

ANDERSON CUNHA DOS SANTOS

**ESTUDO POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA
E HISTOMORFOMETRIA DO REPARO ÓSSEO COM O USO
DO COMPÓSITO DE HIDROXIAPATITA COM ALGINATO E
GELATINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa

Co-orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Salvador
2019

Ficha catalográfica: Keite Birne de Lira CRB-5/1953

Santos, Anderson Cunha dos

Estudo por microtomografia computadorizada e histomorfometria do reparo ósseo com o uso do compósito de hidroxiapatita com alginato e gelatina ./ [Manuscrito]. Anderson Cunha dos Santos. - Salvador, 2019. 56f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Co-orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Salvador, 2019.

1. Biomateriais. 2. Alginato. 3. Gelatina. 4. Microtomografia por Raio X. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Cirelli, Joni Augusto. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciência da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. IV. Título

CDD – 617.471 21. ed.

ANDERSON CUNHA DOS SANTOS

Estudo por Microtomografia Computadorizada e Histomorfometria do Reparo Ósseo com o Uso do Compósito de Hidroxiapatita com Alginato e Gelatina

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em, _____.

Banca Examinadora

Mady Crusoé de Souza _____

Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas pela Universidade Federal da Bahia.
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Luciana Soares de Andrade Freitas Oliveira _____

Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas pela Universidade Federal da Bahia.
Instituto Federal da Bahia - IFBA.

Fúlvio Borges Miguel _____

Doutor em Patologia Humana, Área de Concentração Patologia Experimental, Universidade Federal da Bahia/Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (Fiocruz, Bahia).
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB.

Isabela Cerqueira Barreto _____

Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas pela Universidade Federal da Bahia.
Universidade Federal da Bahia - UFBA.

Eliana dos Santos Câmara Pereira _____

Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas pela Universidade Federal da Bahia.
Universidade Federal da Bahia - UFBA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DO DOUTORANDO
ANDERSON CUNHA DOS SANTOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro de dois mil e dezenove, às 14h reuniu-se em sessão Pública a Comissão Examinadora constituída pelos Professores, **Isabela Cerqueira Barreto**, **Luciana Soares Freitas Oliveira**, **Mady Crusoé de Souza**, **Eliana dos Santos Câmara Pereira** e **Fúlvio Borges Miguel**, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública** da Tese intitulada, **Estudo por Microtomografia Computadorizada e Histomorfometria do Reparo Ósseo, com uso do Compósito de Hidroxiapatita com Alginato e Gelatina**, sob a orientação da Profa. Dra. **Fabiana Paim Rosa**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Profa. Dra. Isabela Cerqueira Barreto Aprovado com correções
Profa. Dra. Luciana Soares Freitas Oliveira Aprovado com correções
Profa. Dra. Mady Crusoé de Souza Aprovado com correções
Profa. Dra. Eliana dos Santos Câmara Pereira Aprovado com correções
Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel Aprovado com correções

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se presente Ata que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, 27 de fevereiro de 2019.

Profa. Dra. Isabela Cerqueira Barreto Isabela C. Barreto
Profa. Dra. Luciana Soares Freitas Oliveira Luciana Oliveira
Profa. Dra. Mady Crusoé de Souza Mady Crusoé de Souza
Profa. Dra. Eliana dos Santos Câmara Pereira Eliana dos Santos Câmara Pereira
Prof. Dr. Fúlvio Borges Miguel FBM.

Ao

Divino Criador, Pai, Mãe, Filho, Todos em UM. Meus Pais, Familiares, Amigos, Professores que acreditaram em mim e me incentivam em cada passo da minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Ao Divino Criador Pai, Mãe, Filho, todos em Um.

Aos meus pais, pela oportunidade da Vida, Amor, Dedicção e por torcerem sempre pelo meu sucesso.

Aos meus familiares.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa, pela dedicação, pelos ensinamentos e confiança, pela contribuição e exemplo para minha vida acadêmica.

Aos pesquisadores do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF): Alexandre Malta Rossi e Sílvia R. Albuquerque Santos, pela produção e concessão dos biomateriais.

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela orientação na análise histológica.

Ao coorientador Prof. Joni Augusto Cirelli pela dedicação, ensinamentos e confiança.

Aos colegas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP - Araraquara): Ana Claudia, Luana Sabino, Maurício Tinajaro, Técnicos do biotério e todos que contribuíram para a construção deste trabalho.

Irmãos do TAO em Araraquara.

Aos colegas do Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais, em especial: Fúlvio, pela contribuição ao meu trabalho em sua participação nas bancas e Iorrana Ribeiro, por dividir comigo também as alegrias e dificuldades deste período, e pela parceria de sempre.

Aos meus Amigos, que me estimularam e torceram por mim neste processo. Agradeço a paciência de vocês!

À CAPES, CNPq e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigado!

Desde que chegaste ao mundo do ser,
uma escada foi posta diante de ti, para que escapasses.

Primeiro, foste mineral;
depois, te tornaste planta,
e mais tarde, animal.

Como pode isto ser segredo para ti?

Finalmente, foste feito homem,
com conhecimento, razão e fé.
Contempla teu corpo - um punhado de pó -
vê quão perfeito se tornou!

Quando tiveres cumprido tua jornada,
decerto hás de regressar como anjo;
depois disso, terás terminado de vez com a terra,
e tua estação há de ser o céu.

Jalaluddin Rumi (1996)

SANTOS, Anderson Cunha dos. *Estudo por Microtomografia Computadorizada e Histomorfometria do Reparo Ósseo com o Uso do Compósito de Hidroxiapatita com Alginato e Gelatina* 2019. 49 f. il. Tese (Doutorado em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2019.

RESUMO

Introdução: Defeitos ósseos críticos representam um problema clínico recorrente. Nestas situações, a capacidade de reparo ósseo torna-se limitada e suscetível a erros. O uso de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como opção aos enxertos, reduz os riscos de contaminação e minimiza os danos aos tecidos saudáveis. A associação de hidroxiapatita (HA) com polímeros biodegradáveis (colágeno, alginato, gelatina) é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de substitutos ósseos ideais. **Objetivos:** Contextualizar o uso de compósitos de alginato e gelatina aplicado ao reparo de tecido ósseo (artigo 1). Avaliar, por microtomografia computadorizada (μ CT) e histomorfometria, o reparo de defeito ósseo crítico, após a implantação do compósito de hidroxiapatita com alginato e gelatina (HAAIlgGel), comparando-o ao Bio-Oss[®] (artigo 2). **Materiais e Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática da literatura, buscas foram realizadas na base de dados PubMed, utilizou-se critérios de inclusão e exclusão e artigos publicados entre 2013 e 2018 no idioma inglês (artigo 1). A amostra foi composta por 24 ratos, *Wistar*, machos, adultos, distribuídos aleatoriamente para compor 3 grupos, com 08 animais em cada: **grupo HAAIlgGel** - defeito ósseo crítico preenchido com grânulos do compósito de hidroxiapatita com alginato a 1% e gelatina a 1%; **grupo Bio-Oss[®]** - defeito ósseo crítico preenchido com grânulos de BioOss[®]; **grupo Controle** - defeito ósseo crítico vazio. As amostras foram avaliadas por μ CT nos pontos biológicos: 1 dia (*base line*), 15 dias, 45 dias e 90 dias e por análise histomorfométrica aos 90 dias (artigo 2). **Resultados:** 16 foram selecionados, sendo 15 artigos originais e 1 revisão de literatura (artigo 1). A análise morfométrica por μ CT mostrou que o grupo HAAIlgGel manteve o percentual de tecido ósseo constante, ao longo do estudo; já nos grupos Bio-Oss[®] e Controle, este percentual aumentou ao longo do período avaliado. A análise histológica evidenciou neoformação óssea restrita às bordas, em todos os grupos experimentais, aos 90 dias (artigo 2). **Conclusão:** Conclui-se que a associação do compósito de alginato ou de gelatina a outros biomateriais, principalmente hidroxiapatita, pode potencializar o seu efeito no reparo ósseo (artigo 1). Os biomateriais não favoreceram a regeneração do defeito ósseo crítico. Predominou o reparo por fibrose em todos os grupos avaliados. A μ CT possibilitou o acompanhamento do reparo ósseo ao longo do estudo, sem a necessidade de sacrifício animal, em diversos pontos biológicos (artigo 2).

