. Após 3 dias o grupo HA apresentou viabilidade celular inferior, quando comparado com o grupo controle e HA/SPG 70/30. No estudo II, a análise de MEV demonstrou que a SPG pode ser incorporada a HA, formando um *scaffold* homogêneo. Na análise histopatológica observou-se que o grupo HA/SPG 70/30 obteve uma maior degradação do material e uma acelerada neoformação óssea comparado ao grupo HA. A análise histomorfométrica demonstrou valores maiores de volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV (%)) e de superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS (%)) do grupo HA/SPG quando comparado ao grupo HA. Na análise imunoistoquímica observou-se a imunomarcação de Runx-2 em tecido de granulação e osso neoformado para todos os grupos experimentais, ainda o grupo HA/SPG obteve uma maior marcação se comparado aos demais grupos. Ainda, para VEGF ocorreu a imunomarcação no tecido de granulação para todos os grupos experimentais, porém nenhuma diferença estatística foi encontrada. No ensaio biomecânico foram encontrados valores semelhantes para todos os grupos. Diante dos resultados dos dois estudos conclui-se que a SPG pode ser utilizado como um aditivo em HA, principalmente em proporções que mimetizam

o tecido ósseo (HA/SP 70/30) proporcionando uma melhora de seu desempenho biológico para aplicações de regeneração óssea. No entanto, estudos a longo prazo devem ser realizados, para proporcionar informações adicionais sobre a degradação do material e a regeneração óssea.

Palavras-chave: Biotecnologia marinha; Esponja Marinha; Biomaterial; Tecido ósseo.

ABSTRACT

Fractures cause non-union and delay in bone consolidation, those problems are associated with a substantial physical incapacity and high socioeconomic costs and it's considered an important clinical challenge. In this context, some biomaterials have been investigated to accelerate the consolidation of fractures and to be effective for bone grafting. One of the most promising strategies to improve the biological performance of bone grafts is the combination of different biomaterials. In this context, the aim of this work was to evaluate through *in vitro* assay (study I) and *in vivo* study (study II) the effects of the incorporation of marine spongin (SPG) from *Aplysina fulva* into Hydroxyapatite (HA) for bone tissue engineering proposals. In the study I, SPG and HA scaffolds with different proportions (HA/SPG 90/10 and HA/SPG 70/30) were produced. For this, the following procedures were evaluated: scaffolds mass loss after incubation, pH, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and *in vitro* cell viability. Regarding study II, HA and HA/SPG 70/30 scaffolds were produced and SEM analysis was performed to characterize the samples. Also, in order to evaluate the *in vivo* tissue response, samples were implanted into a tibial bone defect in rats. Histopathological, immunohistochemistry and biomechanical analyzes were performed after 2 and 6 weeks of implantation to investigate the effects of the material on bone repair. The results of study I showed that pH measurements presented no statistical difference between the groups. Moreover, a higher mass loss was observed for HA/SPG70/30 compared to the other groups for all experimental periods. Moreover, SEM representative micrographs showed the degradation of the samples. FTIR analysis demonstrated the absorption peaks of the materials. A higher L929 cell viability for HA/SPG 70/30 was observed compared to HA and HA/SPG 90/10 on days 7 of culture. Furthermore, HA/SPG 70/30 showed a significant lower MC3T3 cell viability compared to HA and HA/SPG 90/10 on day 1. After 3 days the HA group showed lower cell viability when compared to the control group and HA/SPG 70/30. In the study II, it was possible to observe through the SEM results that SPG were successfully inserted in the HA, forming a homogeneous scaffold. The histological analysis demonstrated that the HA/SPG (70/30) group presented an accelerated material degradation and enhanced newly bone formation compared to the HA group. Additionally, histomorphometry analysis showed higher values of %BV/TV and N.Ob/T.Ar for HA/SPG (70/30) compared to the HA. Immunohistochemical analyzes, the Runx-2 immunolabelling was observed in granulation tissue and newly formed bone for all experimental groups. Furthermore, HA/SPG (70/30) showed an increase of immunolabelling compared to the other groups. Moreover, the VEGF immunolabelling was observed in granulation tissue for all experimental groups however, no difference was found. The biomechanical analysis demonstrated similar values for all groups. Considering the results of the two studies it is concluded that SPG can be used as an additive in HA, especially the one mimicking the composition of bone (with 70% of HA and 30% of SPG), providing an improvement in biological performance for bone regeneration applications. However, further long-term studies should be carried out to provide additional information regarding the material degradation and bone regeneration.

Keywords: marine sponge, spongin, biomaterial, bone repair, hydroxyapatite.

Contextualização

O reparo ósseo é um processo regenerativo altamente complexo, que se inicia na tentativa de restaurar a estrutura e função normal do tecido ósseo frente a uma lesão (TAJIMA et al., 2018). Este processo inclui a interação de uma série de eventos biológicos que determinarão a restauração da integridade deste tecido, com a participação coordenada de células, fatores de crescimento, vias biológicas e moléculas (DIMITRIOU et al., 2011; TAJIMA et al., 2018).

Em situações de normalidade, o tecido ósseo tem a capacidade de restabelecer a sua integridade. No entanto, no decorrer do processo de reparo podem ocorrer falhas, resultando no atraso da consolidação ou a não-união óssea que conseqüentemente implica em diversas complicações incluindo a necessidade de intervenções cirúrgicas e aumento do índice de mortalidade e morbidade (MARSELL et al., 2010; LIU et al., 2017).

Estima-se que em 2050, a incidência de fraturas para homens e mulheres na América Latina aumentará em 400% na faixa etária de 50 a 64 anos e de 700% para faixas etárias acima de 65 anos (INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2018). Adicionalmente, nos Estados Unidos, das 6,2 milhões de fraturas que ocorrem anualmente, 10% evoluem para a não consolidação e para a pseudoartrose (NAZARIAN et al., 2010; WIESE et al., 2010; VELASCO et al., 2015). Estatísticas no Brasil indicam que 24 milhões de reais são gastos com internações decorrentes a traumas e fraturas de quadril com osteoporose, culminando em altos custos para o sistema de saúde público e privado (ARAUJO et al., 2005; INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2018).

Diante desse contexto, a Engenharia de Tecidos tem extrema relevância, possibilitando o desenvolvimento de intervenções terapêuticas seguras e eficazes com a capacidade de estimular o metabolismo ósseo e promover conseqüentemente

a consolidação de fraturas (AXELRAD et al., 2007). Dessa forma, alguns recursos, vêm se destacando, entre eles os biomateriais, que uma vez em contato com o tecido ósseo, tem a capacidade de estimular seu metabolismo e crescimento, sendo eficaz para acelerar o processo de reparo de fraturas (WINKLER et al., 2018). O biomaterial pode ser definido como um material capaz de produzir uma resposta biológica específica em uma interface material/tecido que resulta na formação de uma ligação química entre os tecidos e o material (HENCH et al., 2010).

Dentre esses biomateriais, destaca-se a hidroxiapatita (HA) que é um fosfato de cálcio hidratado que tem uma composição química similar à fase mineral do tecido ósseo ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e tem sido comumente utilizada como substituto ósseo artificial devido às suas propriedades biológicas favoráveis, que incluem, biocompatibilidade e osteocondutividade (HAK, 2007; URQUIA EDREIRA et al., 2014; WANG et al., 2015; MATÉ SÁNCHEZ DE VAL et al., 2016).

A adesão, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, bem como a revascularização pode ser observada após a implantação *in vivo* de HA (WANG et al., 2017). De acordo com Pang et al., (2015), a HA é capaz de estimular a formação de tecido ósseo neoformado mineralizado em diferentes modelos de defeito ósseo, constituindo uma excelente alternativa para ser utilizado como substituto ósseo e revestimentos para implantes dentários. Ainda, Parizi et al., (2013) concluíram que defeitos ósseos enxertados com HA apresentaram maior formação óssea, quando comparado com o controle negativo (defeito vazio), após 8 semanas de defeitos ósseos da diáfise de coelhos.

Uma série de relatos clínicos descrevem resultados positivos, tais como a boa incorporação ao tecido ósseo e um baixo índice de complicações pós o implante de HA em cirurgia reconstrutiva ortopédica e odontológica (HUBER et al., 2006;

MERTENS et al., 2012). Entretanto, a taxa de degradação da HA é relativamente lenta, evitando sua substituição por osso neoformado. Além disso a sua capacidade de estimular o metabolismo e crescimento ósseo também é considerada limitada por alguns autores (Parizi et al. 2013; Pang et al. 2015; WANG et al., 2017).

Apesar do potencial biológico da HA para induzir a formação óssea, acredita-se que a adição de um componente da matriz extracelular orgânica, como colágeno, poderia otimizar a performance biológica do substituto ósseo, constituindo uma ótima estratégia, principalmente por mimetizar a composição e estrutura do tecido ósseo (PANG et al., 2015; RIZWAN et al., 2017).

Atualmente a maioria das fontes para a extração de colágeno é de origem animal, principalmente bovina ou porcina (SELL et al., 2010; GRANITO et al., 2016). No entanto, oferecem alguns riscos de rejeição e a possibilidade de transmissão de vírus e infecções, sobretudo dos agentes causadores de encefalopatias fatais, como a encefalopatia espongiiforme bovina (BELL et al., 2001; SILVA et al., 2014; GRANITO et al., 2017).

Diante desse contexto, uma alternativa muito promissora, segura, biocompatível e que pode servir como meio para a obtenção de colágeno são espécimes marinhas. Dentre elas, podemos destacar as esponjas marinhas que apresentam um potencial terapêutico para diversas aplicações biomédicas, inclusive para a engenharia de tecido ósseo (WANG et al., 2009; SILVA et al., 2014; GRANITO et al., 2017; FERNANDES et al., 2019). As esponjas marinhas, são animais sésseis do filo Poríferas e representam os primeiros animais pluricelulares, filogeneticamente mais antigos do planeta (FEUDA et al., 2017; GRANITO et al., 2017). Esses animais aquáticos são classificados de acordo com as suas características morfológicas,

moleculares e genéticas em quatro grandes classes: *Demospongiae*, *Homoscleromorpha*, *Hexactinellida* e *Calcarea* (VAN SOEST et al., 2019).

A estrutura das poríferas pode variar de acordo com as espécies, entretanto em sua maioria, apresentam esqueleto com composição e estruturas ímpares, formadas por uma fração orgânica e outra inorgânica. O constituinte inorgânico, composto por sílica e calcário já o constituinte orgânico de natureza predominantemente colagenosa, é considerada como colágeno de origem marinha, descritas por diversos pesquisadores como espongina (SPG) (JESIONOWSKI et al., 2018; POZZOLINI et al., 2018; EHRLICH et al., 2018; FERNANDES et al., 2019).

A SPG está presente em quantidade variável no esqueleto da maioria das esponjas da classe *Demospongiae*, que representa a maior e mais diversificada classe das esponjas com aproximadamente 81% das espécies descritas (VAN SOEST et al., 2019; GRANITO et al., 2016). A composição de aminoácidos da SPG é semelhante ao colágeno dos vertebrados, considerado por alguns autores como análogo ao colágeno tipo IV e tipo XIII. Além disso, espectros de absorção de infravermelho demonstraram que a SPG é formada por proteoglicanos e glicoproteínas (JUNQUA et al., 1974; GREEN et al., 2003; EHRLICH et al., 2018; POZZOLINI et al., 2018). Adicionalmente, estudos indicam a presença em sua estrutura de proteínas de adesão como fibronectina e tenascina, como também de ligações cruzadas entre os elementos de tropocolágeno e compostos aromáticos que proporcionam uma estabilidade biológica adicional (GARRONE 1978; SIMPSON 1984; GREEN et al., 2003; PALLELA et al., 2013).

Além disso, resultados descritos na literatura destacam o potencial promissor da SPG para aplicação na engenharia tecidual, principalmente para o tecido ósseo (GREEN et al., 2003; KIM et al., 2009; LIN et al., 2011; GRANITO et al., 2017).

Um estudo conduzido por Green et al., (2003) demonstraram que as células humanas osteoprogenitoras proliferaram ao longo de fibras colagênicas provenientes de uma espécie de esponja marinha *Dictyoceratida spongiidae* (Classe: *Demospongiae*) e foram capazes de depositar uma maior quantidade de matriz óssea mineralizada. Adicionalmente, Heinemann et al., (2007) utilizaram o colágeno proveniente da esponja de espécie *Chondrosia reniformis* (Classe: *Demospongiae*) para fabricação de um hidrogel que permitiu a adesão, proliferação e diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos.

Lin et al., (2011) demonstraram que osteoblastos primários de murinos puderam se ancorar na superfície das fibras colagênicas do esqueleto de esponjas marinhas da espécie *Callyspongiidae* (Classe: *Demospongiae*). Além disso, a diferenciação e a função mineralizadora dessas células foram comprovadas pela maior expressão da fosfatase alcalina após 7 dias de contato, da expressão gênica da osteocalcina e da osteopontina após 7, 14 e 21 dias de cultura e, finalmente pela presença de nódulos de mineralização evidenciada pela coloração de von Kossa após 21 dias. Similarmente, Kim et al., (2009) investigaram os efeitos da SPG derivada da esponja *Hymeniacidon sinapium* (Classe: *Demospongiae*) e observaram através de estudo *in vitro* que a mesma pode promover a mineralização óssea e estimulação da síntese de colágeno em células semelhantes a osteoblastos (MG-63).

Baseados nesses achados, os autores evidenciaram que a SPG é um material natural altamente promissor para ser utilizado na engenharia de tecido ósseo e pode servir como base para a manufatura de biomateriais e enxertos ósseos. No entanto, em situações críticas, como em fraturas de grandes dimensões ou na presença de doenças, as propriedades osteogênicas da SPG podem não ser suficientes para estimular a consolidação óssea. Dessa maneira, a associação com diferentes

biomateriais, especialmente aqueles com potencial bioativo (tal como a HA) seria uma alternativa (PANG et al., 2015; RIZWAN et al., 2017).

Nesse contexto, a associação de diferentes materiais, combinando suas diversas propriedades como bioatividade e resistência mecânica, podem apresentar um melhor desempenho biológico a fim de serem utilizados no tratamento de fraturas ósseas (Pang et al., 2015; Siddiqui et al., 2018). Diante do exposto acima a hipótese deste estudo foi que incorporação de SPG (representando a fração orgânica) em *scaffolds* de HA (representando a fração inorgânica) aceleraria a degradação do biomaterial, melhoraria o desempenho biológico e construiria um material mais apropriado para ser utilizado no processo de reparo ósseo.

Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar através de estudos *in vitro* e “*in vivo*” o desempenho biológico da incorporação de SPG proveniente da esponja marinha da espécie *Aplysina fulva* em HA.

Objetivos Específicos

Estudo I

- Realizar a caracterização físico-química de *scaffolds* de HA/SPG, através da análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de fourier (FTIR), análise de pH e perda de massa.
- Avaliar a viabilidade celular de *scaffolds* de HA/SPG em diferentes proporções, através de experimentos *in vitro* (teste de AlamarBlue®) utilizando as células L929 (fibroblastos) e MC3T3-E1 (pré-osteoblasto).

Estudo II

- Investigar os efeitos da implantação de *scaffolds* de HA/SPG, duas e seis semanas após o modelo experimental de defeito ósseo em tíbias de ratos.
- Avaliar a presença de tecido de granulação, neoformação óssea e resíduos do material através de análises histopatológicas.
- Avaliar a área de tecido ósseo neoformado, número e superfície osteoblastica através de análises histomorfométricas.

- Verificar a presença de imunomarcadores de fator de transcrição relacionado ao runt-2 (RUNX-2) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), através de análises de imunohistoquímica.
- Avaliar a Carga Máxima, Resiliência e Tenacidade através da análise biomecânica das tíbias

Referências

ARAUJO, D. V.; OLIVEIRA, J. H. A.; BRACCO, O. L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. *Arq Bras Endocrinol Metab*, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 897-901, 2005.

AXELRAD, T. W.; KAKAR, S.; EINHORN, T. A. New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury*, v.38 Suppl 1, p. 49-62. 2007.

BELL, J. J.; BARNES, D. K. A. Sponge morphological diversity: a qualitative predictor of species diversity? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. v. 11, n. 2, p. 109-121. 2001.

CEN, L. et al. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*. v. 63, n. 5, p. 492-6, 2008.

DE LONG, W. G. et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am*. v. 89, p. 649-58, 2007.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*. v. 9, p. 1-10, 2011.

EHRlich, H. et al. Collagens of Poriferan Origin. *Marine drugs*, v. 16, n. 3, p. 79, 2018.

FERNANDES, K. R. et al. Influence of the incorporation of marine spongin into a Biosilicate®: an *in vitro* study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. v.30. 2019.

FEUDA, R. et al. Improved modeling of compositional heterogeneity supports sponges as sister to all other animals. *Curr. Biol*. v.27, p. 3864-3870, 2017.

GARRONE R. *Phylogenesis of Connective Tissue: Morphological Aspects and Biosynthesis of Sponge Intercellular Matrix*. John Wiley & Sons; Hoboken, NJ, USA: 1978.

GRANITO, R. N.; CUSTÓDIO, M. R.; RENNÓ, A. C. Natural marine sponges for bone tissue engineering: The state of art and future perspectives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2017.

GREEN, D. et al. Natural marine sponge fiber skeleton: A biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation. *Tissue Eng.* v. 9, p. 1159-1166, 2003.

HAK, D. J. The use of osteoconductive bone graft substitutes in orthopaedic trauma. *J Am Acad Ortho Surg.* v. 15, p. 525-536, 2007.

HENCH, L. L et al. Twenty-first century challenges for biomaterials. *JR Soc Interface,* v.7, p. 379-91, 2010.

HEINEMANN, S. et al. Ultrastructural studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *Biomacromolecules.* v. 8, n. 11, p. 3452-7, 2007.

INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. Broken bones, broken lives: the fragility fracture crisis in six European countries. Disponível em: www.iofbonehealth.org/broken-bones-broken-lives. Acesso em: 26 set. 2019.

JUNQUA, S. et al. Biochemical and morphological studies on collagens of horny sponges. *Ircinia* filaments compared to spongines. *Connect. Tissue Res.* 1974;2:193–203.

KIM, M. M. et al. Effect of Spongin Derived From *Hymeniacidon sinapium* on Bone Mineralization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* v. 90, n. 2, p. 540-6, 2009.

LIN Z. et al. *In vitro* evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biol Sci.*v. 7, n. 7, p. 968-77, 2011.

LIU, W. C. et al. Angiogenesis Assays for the Evaluation of Angiogenic Properties of Orthopaedic Biomaterials. A General Review *Adv. Healthcare Mater.* v.6, 2017.

MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *J Pharm Bioall,* v.8, p.83-91. 2016.

MARSELL, R.; EINHORN, T. A. Emerging bone healing therapies. *J Orthop Trauma.* v. 24, n. 1, p.4-8, 2010.

MATÉ SÁNCHEZ DE VAL, J. E. et al. Influence of hydroxyapatite granule size, porosity, and crystallinity on tissue reaction *in vivo*. Part B: a comparative study with

biphasic synthetic biomaterials. *Clin Oral Implants Res.* v. 27, n. 11, p. 1331-1338, 2016.

NANDI, S.K.; et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the marine sponge skeleton as a bone mimicking biomaterial. *Integr Biol.* v. 7, n. 2, p. 250-62, 2015.

NAZARIAN, A. et al. Application of structural rigidity analysis to assess fidelity of healed fractures in rat femurs with critical defects. *Calcif Tissue Int.* v. 86, p. 397-403, 2010.

PALLELA, R.; JANAPALA, V. R. Comparative ultrastructural and biochemical studies of four demosponges from Gulf of Mannar, India. *Int. J. Marine Sci.* v. 3, p. 295-305, 2013.

PANG, K. M. et al. Biologic properties of nano-hydroxyapatite: An *in vivo* study of calvarial defects, ectopic bone formation and bone implantation. *Biomed Mater Eng.* v. 25, n.1, p. 25-38, 2015.

PARIZI, A. M. et al. Effectiveness of synthetic hydroxyapatite versus Persian Gulf coral in an animal model of long bone defect reconstruction. *J Orthop Traumatol.* v. 14, p. 259-268, 2013.

POZZOLINI, M. et al. Production, Characterization and Biocompatibility Evaluation of Collagen Membranes Derived from Marine Sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847. *Marine drugs.* v. 16, n. 4, p. 111, 2018.

RIZWAN, M.; HAMDY, M.; BASIRUN, W. J. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *J Biomed Mater Res A.* v. 105, p. 3197-3223, 2017.