Palavras-chave: Biomateriais. Alginato. Gelatina. Microtomografia por Raio X.

SANTOS, Anderson Cunha dos. Study by X-ray Microtomography and Histomorphometry of Bone Repair with the Use of the Hydroxyapatite Composite with Alginate and Gelatin. 2019. 49s ill. Thesis (Doctorate in Processes Interactive of Organs and Systems) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia.

ABSTRACT

Introduction: Critical bone defects represent a recurrent clinical problem. In these situations, bone repair capacity becomes limited and susceptible to errors. The use of synthetic biomaterials in the regeneration of bone tissue, as an option to grafts, reduces the risk of contamination and minimizes damage to healthy tissues. The hydroxyapatite (HA) combination with biodegradable polymers (collagen, alginate, gelatin) is a promising strategy for the development of optimal bone replacements.

Objectives: To contextualize the use of alginate and gelatin composites applied to the repair of bone tissue (article 1). Evaluate computed microtomography (μ CT) and histomorphometry of critical bone defect repair, after the implantation of alginate and gelatin hydroxyapatite composite (HAAIlgGel), comparing it to the Bio-Oss® (article 2).

Materials and Methods: This was a systematic review of the literature, searches were carried out in the PubMed database, inclusion and exclusion criteria were used and articles published between 2013 and 2018 in the English language (article 1). The sample consisted of 24 male adult Wistar rats randomly assigned to compose 3 groups with 08 animals each: HAAIlgGel group - critical bone defect filled with granules of the hydroxyapatite composite with 1% alginate and 1% gelatin ; Bio-Oss® group - critical bone defect filled with BioOss® granules; Control group - empty critical bone defect. Samples were evaluated by μ CT at biological points: 1 day (base line), 15 days, 45 days and 90 days and histomorphometric analysis at 90 days (article 2).

Results: 16 were selected, being 15 original articles and 1 literature review (article 1). The morphometric analysis by μ CT showed that the HAAIlgGel group maintained the percentage of bone tissue constant throughout the study; already in the Bio-Oss® and Control groups, this percentage increased over the period evaluated. Histological analysis revealed border-restricted bone neoformation in all experimental groups at 90 days (article 2).

Conclusion: It is concluded that the association of the alginate or gelatin composite with other biomaterials, especially hydroxyapatite, may potentiate its effect on bone repair (article 1). The biomaterials did not favor the regeneration of the critical bone defect. Prevalence of fibrosis repair in all groups evaluated. The μ CT made it possible to follow the bone repair throughout the study, without the need for animal sacrifice, in several biological points (article 2).

Keywords: Biocompatible Materials. Composite. Alginate. Gelatin. X-ray microtomography.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO PRIMEIRO

- Figura 1** Quadro sinóptico dos estudos selecionados de acordo com as características bibliográficas 20

ARTIGO SEGUNDO

- Figura 1** Imagem microtomográfica do grupo HAAlgGel, defeito ósseo crítico na calvária enxertado com biomaterial, mesmo animal e pontos biológicos distintos 32
- Figura 2** Imagem microtomográfica do grupo Bio-Oss[®], defeito ósseo crítico na calvária enxertado com biomaterial, mesmo animal e pontos biológicos distintos 33
- Figura 3** Imagem microtomográfica do grupo controle, defeito ósseo crítico na calvária vazia, mesmo animal e pontos biológicos distintos 33
- Figura 4** Médias dos valores morfométricos obtidos por μ CT, grupos experimentais, 1 dia e 15 dias 35
- Figura 5** Médias dos valores morfométricos obtidos por μ CT, grupos experimentais, 45 dias e 90 dias 35
- Figura 6** Fotomicrografia dos grupos: HAAlgGel (8A,8C e 8E) e Bio-Oss[®] (8B,8D e 8F), 90 dias 37
- Figura 7** Fotomicrografia do grupo controle, 90 dias 38
- Figura 8** Percentuais dos parâmetros avaliados por histomorfometria em 90 dias 39

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PRIMEIRO

Tabela 1	Quantitativos dos temas e artigos encontrados	19
-----------------	---	----

ARTIGO SEGUNDO

Tabela 1	Medidas morfométricas obtidas pela μ CT para o grupo HAAIgGel	34
Tabela 2	Medidas morfométricas obtidas pela μ CT para o grupo Bio-Oss [®]	34
Tabela 3	Medidas morfométricas obtidas pela μ CT para o grupo controle	34
Tabela 4	Valores médios dos parâmetros obtidos pela histomorfometria aos 90 dias	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ CT	Microtomografia Computadorizada
μ m	Micrometro
Bo	Borda óssea
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
HA	Hidroxiapatita
HAAlgGel	Grupo experimental enxertado com compósito de hidroxiapatita, alginato (1%) e gelatina (1%)
HE	Hematoxilina-eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IFBA	Instituto Federal da Bahia
IPAC	Instituto de Patologia Geral e Cutânea
mm ²	Milímetro quadrado
mm ³	Milímetro cúbico
No	Neoformação óssea
PIFG	Picrossírius <i>Red</i>
PubMed	Literatura Internacional em Ciências da Saúde
Tc	Tecido conjuntivo
UFBA	Universidade Federal da Bahia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	ARTIGO 1 - Estudo por microtomografia computadorizada e histomorfometria do reparo ósseo com o uso do compósito de hidroxiapatita com alginato e gelatina – Revisão de literatura	17
	INTRODUÇÃO	17
	MATERIAIS E MÉTODOS	18
	RESULTADOS	19
	DISCUSSÃO	23
	CONCLUSÃO	25
3	ARTIGO 2 - Compósitos de alginato e gelatina aplicados ao reparo de tecido ósseo – Revisão de literatura	27
	INTRODUÇÃO	28
	MATERIAIS E MÉTODOS	29
	RESULTADOS	31
	DISCUSSÃO	40
	CONCLUSÃO	41
4	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO – Certificado CEUA	49

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade, fatores como o aumento da expectativa de vida, doenças degenerativas, a alta incidência de traumas ósseos em decorrência de acidentes e elevado número de intervenções cirúrgicas para reparo ósseo têm estimulado o desenvolvimento e aperfeiçoamento da bioengenharia de tecidual óssea, sobretudo com o uso de biomateriais.¹ Tal desenvolvimento proporciona melhor qualidade de vida para as vítimas de grandes perdas ósseas.

O tecido ósseo possui uma estrutura complexa e heterogênea, e seus componentes básicos são: matriz orgânica, principalmente, colágeno do tipo I e proteínas não-colagênicas; componentes inorgânicos, na forma de hidroxapatita (HA); e água. A osteogênese deste tecido envolve dois tipos básicos de célula: os osteoblastos e os osteoclastos. A ação sinérgica entre esses tipos celulares acarretam em processos de modelagem óssea, o que inclui o crescimento longitudinal, a remodelação óssea e o reparo ósseo.²

O processo de formação óssea pode acontecer de duas formas: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa ocorre com o recrutamento de células-tronco mesenquimais (CTMs) e diferenciação em osteoblastos que secretam matriz osteóide, que, posteriormente, mineraliza e transforma-se em matriz óssea. Em contrapartida, no processo de ossificação endocondral as CTMs diferenciam-se em condroblastos e formam uma cartilagem hialina como molde, que é, seguidamente, substituída por tecido ósseo.³

O tecido ósseo quando lesionado possui a capacidade inata de regeneração, exceto quando há perda tecidual significativa.⁴ Nestes casos, a cicatrização óssea ocorre com a formação de tecido fibroso e conseqüente perda de função. Em relação à extensão da perda tecidual, o reparo ósseo pode ocorrer de forma direta ou indireta. O reparo direto da lesão acontece, principalmente, quando o espaço da fratura é menor que 0,1mm, e o local da fratura é rigidamente estabilizado, contudo esse tipo de reparo ainda carece de evidências histológicas e casos clínicos.⁵

Já o reparo ósseo indireto é mais comum. Este ocorre quando as bordas da fratura possuem no mínimo duas vezes o diâmetro da lesão. Fisiopatologicamente, ocorrem múltiplos eventos, tais como: coagulação sanguínea, migração celular seguida de resposta inflamatória, formação de calo ósseo e consolidação. Neste tipo

de reparo, nota-se ossificação intramembranosa e endocondral e remodelação tecidual, ora do calo de fibrocartilagem ora do tecido ósseo neoformado.⁵

No contexto da bioengenharia tecidual óssea, o uso de estratégias regenerativas, principalmente o uso de biomateriais, torna-se uma alternativa segura para auxiliar o processo de regeneração óssea, essencialmente em perdas teciduais extensas. Isto se justifica por estes apresentarem propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas que promovem o reparo tecidual e favorecem a regeneração dos tecidos.⁶

A hidroxiapatita (HA) é um biomaterial amplamente usado nas técnicas regenerativas óssea, tanto de forma individual quanto em associação aos implantes ósseos, devido à sua alta bioatividade, biocompatibilidade, osteocondução, osseointegração e não-toxicidade.⁷ Contudo, sua aplicação clínica é limitada em consequência de sua não degradação e bioabsorção após implantação no sítio enxertado⁸, por isso, esse material, em grande parte das vezes, forma uma estrutura óssea quebradiça e de difícil remodelação por completo.^{9,10}

Diante das limitações da HA, os pesquisadores têm buscado desenvolver biomateriais do tipo compósitos que são materiais que combinam componentes inorgânicos e orgânicos, por exemplo, associação de HA com polímeros biodegradáveis (colágeno, alginato, gelatina), como estratégia promissora para o desenvolvimento de substitutos ósseos ideais.¹¹ A associação de HA com alginato forma arcabouços porosos, biotativos e biocompatíveis.¹² Compósitos de HA e gelatina apresentam propriedades mecânicas superiores aos materiais de HA puro, o que aumenta a resistência à compressão devido à ligação molecular entre os compostos de cálcio e a gelatina.¹³

Entre os biomateriais já aplicados clinicamente nas técnicas regenerativas ósseas, destaca-se o Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça), material composto de osso bovino, desproteinizado, constituído por um carbonato de apatita deficiente em cálcio, semelhante à porção inorgânica do tecido ósseo humano. O Bio-Oss® apresenta boa biocompatibilidade, baixa cristalinidade, alto teor de carbonatos, boa osteocondutividade, alta taxa de dissolução em condições ácidas¹⁴, possui resistência à compressão de 35 Mpa e sua natureza porosa (75-80% do volume total) aumenta significativamente, a área superficial, característica que favorece a angiogênese.¹⁵ Contudo não é osteogênico.⁸

No contexto da regeneração tecidual óssea, o emprego de técnicas radiográficas é fundamental na avaliação do uso de técnicas reconstrutivas devido à sua capacidade de evidenciar estruturas internas de forma não invasiva, não destrutiva e sem a necessidade de corte ou manipulação tecidual.¹⁶ No início dos anos 70, a imagem clínica foi revolucionada pela introdução da tomografia computadorizada (TC). Entretanto, este tipo de exame, quando aplicados à pesquisa em pequenos roedores, apresenta limitações pela capacidade de resolução geométrica relativamente baixa (1mm^3).¹⁷

Diante disso, foi desenvolvida a microtomografia computadorizada (μCT), tecnologia que oferece informações únicas, com alta resolução, sobre as respostas temporais de regiões ósseas específicas a estímulos patológicos ou terapêuticos.¹⁸ De forma simplificada, um equipamento de μCT é composto por uma fonte de raios-X, fase de amostra e um detector de área de configuração.¹⁶ As fontes de raios-X utilizadas em μCT são classificadas em dois tipos: gerador de raios-X de laboratório e fonte de radiação síncrotron. A aquisição de dados é realizada colocando amostras expostas aos raios-X gerados a partir dessas fontes.¹⁹

Os feixes de raios-X atravessam a amostra; a quantidade e intensidade dos feixes absorvidos por essas amostras dependerá da densidade do material (ρ), número atômico (Z) e energia do feixe (E). Os fótons absorvidos pela amostra são captados por um cintilador, que converte raios-X em luz visível e um conjunto de fotodiodos convertem a luz em corrente elétrica, que é utilizada por um computador para criar a imagem digital.²⁰

Nos estudos longitudinais *in vivo*, com roedores, a μCT é utilizada para determinar parâmetros ósseos tridimensionais²¹, tais como geometria; massa; densidade mineral; parâmetros trabeculares: espessura, número, separação e conectividade das trabéculas e grau de anisotropia; parâmetros corticais: área óssea, espessura, porosidade, perímetro endocortical; e quantificar tecido ósseo neoformado.²²

Isso posto, o objetivo deste estudo foi avaliar por μCT e histomorfometria o reparo de defeito ósseo crítico, após a implantação do compósito de hidroxiapatita com alginato e gelatina. Esta tese, em consonância com as normas do Programa de Pós-graduação, está dividida em quatro (4) capítulos: Introdução, Artigo primeiro, Artigo segundo e Conclusão. O artigo primeiro intitula-se *Compósitos de alginato e gelatina aplicado ao reparo de tecido ósseo*, e o artigo segundo *Estudo por*

Microtomografia Computadorizada e Histomorfometria do Reparo ósseo com o uso do compósito de hidroxiapatita associado com alginato e gelatina.

**2 ARTIGO PRIMEIRO: COMPÓSITOS DE
ALGINATO E GELATINA APLICADOS AO
REPARO DE TECIDO ÓSSEO – REVISÃO DE
LITERATURA**

2 ARTIGO PRIMEIRO

Compósitos de alginato e gelatina aplicados ao reparo de tecido ósseo – Revisão de literatura

*Composites of alginate and gelatin composites applied to the repair of bone tissue -
Literature review*

Anderson Cunha dos SANTOS ^a; Fabiana Paim ROSA ^a

^aInstituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil

RESUMO

Objetivo: contextualizar o uso de compósitos de alginato e gelatina aplicado ao reparo de tecido ósseo. **Materiais e Métodos:** As buscas foram realizadas na base de dados bibliográfica PubMed. Utilizou-se como critérios de inclusão artigos no modelo de ensaios clínicos, com estudos experimentais, *in vitro* ou *in vivo*, aplicados ao reparo de tecido ósseo, revisões da literatura; que abordaram experimentos em animais e artigos publicados entre 2013 e 2018 no idioma inglês. Quanto aos critérios de exclusão: artigos que não obedecessem aos critérios de inclusão, artigos pagos e duplicadas. **Resultados:** Foram localizados 1.798 artigos; lidos os títulos e resumos, foram selecionados 54 artigos. Subsequente à leitura dos textos na íntegra, encontrou-se 21 artigos e, destes, 16 foram selecionados, sendo 15 artigos originais e 1 revisão de literatura. Dentre estes, os principais temas abordados foram: compósito de alginato e hidroxiapatita (HA), compósito de gelatina e HA, compósito de alginato e biomateriais naturais, compósito de Alginato e matriz óssea desmineralizada, compósito de gelatina e quitosana, compósito de gelatina e PLCL - poli (L-ácido láctico-co- ϵ - caprolactona) e gelatina de extração ácida e básica. **Conclusão:** A associação do compósito de alginato ou de gelatina a outros biomateriais, principalmente hidroxiapatita, pode potencializar o seu efeito no reparo ósseo.

Palavras Chave: Compósito. Alginato. Gelatina. Durapatita. Reparo ósseo.

INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos de tamanho crítico podem ser causados por vários agentes, tais como: cistos ou ressecção de tumores, traumas e fraturas graves e, por isso, frequentemente necessitam de intervenção cirúrgica para promover a regeneração

óssea. Nestes casos, o transplante de enxerto ósseo, incluindo autoenxertos, aloenxertos e xenoenxertos ainda são as opções atuais.²³

O osso autógeno é considerado padrão ouro como enxerto ósseo, pois trata-se de um material osteogênico, osteoindutor, osteocondutor e biocompatível. Contudo, esse material apresenta algumas limitações clínicas tais como seu alto potencial de reabsorção e dependência de uma área doadora como um segundo sítio cirúrgico.²⁴ Neste contexto, surge a engenharia tecidual óssea com a finalidade de elaborar uma estrutura que combine as propriedades físicas e biológicas do tecido ósseo natural, sem as desvantagens impostas por enxertos ósseos autólogos ou alogênicos.²⁵

A hidroxiapatita (HA) é um biomaterial amplamente usado nas técnicas regenerativas ósseas, tanto de forma individual quanto em associação aos implantes ósseos, devido à sua alta bioatividade, biocompatibilidade, osteocondução, osseointegração e não-toxicidade.⁷ Contudo, a sua aplicação clínica é limitada em consequência do seu baixo nível de degradação e bioabsorção após sua implantação no sítio enxertado⁸, por isso, esse material, em grande parte das vezes, forma uma estrutura óssea quebradiça e de difícil remodelação óssea por completo.^{10,26}

A partir das limitações desta cerâmica, os pesquisadores têm buscado desenvolver biomateriais do tipo compósitos, materiais que combinam componentes inorgânicos e orgânicos, como, por exemplo, associação de HA com polímeros biodegradáveis (colágeno, alginato, gelatina), estratégia promissora para o desenvolvimento de substitutos ósseos ideais.¹¹ A associação de HA com alginato formam arcabouços porosos, bioativos e biocompatíveis.¹² Compósitos de HA e gelatina apresentam propriedades mecânicas superiores aos materiais de HA puro, o que aumenta a resistência à compressão devido à ligação molecular entre os compostos de cálcio e a gelatina.¹³

O objetivo deste artigo é contextualizar, através de uma revisão de literatura, o uso de compósitos de alginato e gelatina aplicado ao reparo de tecido ósseo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho consiste em uma revisão sistemática da literatura. As buscas foram realizadas na base de dados bibliográficos da Literatura Internacional em Ciências da Saúde (PubMed). Utilizou-se descritores em combinação com o operador booleano “AND” em um total de 12 associações: “composite AND alginate”, “composite AND gelatina”, “composite AND alginate AND gelatina”, “bone repair AND alginate”, “bone repair AND gelatin”, “bone repair AND alginate AND Gelatin”, “durapatite AND alginate”, “durapatite AND gelatina”, “durapatite AND alginate AND gelatin”, “bioengineering AND alginate”, “bioengineeing AND gelatin”, “bioengineering AND alginate AND gelatin”. Ao finalizar as pesquisas, as referências duplicadas foram excluídas.

Utilizou-se como critérios de inclusão artigos no modelo de ensaios clínicos, com estudos experimentais, *in vitro* ou *in vivo*, aplicados ao reparo de tecido ósseo, revisões da literatura; que abordaram experimentos em animais e artigos publicados entre 2013 e 2018 no idioma inglês. Quanto aos critérios de exclusão: artigos que não obedecessem aos critérios de inclusão, artigos pagos e duplicados.

RESULTADOS

Após aplicação dos critérios de inclusão foram localizados 1.798 artigos; lidos os títulos e resumos, foram selecionados 54 artigos. Subsequente à leitura dos textos na íntegra, encontrou-se 21 artigos e, destes, 16 foram selecionados, sendo 15 artigos originais e 1 revisão de literatura. Os principais temas abordados nos artigos selecionados estão demonstrados abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 Quantitativos dos artigos selecionados por tema

Tema abordado	Quantidade
Compósito de alginato e HA	1
Compósito de gelatina e HA	7
Compósito de alginato e biomateriais naturais	3
Compósito de alginato e matriz óssea desmineralizada	1
Compósitos de gelatina e quitosana	2

Compósito de gelatina e PLCL - poli (L-ácido láctico-co- ε- caprolactona)	1
Gelatina de extração ácida e básica	1
Total	16

A comparação dos artigos quanto aos autores/ano, tipo de estudo, objetivo geral, resultados e conclusões estão no quadro sinóptico (Figura 1).

Figura 1 Quadro sinóptico dos estudos selecionados de acordo com características bibliográficas

AUTORES / ANO	TIPO DE ESTUDO	OBJETIVO	RESULTADOS	CONCLUSÃO
Chang H-C, Yang C, Feng F, Lin F-H, Wang C-H, Chang P-C./ 2017.	Experimental	Desenvolver uma estratégia de tratamento para rebordo alveolar usando um substituto ósseo criogênico osteoindutivo contendo gelatina e fosfato de HA / β -TCP e microesferas de PLGA carregadas com BMP-2.	O compósito gelatina / HA / β -TCP foi homogeneamente poroso. Observou-se aumento do rebordo em todas as amostras tratadas com o compósito gelatina / HA / β -TCP.	Microesferas PLGA carregadas com BMP-2 promoveram efetivamente o potencial osteogênico do compósito gelatina / HA / β -TCP e aumentaram o aumento do rebordo supra-alveolar <i>in vivo</i> .
Chao SC, Wang M-J, Pai N-S, Yen S-K./2015.	Experimental (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Avaliar a proliferação e a viabilidade celular em células semelhantes a osteoblastos (<i>in vitro</i>), e as capacidades bioativas, biocompatíveis de microesferas compostas de gelatina e HA (G-HA), cola de fibroína (F) e OSTEASET® (OS), aplicadas ao reparo ósseo (<i>in vivo</i>).	Microesferas compostas de G-HA sem toxicidade, promovem proliferação e diferenciação de células semelhantes a osteoblastos (<i>in vitro</i>). O G-HA reparou completamente defeito ósseo em uma calvária de rato.	Microesferas compostas G-HA são biocompatíveis e bioativas. Estruturas de G-HA, indicaram maior osteocondutividade e bioatividade do que F e OS.
Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Larijani B./2017.	Experimental	Fabricar um novo arcabouço compósito de hidróxidos duplos em camadas (LDH), hidroxiapatita (HA) e gelatina (GEL) para facilitar o processo de reparo ósseo.	Bom desempenho do arcabouço de LDH (hidróxidos duplos em camadas) HA / GEL para induzir a regeneração óssea, em defeitos críticos (5,0mm), 12 semanas após implante em coelhos.	O compósito de LDH (hidróxidos duplos em camadas) -HA / GEL, apresentou-se biocompatível e osteoindutor.