SILVA, T. H. et al. Marine origin collagens and its potential applications. *Mar Drugs.* v. 12, p. 5881-5901, 2014.

SIMPSON, T. L. *The Cell Biology of Sponges.* New York: Springer-Verlag, 1984.

TAJIMA, S.; TOBITA, M.; MIZUNO, H. Current status of bone regeneration using adipose-derived stem cells. *Histol Histopathol.* v. 33, n. 7, p. 619-627, 2018.

VAN SOEST, R. W. M et al. World Porifera Database. Disponível em: www.marinespecies.org/porifera. Acesso em: out. 2019.

VELASCO, M. A.; NARVÁEZ-TOVA, C. A.; GARZÓN-ALVARADO, D. A. Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable *Scaffolds* for Bone Tissue Engineering. *BioMed Research International*. v. 40, n. 5, p. 363-408, 2015.

WANG, Z. et al. MicroRNA-26a-modified adipose-derived stem cells incorporated with a porous hydroxyapatite scaffold improve the repair of bone defects. *Mol Med Rep*. v. 12, n. 3, p. 3345-5, 2015.

WANG, B. et al. Nucleosides from the marine sponge *Haliclona* sp. *Z Naturforsch C*. v. 64, p. 143-148, 2009.

WANG, W.; YEUNG, K. W. K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. v. 2, n. 4, p. 224-247, 2017.

WIESE, A. E.; PAPE, H. C. Bone defects causes by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. *Orthop Clin North Am*. v. 41, n. 1, p. 1-4, 2010.

WINKLER, T. F. A. et al. review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Joint Res*. v. 7, p. 232-243, 2018.

Estudo I

**Incorporação de colágeno marinho extraído de esponjas marinhas (espongina)
em amostras de hidroxiapatita: caracterização e avaliação biológica *in vitro***

***Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongin) into Hydroxyapatite
Samples: Characterization and in vitro Biological Evaluation***

Observação: Artigo publicado na revista “Marine Biotechnology” (anexo I), sob autoria de: Julia. Risso Parisi, Kelly Rossetii Fernandes, Ingrid Regina Avanzi, Bianca Priscila Dorileo, Alan de França Santana, Ana Laura Martins de Andrade, Paulo Roberto Gabbai-Armelin, Carlos Alberto Fortulan, Eliandra Sousa Trichês, Renata Neves Granito e Ana Claudia Muniz Rennó.

Resumo

Na engenharia de tecidos ósseos, os enxertos à base de biomateriais possuem um papel importante. Dessa maneira, o colágeno, incluindo os extraídos de esponjas marinhas (em geral, chamado esponjina (SPG) vem ganhando destaque, já que é considerado um biomaterial promissor na engenharia de tecido ósseo. Assim como a hidroxiapatita (HA) que também contribui positivamente na estimulação do metabolismo ósseo. Portanto, este trabalho investigou diferentes proporções de *scaffolds* compostos por HA e SPG, a fim de avaliar suas características físico-químicas, morfológicas e o seu desempenho biológico *in vitro*. Para isso, os *scaffolds* foram avaliados por meio do teste de perda de massa após a incubação, avaliação de pH, espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), e avaliação da viabilidade celular *in vitro*. Nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada na análise de pH. Observou-se uma perda de massa mais elevada para HA/SPG 70/30 em comparação com os outros grupos para todos os períodos experimentais. Nas análises de MEV, foi possível observar a degradação das amostras e observou-se na análise de FTIR os picos característicos dos materiais utilizados. Após 3 dias, foi observada uma maior viabilidade de células L929, no grupo controle em comparação com o grupo HA e PMMA quando comparado com os grupos HA e HA/SPG 90/10. Após 7 dias, o grupo HA/SPG 70/30 apresentaram maior viabilidade celular em comparação com os grupos HA e HA/SPG 90/10. Foi observada uma maior viabilidade celular de MC3T3-E1 para o grupo HA/SPG 70/30 quando comparado com HA, e HA/SPG 90/10 após 1 dia, já após 3 dias o grupo HA apresentou viabilidade celular inferior, quando comparado com o grupo controle, PMMA e HA/SPG 70/30. Sendo assim, com base em nossas investigações, pode-se concluir que a incorporação de SPG em HA apresentou melhores propriedades biológicas, especialmente a uma composição que mimetiza o osso (com 70% de HA e 30% de SPG). Diante disso, estes dados destacam o potencial da incorporação de SPG em HA para melhorar o desempenho do enxerto para aplicações na regeneração óssea. Além disso estudos a longo prazo devem ser realizados, para proporcionar informações adicionais sobre a degradação do material e a regeneração óssea na presença de HA/SPG.

Palavras-chave: Colágeno, biotecnologia marinha, biomateriais marinhos, engenharia de tecidos, aplicação biomédica.

1. Introdução

A não consolidação óssea ou o atraso no reparo ósseo ocorre frequentemente como consequência de traumas graves e doenças como a osteoporose (Einhornand e Gerstenfeld 2015). Em todo o mundo, a osteoporose causa mais de 8,9 milhões de fraturas por ano, o que resulta em uma fratura osteoporótica cada 3 segundos (Bijlsma et al. 2011; Szpalski et al., 2010). Neste contexto, os tratamentos para fraturas ósseas devido a doenças relacionadas com a idade e perda óssea grande dimensão são particularmente difíceis (Amini et al., 2012; Black et al., 2015).

Nos últimos anos, fármacos e compostos bioativos, com o potencial de estimular o metabolismo do tecido ósseo, têm sido utilizados com o objetivo de regenerar partes danificadas (Black et al., 2015). No entanto, o seu uso envolve alguns problemas especialmente relacionados com os elevados custos, os efeitos secundários prejudiciais, com respostas imunológicas e da disponibilidade do limitada do material (Bose et al., 2015).

Neste contexto, muitas estratégias biotecnológicas têm sido propostas na tentativa de suprir estas limitações, especialmente através do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, incluindo baseados na biodiversidade marinha (Silva et al., 2014). O ambiente marinho fornece recursos abundantes para o desenvolvimento de novos produtos médicos. Entre a biodiversidade marinha, as esponjas marinhas (Poríferas) são uma das fontes mais promissoras de elementos biológicos e moléculas com um alto potencial terapêutico para uma gama de aplicações, incluindo para engenharia de tecido ósseo (Wang et al., 2009; Silva et al., 2014; Granito et al., 2017).

As esponjas marinhas apresentam em sua estrutura uma porção orgânica, denominada espongina (SPG) ou colágeno marinho, que possui composição similar

ao colágeno do tipo XIII dos vertebrados. Por esta razão, a SPG tem sido considerada um composto natural promissor para bioregeneração tecidual (Green et al., 2003; Lin et al., 2011; Iwatsubo et al., 2015). Iwatsubo et al., 2015). Diversos estudos *in vitro* revelaram que as matrizes à base de SPG são capazes de acelerar a proliferação de osteoblastos (Exposito et al., 2002; Green et al., 2003; Iwatsubo et al., 2015).

No entanto, em situações críticas, como em fraturas de grandes dimensões ou na presença de doenças, as propriedades osteogênicas da SPG podem não ser suficiente para estimular a consolidação óssea. Dessa maneira, a associação com diferentes biomateriais, especialmente aqueles com potencial bioativo (tais como a hidroxiapatita (HA)), podem constituir um enxerto de osso com o desempenho biológico superiores (Pang et al., 2015; Rizwan et al., 2017). Sendo assim, a associação de SPG (que representa a porção orgânica) com HA (a porção inorgânica) podem mimetizar a composição e estrutura de tecido ósseo humano.

A HA, apresenta uma fase cristalina de fosfato de cálcio, e vem sendo amplamente utilizada como material para enxerto de osso, pois apresenta rigidez mecânica, uma estrutura osteocondutora, bem como propriedades angiogênicas (Parizi et al., 2013; Wang et al., 2007; Pang et al., 2015). Parizi et al., (2013) concluíram que defeitos ósseos enxertados com HA apresentaram maior formação óssea, quando comparado com o controle negativo (defeito vazio), após 8 semanas de defeitos ósseos da diáfise de coelhos.

Nesse contexto, o presente estudo desenvolveu um *scaffold* composto por HA associado a SPG, com o intuito de mimetizar o tecido ósseo, composto por uma porção inorgânica, associado com uma porção orgânica, possibilitando seu uso na engenharia do tecido. Dessa maneira, acredita-se que o material semelhante ao osso apresentaria um desempenho biológico superior em comparação *scaffolds* HA. Além

disso, diferentes formulações de HA e SPG foram avaliadas por meio de testes de caracterização físico-química, morfológicas e desempenho biológico *in vitro*. Para este fim, os compósitos pré-estabelecidos, foram avaliados por meio de perda de massa e medições de pH, caracterização FTIR, e MEV. Além disso, experimentos *in vitro* foram realizados para avaliar os efeitos da proliferação celular e citotoxicidade dos *scaffolds*.

2. Material e métodos

2.1. Materiais utilizados

A HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), com a densidade de $2,82 \text{ g/cm}^3$, foi utilizada neste estudo e fornecida pelo Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (São José dos Campos, São Paulo, Brasil). A mesma foi obtida a partir da precipitação de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), fosfato de amônio de hidrogênio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), e hidróxido de amônia (NH_4OH) (Lobo et al., 2013).

Adicionalmente, a SPG foi obtida a partir da esponja marinha *Aplysina Fulva*, que foram coletadas em costões de alto hidrodinamismo, na zona entremarés, na área de Praia Grande ($23^{\circ}49'23.76''\text{S}$, $45^{\circ}25'01.79''\text{W}$, São Sebastião, Brasil).

Para a extração SPG, foi utilizado o método descrito por Swatschek et al., (2002). Em resumo, as esponjas foram cortadas em pequenos pedaços (2 mm de largura x 2 mm) e foram colocadas em 100 mM de tampão Tris-HCl (10 mM EDTA, 8 M Ureia, 100 mM 2-mercaptoethanol, pH 9.0). A solução foi agitada por 24 h à temperatura ambiente e centrifugada (5000G; 2°C ; 5 min), o pH foi ajustado para a 4.0 (solução de ácido acético) e a solução foi centrifugada novamente (18.000G; 2°C ; 40 min). O precipitado foi suspenso em água Milli-Q e centrifugado (18000 G; 2°C ; 40 min), a solução foi, em seguida, liofilizada, triturada e peneirada (180 μm , densidade de $1,347 \text{ g/cm}^3$). SPG foi armazenada em tubos, à temperatura ambiente.

Além disso, o *poly (methyl methacrylate)* (PMMA, tamanho de partícula 15 µm) e *methyl methacrylate* (MMA, 99% de pureza) (VIPI Dental Products, Pirassununga, São Paulo, Brasil) e *carboxymethyl cellulose* (CMC) (densidade de 1.59 g/cm³) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) foram materiais utilizados para a confecção dos *scaffolds*.

2.2. Preparação dos *scaffolds*

Para os testes de FTIR e MEV, foram utilizados seis grupos experimentais diferentes: PMMA, SPG, HA, HA/SPG 90/10, e HA/SPG 70/30, já para os demais testes foram utilizados 5 grupos (PMMA, HA, HA/SPG 90/10, e HA/SPG 70/30). Os materiais utilizados foram adicionados em diferentes proporções de acordo com cada grupo (Tabela 1).

Para a fabricação dos *scaffolds*, todos os materiais em forma de pó foram pesados e misturados em um recipiente de silicone utilizando uma espátula (de acordo com os grupos). Foi adicionada água Milli-Q e a combinação foi misturada novamente em seguida foi adicionado o monômero de MMA e a mistura foi rapidamente transferida para um molde de silicone de 6 mm de diâmetro x altura de 2 mm.

Adicionalmente, os moldes foram selados e submetidos a uma câmara de ar em pressão (0,6 MPa) por 30 minutos, logo após, os moldes foram secos a vácuo (10⁻³ Torr) por 15 minutos. Depois os *scaffolds* foram removidos dos moldes, embalados em envelopes (Medsteril® São Paulo, Brasil) e esterilizados com óxido de etileno (Acecil, Campinas, Brasil).

É importante citar que a adição de monômero MMA foi utilizada a fim de produzir ligação cruzada aos *scaffolds*, já o PMMA é um material biocompatível e inerte utilizado para agregar os diferentes materiais e o CMC foi utilizado por ser um agente

porogênico, a fim de fornecer 60% de porosidade para os *scaffolds* (Nuss et al., 2008; Sousa 2009; Lopez-Heredia et al., 2012; Ozel et al., 2016).

Tabela 1: Grupos experimentais e suas diferentes formulações

Grupos	PMMA (g)	MMA (g)	HA (g)	SPG (g)	CMC (g)	Água Milli-Q (g)
PMMA	0,472	0,944	0	0	0,043	0,565
HA	0,236	0,472	0,564	0	0,043	0,565
SPG	0,236	0,472	0	0,268	0,043	0,565
HA/SPG 90/10	0,236	0,472	0,4577	0,0508	0,043	0,565
HA/SPG 70/30	0,236	0,472	0,296	0,127	0,043	0,565

2.3. Caracterização físico-química

2.3.1. Teste de degradação *in vitro*

Para a avaliação de massa, as amostras ($n = 3$) foram pesadas e incubadas em 3,0 ml de Tampão Fosfato-salino (PBS) durante 1, 3, 7, 14, e 21 dias à temperatura ambiente. A massa final foi calculada comparando as massas iniciais (M_{ini}) e finais (M_{fin}) para cada amostra individual: $(M_{fin} \times 100) / M_{ini}$.

2.3.2. Avaliação de pH

As amostras ($n=3$) foram incubadas em 3,0 ml de PBS durante 1, 3, 7, 14, e 21 dias à temperatura ambiente e o pH foi mensurado, através do pH eletrônico (Orion A211 Star, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA).

2.3.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi avaliada através do MEV (Ie0 440, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), operando com um feixe de elétrons de 10 keV. As amostras foram montadas em bases de alumínio usando fita de carbono e revestida com ouro. A morfologia da superfície e degradação foram analisadas após 0, 7, e 21 dias de incubação em PBS.

2.3.5 Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Foi realizada a identificação das amostras através dos espectros da análise de FTIR (Bomem Michelson na faixa de 4000 e 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1}) As amostras foram digitalizadas 100 vezes para cada medição e o espectro coletado foi a média de todas as varreduras.

2.3.6 Estudos *in vitro*

Duas linhagens celulares foram utilizadas no presente estudo, células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), derivadas de calvária de ratos e fibroblásticas (L929), derivados de fibroblastos murinos (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de cultura, utilizando meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) para L929 e o Meio Essencial Mínimo Modificado α para MC3T3-E1, suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de solução antibiótica-antimicótica (Vitrocell, Campinas, Brasil) a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Fernandes et al., 2016).

2.3.7. Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do teste de AlamarBlue®, por ensaio indireto, utilizando extratos dos materiais as linhagens celulares foram avaliadas (Shin et al., 2003). Para obtenção dos extratos, as amostras foram completamente imersas em meio de cultura (50 mL/g) a 37 °C em uma atmosfera úmida de 5% de CO₂ durante 7 dias. Após este período, as amostras foram filtradas e utilizadas para os experimentos *in vitro*. Para o grupo controle, apenas o DMEM ou α -MEM foi utilizado de acordo a linhagem celular.

Após as garrafas atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas (solução tripsina/EDTA - 0,25%, Cultiab) e semeadas em placas de cultura de 48 poços a uma densidade de 1×10^4 células/mL, contendo 500 μ L de extratos dos *scaffolds* e incubados durante os períodos de 1 e 3, e 7 dias. Após cada período avaliado, o AlamarBlue® (Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, Alemanha) foi adicionado em todas as amostras, a fim de avaliar a viabilidade celular. Para esta análise, 50 μ L de solução de AlamarBlue® foi adicionado a cada poço, e a placa foi armazenada protegida de luz, durante 4 horas a 37 °C na incubadora. Depois deste período, 200 μ L foram transferidas para uma placa células de 96 poços (em duplicata). A absorbância foi mensurada a 570 nm usando um espectrofotômetro de microplacas (Biotek Instruments, Inc.) (Fernandes et al., 2016).

2.3.8. Análise estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a distribuição e o teste de Kruskal-Wallis e Dunn post hoc foram utilizados para dados não-

paramétricos. Uma análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas de Tukey post-testes foram utilizados para os dados paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Testes de degradação in vitro

As medidas de massa foram realizadas para investigar a perda de massa dos *scaffolds* em PBS em diferentes períodos (Figura 1). Para todos os períodos experimentais analisados, foi observada uma perda de massa superior significativa para a HA/SPG 70/30 em comparação com todos os outros grupos ($p < 0,05$).

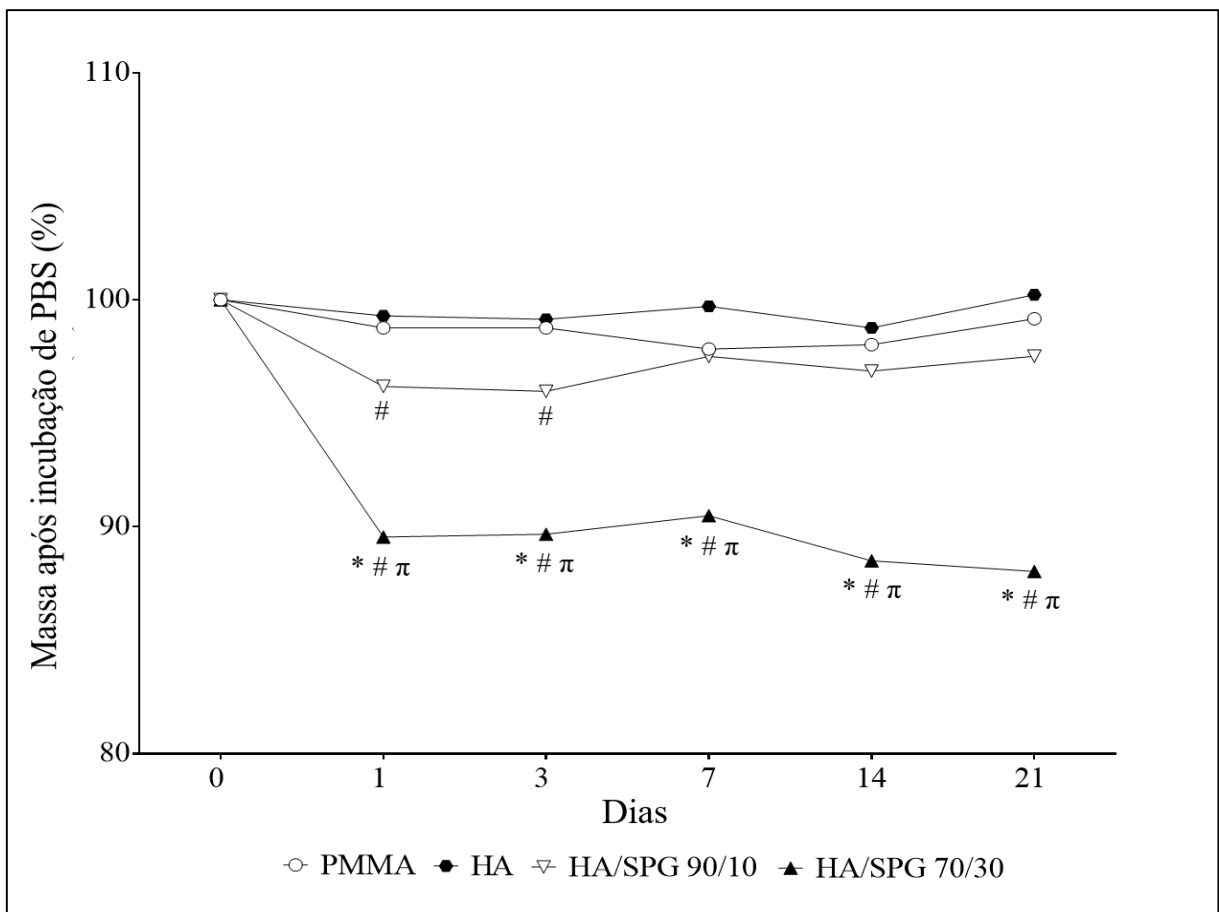


Figura 1: Massa após incubação em PBS (%) para os *scaffolds* PMMA, HA, HA/SPG 90/10, HA/SPG 70/30). Os valores representam a média de três amostras. Dia 1 e dia 3: # HA vs. HA/SPG90/10, * PMMA vs. HA/SPG70/30, # HA vs HA/SPG 70/30, e π HA/SPG 90/10 vs. HA/SPG 70/30. Dia 7, 14 e 21: * PMMA vs. HA/SPG 70/30, # HA vs. HA/SPG 70/30 e π HA/SPG 90/10 vs HA/SPG 70/30. $p < 0.05$.