Georgopoulou A, Papadogiannakis F, Batsali A, Marakis J, Alpantaki K, Eliopoulos AG, <i>et al.</i> /2018.	Experimental (<i>in vitro e in vivo</i>)	Avaliar a biocompatibilidade e as respostas osteogênicas <i>in vitro</i> de arcabouços quimicamente reticulados com glutaraldeído e genipina, associado a quitosana/gelatina (CS:40%/Gel:60%). Avaliar a capacidade, destes arcabouços, <i>in vivo</i> , de suportar uma neoformação óssea após 8 semanas em camundongos após a implante no fêmur.	Os dados histológicos após a implantação de um suporte CS: Gel num fêmur de rato demonstraram que os suportes suportam a formação de matriz extracelular, enquanto os fibroblastos que envolvem o suporte poroso produzem colágeno com uma reação inflamatória mínima.	Estes resultados mostram o potencial dos arcabouços de CS: Gel para apoiar a formação de novos tecidos e, assim, fornecer uma estratégia promissora para engenharia de tecido ósseo.
Hamidabadi H, Shafaroudi M, Seifi M, Bojnordi M, Behruzi M, Gholipourmalekabadi M, <i>et al.</i> /2018.	Experimental (<i>in vitro e in vivo</i>)	Avaliar a eficácia do compósito de Hidroxiapatita/Gelatina (HA: 40%/Gel:60%), semeada com células estromais da medula óssea (BMSCs), para a reparo de defeitos ósseos de tamanho crítico (7mm).	Os primeiros sinais de ossificação com compósito de HA/Gel e o grupo de células BMSCs apareceram na primeira semana. Na quarta semana, a ossificação foi concluída e o suporte remanescente foi encontrado como ilhas embutidas no tecido ósseo esponjoso.	A estrutura de gelatina de hidroxiapatita revestida com células BMSCs tem um papel potencial no processo de reparo ósseo e seria uma possível nova estratégia terapêutica para reparar lesões ósseas extensas.
Jo Y-Y, Kim S-G, Kwon K-J, Kweon H, Chae W-S, Yang W-G, <i>et al.</i> /2017.	Experimental	Avaliar a capacidade de regeneração óssea <i>in vivo</i> de compósitos de alginato (AL), AL / hidroxiapatita (HA) e AL / HA / fibroína de seda (SF), em defeitos críticos (8,0mm) em calvária de ratos.	A associação do Alginato com Hidroxiapatita e fibroína de seda potencializou a osteogênese comparado quando comparado aos compósitos de Alginato e HA e Alginato isolado, implantados após 8 semanas em defeitos ósseo críticos em ratos.	O compósito AL / HA / SF é eficaz como arcabouço para engenharia de tecido ósseo.
Johari B, Ahmadzadehazarabad M, Azami M, Kazemi M, Soleimani M, Kargozar S, <i>et al.</i> /2016.	Experimental	Avaliar a capacidade de regeneração óssea após implantação de arcabouço nanocompósitos de Gel/HA (40/60%) associado a osteoblastos e células endoteliais, Gel/HA (40/60%) associado a osteoblastos e Gel/HA (40/60%) isoladamente.	Arcabouços de Gel/HA/osteoblastos e células endoteliais induziram a reconstrução óssea em 83% comparado a 42% após implantes de arcabouços de Gel/HA, em 4 e 12 semanas pós implante.	Em conjunto, o suporte de nanocompósito Gel / HA com osteoblastos e células endoteliais apresentou uma combinação eficaz para melhorar a osteogênese no implante ósseo projetado.
Kanda N, Anada T, Handa T, Kobayashi K, Ezoe Y, Takahashi T, <i>et al.</i> /2015.	Experimental	Investigar se esponjas de gelatina com uma estrutura porosa específica obtida através de dois métodos de diferentes extração (ácido e básico), exibem osteogenicidade ortotópica em um modelo de calvária de rato de tamanho crítico.	A esponja de gelatina com um poro menor, de extração ácida e reticulada com tratamento desidrotérmico induziu a regeneração óssea ortotópica em mais de 60%, com biodegradação concomitante, em defeito crítico na calvária de rato.	Os resultados fornecem as descobertas de que uma esponja de gelatina com uma estrutura porosa específica é capaz de induzir a formação óssea ortotópica em ambiente <i>in vivo</i> .

Diaz-Rodriguez P, Garcia-Triñanes P, Echezarreta López MM, Santoveña A, Landin M./2018.	Experimental	Desenvolver de hidrogéis mineralizados de alginato de cálcio pela adição de partículas biominais de carbonato de cálcio derivadas de conchas de moluscos.	Foram desenvolvidos hidrogéis de alginato mineralizado e biocompatíveis. A seleção de alginatos hidrogéis contendo 7 mg / ml de partículas ostras foi capaz de promover a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (hMSCs).	As propriedades mecânicas e as respostas celulares desses hidrogéis poderiam ser adaptadas, alterando o tipo de alginato, a fonte natural selecionada, para obter a mineral produzido e a concentração de micropartículas na rede.
Samadikuch aksaraei A, Gholipourm alekabadi M, Erfani Ezadyar E, Azami M, Mozafari M, Johari B, et al./2016.	Experimental (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Avaliar os efeitos do condicionamento osteoblástico na biocompatibilidade, adesão celular e propriedades de indução óssea do nanocompósito de Hidroxiapatita /Gelatina/ Osteoblastos condicionados <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	As propriedades mecânicas e biológicas do arcabouço foram alteradas pelo processo de condicionamento osteoblástico. No grupo experimental que recebeu o nano compósito e as células tronco mesenquimais, o osso neoformado ocupou quase todo o defeito em três meses.	Este estudo indica que o condicionamento osteoblástico é uma estratégia viável para o desenvolvimento de arcabouços de engenharia de tecido ósseo.
Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang K-H, Kim S-K. /2015.	Revisão de literatura	Propor uma visão geral da preparação de alginato e suas aplicações para a engenharia de tecido ósseo.		O alginato é um biomaterial promissor para a engenharia de tecidos ósseos devido à sua biocompatibilidade, propriedades degradáveis, capacidade de formação de gel, propriedades de encapsulação e facilidade de moldar diversas geometrias.
Won J-R, El-Fiqi A, Jegal S-H, Han C-M, Lee E-J, Knowles J-C, et al. 2014.	Experimental	Desenvolver nanocompósitos co-precipitados de gelatina-apatita em poli (L-ácido láctico-co-ε-caprolactona) que mimetizem a composição da matriz óssea nativa e com propriedades mecânicas e biológicas apropriadas para a regeneração óssea.	A adição de gelatina-apatita aumentou consideravelmente a afinidade da água e a capacidade de formação de mineral celular <i>in vitro</i> em fluido corporal simulado; além disso, estimulou a proliferação celular e a diferenciação osteogênica.	A composição de nanocompósitos (GAP-PLCL) possui excelentes propriedades mecânicas e biológicas, que possuem grande potencial para uso como matrizes regenerativas ósseas.
Zheng A, Cao L, Liu Y, Wu J, Zeng D, Hu L, et al./2018.	Experimental	Desenvolver um hidrogel de rede interpenetrante utilizando Ca ²⁺ do silicato de cálcio (CS) para, simultaneamente, reticular a fibroína de seda (SF) e o alginato de sódio (SA) e estabelecer adequações para engenharia de tecido ósseo.	O silicato de cálcio (CS), dentro da estrutura porosa dos arcabouços (SF/CS/AS), pode aumentar notavelmente a hidrofiliabilidade, a degradação, a resistência à compressão, a bioatividade e o pH desse arcabouço.	Os resultados são referências valiosas para a fabricação de arcabouços usando polímeros naturais aplicados a regeneração de defeitos ósseos, na região maxilofacial.

Zhang Y, Wang J, Ma Y, Niu X, Liu J, Gao L, <i>et al.</i> 2017.	Experimental (<i>in vitro</i>)	Avaliar a possibilidade de entrega de pó de matriz óssea desmineralizada (DBM) com a utilização de transportador de alginato de sódio (ALG). Determinar a concentração ótima de ALG e avaliar <i>in vivo</i> a histocompatibilidade do DBM-ALG ideal.	Os resultados indicaram que a área de calcificação no grupo DBM- ALG foi semelhante àquela do grupo DBM, maior que o grupo ALG e o grupo meio de cultura DMEM.	Este estudo fornece a relação DBM / ALG ótima e provou que o MCD-ALG, com a relação de 7:3, possui uma boa biocompatibilidade e osteoindução <i>in vitro</i> .
Oryan A, Alidadi S, Bigham-Sadegh A, Moshiri A./2016.	Experimental (<i>in vivo</i>)	Avaliar a eficácia da quitosana e da gelatina ou a combinação dos dois biopolímeros, quitosana-gelatina (Gel-CS), como arcabouço ósseo no processo de regeneração óssea, em modelo de defeito ósseo de tamanho crítico em ratos.	A combinação do arcabouço de Gel-CS aumentou consideravelmente as propriedades estruturais e funcionais dos ossos reparados quando comparado ao arcabouço de quitosana.	A aplicação da gelatina sozinha ou sua combinação com a quitosana teve efeitos benéficos na regeneração óssea e pode ser considerada como uma boa estratégia para a engenharia de tecido ósseo.
Yin B, Ma P, Chen J, Wang H, Wu G, Li B, <i>et al.</i> /2016.	Experimental (<i>in vitro e in vivo</i>)	Avaliar o uso de gelatina (Gel) e nano-hidroxiapatita (nHA), em diferentes proporções, para a construção de micro-arcabouços 3D nos poros de titânio poroso. Avaliar características morfológicas, a biocompatibilidade e a capacidade de osteogênese dos arcabouços híbridos <i>in vitro e in vivo</i> .	Todos os arcabouços híbridos com diferentes proporções de composição apresentaram efeitos promocionais significativos na adesão, proliferação e diferenciação celular, nos quais o grupo com Gel: nHA = 1:1 apresentou o melhor desempenho <i>in vitro</i> , bem como o maior volume de regeneração óssea <i>in vivo</i> .	Todos esses resultados indicaram que arcabouços de micro-estrutura 3D de Gel/nHA para titânio poroso teve uma boa biocompatibilidade e capacidade de regeneração óssea, e pode potencialmente ser aplicado na clínica.