3.2. Mensuração do pH

Foi observado que os valores de pH variaram entre 7,2 e 7,6 para todos os grupos e em todos os períodos experimentais, não apresentando diferença estatística (Figura 2).

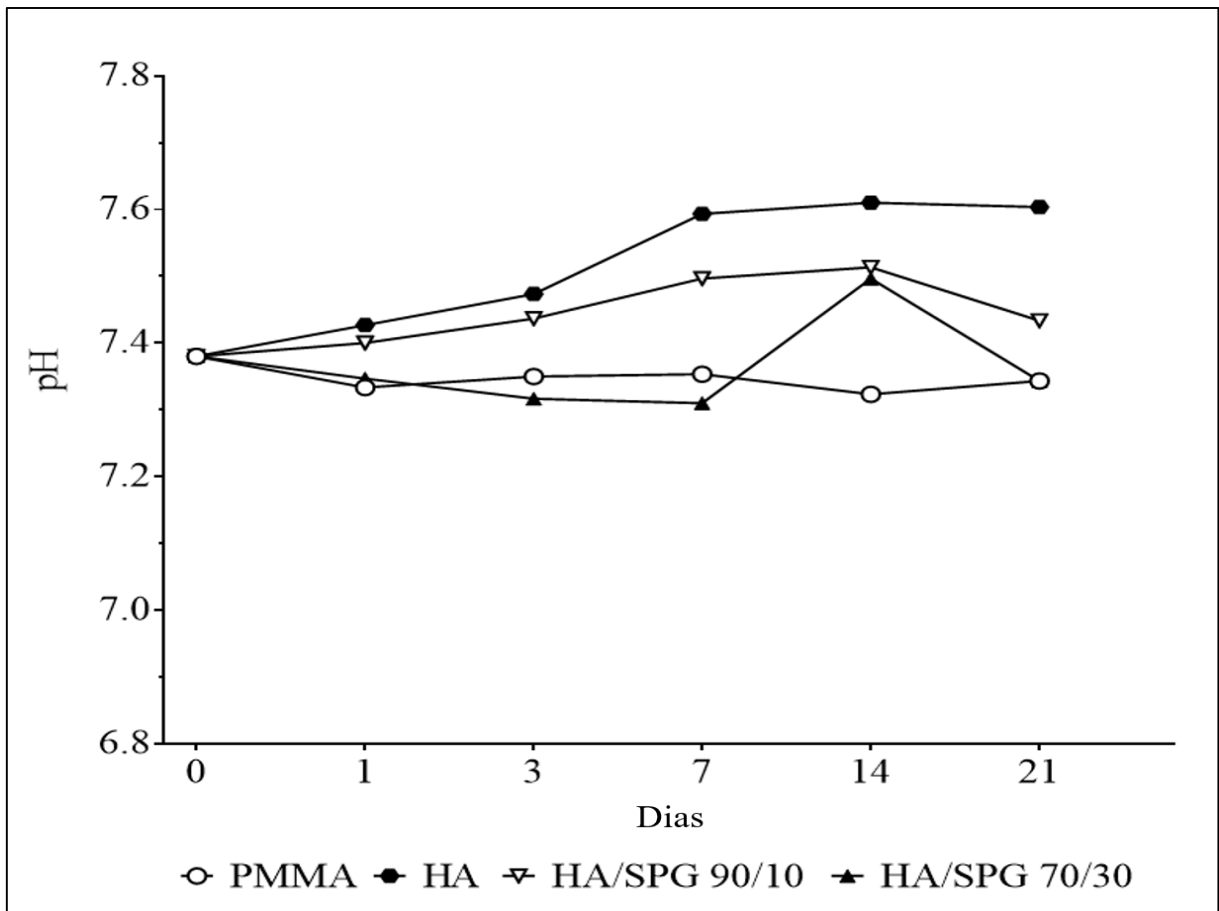


Figura 2: Valores de pH após incubação em PBS para PMMA, HA, HA / SPG 90 /10, HA/SPG 70/30 em diferentes tempos de incubação (1, 3, 7, 14, e 21 dias).

3.3. MEV

As fotomicrografias representativas dos *scaffolds* foram representadas na Figura 3. Foi possível observar na Figura 3 (A1-E1) a morfologia e a estrutura dos *scaffolds* de PMMA, SPG e HA, a presença de de partículas de PMMA, HA, e SPG foi observada nos *scaffolds* de HA/SPG 90/10 e HA/SPG70, no dia 0 (sem a incubação

de PBS). Após 7 e 21 dias da incubação em PBS, o grupo PMMA não demonstrou nenhuma modificação morfológica do material (A2 e A3). Já para HA, após 7 dias (B2), uma degradação inicial das amostras foi observada com algumas modificações estruturais das partículas.

A figura 3 (D2) e (E2) representa os *scaffolds* de HA/SPG 90/10 e HA/SPG 70/30 após 7 dias de incubação em PBS. Foi possível observar partículas de PMMA, SPG e HA. Além disso, a degradação de HA/SPG, para ambas as composições, foi superior em comparação com o HA. A degradação continuou para as amostras de HA, até 21 dias (B3). O mesmo comportamento foi observado para as amostras com SPG em todas as formulações (degradação de HA), com a formação de poros.

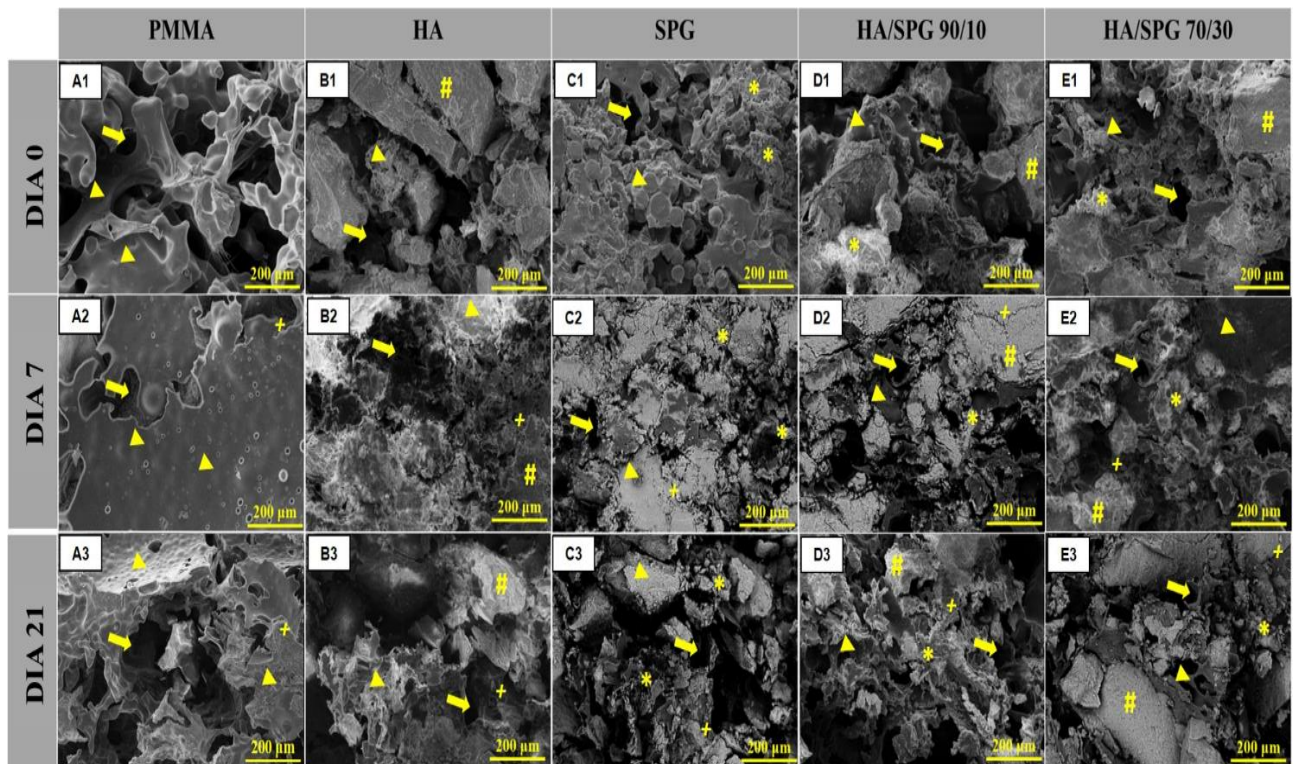


Figura 3: Fotomicrografia de MEV dos scaffolds antes de incubação de PBS. Dia 0 (A1-E1), dia 7 (A2-E2) e 21 (A3-E3). Poros (setas). PMMA (triângulo), HA (#), SPG (*) e a degradação do material (+). Escala 200 µm

3.4. FTIR

Nos espectros de FTIR (Fig. 4) foi possível observar os picos de absorção para os grupos de PMMA, HA, SPG, HA/SPG 90/10 e HA/SPG 70/30.

Os picos característicos para PMMA foram encontrados em 843 cm^{-1} , $1,987\text{ cm}^{-1}$ e 1062 cm^{-1} , relacionados aos grupamentos característicos deste polímero (Duan et al., 2008), enquanto que os picos representativos ao grupamento PO_4^{3-} a 560 cm^{-1} , 600 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} característicos, puderam ser observados em todas os grupos contendo HA (Berzina-Cimdina e Borodajenko, 2012)

Bandas características referentes aos grupamentos OH, CH, NH, foram detectadas a 3435 cm^{-1} , 2927 cm^{-1} e 1546 cm^{-1} respectivamente para todos os grupos contendo SPG (Zdarta et al., 2017). A incorporação bem-sucedida da SPG na estrutura de HA pôde ser observada a partir da observação das bandas adicionais presentes, características dos grupamentos orgânicos da SPG, nos espectros híbridos obtidos de HA/SPG (Figura 4).

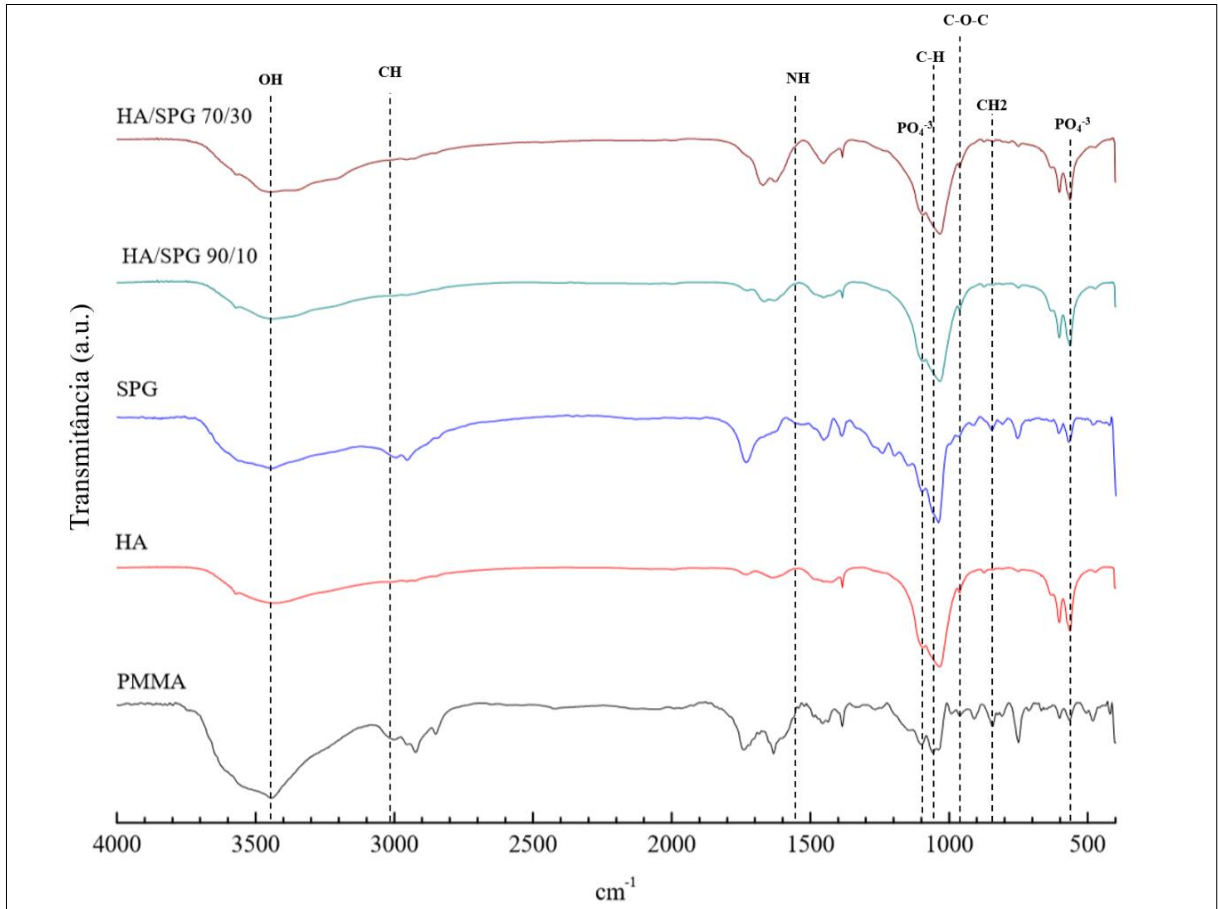


Figura 4: Os espectros de FTIR de PMMA, SPG, HA, HA / SPG 90/10, e HA / SPG 70/30. As linhas tracejadas indicam picos associados ao PMMA (flexão das ligações de CH₂, alongamento das ligações de C-O-C e flexão das ligações de C-H), HA (flexão das ligações de PO₄⁻³) e SPG (alongamento das ligações de NH,CH, OH).

3.5. Estudos *in vitro*

Não foi observada diferença significativa no primeiro período experimental (dia 1) entre os grupos avaliados para a viabilidade celular de L929, em contato com os estratos dos *scaffolds*. No dia 3, foi possível observar uma viabilidade celular maior para o grupo PMMA em comparação aos grupos HA e HA/SPG 90/10 ($p = 0,0066$ e $0,0118$, respectivamente). Além disso, foi possível observar uma viabilidade celular maior para o grupo controle em comparação ao grupo HA ($p = 0,0424$). Adicionalmente, no último período experimental (7 dias), o grupo controle e o grupo PMMA apresentaram valores significativamente mais elevados quando comparados

com os grupos HA e HA/SPG 90/10 ($p < 0,0001$). O grupo HA/SPG 70/30 apresentou maior viabilidade celular em comparação com HA ($p = 0,001$) e HA/SPG 90/10 ($p = 0,0019$) (Fig. 5).

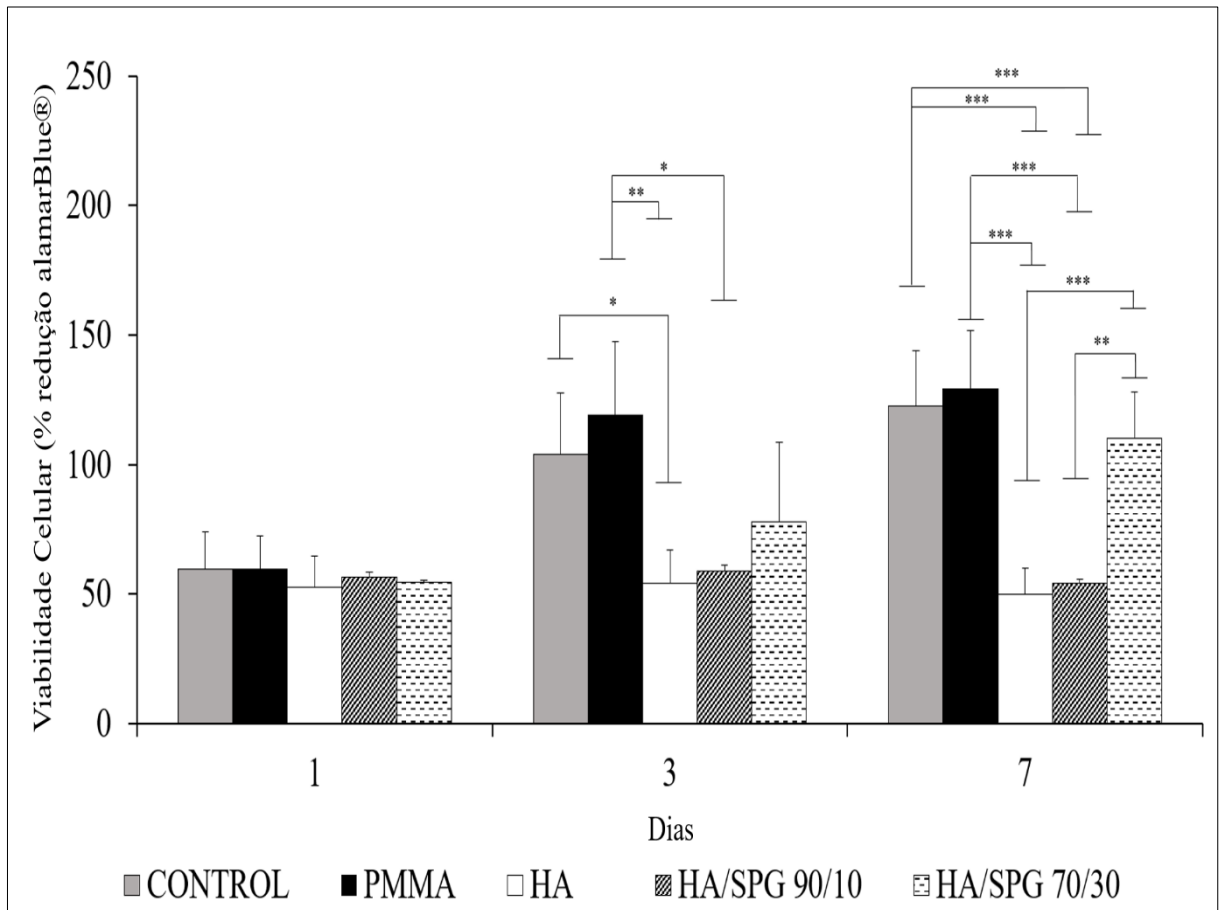


Figura 5: Viabilidade celular para L929 cultivadas em solução contendo extrato de PMMA, HA, HA/SPG 90/10, e HA/SPG 70/30 em diferentes momentos de cultivo (1, 3 e 7 dias). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,0001$.

A análise de viabilidade celular para linhagem celular MC3T3 dos estratos dos *scaffolds*, foi apresentada na figura 6. No primeiro período experimental analisado (dia 1), foi observado uma viabilidade celular significativamente maior para o grupo controle, quando comparado com HA ($p < 0,0001$) e HA/SPG 90/10 ($p = 0,0448$). Além disso, o grupo PMMA mostrou uma maior viabilidade celular significativa em comparação com o grupo controle ($p = 0,0448$), HA ($p < 0,0001$), HA/SPG 90/10 ($p <$

0,0001), e HA/SPG 70/30 ($p = 0,0074$). Adicionalmente, o grupo HA apresentou uma viabilidade celular inferior em relação aos grupos de HA/SPG 90/10 e HA/SPG 70/30 ($p = 0,0282$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Após 3 dias, o grupo HA mostrou uma viabilidade celular significativamente menor em comparação ao grupo controle ($p = 0,01$), PMMA ($p = 0,0118$), e HA/SPG 70/30 ($p = 0,0184$). No último período experimental (7 dias), o grupo controle apresentou uma maior viabilidade celular em comparação com HA, HA / SPG 90 /10 e HA / SPG 70/30 ($p = 0.003$, $p < 0,006$, e $p = 0,0291$, respectivamente). Ainda, o PMMA apresentou uma viabilidade celular superior em comparação com HA e HA/SPG 90/10 ($p = 0,0104$ e $p = 0,0207$, respectivamente).