DISCUSSÃO

O tecido ósseo possui uma fase mineral e outra orgânica, devido a essa característica são desenvolvidos materiais na tentativa de aproximar-se da estrutura e composição do osso natural.²⁷ As características cruciais levadas em consideração para o desenvolvimento de biomateriais aplicados à bioengenharia tecidual óssea são: composição química, propriedades físicas e mecânicas, biodegradabilidade, biocompatibilidade e a funcionalidade.²⁸ Entre os tipos de biomateriais, os polímeros naturais apresentam vantagens devido à possibilidade de várias modificações químicas e potencial para serem biodegradáveis e biocompatíveis.²⁹

A gelatina é um biopolímero degradável que tem como atributos os sequenciamentos de aminoácidos similares ao colágeno, capaz de transformar-se

espontaneamente nessas moléculas.^{30,31} A gelatina isolada, aplicada como biomaterial para enxerto ósseo, pode ser extraída de várias fontes de colágeno, sob condições básicas e ácidas, em pesos moleculares e pontos isoelétricos distintos.³² Na bioengenharia tecidual óssea, a gelatina pode apresentar-se na forma de arcabouços, misturado com hidroxiapatita, integrada a polímeros naturais, ácido hialurônico, seda, hidrogéis de alginato, integrada a polímeros artificiais, tais como, por exemplo poli (ácido lático-co-ácido glicólico).³³

A deposição de minerais de hidroxiapatita (HA) em fases de colágeno natural/gelatina fornecem ao biomaterial estruturas químicas mais semelhantes ao osso natural. Chao, Wang, Pai, Yen¹⁰, em seu estudo com microesferas de HA (21%)/Gelatina (70%), indicam este compósito como osteoindutor e bioativo aplicado ao reparo ósseo. De acordo com Hamidabadi e seus colaboradores²⁷, a não toxicidade de compósitos de HA e gelatina favorece crescimento, diferenciação e migração de células em defeitos ósseos críticos e, nesta pesquisa, concluiu-se que a estratégia de associar arcabouços de HA-gelatina a células tronco mesenquimais, potencializa a regeneração óssea em lesões extensas.

Compósitos de Nano Hidroxiapatita apresentam-se como biomaterial osteoindutor, biocompatível e biodegradável conforme os achados de Yin e seus colaboradores.³⁴ A biocompatibilidade e biodegradabilidade também pode ser confirmada com a associação da gelatina a outros biomateriais, por exemplo da quitosana.²⁸ Segundo os experimentos de Oryan, Alidadi, Bigham-Sadegh, Moshiri²³ a associação da quitosana com a gelatina favoreceu a formação óssea em defeitos ósseos críticos. No contexto da associação de compósito de gelatina e HA com células, Johari e seus colaboradores³⁵ em sua pesquisa obteve nos resultados com arcabouços de Gel/HA/osteoblastos e células endoteliais, um aumento de 41% na reconstrução óssea em calvárias de rato (defeito de 5,0mm), quando comparado ao compósito de Gel/HA, em 12 semanas pós implante.

O Alginato é um copolímero polianiónico constituído por uma sequência de dois resíduos de ácido hexurônico: uma unidade de ácidos α L-gulurônico e β D-manurônicos em proporções variadas.³⁶ A adição de cátions bivalentes, tais como cálcio, ao alginato, em solução aquosa, pode induzir a ligações cruzadas entre as moléculas e à formação de hidrogéis, com uma rede tridimensional que estabiliza os polímeros permanentemente.³⁷ A capacidade de formar hidrogéis sustenta a

versatilidade do alginato, que é empregado na bioengenharia ou em cicatrização de feridas.^{38,39}

A bioengenharia tecidual óssea apresenta o alginato na forma de arcabouços; nanocompósitos de polímeros de alginato, quitosana, colágeno, gelatina; compósitos ligados a polímeros sintéticos e a biovidros, compósitos cerâmicos com HA associado a quitosana, colágeno e polímeros sintéticos.⁴⁰ Os arcabouços para reparo tecidual projetados apenas com hidrogéis possuem desempenho mecânico fraco e inadequado.⁴¹ Entretanto, o alginato associado a HA torna-se um biomaterial biocompatível e favorece à aplicação como meio de entrega de fármacos.⁴² O Alginato é amplamente explorado, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, baixo preço de mercado, versatilidade química e rápida gelificação iônica em condições suaves, na presença de cátions bivalentes.^{40,43}

A associação com HA melhora o desempenho do alginato quando aplicado ao reparo ósseo. Um estudo com compósitos de HA/alginato/fibroína de seda demonstrou biocompatibilidade, bioatividade, baixa taxa de toxicidade e potencializou a osteogênese em defeitos ósseos críticos, quando comparado à HA/alginato e alginato sozinho⁷. Ademais, a associação de silicato de cálcio ao alginato e fibroína de seda fornece boas propriedades biológicas como biocompatibilidade e biodegradabilidade.⁴⁴

CONCLUSÃO

A partir da literatura pesquisada conclui-se que os compósitos associados a alginato ou gelatina proporcionam uma gama de aplicações e estratégias promissoras aplicadas ao reparo tecidual ósseo. A associação do compósito de alginato ou de gelatina a outros biomateriais, principalmente hidroxiapatita, pode potencializar o seu efeito no reparo ósseo.

ABSTRACT

Objective: To contextualize the use of alginate and gelatine composites applied to the repair of bone tissue. **Materials and Methods:** The searches were carried out in the PubMed bibliographic database. It was used as inclusion criteria articles in clinical trials model with experimental studies, in vitro or in vivo applied to repair bone tissue, literature reviews; that addressed in animal experiments and articles published between 2013 and 2018 in English. As for the exclusion criteria: articles that did not meet the inclusion criteria, paid and duplicate articles. **Results:** We found 1.798 articles; the titles and abstracts were read, 54 articles were selected. Subsequent to the reading of the texts in full, 21 articles were found, of which 16 were selected, 15 of which were original articles and 1 were a literature review. Among these, the main subjects were: alginate and hydroxyapatite (HA) composite, HA and gelatin composite, alginate composite and natural biomaterials, Alginate composite and demineralized bone matrix, gelatin and chitosan composite, gelatin composite and PLCL - poly (L-lactic acid-co-ε- caprolactone) and gelatin of basic and acidic extraction. **Conclusion:** It is concluded that the association of the alginate or gelatin composite with other biomaterials, especially hydroxyapatite, may potentiate its effect on bone repair.

Keywords: Composite. Alginate. Gelatin. Durapatita. Bone repair.

**3 ARTIGO SEGUNDO: ESTUDO POR
MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA
E HISTOMORFOMETRIA DO REPARO
ÓSSEO COM O USO DO COMPÓSITO DE
HIDROXIAPATITA COM ALGINATO E
GELATINA**

3 ARTIGO SEGUNDO

Estudo por Microtomografia Computadorizada e Histomorfometria do Reparo Ósseo com o Uso do Compósito de Hidroxiapatita com Alginato e Gelatina

Study by Computerized Microtomography and Histomorphometry of Bone Repair with the Use of the Hydroxyapatite Composite with Alginate and Gelatin

^a Anderson Cunha dos SANTOS ^a; Fabiana Paim ROSA ^a; ^b Joni Augusto CIRELLI; ^b Mauricio Andres Tinajero ARONI

^a Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador - BA, Brasil;

^b Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), Araraquara-SP, Brasil.