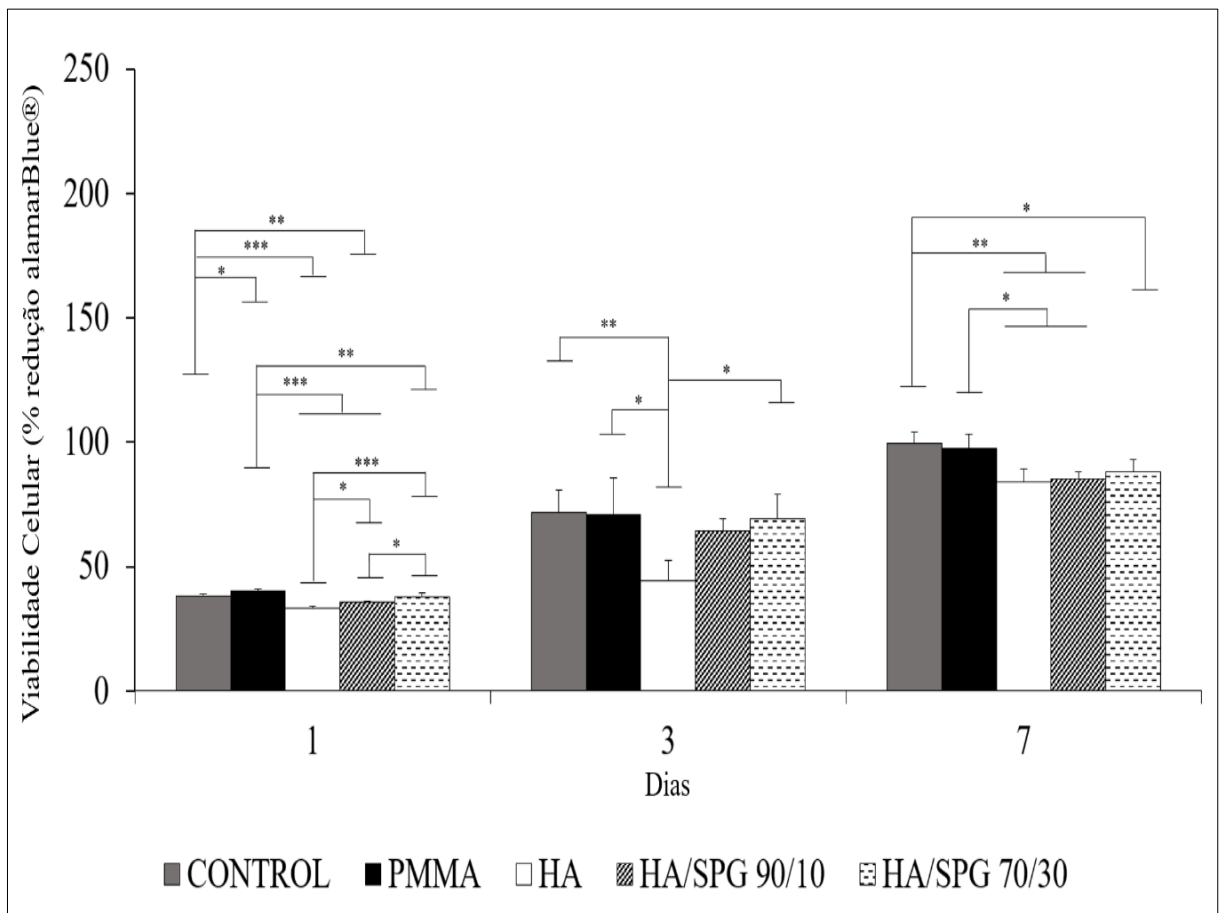


Figura 6: Viabilidade celular para MC3T3 cultivadas em solução contendo extrato de PMMA, HA, HA / SPG 90/10, e HA / SPG 70/30 em diferentes momentos de cultivo (1, 3 e 7 dias). * $p < 0,05$; ** $< 0,01$, e *** $p < 0,0001$.

4. Discussão

O presente estudo investigou as características físico-químicas e a viabilidade celular da incorporação de SPG extraído da esponja marinha *Aplysina fulva* (SPG) na HA, com o objetivo de desenvolver um implante ósseo mais adequado para ser usado na área da engenharia do tecido ósseo. Vale ressaltar que a SPG pode ser introduzida com sucesso na HA e os *scaffolds* obtidos eram de fácil manuseio e apresentaram coesão após a incubação. Além disso, as amostras contendo a maior quantidade de SPG (30%) demonstraram uma perda de massa acelerada após a incubação e os valores de pH para todos os grupos foram estáveis (variando de 7,2 a 7,6). Ainda, a avaliação do MEV demonstrou que todos os *scaffolds* eram homogêneos e as análises de FTIR demonstraram seus picos característicos. Curiosamente, a viabilidade celular de HA/SPG 70/30, para ambas as linhagens, apresentou resultados positivos em comparação com os outros grupos de biomateriais (HA e HA/SPG 90/10), evidenciando que a introdução de SPG melhora o desempenho biológico da HA.

A avaliação da perda de massa mostrou uma diminuição significativa observada nas formulações HA/SPG 70/30 e HA/SPG 90/10 durante os períodos experimentais. Por outro lado, o peso dos *scaffolds* HA permaneceu constante, quando comparado ao peso de HA/SPG 70/30. Sabe-se que a taxa de dissolução da HA é baixa, o que pode ser uma desvantagem do uso deste material como enxerto ósseo (Oryan et al., 2018; Lim et al., 2017). Para o crescimento ósseo, a reabsorção do material utilizado como substituto ósseo é obrigatória, pois a formação de osso recém-formado na área do defeito precisa da liberação do espaço (Qi et al., 2008; Ruhé et al., 2005; van de Watering et al., 2012). Diante disso, a introdução da SPG em HA pode ser considerada uma estratégia que permite a aceleração da degradação do material (demonstrada pela maior perda de massa), o que conseqüentemente

poderia estimular a substituição do material por osso neoformado. Tomados em conjunto, os resultados da perda de massa e do MEV mostraram a degradação mais evidente do material nos grupos contendo SPG.

Além disso, valores de pH próximos ao fisiológico podem ser observados para todos os grupos durante os períodos experimentais. Ainda, esse comportamento constitui um aspecto positivo do uso de HA e HA associado ao SPG para fins de engenharia de tecido ósseo. Um pH equilibrado e seu consequente ambiente mais homeostático, é outro fator essencial que pode influenciar o metabolismo celular e a regeneração tecidual (Lu et al., 2005; Välimäki et al., 2005). Curiosamente, a adição de SPG também não alterou os valores de pH. Magri et al. também demonstraram que não houve alterações nas análises de pH com a incorporação de colágeno em materiais à base de biovidro e os mesmos obtiveram valores próximos ao fisiológico (Magri et al., 2017).

A análise de FTIR dos materiais mostrou picos característicos para PMMA, HA e SPG. O PMMA apresentou os picos de absorção para CH₂, C-O-C e C-H (Duan et al., 2008). O HA e as amostras contendo cerâmica apresentaram os picos representativos bem conhecidos para o PO₃ (Berzina-Cimdina e Borodajenko, 2012). Além disso, foram detectados picos de NH, CH e OH em amostras contendo SPG (Zdarta et al., 2017). Evidentemente, os picos descritos respectivamente também foram observados nos compósitos HA/SPG 90/10 e HA/SPG 70/30.

Os estudos *in vitro* também demonstraram um desempenho biológico superior de HA/SPG 70/30 em comparação com HA e HA/SPG 90/10. Ambas as linhagens celulares apresentaram uma maior viabilidade celular cultivada na presença da maior porcentagem de SPG. Sabe-se que a HA é um material osteocondutor, mas sem propriedades osteoindutoras (que podem limitar seu uso clínico) (Scarano et al. 2017).

Assim, a introdução de colágeno pode desempenhar um papel importante na melhoria do desempenho biológico da HA, aumentando a mineralização óssea e o crescimento de tecidos (Scarano et al., 2017). A associação de HA e colágeno (HA/Colágeno) têm sido usados para melhorar a diferenciação dos osteoblastos (Ramírez-Rodríguez et al., 2016). Os resultados *in vitro* do presente estudo demonstraram que a SPG pode ser usada como parte orgânica de um enxerto ósseo bioinspirado, imitando melhor a composição do tecido ósseo humano (Kwak, 2013), possivelmente constituindo um enxerto ósseo com melhores propriedades biológicas.

O colágeno, que constitui o principal componente da matriz extracelular, tem sido amplamente utilizado para fins de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Silva et al., 2014). Conforme exposto acima, o colágeno marinho das esponjas foi emergindo como fonte promissora de colágeno, uma vez que é biocompatível, fácil de obter e apresenta propriedades osteogênicas (Silva et al., 2014). Nossos resultados demonstraram que a incorporação de SPG na HA foi possível e produziu uma melhora nas características físico-químicas e no desempenho biológico do enxerto, principalmente na formulação com 70/30. A proporção de 70% composta por um material inorgânico e 30 % composta por um material orgânico, mimetiza a composição do tecido ósseo, que pode ser considerado um possível substituto ósseo mais eficaz (Habibovic et al., 2006; Laurenti et al., 2014; Lu et al., 2003). Nesse contexto, os compósitos HA/SPG podem constituir uma estrutura mais apropriada para a regeneração óssea em comparação com o HA somente. Os efeitos observados da incorporação de SPG na HA justificam novas pesquisas usando modelos pré-clínicos para estudar o desempenho biológico *in vivo* desses materiais.

5. Conclusão

Com base em nossas investigações de amostras de HA/SPG, foi possível concluir, que os compósitos mencionados foram obtidos com sucesso, com propriedades biológicas melhoradas, especialmente a que imita a composição óssea (com 70% de HA e 30% de SPG). Conseqüentemente, esses dados destacam o potencial da introdução de SPG na HA a fim de melhorar o desempenho do enxerto para aplicações de regeneração óssea. No entanto, estudos a longo prazo devem ser realizados, para proporcionar informações adicionais sobre a degradação do material e a regeneração óssea na presença de HA/SPG.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação CAPES, Ministério da Educação do Brasil, Brasília-DF, Brasil. Prof. Dr. Márcio Reis Custódio, do Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências (IB-USP), pela assistência neste experimento.

Conformidade com os padrões éticos

Conflito de interesse: Os autores declaram não ter conflito de interesses.

Referências

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP (2012) Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 40:363–408

Berzina-Cimdina L, Borodajenko N (2012) Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy. In: Theophile.

T(eed) Infrared spectroscopy - materials science, engineering and technology. InTech. Available from: http://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science_engineeringandtechnology/research-of-calcium-phosphates-using-fourier-transformation-infrared-spectroscopy. Accessed 11 Sept 2018

- Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP (2011) Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet* 18:2115–2126
- Black CRM, Goriainov V, Gibbs D, Kanczler J, Tare RS, Oreffo ROC (2015) Bone tissue engineering. *Curr Mol Biol Rep* 3:132–140
- Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A (2015) Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 30:546–554
- Duan G, Zhang C, Li A, Yang X, Lu L, Wang X (2008) Preparation and characterization of mesoporous zirconia made by using a poly (methyl methacrylate) template. *Nanoscale Res Lett* 3:118–122
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2015) Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 11:45–54
- Exposito JY, Cluzel C, Garrone R, Lethias C (2002) Evolution of collagens. *Anat Rec* 268:302–316
- Granito RN, Custódio MR, Rennó AC (2017) Natural marine sponges for bone tissue engineering: the state of art and future perspectives. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105:1717–1727
- Green D, Howard D, Yang X, Kelly M, Oreffo RO (2003) Natural marine sponge fiber skeleton: a biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation. *Tissue Eng* 9:1159–1166
- Haach LCA (2015) *Corpos compósitos de poli(metacrilato de metila) com microfibras de biovidro e poros para reparo de defeitos ósseos*. Universidade de Sao Paulo, Sao Carlos
- Habibovic P, Sees TM, van den Doel MA et al (2006) Osteoinduction by biomaterials - physicochemical and structural influences. *J Biomed Mater Res A* 774:747–762
- Iwatsubo T, Kishi R, Miura T, Ohzono T, Yamaguchi T (2015) Formation of hydroxyapatite skeletal materials from hydrogel matrices via artificial biomineralization. *J Phys Chem B* 119:8793–8799
- Kwak HB (2013) Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. *J Exerc Rehabil* 9:338–347
- Laurenti KC, Haach LCA, ARd SJ et al (2014) Cartilage reconstruction using self-anchoring implant with functional gradient. *Mater Res* 17: 638–649
- Lim HK, Byun SH, Woo JM, Kim SM, Lee SM, Kim BJ, Kim HE, Lee JW, Kim SM, Lee JH (2017) Biocompatibility and biocorrosion of hydroxyapatite-coated magnesium plate: animal experiment. *Materials* 10:1149
- Lin Z, Solomon KL, Zhang X, Pavlos NJ, Abel T, Willers C, Dai K, Xu J, Zheng Q, Zheng M (2011) In vitro evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering. *Int J Biol Sci* 7:968–977

Lobo AO, Zanin H, Siqueira IA, Leite NC, Marciano FR, Corat EJ (2013) Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/MWCNT nanocomposites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 33:4305–4312

Lopez-Heredia MA, Sa Y, Salmon P, de Wijn JR, Wolke JG, Jansen JA (2012) Bulk properties and bioactivity assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with calcium phosphates under simulated physiological conditions. *Acta Biomater* 8:3120–3127

Lu HH, El-Amin SF, Scott KD et al (2003) Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *J Biomed Mater Res A* 64:465–474

Lu HH, Tang A, Oh SC, Spalazzi JP, Dionisio K (2005) Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. *Biomaterials* 32:6323–6334

Magri AMP, Fernandes KR, Ueno FR, Kido HW, Da Silva AC, Braga FJC, Granito RN, Gabbai-Armelin PR, Rennó ACM (2017) Osteoconductive properties of two different bioactive glass forms (powder and fiber) combined with collagen. *Appl Surf Sci* 423:557–565

Nuss KMR, von Rechenberg B (2008) Biocompatibility issues with modern implants in bone - a review for clinical orthopedics. *Open Orthop J* 2:66–78

Oryan A, Baghaban Eslaminejad M, Kamali A, Hosseini S, Sayahpour FA, Baharvand H (2018) Synergistic effect of strontium, bioactive glass and nano-hydroxyapatite promotes bone regeneration of critical-sized radial bone defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34094>

Ozel T, Bártolo PJ, Ceretti E, De Ciurana Gay J, Rodriguez CA, Da Silva JVL (2016) *Biomedical devices: design, prototyping, and manufacturing*. John Wiley & Sons, New Jersey

Pang KM, Lee JK, Seo YK, Kim SM, Kim MJ, Lee JH (2015) Biologic properties of nano-hydroxyapatite: an in vivo study of calvarial defects, ectopic bone formation and bone implantation. *Biomed Mater Eng* 25:25–38

Parizi AM, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z, Bigham-Sadegh A (2013) Effectiveness of synthetic hydroxyapatite versus Persian Gulf coral in an animal model of long bone defect reconstruction. *J Ortho Traumatol* 14:259–268

Qi X, Ye J, Wang Y (2008) Improved injectability and in vitro degradation of a calcium phosphate cement containing poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Acta Biomater* 4:1837–1845

Ramírez-Rodríguez GB, Delgado-López JM, Lafisco M, Montesi M, Sandri M, Sprio S, Tampieri A (2016) Biomimetic mineralization of recombinant collagen type I derived protein to obtain hybrid matrices for bone regeneration. *J Struct Biol* 196:138–146

- Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ (2017) Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *Biomed Mater Res A* 105:3197–3223
- Ruhé P, Hedberg E, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos A (2005) Biocompatibility and degradation of poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites. *J Biomed Mater Res A* 74:533–544
- Scarano A, Lorusso F, Staiti G, Sinjari B, Tampieri A, Mortellaro C (2017) Sinus augmentation with biomimetic nanostructured matrix: tomographic, radiological, histological and histomorphometrical results after 6 months in humans. *Front Physiol* 8:565
- Shin H, Quinten Ruhe P, Mikos AG, Jansen JA (2003) In vivo bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo(poly(ethyleneglycol) fumarate) hydrogels. *Biomaterials* 24:3201–3211
- Silva TH, Moreira-Silva J, Marques ALP, Domingues A, Bayon Y, Reis RL (2014) Marine origin collagens and its potential applications
- Ehrlich H et al (2018). Collagens of Poriferan Origin. *Marine drugs* 12:5881–5901
- Sousa THS (2009) Projeto conceitual de implante bioativo com gradiente de estrutura funcional em PMMA e HA. Análises: in vitro e in vivo. Universidade de Sao Paulo, Sao Carlos
- Swatschek D, Schatton W, Kellermann J, Müller WE, Kreuter J (2002) Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *Eur J Pharm Biopharm* 53:107–113
- Szpalski C, Barr J, Wetterau M, Saadeh PB, Warren SM (2010) Cranial bone defects: current and future strategies. *Neurosurg Focus* 29:6–8
- Välimäki V-V, Yrjans JJ, Vuorio E, Aro HT (2005) Molecular biological evaluation of adjunct treatment with BMP-2 gene transfer and bioactive glass microspheres in enhancement of new bone formation. *Tissue Eng* 11:387–394
- Van de Watering FCJ, van den Beucken JJJP, Walboomers XF, Jansen JA(2012) Calcium phosphate/poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) composite bone substitute materials: evaluation of temporal degradation and bone ingrowth in a rat critical-sized cranial defect. *Clin Oral Implants Res* 23:151–159
- Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L (2007) Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 28:3338–3348
- Wang B, Dong J, Zhou X, Lee KJ, Huang R, Zhang S, Liu Y (2009) Nucleosides from the marine sponge *Haliclona* sp. *Z Naturforsch C* 64:143–148
- Wang L, Yoon DM, Spicer PP, Henslee AM, Scott DW, Wong ME et al (2013) Characterization of porous polymethylmethacrylate space maintainers for craniofacial reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 101:813–825

Zdarta J, Norman M, Smulek W, Moszyński D, Kaczorek E, Stelling A, Ehrlich H, Jesionowski T (2017) Spongin-based scaffolds from *Hippospongia communis* demosponge as an effective support for lipase immobilization. *Catalysts* 7:147

Estudo II



“Avaliação dos efeitos biológicos *in vivo* de compósitos de hidroxiapatita e colágeno marinho no modelo experimental de defeito ósseo em tíbias de ratos”

“Evaluation of the *in vivo* biological effects of marine collagen and hydroxyapatite composite in a tibial bone defect model in rats”

Observação: Artigo submetido na revista “Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine” (anexo II) em setembro de 2019, sob autoria de: Julia. Risso Parisi, Kelly Rossetii Fernandes, Ingrid Regina Avanzi, Matheus de Almeida Cruz, Alan de França Santana, Giovanna Aparecida do Vale, Carlos Alberto Fortulan, Eliandra Sousa Trichês, Renata Neves Granito e Ana Claudia Muniz Rennó;

Resumo

Uma das estratégias mais promissoras para melhorar o desempenho biológico de enxertos ósseos é a combinação de diferentes biomateriais. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da incorporação de esponjina (SPG) extraída da esponja marinha *Aplysina fulva* em hidroxiapatita (HA) para aplicação na engenharia do tecido ósseo. A hipótese do presente estudo é que a introdução de SPG em HA apresentaria um material com melhor desempenho biológico e também proporcionaria um estímulo positivo para a formação óssea. Assim, materiais de HA e HA/SPG foram produzidos, a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para caracterizar a morfologia dos *scaffolds*. Além disso, a fim de avaliar a resposta biológica, experimentos *in vivo* foram realizados, através do modelo experimental de defeito ósseo em tíbias de ratos, nos quais os *scaffolds* foram implantados. Análises histopatológicas, histomorfométricas, imunoistoquímica e biomecânica foram realizadas 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico de implantação dos *scaffolds*, para investigar os efeitos biológicos do material na reparação óssea. A análise histopatológica demonstrou que *scaffolds* de HA/SPG apresentaram uma degradação do material mais acelerada que HA. Na análise histomorfométrica foram observados valores maiores de volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV, %) e de superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS, %), do grupo HA/SPG, quando comparado com o grupo HA. A imunomarcagem de RUNX-2 foi maior para o grupo HA/SPG e nenhuma diferença significativa foi encontrada para o imunomarcador VEGF. Adicionalmente, no ensaio biomecânico valores semelhantes para todos os grupos foram encontrados. Diante disso, estes resultados indicam o potencial de SPG para ser utilizado como um aditivo em HA visando uma melhora de seu desempenho biológico para aplicações na regeneração óssea. No entanto, estudos a longo prazo devem ser realizados, para proporcionar informações adicionais sobre a degradação do material e a regeneração óssea.

Palavras-chave: biotecnologia marinha, colágeno, esponjina, esponjas marinhas.

1. Introdução

O desenvolvimento de novos materiais que possam substituir o osso frente a um defeito ósseo, principalmente aqueles de grande dimensão e incapazes de se recuperar normalmente, caracteriza-se como um dos principais desafios da engenharia de tecidos. Os defeitos ósseos são comuns na prática clínica e podem estar relacionados à infecção, remoção de tumores e perdas ósseas extensas, também podem estar relacionados com traumas e doenças associadas, como por exemplo, a osteoporose (Sarkar et al., 2015; Guerado et al., 2017).

Os enxertos ósseos são uma das abordagens terapêuticas mais utilizadas para o tratamento de perdas ósseas, dentre eles podemos citar os autoenxertos, aloenxertos e substitutos ósseos sintéticos (Matassi et al., 2011; Smith et al., 2011). Os enxertos autólogos são considerados o padrão ouro na área na engenharia do tecido ósseo, no entanto a sua utilização está associada à necessidade adicional de cirurgias, como também altos índices de morbidade estão associadas, ainda a quantidade de osso autólogo disponível é relativamente baixa (Dimitriou et al., 2011; Mishra et al., 2016). A utilização de enxertos ósseos alogênicos está sendo evidenciada como uma alternativa promissora, porém o risco de rejeição e transmissão de doenças estão associados (Orian et al., 2014). Na tentativa de solucionar algumas destas limitações, a engenharia de tecidos desenvolve substitutos ósseos sintéticos, incluindo principalmente materiais à base de polímeros, fosfato de cálcio (CaP), hidroxiapatita (HA), e cerâmicas (Dorozhkin 2010; Campana et al., 2014; Denry et al., 2015).

Destaca-se a HA, que é comumente utilizada como enxerto ósseo sintético, devido a sua facilidade de manuseio, propriedades osteoindutoras e biocompatibilidade (Bhatt et al., 2012; Wang et al., 2017). Entretanto, apesar de seus

efeitos positivos que estimulam o metabolismo do tecido ósseo, a taxa de degradação de HA é consideravelmente lenta, evitando a sua substituição por osso neoformado e consequentemente a sua capacidade para estimular o crescimento ósseo é limitada (Wang et al., 2007; Parizi et al., 2013; Pang et al., 2015).

Dessa maneira, a associação de diferentes materiais, combinando suas propriedades tais como resistência mecânica e bioatividade, pode ser considerada na tentativa de desenvolver materiais com um melhor desempenho biológico (Pang et al., 2015; Siddiqui et al., 2018).

Neste contexto, os enxertos biomiméticos, compostos de uma porção inorgânica (HA, por exemplo) e outra porção orgânica (como o colágeno), mimetizaria a estrutura e composição do tecido ósseo, podendo constituir um tratamento otimizado para melhorar da cicatrização óssea (PEK et al., 2008; Gleeson et al., 2010; Walsh et al., 2019). Gleeson et al., (2010) e Pek et al., (2008) desenvolveram *scaffolds* biomiméticos através da incorporação de partículas de HA em colágeno e tiveram efeitos positivos no reparo ósseo.

Além disso, o colágeno marinho, extraído especialmente de esponjas (Poríferas), é considerado uma alternativa muito promissora para aplicações de engenharia de tecido ósseo (Wang et al., 2009; Silva et al., 2014; Granito et al., 2017; Parisi et al., 2019). O colágeno marinho de esponjas (também chamado esponjina (SPG)), apresenta uma composição de aminoácidos análogo ao colágeno tipo XIII dos vertebrados, também espectros de absorção infravermelhos de SPG demonstraram que a mesma é formada por proteoglicanos e glicoproteínas (Junqua et al., 1974; Green et al., 2003; Iwatsubo et al., 2015; Pozzolini et al., 2018).

Um recente estudo *in vitro* realizado pelo nosso grupo de pesquisa comparou diferentes proporções de SPG associada a HA e um efeito positivo em relação a

proliferação de osteoblastos e de fibroblastos foi observado, com destaque a concentração de 70% de HA e 30% de SPG (Parisi et al., 2019). Estudo este que formou a base para esse estudo *in vivo*, que teve como objetivo avaliar as respostas biológicas no tecido ósseo da incorporação de SPG extraída da esponja marinha *Aplysina fulva* em HA, através das análises de histopatologia, histomorfometria, imunohistoquímica e biomecânica, realizadas 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico de implantação de *scaffolds* de HA e HA/SPG, no modelo experimental de defeito ósseo em tíbias de ratos.

2. Material e métodos

2.1 Materiais

Para este estudo foi utilizado a HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), obtida a partir da precipitação de nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), fosfato de amônio de hidrogênio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) e hidróxido de amônia (NH_4OH), com uma densidade de $2,82 \text{ g/cm}^3$ (Lobo et al., 2013), fornecida pelo Instituto de Ciência e Tecnologia - TIC, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP (São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

Amostras de esponja marinha *Aplysina fulva*, coletadas nos costões de alto hidrodinamismo, na zona entremarés, na área de Praia Grande ($23^{\circ}49'23.76''\text{S}$, $45^{\circ}25'01.79''\text{W}$, São Sebastião, Brasil) foram utilizadas para a extração de SPG, utilizando o método descrito por Swatschek et al., (2002).

Resumidamente, após a coleta das amostras, as de esponjas marinhas foram lavadas e armazenadas em recipientes contendo água do mar para o transporte até o laboratório. Três etapas de lavagem em água Mili-Q foram realizadas a fim de remover os *debris celulares*. As amostras foram cortadas em pequenos pedaços e adicionadas em solução 100mM Tris-HCl buffer (pH 9,5; 10mM EDTA; 8 M Ureia; 100mM de 2-Mercaptoetanol). O pH da solução foi ajustado para 9 com solução de hidróxido de

sódio (NaOH) 0,1 M e deixado sob agitação contínua em temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, os extratos resultantes foram centrifugados (Eppendorf, São Paulo, Brasil) (5000G; 2°C; 5 min). As frações sólidas foram descartadas e ao precipitado foi adicionado uma solução de ácido acético 0,1 M até pH 4, e uma nova centrifugação do material foi realizada (18.000G; 2 ° C; 40 min). O precipitado foi suspenso em água destilada e submetido à nova centrifugação (18.000G; 2 ° C; 40 min). A SPG na forma de *pellet* foi então congelada a -20°C, liofilizada, triturada, peneirada (180 µm, densidade de 1,347 g/cm³) e armazenada em temperatura ambiente.

2.2 Preparação dos scaffolds

Para este estudo, *scaffolds* (HA (100% HA) e HA/SPG (70%HA e 30%SPG)), foram fabricados utilizando diferentes materiais, seguindo o protocolo descrito em estudo anterior (Parisi et al., 2019). Foi utilizado o *poly (methyl methacrylate)* (PMMA), com tamanho de partícula de 15 µm (VIPI Dental Products, Pirassununga, São Paulo, Brasil) para agregar os materiais. Ainda, o *carboxymethyl cellulose* (CMC), com densidade de 1,59 g/cm³, (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) foi utilizado a fim de gerar porosidade aos *scaffolds* (em torno 60% de poros) (Lopez-Heredia et al. 2012.; Haach et al., 2014; Sousa et al., 2019). Todos os materiais, em pó, foram pesados e misturados em diferentes proporções correspondentes a cada grupo (Tabela 1).

Tabela 1: Grupos experimentais e suas diferentes formulações

Grupos	PMMA (g)	MMA (g)	HA (g)	SPG (g)	CMC (g)	Água Milli-Q (g)
HA	0,236	0,472	0,564	0	0,043	0,565
HA/SPG 70/30	0,236	0,472	0,296	0,127	0,043	0,565

Logo após, foi adicionada Milli-Q e *methyl methacrylate* (MMA) apresentado 99% de pureza (VIPI Dental Products, Pirassununga, São Paulo, Brasil) a mistura foi rapidamente transferida para moldes de silicone (3 x 2 milímetros de diâmetro). Além disso, os moldes foram selados e submetidos a uma câmara de ar em pressão (0,6 MPa) por 30 minutos. Depois, foram secos a vácuo (10⁻³ Torr) por 15 minutos. Em seguida os *scaffolds* foram removidos dos moldes, embalados em envelopes (Medsteril®, São Paulo, Brasil) e esterilizados com óxido de etileno (Acecil, Campinas, Brasil).

2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A superfície dos materiais foi avaliada através do MEV (Ie0 440, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), operando com um feixe de elétrons de 10 keV. As amostras foram montadas em bases de alumínio usando fita de carbono e revestida com ouro.

2.4 Estudo *in vivo*

Os experimentos *in vivo* foram realizados de acordo com protocolo aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (2017-1952071216).

Neste trabalho foram utilizados quarenta e oito ratos machos da linhagem Wistar, com três meses de idade e com peso corporal médio de 300-350 gramas no início do experimento, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Biologia e Medicina (CEDEME). Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biociências da UNIFESP, alimentados com ração comercial e água a vontade, mantidos em regime de luz (12 horas claro e 12 horas escuro) e temperatura controlada a 22 ± 2°C.

Os animais (n:48) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos: grupo de controle (GC); grupo de hidroxiapatita (HA) e grupo hidroxiapatita e esponjina (HA/SPG). Cada grupo foi subdividido em dois sub-grupos com diferentes períodos de eutanásia pós-cirurgia (2 e 6 semanas). Todos os animais foram submetidos à cirurgia para indução de um defeito ósseo em ambas as tíbias, sendo este preenchido ou não com os *scaffolds*, de acordo com os grupos.

2.4.1 Cirurgia

As cirurgias foram realizadas de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), sob condições padrão de assepsia e anestesia geral. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg), xilasina (8 mg/kg), acepromazina (1 mg/kg) e fentanil (0,05 mg/kg) com doses de acordo com o peso corporal do animal. No pós-operatório foi aplicado uma dose única do antibiótico cefalotina (60 mg/kg), já o analgésico cloridrato de tramadol (2 mg/kg) foi aplicado de 8 em 8 horas durante os 3 primeiros dias.

Para a realização do defeito ósseo induzido nas tíbias dos ratos foi utilizada uma broca odontológica do tipo trefina, da marca WMA - Brasil, com 2 cm de comprimento, 2,5 mm de diâmetro externo, acionada por um micromotor (Beltec®, Araraquara, SP, Brasil) irrigada com soro fisiológico. Após anestesia, tricotomia e assepsia da área a ser operada, foi realizada uma incisão no terço proximal da tíbia, através da qual foi realizado o defeito ósseo. O defeito ósseo foi realizado com a trefina mantida na posição horizontal e perpendicular em relação ao eixo longitudinal do osso, de modo a penetrar a cortical medial e danificar o canal medular (sem atingir a face contralateral) criando, um orifício com 3,0 mm de diâmetro. Os *scaffolds* (HA e

HA/SPG), foram implantados no defeito criado, para o grupo controle não houve o preenchimento do orifício por *scaffold* (n = 8 por grupo experimental). Para finalizar, a pele foi suturada (Shalon[®], Alto da Boa Vista, PR, Brasil) e foi realizada a assepsia do local. Os animais foram eutanasiados por meio de overdose de anestésico 240 mg/kg de Cetamina e 24 mg/kg de Xilazina na segunda e sexta semana de pós-operatório, de acordo com cada subgrupo experimental.

2.5 Análise histopatológica e histomorfométrica

Após a eutanásia, as tíbias direitas foram dissecadas e fixadas em formalina tamponada a 10% (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 48 horas e submetidas a descalcificação em 10% de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético) (Merck, Darmstadt, Alemanha), por aproximadamente 40 dias, seguida por desidratação, por meio de uma série graduada de etanol e a incorporação em blocos de parafina. As lâminas com cortes semi-seriados de 5 µm de espessura (utilizando um micrótomo (Leica Microsystems SP 1600, Nussloch, Alemanha)) foram preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE, Merck, Darmstadt, Alemanha).

Na análise histopatológica, foi realizada uma análise qualitativa, através da descrição morfológica do tecido ósseo (região do defeito ósseo), levando em consideração os seguintes critérios: presença de tecido de granulação, osso neoformado e a presença de material. A análise foi realizada por dois observadores de modo cego (JRP e MAC).

Para a análise de histomorfometria, as lâminas foram quantitativamente analisadas utilizando um microscópio de luz (Labophot 2^a, Nikon), acoplado à uma placa digitalizadora e programa semi-automático Osteomeasure[®] (Osteometrics, Atlanta, GA, EUA). Inicialmente, foi realizado o contorno de toda a extensão do defeito

ósseo em um aumento de 100x. Ainda, dentro da área do defeito, as áreas de tecido ósseo neoformado foram contornadas e o programa calculou os seguintes parâmetros, padronizados por Parfitt et al., (1988): volume ósseo como porcentagem do volume tecidual (BV/TV, %), superfície osteoblástica como porcentagem da superfície óssea (Ob.S/BS, %) e o número de osteoclastos por área de tecido (N.Oc/T.Ar, /mm²). A área média do tecido (T.Ar) analisada foi de $9,49 \pm 3,0$ mm² e a análise foi realizada de forma cega por dois observadores experientes (JRP e GCAV).

2.6 Análise Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica, foi utilizada com o objetivo de verificar a imunomarcagem de RUNX-2 e VEGF, utilizando o método de biotina-estreptavidina-peroxidase.

As amostras foram submetidas ao processamento de inclusão em parafina histológica e cortes de 5 µm de espessura foram obtidos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e desparafinizadas, logo após foi realizado o processo de bloqueio da peroxidase endógena, utilizando o peróxido de hidrogenio em PBS (tampão fosfato-salino) durante 5 min, depois foram bloqueadas utilizando soro de cabra a 5% (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) em PBS durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 24 horas com os anticorpos primários anti-RUNX2 (código: sc-8566, Santa Cruz Biotechnology, EUA) a uma concentração de 1: 100, e monoclonais de VEGF (código: sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, EUA), também numa concentração de 1: 100. (Santa Cruz Biotechnology, USA). Após a incubação foi utilizado o anticorpo secundário conjugado com biotina (anti-IgG de coelho (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) a uma concentração de 1:200 em PBS durante 1

h. Posteriormente as lâminas foram incubadas com o complexo biotina avidina conjugado com peroxidase por 45 min, logo após, revelados em DAB (3,3 diaminobenzidina – Sigma Chemical). Por fim, as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris.

A imunomarcação de RUNX2 e VEGF foi realizada qualitativamente (presença e localização dos imunomarcadores) e semi-quantitativamente, usando um microscópio de luz comum (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemanha), de acordo com os escores utilizados em trabalhos prévios (Pedrosa et al., 2009; Matsumoto et al., 2012). Na análise semi-quantitativa foi mensurada a imunomarcação nos cortes por porcentagem da área do campo avaliado em: ausente (escore 1; 0%), levemente marcado (escore 2; 1% a 34%), moderadamente marcado (escore 3; 35% a 65%) e intensamente marcado (escore 4; 66% a 100%) (Pedrosa et al. 2009; Magri et al. 2015). Esta análise foi realizada por 2 avaliadores de forma cega (JRP e GCAV).

2.7 Ensaio Biomecânico

Após a ressecção cirúrgica, as tíbias esquerdas dos animais foram armazenadas em solução salina e em seguida, submetidas ao ensaio biomecânico. O teste foi realizado pela máquina de ensaio universal Instron, modelo 3342 e célula de carga com capacidade máxima de 500 N. A célula de carga foi posicionada perpendicularmente no ponto médio de cada tíbia. Uma pré-carga de 5 N foi aplicada ao eixo longitudinal do osso, no sentido ântero-posterior por uma haste cilíndrica com um rolete de 2,0 mm de diâmetro fixado na sua extremidade, com velocidade constante de 0,5 cm/min até a fratura acontecer.

Desse modo, foram calculadas as curvas de força-deformação para os diversos ensaios. A partir destes dados, foram calculadas as seguintes variáveis: tenacidade,

que é definida como a quantidade de energia necessária para causar a fratura óssea (J); resiliência que avalia a elasticidade da amostra (N/mm²) e a carga máxima, definida como a maior carga suportada pelo osso até fraturar (N) (Patrocínio-silva et al., 2016).

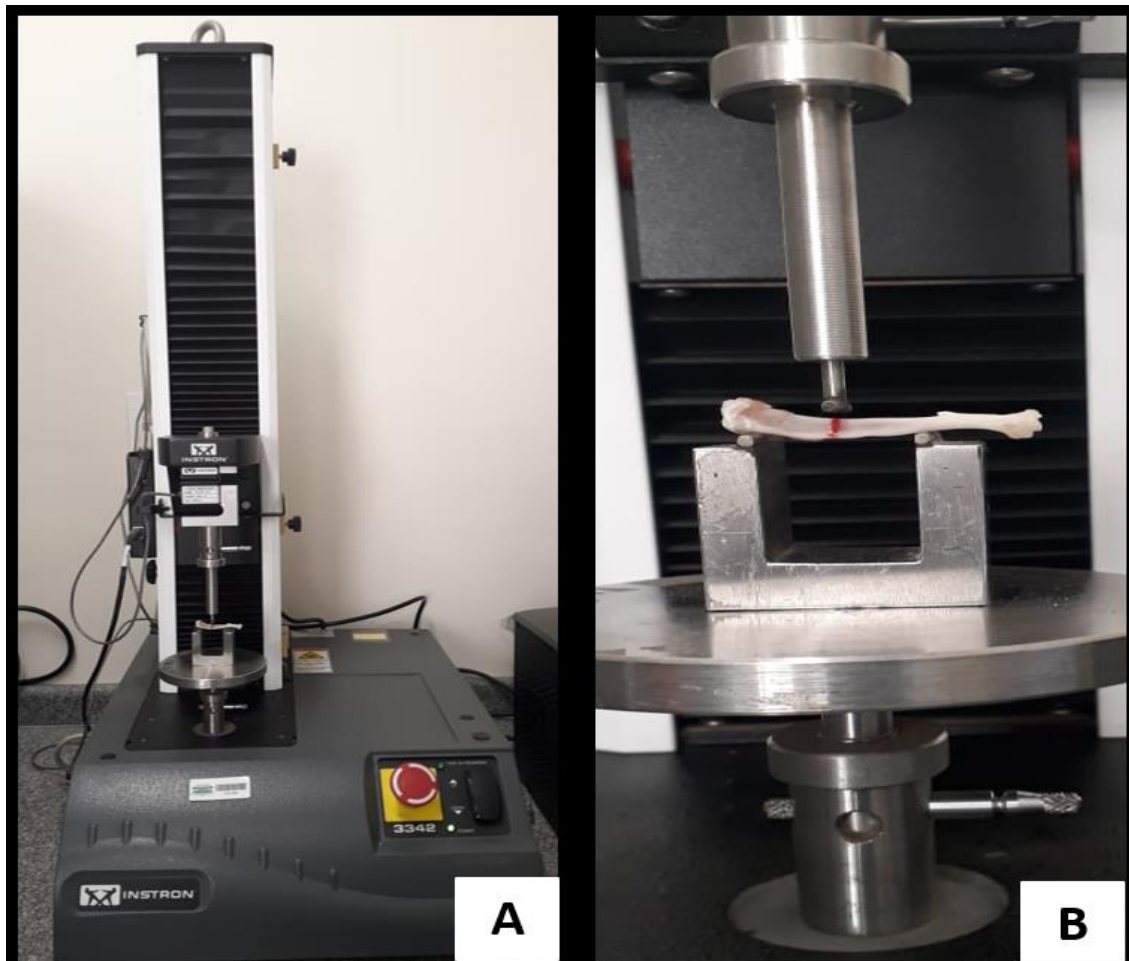


Figura 1. Teste biomecânico: (A) Instron® Universal Testing Machine, 3342 modelo utilizado no experimento; (B) Tíbia posicionada durante o teste.

2.8 Análise estatística

Os dados foram analisados e expressos em média e desvio padrão. Na análise estatística, a distribuição das variáveis foi testada utilizando o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para as variações classificadas não paramétricas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5%

($p \leq 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3. Resultados

3.1 Morfologia dos scaffolds

A Figura 2 ilustra as fotomicrografias de MEV de HA e SPG em forma de pó (2A e 2B, respectivamente) e dos *scaffolds* de HA e HA/SPG (2C e 2D, respectivamente).

É possível observar na Figura 2A os grânulos irregulares com aspecto liso da HA em pó. Além disso, a Figura 2B demonstra a morfologia das fibras de SPG. Nos *scaffolds* de HA, são observadas as partículas de e a presença de poros (Figura 2C). Nas fotomicrografias dos *scaffolds* de HA/SPG foi observada a presença de partículas de HA associadas a fibras de SPG, ainda é possível identificar a presença de poros (Figura 2D).