RESUMO

Objetivo: avaliar, por microtomografia computadorizada (μ CT) e histomorfometria, o reparo de defeito ósseo crítico, após a implantação do compósito de hidroxiapatita com alginato e gelatina (HAAIlgGel), comparando-o ao Bio-Oss[®]. **Materiais e Métodos:** A amostra foi composta por 24 ratos, *Wistar*, machos, adultos, distribuídos aleatoriamente para compor 3 grupos, com 8 animais em cada: **grupo HAAIlgGel** - defeito ósseo crítico preenchido com grânulos do compósito de hidroxiapatita com alginato a 1% e gelatina a 1%; **grupo Bio-Oss[®]** - defeito ósseo crítico preenchido com grânulos de BioOss[®]; **grupo Controle** - defeito ósseo crítico vazio. As amostras foram avaliadas por μ CT nos pontos biológicos: 1 dia (*base line*), 15 dias, 45 dias e 90 dias e por análise histomorfométrica aos 90 dias. **Resultados:** A análise morfométrica por μ CT mostrou que o grupo HAAIlgGel manteve o percentual de tecido ósseo constante ao longo do estudo; já nos grupos Bio-Oss[®] e Controle, esse percentual aumentou ao longo do período avaliado. A análise histológica evidenciou neoformação óssea restrita às bordas em todos os grupos experimentais, aos 90 dias. Nos grupos HAAIlgGel e Bio-Oss[®] houve formação de tecido conjuntivo fibroso de permeio às partículas do biomaterial. No grupo HAAIlgGel, essas fibras apresentaram-se de forma densa, comparadas aos demais grupos. A histomorfometria apontou que os grupos HaAlgGel e Controle formaram os maiores percentuais de neoformação óssea. **Conclusão:** Os biomateriais não favoreceram a regeneração do defeito ósseo crítico, predominou o reparo por fibrose em todos os grupos avaliados. A μ CT possibilitou o acompanhamento do reparo ósseo ao longo do estudo, sem a necessidade de sacrifício animal, em diversos pontos biológicos.

Palavras-chave: Biomateriais. Alginato. Gelatina. Microtomografia por Raio X.

INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos críticos provenientes de traumas ósseos, ressecção de tumores e anormalidades congênitas representam um problema clínico recorrente.⁴⁵ Nessas situações, a capacidade de reparo ósseo torna-se limitada e suscetível a falhas, o que pode resultar em defeitos ósseos, por vezes, com morfologia complexa que impedem a sua reconstituição de forma espontânea.⁴⁶

O emprego de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo surge como uma opção aos enxertos ósseos, já que não compromete tecidos saudáveis, reduz os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponíveis comercialmente. Alguns são de fácil dissolução e absorção que, concomitantemente, possibilitam e estimulam a formação óssea.⁶

O biomaterial à base de hidroxiapatita (HA) é utilizado em aplicações clínicas como substituto ósseo para aplicações médicas em decorrência da sua composição química e morfologia porosa tridimensional, além de ser muito similar ao osso humano.⁸ A hidroxiapatita cerâmica (BioOss[®]) é um biomaterial derivado de osso bovino, com ausência dos seus componentes orgânicos⁴⁷. Biomaterial muito usado na bioengenharia tecidual óssea, o BioOss apresenta boa biocompatibilidade e osteoindutividade, contudo não é um material osteogênico.^{8,48}

A HA tem a função de conferir dureza ao tecido ósseo, tornando-o resistente ao esmagamento, e é limitada pela sua rigidez e friabilidade. Por esta razão, pesquisadores modificam a HA, associando-a com polímeros naturais tais como colágeno, quitosana, gelatina e alginato, com a finalidade de produzir biocerâmicas de HA de alta qualidade.¹⁰ A gelatina é um biopolímero natural, derivado da hidrólise parcial do colágeno, que possui excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade, disponibilidade comercial e baixo custo.⁴⁹

O Alginato também é um biopolímero muito empregado em diversas áreas, como na engenharia de tecidos.⁴¹ Este destaca-se por ser biocompatível, biodegradável, induzir uma baixa resposta imunológica *in vivo* e é estruturalmente similar aos glicosaminoglicanos, que compõem a matriz extracelular.⁵⁰ O Alginato é um polissacarídeo aniônico extraído de algas castanhas (*Phaeophyceae*) ou obtido por biossíntese bacteriana da *Azotobacter* e *Pseudomonas ssp.* É constituído por uma sequência de dois resíduos de ácido hexurônico (1,4) ligado a β -D-manuronato (ou unidade M) e seu epímero C-5 α -L-gulonato (ou unidade G) residual, ligados

entre si em blocos homopoliméricos (-MMM- ou -GGG-) ou blocos aleatórios (-MGMG-).^{51,52}

Os compósitos são biomateriais que combinam as qualidades de dois ou mais materiais distintos e, de acordo com a sua composição, apresentam características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioatividade, osteocondutividade, osteoindutividade e versatilidade.⁵³ Tendo em vista as possíveis vantagens do uso de um compósito que combina o potencial da hidroxiapatita ao alginato e a gelatina, o objetivo deste artigo foi avaliar por microtomografia computadorizada (μ CT) e histomorfometria o reparo de defeito ósseo crítico, após a implantação do compósito de hidroxiapatita com alginato e gelatina (HAAIlgGel), comparando-o ao Bio-Oss®.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Este experimento foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/Araraquara-SP), protocolo nº 27/2016.

Biomaterial

Foram utilizados grânulos do compósito de hidroxiapatita com alginato a 1% e gelatina a 1% (HAAIlgGel), tamanho padronizado entre 0,42 a 0,6 mm, desenvolvidos, preparados, caracterizados e fornecidos pelo Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) sob a supervisão do Professor Alexandre Malta Rossi.

Foram selecionados também grânulos de hidroxiapatita de origem bovina BioOss®, comercialmente encontrados. Esse biomaterial é produzido com um padrão de tamanho médio, entre 0,25 a 1mm, sendo, em seu processamento, desproteinizado e submetido ao tratamento térmico a uma temperatura de 300°C.

Amostra

Foi realizado um cálculo amostral, que resultou em uma amostra de 24 ratos da linhagem *Rattus Novergicus*, *Albinos*, *Wistar*, machos, adultos, com massa

corpórea entre 350 e 400g. Os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP, em caixas plásticas forradas com maravalha, previamente autoclavadas; alimentados com ração sólida e água *ad libitum*, mantidos em condições ambientais de temperatura e umidade adequadas à espécie.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para compor três grupos experimentais, com oito animais por grupo: Grupo HAAIlgGel, defeito ósseo crítico preenchido com grânulos compósito de hidroxiapatita com alginato a 1% e gelatina a 1%; Grupo Bio-Oss[®], defeito ósseo crítico e com grânulos de Bio-Oss[®]; Grupo controle, defeito ósseo crítico e sem implantação de biomateriais.

Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina (0,06 ml/kg) e cloridrato de cetamina (0,12 ml/kg). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia e antissepsia com álcool iodado da região da calvária. Posteriormente, foi confeccionado um defeito ósseo crítico de aproximadamente 8,5 mm de diâmetro, na porção mediana da calvária, com uma fresa trefina. Este defeito foi preenchido de acordo com os grupos experimentais pré-estabelecidos e citados na etapa anterior.

Análise por Microtomografia Computadorizada (μ CT)

A aquisição das imagens foi feita por um Técnico responsável pela μ CT no equipamento Microtomógrafo SkyScan 1176, da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Para a avaliação na μ CT, os ratos foram sedados com Cloridrato de Cetamina (0,1mL/100g de peso corporal) e, após esse procedimento, foram colocados em um suporte e fixados na sela do equipamento, para imobilizar o animal durante o processo de aquisição das imagens.