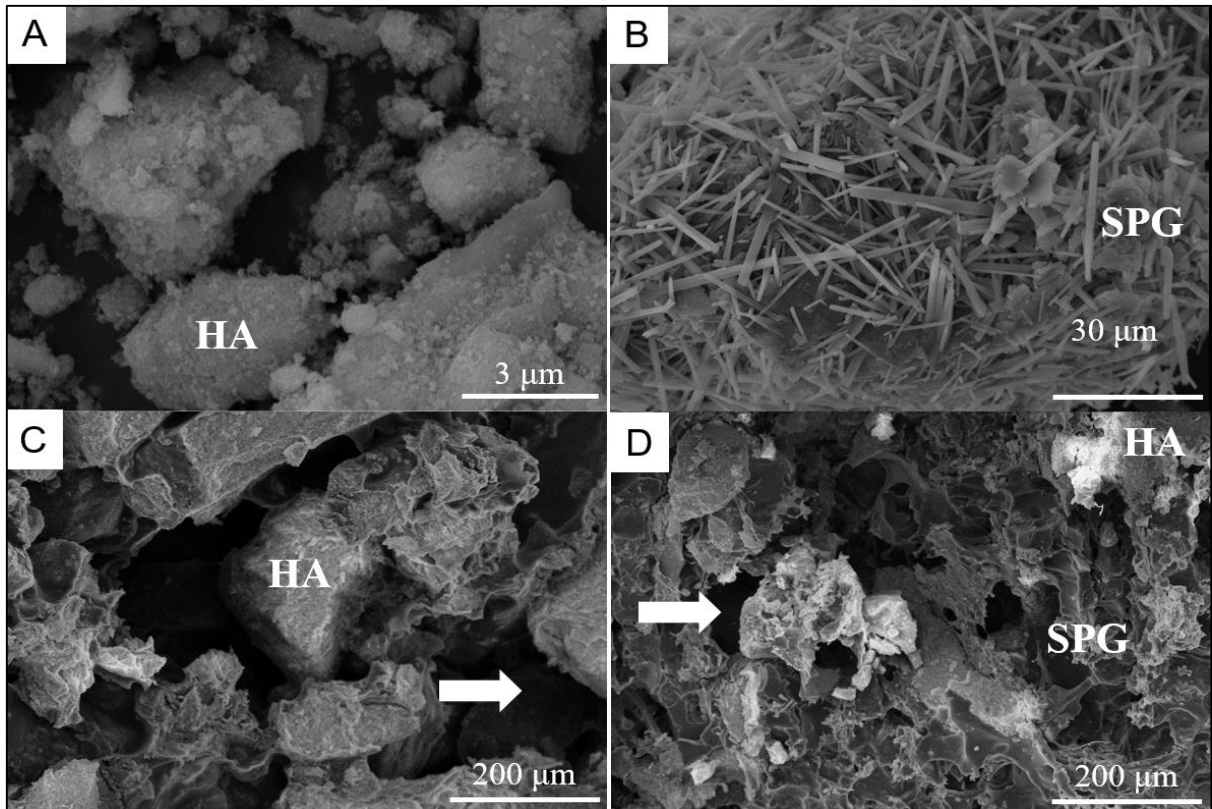


Figura 2. Fotomicroscopia de MEV dos materiais em forma de pó HA (A) e SPG (B) e dos *scaffolds* de HA (C) e HA/SPG (D). A seta (→) representa a presença de poros. Barra de escala: A = 3 μm; B = 30 μm; C e D = 200 μm.

3.2 Análise histopatológica

A figura 3 apresenta os achados histológicos para os grupos experimentais (GC, HA e HA/SPG) 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico.

Duas semanas após o procedimento cirúrgico, no GC foi possível observar a presença de tecido de granulação na região central do defeito e presença de osso neoformado nas margens do defeito (Figura 3A). Para HA, foi observada a presença de material remanescente, seguidas de áreas com tecido de granulação, algumas com áreas osso neoformado também foram encontradas, principalmente, nas bordas do defeito (Figura 3C). Para HA/SPG, na área central do defeito foi possível observar a presença de resíduo de material seguida de áreas de tecido de granulação. Ainda, uma intensa presença de osso neoformado é observado nas extremidades do defeito (Figura 3E).

A figura 3 (3B, 3D e 3F) apresenta os achados histológicos de seis semanas após o procedimento cirúrgico. Para GC em toda a região do defeito ósseo, foi possível observar a presença de tecido de granulação, como também áreas de osso neoformado, apresentando um aspecto de osso mais maduro (Figura 3B). Para HA, a degradação do material foi observada, quando comparada com a quantidade de material presente no período anterior. Nota-se também a presença de tecido de granulação na região central do defeito, já nas margens do defeito foi observada a presença de osso neoformado (Figura 3D). Para o grupo HA/SPG, grande parte do defeito foi preenchido por osso neoformado, evidenciando uma degradação do material mais intensificada, quando comparada com o período anterior. Ainda foi possível observar na região central do defeito áreas com presença de tecido de granulação (Figura 3F).

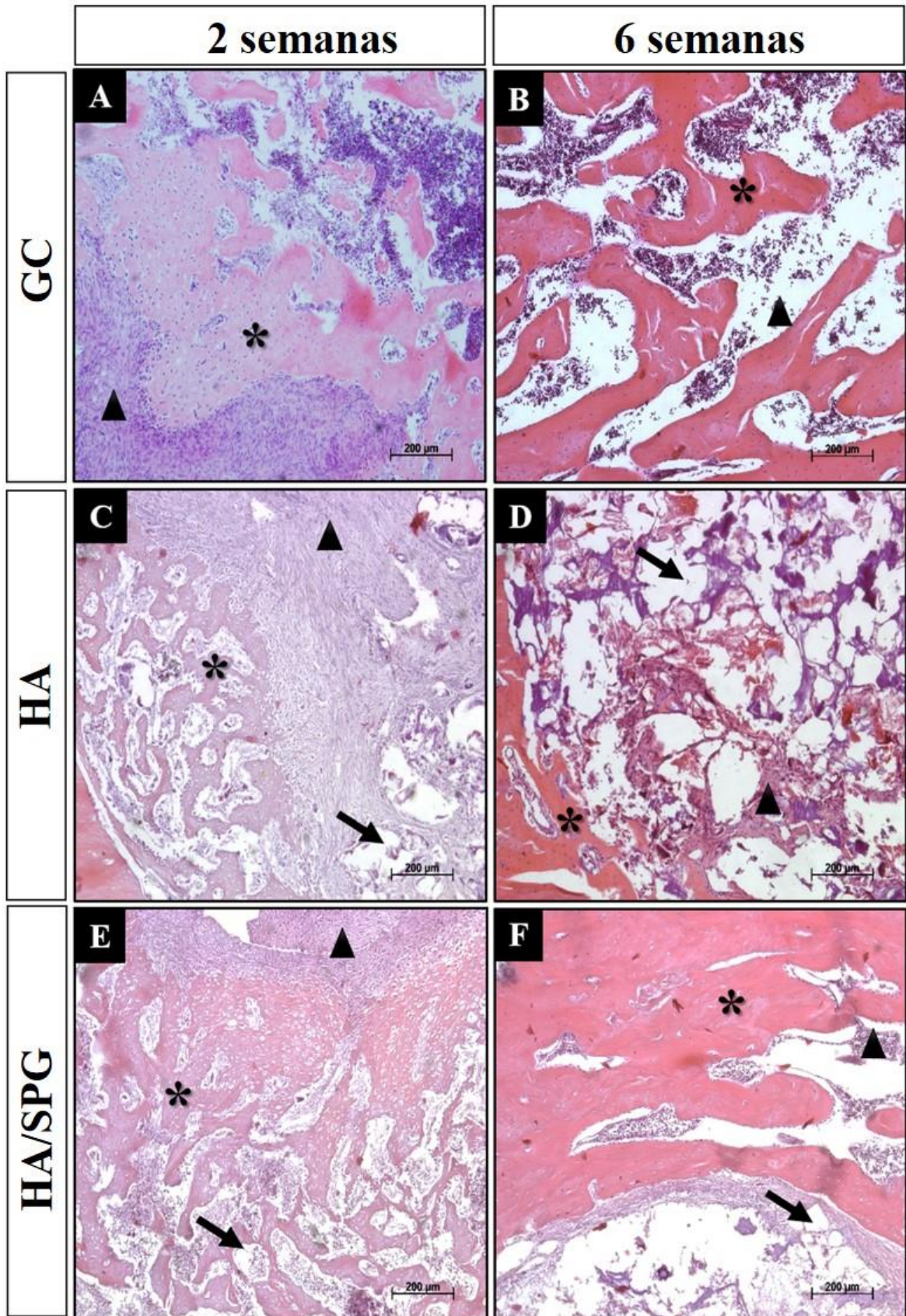


Figura 3. Cortes histológicos, GC (A, B); HA (C, D); HA/SPG (E, F), após 2 e 6 semanas, respectivamente. Osso neoformado(*), o tecido de granulação (▲), material (→). Barra representa 200μM. (mag. X 2,5). Hematoxilina e Eosina.

3.3 Análise histomorfométrica

A Figura 4 apresenta os dados da análise histomorfométrica de todos os grupos experimentais, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico.

Nos grupos CG e HA/SPG foi encontrado valores significativamente maiores em BV/TV (%) quando comparado com HA, em ambos os períodos experimentais ($p = 0,0113$, $p = 0,0487$, $p = 0,0401$ e $p = 0,0141$, respectivamente) (Figura 4A).

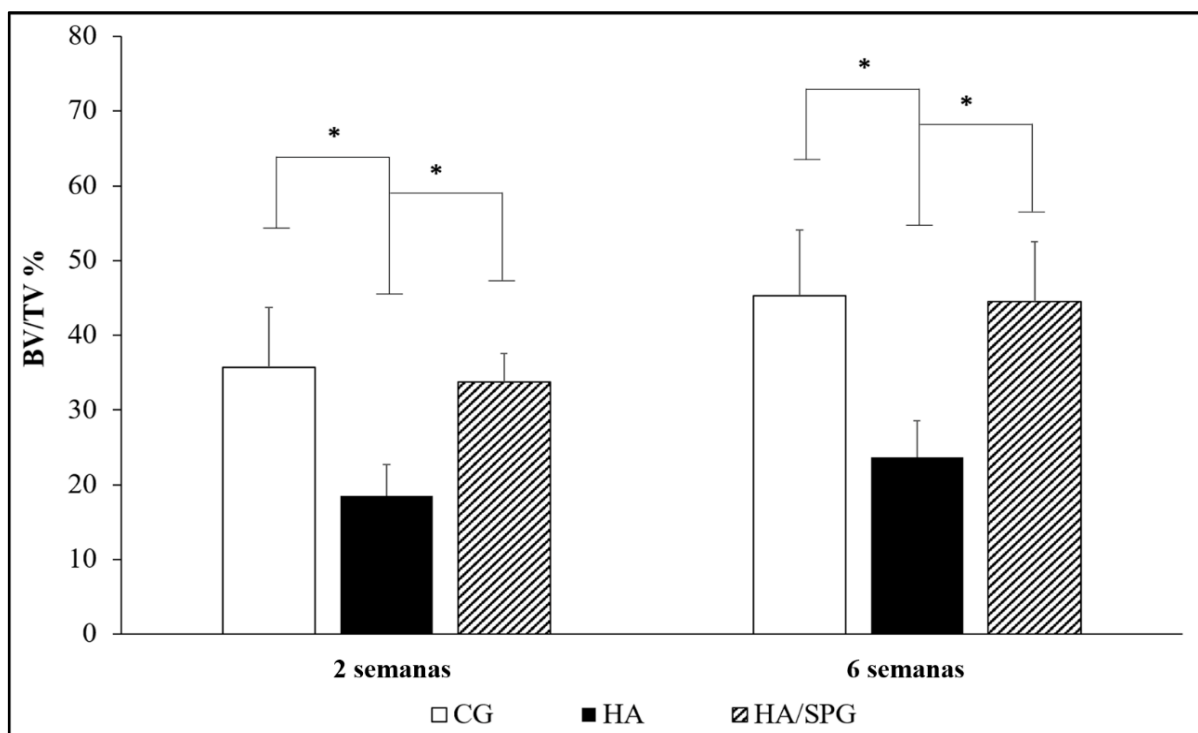


Figura 4. Média e desvio padrão de BV/TV (%) para os grupos: GC, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Teste de Dunn's. * $p < 0,05$

Para Ob.S/BS (%), um valor significativamente maior foi encontrado para o grupo HA/SPG comparado com HA ($p = 0,0085$) no primeiro período experimental (Figura 5). Ainda, após 6 semanas da cirurgia, foi possível verificar um aumento significativo de Ob.S/BS (%) para o grupo HA/SPG em comparação ao GC ($p = 0,0184$) (Figura 5). Adicionalmente, a Figura 6 demonstra que não houve diferença estatística para N.Ob/ T.Ar (mm^2) entre os grupos nos dois períodos.

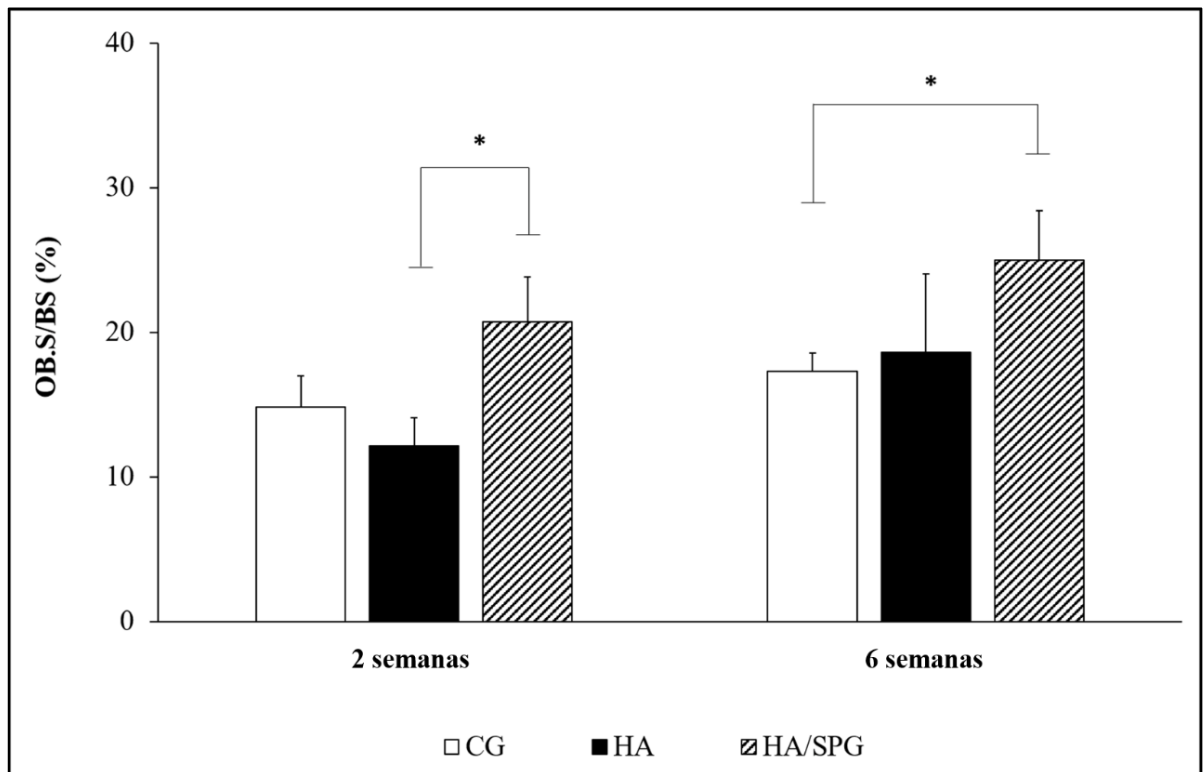


Figura 5. Média e desvio padrão de Ob.S/BS (%) para os grupos: CG, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Teste de Dunn's. * $p < 0,05$.

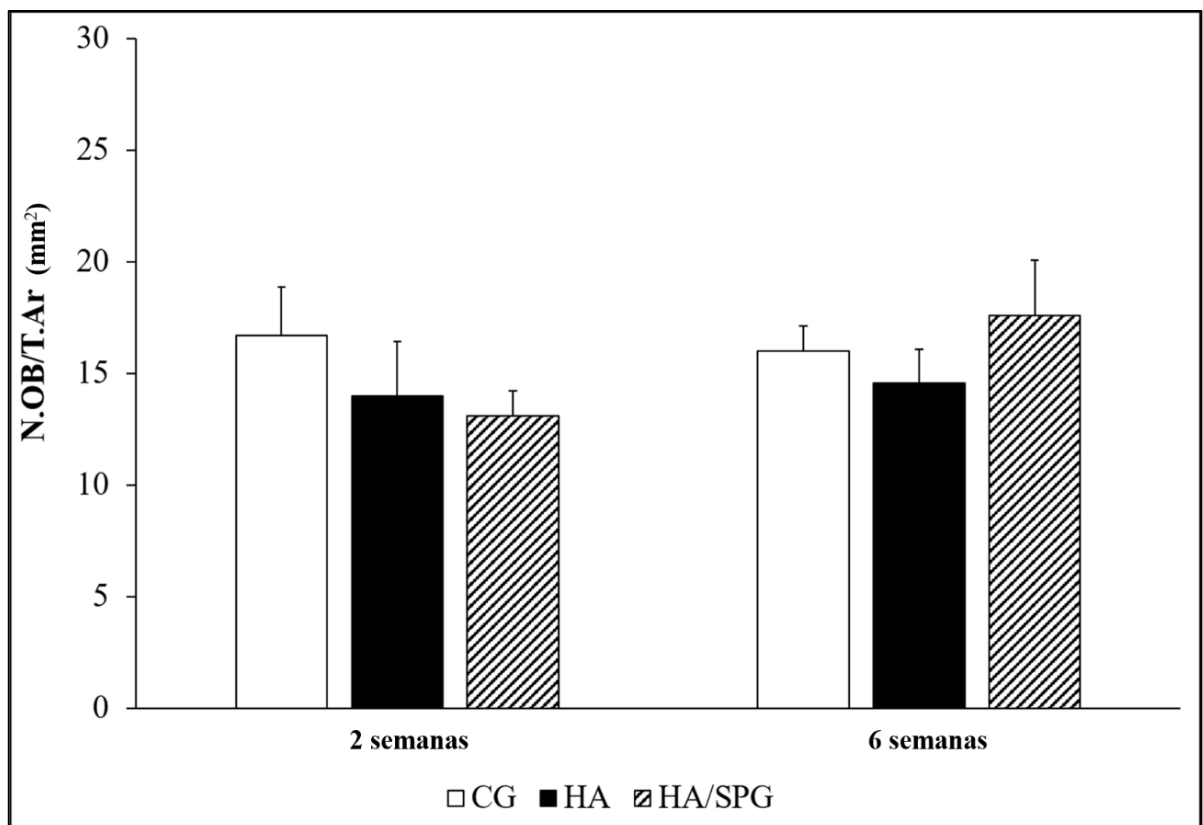


Figura 6. Média e desvio padrão de N.Ob/T.Ar (mm²) para os grupos: GC, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico.

3.4 Análise Imunoistoquímica

3.4.1 RUNX-2

A figura 7 representa a análise qualitativa de imunoistoquímica para o imunomarcador RUNX-2 de todos grupos experimentais, 2 e 6 semanas pós-cirúrgico. Foi possível observar a imunomarcação de RUNX-2 em todos os grupos experimentais em ambos os períodos analisados (7A, 7C e 7E). Ainda, todos os grupos demonstraram a imunomarcação de RUNX-2 predominantemente no tecido de granulação após 2 semanas do procedimento cirúrgico. Além disso, 6 semanas após a cirurgia, em todos grupos, foi possível observar a imunomarcação de Runx-2 no tecido de granulação e também no osso neoformado (Figura 7B, 7D e 7F).

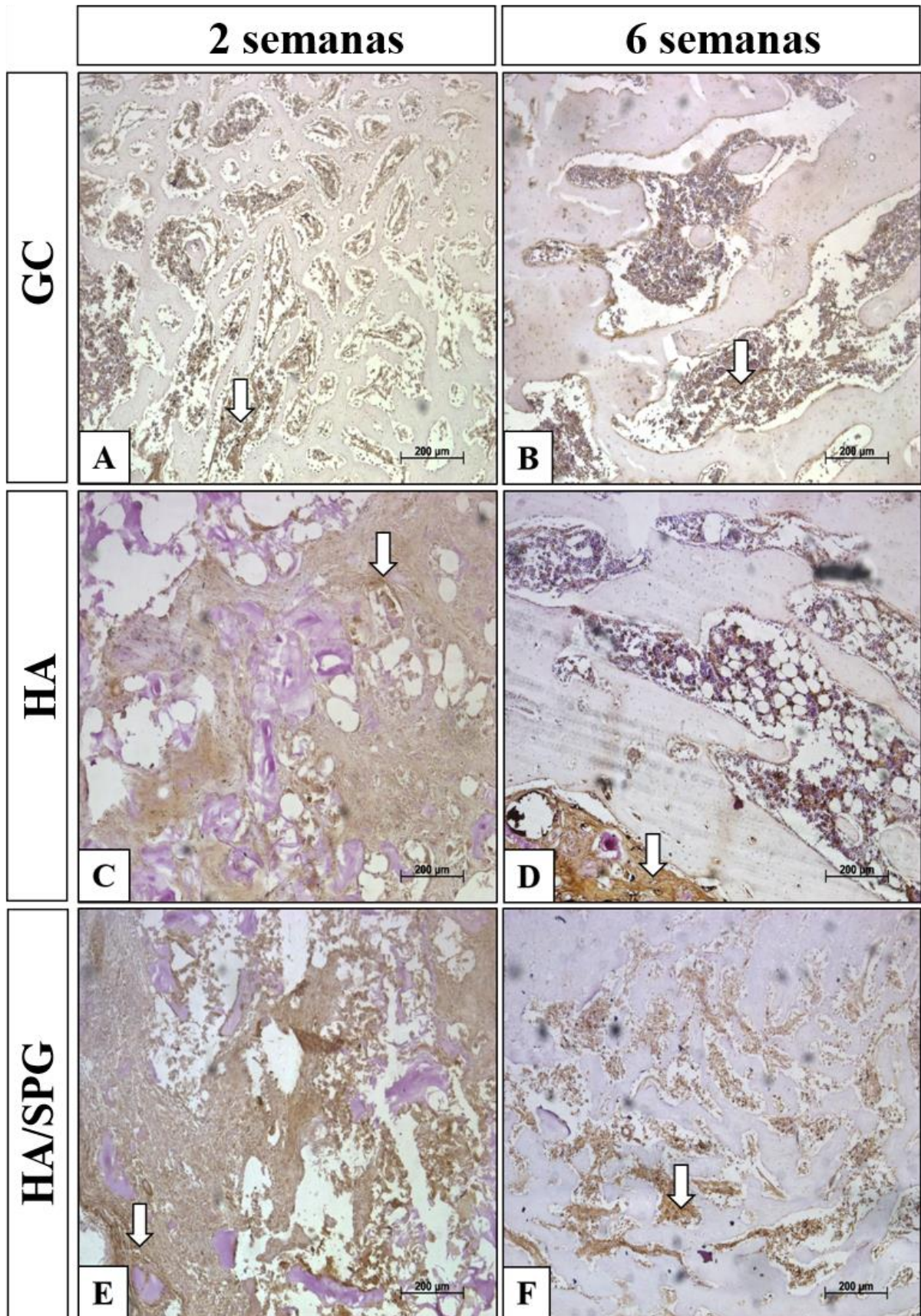


Figura 7. Fotomicrografias representativas da imunexpressão de RUNX-2 (seta branca) dos grupos: CG (A;B), HA (C;D) e HA/SPG (E;F) após 2 e 6 semanas do procedimento cirúrgico. 200 µm (mag. X10).

Os dados da análise semi-quantitativa da imunomarcação de RUNX-2, após 2 e 6 semanas da cirurgia estão apresentados na Figura 8. Foi observado em ambos os períodos analisados (2 e 6 semanas), houve uma maior imunomarcação de RUNX-2 para grupo HA/SPG em comparação com GC ($p = 0,005$).

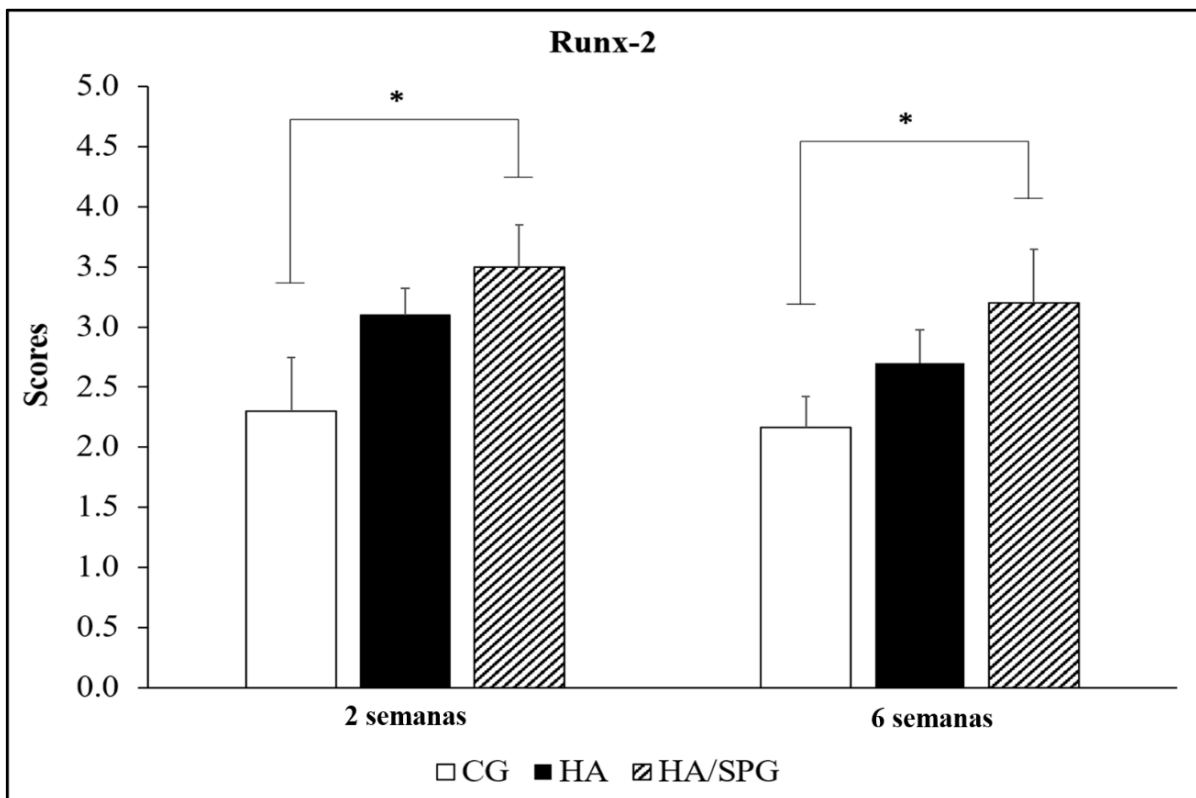


Figura 8. Média e desvio padrão dos escores da imunomarcação de RUNX-2 para os grupos: CG, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após a cirurgia. Teste de Dunn's. * $p < 0,05$.

3.4.2 VEGF

A Figura 9 representa a análise qualitativa de imunoistoquímica para o imunomarcador VEGF de todos os grupos experimentais, 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. No primeiro período experimental foi observado a imunomarcação de VEGF no tecido de granulação para todos os grupos (9A, 9C e 9E). Similarmente, após 6 semanas da cirurgia, foi possível observar que a

imunomarcacão de VEGF se manteve no tecido de granulaçã, principalmente na regiã central do defeito (Figura 9B, 9D e 9F).

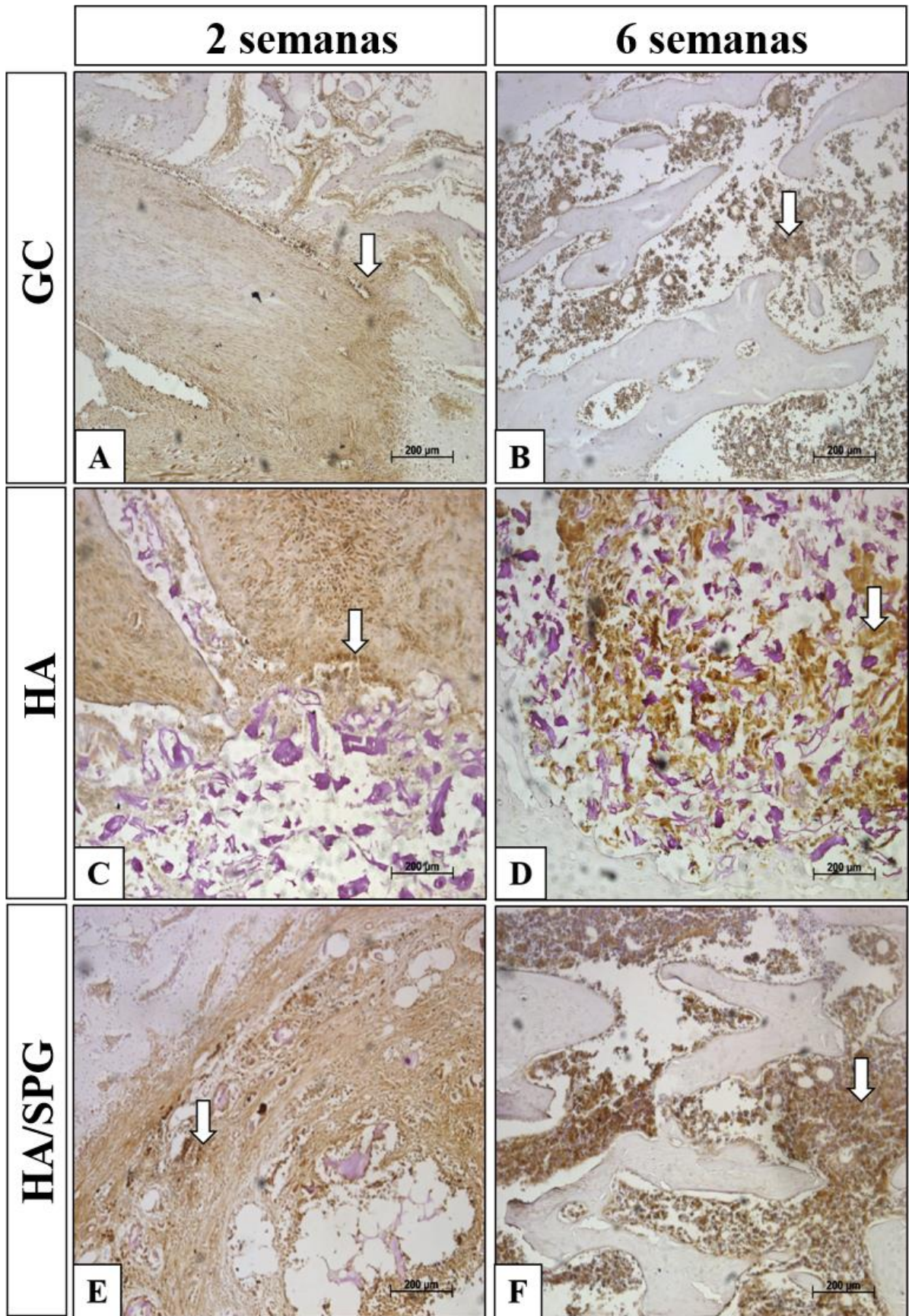


Figura 9. Fotomicrografias representativas da imunexpressão de VEGF (seta branca) para grupos: CG (A;B), HA (C;D) e HA/SPG (E;F) após 2 e 6 semanas do procedimento cirúrgico. 200 µm (mag. X10).

A Figura 10 apresenta a análise semi-quantitativa de imunohistoquímica para o imunomarcador VEGF, após duas e seis semanas da cirurgia. Não foi observada diferença significativa da imunomarcação de VEGF entre os grupos em ambos os períodos analisados

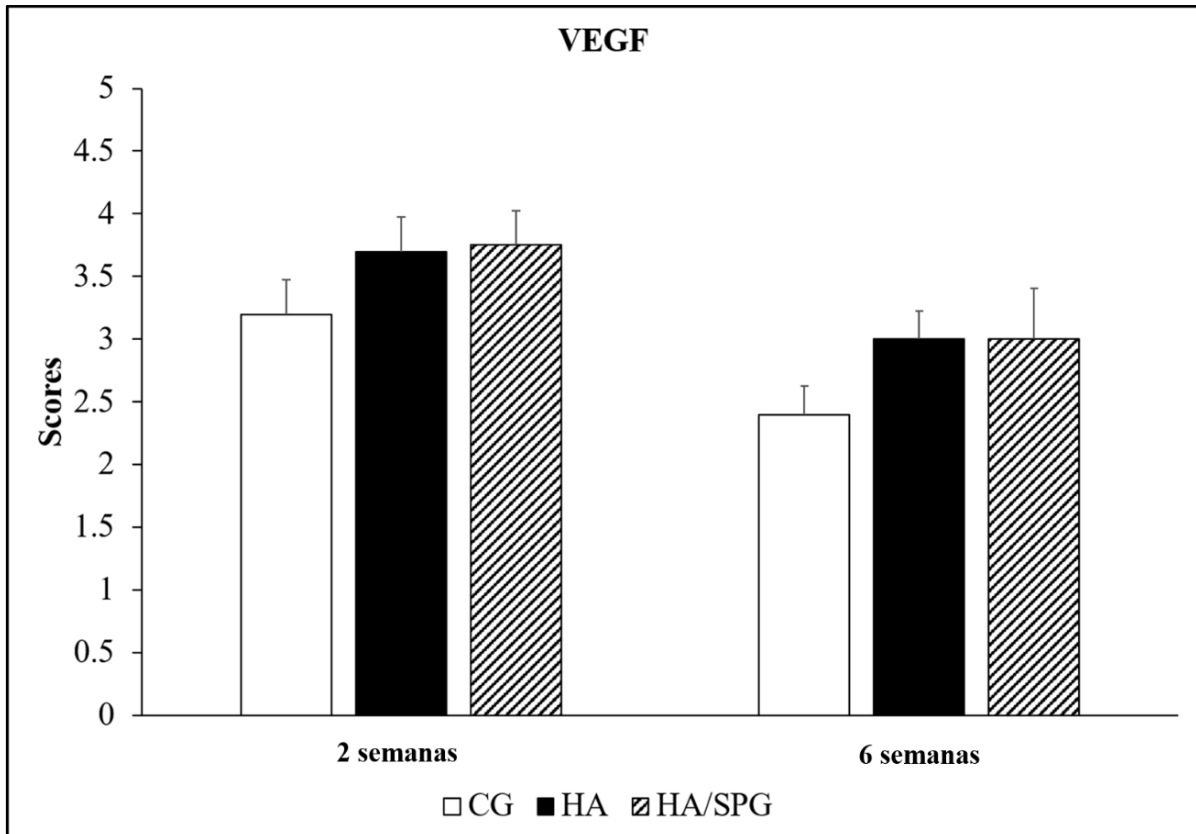


Figura 10. Média e desvio padrão dos escores da imunomarcação de VEGF para os grupos: CG, HA e HA/SPG, 2 e 6 semanas após a cirurgia. Teste de Dunn's.

3.5 Análise biomecânica

A tabela 2 refere-se aos dados de carga máxima (N), tenacidade (J) e resiliência (N/mm²) dos diferentes grupos experimentais (GC, HA, HA/SPG) 2 e 6 semanas após o procedimento cirúrgico. Não houve diferença estatística entre os grupos em ambos os períodos para as variáveis analisadas.

Table 2: Médias e desvios-padrão da carga máxima, resiliência e tenacidade nos diferentes grupos experimentais.

Grupos	2 semanas			6 semanas		
	GC	HA	HA/SPG	GC	HA	HA/SPG
Carga Máxima (N)	53,43±4,40	54,47±6,84	62,76±7,08	86,48±3,369	76,81±14,62	79,09±11,90
Resiliência (N/mm²)	0,018±0,008	0,014±0,005	0,019±0,006	0,0310±0,00	0,0236±0,006	0,0260±0,007
Tenacidade (J)	0,03±0,017	0,02±0,020	0,02±0,012	0,05±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01

4. Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos biológicos através de estudo *in vivo* da incorporação de SPG extraída da esponja marinha *Aplysina fulva* em HA para aplicação na engenharia do tecido ósseo, utilizando o modelo experimental de defeito ósseo não crítico em tíbias de ratos. A hipótese do presente estudo é que a introdução de SPG em HA melhoraria o potencial osteogênico da HA, constituindo um material com um desempenho biológico. Os principais achados histológicos demonstraram que os animais tratados com os *scaffolds* de HA/SPG apresentaram uma degradação do material mais acelerada e uma evidente neoformação óssea quando comparado com os outros grupos.

Além disso, as análises de histomorfometria apresentaram valores significativamente maiores de BV/TV (%) e N.Ob/T.Ar (mm²) para o grupo HA/SPG. Na análise de imunistoquímica, a imunomarcagem de RUNX-2 apresentou um maior valor significativo para o grupo HA/SPG quando comparado com os grupos GC e HA. Nenhuma diferença estatística foi encontrada para o imunomarcador VEGF. Também

não foram observadas diferenças estatísticas na análise biomecânica entre os grupos analisados.

Sabe-se que o colágeno possui um papel fundamental para os tecidos, já que o mesmo proporciona uma integridade estrutural ao tecido e devido à sua baixa imunogenicidade e biocompatibilidade, é considerado um excelente biomaterial para ser utilizado na medicina regenerativa como estratégia de tratamentos para a saúde humana (Pozzolini et al., 2018). Diante desse contexto, a esponja marinha é uma das maiores e mais promissoras fontes de colágeno para aplicações biomédicas (Silva et al., 2014).

No presente estudo, a análise MEV demonstra que a SPG pode ser incorporada a HA, com sucesso, formando um *scaffold* homogêneo. É importante ressaltar que a composição dos *scaffolds* foi definida a fim de mimetizar o osso, apresentando percentagens de componentes orgânicos e inorgânicos, presentes no tecido ósseo (Liu et al., 2017).

Adicionalmente, a análise histológica demonstrou a biocompatibilidade dos *scaffolds* de HA/SPG, já que não houve a presença de reações inflamatórias, corroborando com os resultados de outros trabalhos que utilizaram enxertos ósseos de HA no reparo de defeitos em ossos longos (Brandt et al., 2010) e maxilofacial (Thorwarth et al., 2005). Além disso, em relação a degradação do material, foi observado que *scaffolds* de HA/SPG apresentaram uma menor quantidade de material remanescente e uma maior quantidade de osso neoformado na região do defeito, quando comparado com os *scaffolds* compostos apenas por HA. A HA é um biomaterial comumente utilizado para a manufatura de enxertos ósseos, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteocondução (Yoshikawa et al., 2014; Cassino et al., 2018). No entanto, possui uma lenta taxa de degradação e um baixo

índice de bioatividade, que é considerada uma desvantagem para aplicações mais severas, tais como a elevação do seio maxilar (Raucci et al., 2015). Diante disso, a fim de melhorar o potencial osteogênico de HA, uma estrutura orgânica, como o colágeno foi adicionada em HA com o objetivo de aumentar a mineralização óssea e crescimento do tecido (Scarano et al., 2017).

Os efeitos positivos observados no presente estudo corroboram os da Alt et al., (2016) que demonstraram que compósitos de HA/colágeno tipo 1 produziram altos índices de densidade óssea e um maior número de trabéculas em defeitos ósseos metafisários realizados em em cabras osteoporóticas. É provável que o desempenho biológico superior de HA suplementado com colágeno é determinada pela composição biomimética de enxertos. É evidenciado que o colágeno apresenta excelentes características biológicas e propriedades físico-químicas, sendo responsável por um aumento da atividade de células ósseas e conseqüentemente, responsável pelo aumento da deposição e mineralização óssea, constituindo um material muito adequado para ser utilizado como enxerto ósseo (Lin et al., de 2018; Zhang et al., 2018).

Em relação à análise imunoistoquímica, observou-se a diferença significativa da imunomarcagem de RUNX-2 para os animais tratados com HA/SPG (em ambos períodos experimentais). É amplamente conhecido que RUNX-2 é essencial para a estimulação das células ósseas e a regulação da expressão de muitos genes de proteínas da matriz extracelular que atuam durante a diferenciação da célula óssea (Komori et al., 2017; Wei et al., 2018). Pode-se sugerir que *scaffolds* utilizados neste estudo poderia ter estimulado uma diferenciação de células pré-osteoblasticas em osteoblastos maduros, os quais, conseqüentemente, têm levado a um aumento da quantidade de osso neoformado em HA/SPG.

Também é evidente que a expressão de VEGF é um fator essencialmente necessário para uma cicatrização adequada, já que está relacionada ao estímulo de formação de vasos sanguíneos e neoangiogênese. Curiosamente, não foi observada nenhuma diferença da imunomarcagem de VEGF entre os grupos, indicando que os *scaffolds* de HA/SPG não possuem qualquer efeito extra sobre a expressão de VEGF.

De forma similar, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais para a análise biomecânica. Este fato provavelmente indica que os grupos apresentaram análoga distribuição espacial dos materiais e/ou do tecido de granulação ou do osso recentemente formado, que culminaram na mesma força óssea. Pode-se sugerir que diferenças poderiam ser observadas em períodos maiores após a implantação do material, especialmente relacionado com a maior quantidade de osso presente nos animais de HA/SPG. Estes dados corroboram os de Wei et al. (2018) que não encontrou nenhuma diferença na força biomecânica de animais tratados com HA/Colágeno, utilizando um modelo de osteotomia do fêmur de ratos.

Vale enfatizar que este estudo foi realizado em um período consideravelmente curto. Neste contexto, ainda são necessários estudos com períodos mais longos, a fim de investigar melhor o desempenho biológico dos *scaffolds* de HA/SPG. Ainda, é necessário investigar os efeitos dos presentes materiais utilizando um modelo de defeito ósseo crítico, a fim de avaliar o comportamento do material em processos de cura não espontânea. Dessa maneira, investigações adicionais são necessárias, com o intuito de validar a incorporação de SPG em HA, como material seguro e eficiente para aplicações biomédicas.

5. Conclusão

Diante dos resultados apresentados, é possível concluir que a incorporação de SPG em HA apresenta uma estratégia promissora para o tratamento de lesões ósseas

e estimulam a deposição de osso neoformado, apresentando um aumento na imunomarcação de RUNX-2. Entretanto, não foram observadas diferenças para a imunomarcação de VEGF e para as análises biomecânica entre os grupos experimentais. Tomados em conjunto, os resultados demonstraram o potencial da SPG para ser utilizado como um aditivo em HA, a fim de melhorar o desempenho biológico para regeneração óssea. No entanto, mais estudos com períodos mais longos de avaliação devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre as fases mais tardias do reparo, em relação a degradação do material e a regeneração óssea induzida pelos *scaffolds*. Além disso, seria interessante avaliar o desempenho biológico de HA/SPG em situações patológicas, como, por exemplo, osteoporose.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES e ao Prof. Dr. Márcio Reis Custódio de Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências (IB-USP) pela assistência com os experimentos.

Referências

Alt V, Cheung WH, Chow SK, Thormann U, Cheung EN, Lips KS, Schnettler R, Leung KS. Bone formation and degradation behavior of nanocrystalline hydroxyapatite with or without collagen-type 1 in osteoporotic bone defects - an experimental study in osteoporotic goats. *Injury* 2016; 47(2): 58-65

Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clinics* 2012; 28: 457-468.

Brandt J, Henning S, Michler G, Hein W, Bernstein A, Schulz M. Nanocrystalline hydroxyapatite for bone repair: an animal study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2010; 21: 283-94.

Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of materials science. Materials in medicine* 2014; 25(10): 2445-61.

Cassino PC, Rosseti LS, Ayala OI, Martines MA, Portugal LC, Oliveira CG, Silva IS, Ruy de Araujo. Potencial of different hydroxyapatites as biomaterials in the bone remodeling. *Acta Cirurgica Brasileira* 2018; 33(9): 816-823.

Denry I, Kuhn LT. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials* 2015; 32(1): 43-53.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury* 2011; 42(2): 3-15.

Dorozhkin SV. Bioceramics of calcium thophosphates. *Biomaterials* 2010; 31(7): 1465-1485.

Exposito JY, Cluzel C, Garrone R, Lethias C. Evolution of collagens. *Anat Rec.* 2002;268:302–16

Fernandes KR, Magri AMP, Kido HW, Ueno F, Assis L, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, Martins VC, Plepis AM, Renno ACM. Characterization and biological evaluation of the introduction of PLGA into biosilicate®. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2016; 05(5): 1063-1074.

Gabbai-Armelin PR, Souza MT, Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Magri AM, Fernandes KR, Pastor FA, Zanotto, ED, Parizotto, NA, Peitl O, Renno AC. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2015; 26: 26.

Gleeson JP, Plunkett NA, O'Brien FJ. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffolds for bone tissue regeneration. *Eur Cell Mater.* 2010; 20: 218-30.

Granito RN, Custódio MR, Rennó AC. Natural marine sponges for bone tissue engineering: the state of art and future perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials* 2017; 105: 1717-1727.

Green D, Howard D, Yang X, Kelly M, Oreffo RO. Natural marine sponge fiber skeleton: a biomimetic scaffold for human osteoprogenitor cell attachment, growth, and differentiation. *Tissue Engineering* 2003; 9: 1159-1166.

Guerado E, Caso E. Challenges of bone tissue engineering in orthopaedic patients. *World journal of orthopedics* 2017; 8(2): 87-98. doi:10.5312/wjo.v8.i2.87

Haach LCA, Purquerio, BM, Silva Jr NF, Gaspar AM, Fortulan CA. Comparison of Two Composites Developed to be Used as Bone Replacement – PMMA/Bioglass 45S5® Microfiber and PMMA/ Hydroxyapatite. *Bioceramics Development and Applications* 2014; 4: 071. doi: 10.4172/2090-5025.1000071

Iwatsubo T, Kishi R, Miura T, Ohzono T, Yamaguchi T. Formation of hydroxyapatite skeletal materials from hydrogel matrices via artificial biomineralization. *Journal of Physical Chemistry B* 2015; 119: 8793-8799.

Junqua S, Robert L, Garrone R, Pavans de Ceccatty M, Vacelet J. Biochemical and morphological studies on collagens of horny sponges. Ircinia filaments compared to spongines. *Connect. Tissue Res.* 1974;2:193–203.

Komori T. Roles of Runx2 in Skeletal Development. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2017; 962: 83-93.

Lin K, Zhang D, Macedo MH, Cui W, Sarmiento B, Shen G. Advanced Collagen- Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine 2018; 1-16. DOI: 10.1002/adfm.201804943

Lin Z, Solomon KL, Zhang X, Pavlos NJ, Abel T, Willers C, Dai K, Xu J, Zheng Q, Heng M. In vitro evaluation of natural marine sponge collagen as a scaffold for bone tissue engineering. *International journal of biological sciences* 2011; 7(7): 968-77.

Liu WC, Chen S, Zheng L, Qin L. Angiogenesis Assays for the Evaluation of Angiogenic Properties of Orthopaedic Biomaterials - A General Review. *Advanced Healthcare Materials* 2017; 6(5).

Lobo AO, Zanin H, Siqueira IA, Leite NC, Marciano FR, Corat EJ. Effect of ultrasound irradiation on the production of nHAp/ MWCNT nanocomposites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2013;33(7):4305-12.

Lopez-Heredia MA, Sa Y, Salmon P, de Wijn JR, Wolke JG, Jansen, J. A. Bulk properties and bioactivity assessment of porous polymethylmethacrylate cement loaded with calcium phosphates under simulated physiological conditions. *Acta Biomaterialia* 2012; 8: 3120-3127.

Magri AM, Fernandes KR, Assis L, Mendes NA, da Silva Santos AL, de Oliveira Dantas E, Rennó AC. Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers in Medical Science* 2015; 30(7): 1949-57.

Matassi F, Nistri L, Chicon Paez D, Innocenti M. New biomaterials for bone regeneration. Clinical cases in mineral and bone metabolism: the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases 2011; 8(1): 21- 4.

Magri, A. M., K. R. Fernandes, L. Assis, N. A. MENdes, A. L. DA SILVA SANTOS, E. DE OLIVEIRA DANTAS e A. C. Renno. Photobiomodulation and bone healing in diabetic rats: evaluation of bone response using a tibial defect experimental model. *Lasers Med Sci*, v.30, p.1949-57. 2015.

Mishra R, Bishop T, Valerio IL, Fisher JP, Dean D. The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regenerative medicine* 2016. 11(6), 571-87.

Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of orthopaedic surgery and research* 2014; 9(1): 18. doi:10.1186/1749-799X-9-18.

Pang KM, Lee JK, Seo YK, Kim SM, Kim MJ, Lee JH. Biologic properties of nanohydroxyapatite: an in vivo study of calvarial defects, ectopic bone formation and bone implantation. *Bio-medical materials and engineering* 2015; 25: 25-38.

Parfitt, A. M. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols and units (summary of proposed system). *Bone*, 1988

Parisi JR, Fernandes KR, Avanzi IR, Dorileo BP, Santana AF, Andrade AL, Gabbai-Armelin PR, Fortulan CA, Trichês ES, Granito RN, Renno ACM. Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongin) into Hydroxyapatite Samples: Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Marine Biotechnology* 2019, 21:30-37.

Parizi AM, Oryan A, Shafiei-Sarvestani Z, Bigham-Sadegh A. Effectiveness of synthetic hydroxyapatite versus Persian Gulf coral in an animal model of long bone defect reconstruction. *Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology* 2013, 14(4): 259-68.

Patrocínio-silva, Tatiane Lopes e colab. Low-level laser therapy associated to a resistance training protocol on bone tissue in diabetic rats. *Archives of Endocrinology and Metabolism*, v. 60, n. 5, p. 457–464, 2016.

Pek YS, Gao S, Arshad MS, Leck KJ, Ying, JY. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials* 2008; 29(32): 4300-5.

Pedros A, W. F., JR., R. Okamoto, P. E. Faria, M. F. Arnez, S. P. Xavier e L. A. Salata. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*, v.20, p.1254-64. 2009.

Pozzolini M, Scarfi S, Gallus L, Castellano, M, Vicini S, Cortese K, Gagliani MC, Bertolino M, Costa G, Giovine M. Production, Characterization and Biocompatibility Evaluation of Collagen Membranes Derived from Marine Sponge *Chondrosia reniformis* Nardo, 1847. *Marine drugs* 2018, 16(4), 111. doi:10.3390/md16040111

Raucci MG, Giugliano D, Alvarez-Perez, MA, Ambrosio L. Effects on growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by the strontium-added sol-gel hydroxyapatite gel materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2015; 26: 90.

Sarkar SK, Lee BT. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. *The Korean journal of internal medicine* 2015; 30(3): 279-93.

Scarano A, Lorusso F, Staiti G, Sinjari B, Tampieri A, Mortellaro C. Sinus Augmentation with Biomimetic Nanostructured Matrix: Tomographic, Radiological, Histological and

Histomorphometrical Results after 6 Months in Humans. *Frontiers in physiology* 2017; 8, 565. doi:10.3389/fphys.2017.00565

Shin H, Quinten Ruhe P, Mikos AG, Jansen JA. In vivo bone and soft tissue response to injectable, biodegradable oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels. *Biomaterials* 2003, 24, 3201-3211.

Siddiqui HA, Pickering KL, Mucalo MR. A Review on the Use of Hydroxyapatite-Carbonaceous Structure Composites in Bone Replacement Materials for Strengthening Purposes. *Materials (Basel, Switzerland)* 2018; 11(10): 1813.

Silva TH, Moreira-Silva J, Marques AL, Domingues A, Bayon Y, Reis RL. Marine origin collagens and its potential applications. *Marine drugs* 2014, 12(12), 5881- 901. doi:10.3390/md12125881

Smith JO, Aarvold A, Tayton, ER, Dunlop, DG, Oreffo RO. Skeletal Tissue Regeneration: Current Approaches, Challenges, and Novel Reconstructive Strategies for an Aging Population. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 2011; 17(5): 307-20.

Sousa THS, Fortulan CA, Antunes ES, Purquerio BM. Concept of a Bioactive Implant with Functional Gradient Structure. *Key Engineering Materials* 2019; 396: 221-224.

Swatschek D, Schatton W, Kellermann J, Müller WE, Kreuter J. Marine sponge collagen: isolation, characterization and effects on the skin parameters surface-pH, moisture and sebum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2002; 53: 107-113.

Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2005; 63:1626-33.

Villa MM, Wang L, Huang J, Rowe DW, Wei M. Bone tissue engineering with a collagen-hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 2014; 103(2): 243-53.

Wang B, Dong J, Zhou X, Lee KJ, Huang R, Zhang S, Liu Y. Nucleosides from the marine sponge *Haliclona* sp. *Z. Naturforsch* 2009; 64:143-148.

Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2007, 28, 3338-3348.

Wang W, Yeung K. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive materials* 2017; 2(4): 224-247.

Walsh DP, Raftery RM, Chen G, Heise A, O'Brien FJ, Cryan SA. Rapid healing of a critical-sized bone defect using a collagen-hydroxyapatite scaffold to facilitate low dose, combinatorial growth factor delivery. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019.

Wei X, Egawa S, Matsumoto R, Yasuda H, Hirai K, Yoshii T, Okawa A, Nakajima T, Sotome S. Augmentation of fracture healing by hydroxyapatite/collagen paste and bone morphogenetic protein-2 evaluated using a rat femur osteotomy model. *Journal of Orthopaedic Research* 2018; 36(1): 129-137.

Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. *Journal of Artificial Organs* 2005, 8(3), 131-6.

Zhang Z, Li Z, Zhang C, Liu J, Bai Y, Li S, Zhang C. Biomimetic intrafibrillar mineralized collagen promotes bone regeneration via activation of the Wnt signaling pathway. *Int J Nanomedicine* 2018;13:7503–7516.

Considerações Finais e Conclusão

Baseado nos resultados dos dois estudos expostos na presente tese foi possível concluir que:

- A introdução da SPG em HA constituiu uma estratégia potencial para aplicações de regeneração óssea, permitindo a aceleração da degradação do material, demonstrada pela maior perda de massa. Destaca-se os *scaffolds* de proporção 70/30, que apresentaram elevada perda de massa.
- Valores de pH próximos ao fisiológico foram encontrados para todos os grupos durante os períodos experimentais, fato esse que constitui um aspecto positivo do uso de HA e HA associado a SPG para fins de engenharia de tecido ósseo, uma vez que o pH equilibrado é um fator essencial que pode influenciar o metabolismo celular e a regeneração tecidual;
- Os *scaffolds* HA/SPG 70/30 foram capazes de aumentar a viabilidade osteoblastos e fibroblastos em cultura de células;
- Os *scaffolds* HA/SPG se mostraram biocompatíveis e com uma adequada taxa de degradação, permitindo a substituição do mesmo, por tecido ósseo neoformado *in vivo*. Além disso, as análises histopatológicas e histomorfométricas revelaram que o grupo HA/SPG apresentou uma resposta biológica superior com uma degradação do material, acompanhada da presença de tecido ósseo neoformado na área do defeito, além do mesmo grupo apresentar um aumento da imunomarcagem de RUNX-2.

Estes resultados indicam que *scaffolds* de HA/SPG 70/30, é considerado um material promissor para o desenvolvimento de novas terapias relacionadas para o tratamento de fraturas ósseas.

Perpescitivas Futuras

Como perspectivas futuras, estudos com períodos mais longos de avaliação devem ser realizados para fornecer informações adicionais sobre as fases mais tardias do reparo, em relação a degradação do material e a regeneração óssea induzida pelos *scaffolds*. Ainda, são necessários estudos para avaliar os *scaffolds* formados de HA e SPG em modelos de defeito ósseo crítico (calota craniana de ratos), que não possuem a capacidade de se reparar espontaneamente. Além disso, estudos que avaliam o desempenho biológico de HA/SPG em situações patológicas, como, por exemplo, osteoporose, também são necessários.

Todas as informações, em conjunto, fornecerão suporte para o uso inovador e promissor da introdução de SPG em HA, proporcionando a formação de um material biomimético para ser utilizado na engenharia do tecido ósseo, otimizando o reparo tecidual.

Anexos

ANEXO 1

Artigo publicado na revista “Marine Biotechnology”

Marine Biotechnology
<https://doi.org/10.1007/s10126-018-9855-z>

ORIGINAL ARTICLE



Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongin) into Hydroxyapatite Samples: Characterization and In Vitro Biological Evaluation

J. R. Parisi¹ · K. R. Fernandes¹ · I. R. Avanzi² · B. P. Dorileo² · A. F. Santana² · A. L. Andrade¹ · P. R. Gabbai-Armelin² · C. A. Fortulan³ · E. S. Trichês⁴ · R. N. Granito² · A. C. M. Renno²

Received: 6 April 2018 / Accepted: 30 August 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Biomaterial-based bone grafts have an important role in the field of bone tissue engineering. One of the most promising classes of biomaterials is collagen, including the ones from marine biodiversity (in general, called spongin (SPG)). Also, hydroxyapatite (HA) has an important role in stimulating bone metabolism. Therefore, this work investigated the association of HA and SPG composites in order to evaluate their physico-chemical and morphological characteristics and their in vitro biological performance. For this, pre-set composite disks were evaluated by means of mass loss after incubation, pH, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), and “in vitro” cell viability. pH measurements showed no statistical difference between groups. Moreover, a higher mass loss was observed for HA/SPG70/30 compared to the other groups for all experimental periods. Moreover, SEM representative micrographs showed the degradation of the samples with and without immersion. FTIR analysis demonstrated the absorption peaks for poly(methyl methacrylate) (PMMA), HA, and SPG. A higher L292 cell viability for control and PMMA was observed compared to HA and HA/SPG 90/10. Also, HA/SPG 70/30 showed higher cell viability compared to HA and HA/SPG 90/10 on days 3 and 7 days of culture. Furthermore, HA showed a significant lower MC3T3 cell viability compared to control and HA/SPG 70/30 on day 3 and no significant difference was observed between the composites in the last experimental period. Based on our investigations, it can be concluded that the mentioned composites were successfully obtained, presenting improved biological properties, especially the one mimicking the composition of bone (with 70% of HA and 30% of SPG). Consequently, these data highlight the potential of the introduction of SPG into HA to improve the performance of the graft for bone regeneration applications. Further long-term studies should be carried out to provide additional information concerning the late stages of material degradation and bone healing in the presence of HA/SPG.

Keywords Collagen · Marine biotechnology · Marine biomaterials · Tissue engineering · Biomedical application

ANEXO II

Artigo submetido ao Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine

Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine



Evaluation of the in vivo biological effects of a composite of marine collagen and hydroxyapatite using a tibial bone defect model in rats

Journal:	<i>Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine</i>
Manuscript ID	TERM-18-0467
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	13-Sept-2019
Complete List of Authors:	Parisi, Julia; UFSCar, Department of Physiotherapy; Fernandes, Kelly; UNIFESP, Biosciences Cruz, Matheus; UNIFESP, Biosciences Avanzi, Ingrid Regina; Federal University of São Paulo, Biosciences Santana, Alan; UNIFESP, Biosciences Do Vale, Giovanna; UNIFESP, Biosciences Fortulan, Carlos; Universidade Cidade de Sao Paulo Trichês, Eliandra; Federal University of São Paulo, Biosciences Granito, Renata; Federal University of São Paulo, Biosciences Renno, Ana; Federal University of Sao Paulo,
Keywords:	tissue engineering, biomedical application, marine biotechnology, biomaterials, hydroxyapatite, bone tissue engineering

SCHOLARONE™
Manuscripts

Anexo III

Aprovação da comissão de ética no uso de animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "BIOCOMPATIBILIDADE E PERFORMANCE BIOLÓGICA DO COMPÓSITO DE ESPONGINA EXTRAÍDO DE ESPONJAS MARINHAS E HIDROXIAPATITA COMO SUBSTITUTOS NA ENGENHARIA DO TECIDO ÓSSEO", protocolada sob o CEUA nº 1952071216 (00 005656), sob a responsabilidade de **Julia Risso Parisi** e equipe; Ana Cláudia Muniz Rennó - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Paulo (CEUA/UNIFESP) na reunião de 18/05/2017.

We certify that the proposal "BIOCOMPATIBILITY AND BIOLOGICAL PERFORMANCE OF ESPONGINA EXTRACTED FROM MARINE SPONGES AND HYDROXYAPATITE COMPOSITE AS SUBSTITUTE ON BONE TISSUE ENGINEERING", utilizing 80 Isogenic rats (80 males), protocol number CEUA 1952071216 (00 005656), under the responsibility of **Julia Risso Parisi** and team; Ana Cláudia Muniz Rennó - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sao Paulo (CEUA/UNIFESP) in the meeting of 05/18/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **01/2019** Área: **Biociências**

Origem: **Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia - CEDEME**

Espécie: **Ratos isogênicos** sexo: **Machos** idade: **3 a 3 meses**

Linhagem: **Wistar** Peso: **300 a 350 g**

Local do experimento: **Laboratório de biomateriais e biotecnologia. UNIFESP, baixada Santista**

São Paulo, 23 de janeiro de 2019

Profa. Dra. Monica Levy Andersen
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo

Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Paulo