As amostras foram digitalizadas no Microtomógrafo *in vivo* SkyScan 1176, resolução intermediária de 2000 x 2000 pixels e cortes de 18 μ m de espessura, filtro de alumínio de 1mm, kilovtagem de 65kV e miliamperagem de 385 μ A, tempo de exposição 320ms, passo de rotação de 0,50° e varredura de 180°. As imagens radiográficas foram reconstituídas pelo uso do *software NRecon*, redirecionadas no *Data Viewer* e analisadas em 3D pelo programa *CTan*. No *CTan*, foi delimitado o ROI circular de 8,0mm de diâmetro e com a espessura que corresponde a díploe óssea da calvária do animal. Para obtenção da morfometria e imagem 3D, foi

ajustada a escala de cinza (*gray threshold*) em um intervalo de 62 a 255, para diferenciar tecido mineralizado de tecido mole na região analisada.

Os parâmetros morfométricos obtidos pelo *CTan* foram: volume de tecido ósseo, quantidade de tecido mineralizado presente no interior do defeito e a porcentagem de tecido ósseo, obtida pela razão entre o volume de tecido ósseo. Cada grupo foi avaliado nos pontos biológicos: 1 dias (*base line*), 15, 45 e 90 dias.

Etapa Laboratorial e Análise Histomorfométrica

Ao atingir o ponto biológico de 90 dias, os animais foram eutanasiados por aprofundamento da anestesia, de acordo com a Resolução Normativa nº 37/2018 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). As calvárias foram retiradas com remoção de todo tecido mole, fixadas em solução de formol tamponado a 4%, por 48 horas, lavados em água corrente por 24 horas e conservadas em álcool a 70%, para serem encaminhadas ao processamento histológico. As amostras foram descalcificadas com Ácido Etilenodiamino Tetraacético (EDTA - 7%) por 60 dias, com 3 trocas semanais, encaminhadas para processamento histológico de rotina. Os espécimes foram cortados com 4µm de espessura e os cortes histológicos foram corados pelos pigmentos Hematoxilina e Eosina (HE), Picrossírius *red* (PIFG).

As análises histomorfométricas foram realizadas no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais - LBTB. Para as análises, foi utilizado o *software* LAS - *Leica Application Suite* (Leica®, *Biosystems Nussloch GmbH, Germany*). Os seguintes parâmetros foram aferidos: Área de tecido ósseo neoformada; Área de biomaterial; Área de tecido conjuntivo; Percentuais de tecido ósseo neoformado, biomaterial presente no defeito e tecido conjuntivo. O percentual de matriz osteóide neoformada foi calculado com a área do defeito medindo 6,8mm² (8,5mm de diâmetro x 0,8 mm espessura) para equivaler à área total do defeito. A obtenção dos gráficos e dos valores de média e desvio padrão foi feita no programa Microsoft® Office Excel 2013.

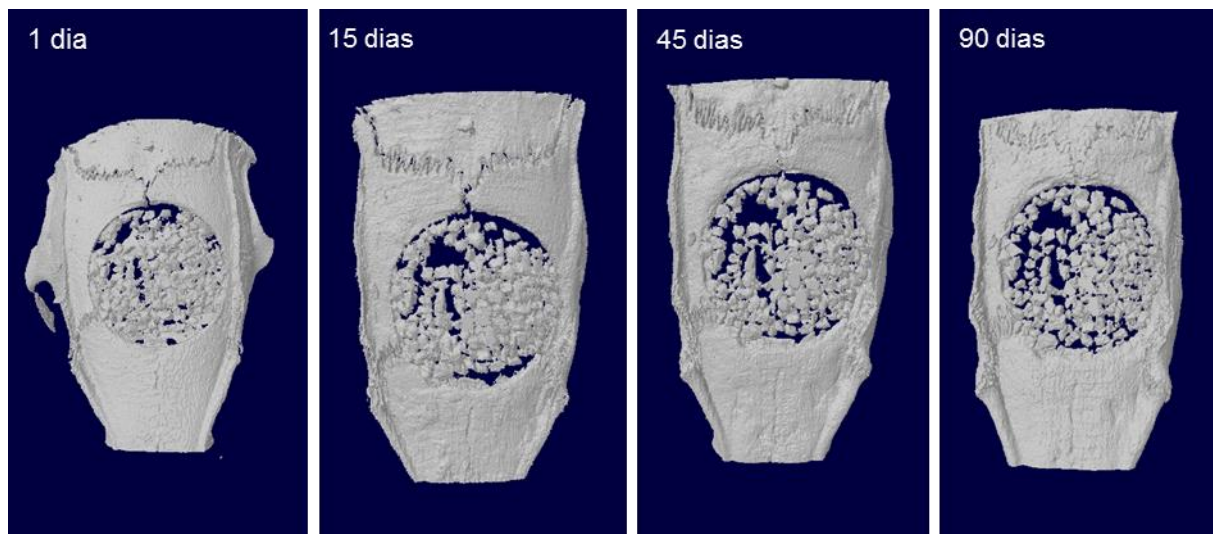
RESULTADOS

Imagens microtomográficas tridimensionais

Observou-se, nos grupos HAAIlgGel e HA, que os fragmentos do compósito hidroxiapatita alginato e gelatina e do Bio-Oss®, respectivamente, preencheram todo o defeito, em todos os pontos biológicos.

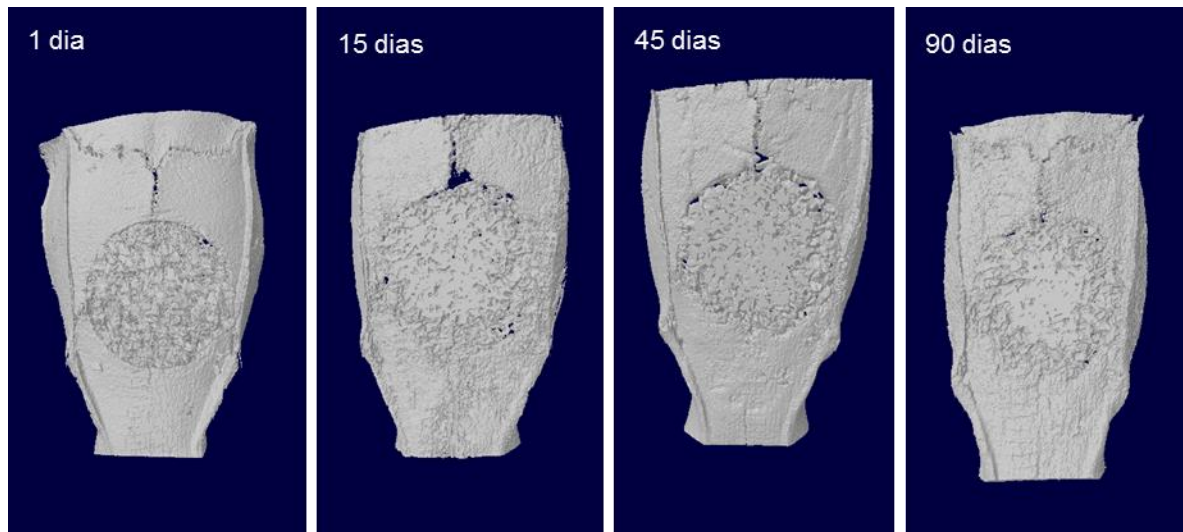
Percebe-se, no grupo HAAIlgGel, as bordas com aspecto biselado e indícios de neoformação óssea. Notou-se um preenchimento mais acentuado do defeito no grupo Bio-Oss®, quando comparado ao grupo HAAIlgGel, principalmente aos 90 dias. Há uma similaridade de radiopacidade dos biomateriais com o osso da calvária. Sugere-se que os espaços entre os biomateriais na região do defeito esteja preenchido com tecido conjuntivo radiolúcido (Figuras 1 e 2). No grupo controle é visualizado o defeito vazio com 8,5 mm de diâmetro, bordas com aspecto biselado e irregulares (Figura 3). Observou-se-se, em todos os grupos, uma consolidação das suturas ao longo do tempo, sinostose (Figuras 1, 2 e 3).

Figura 1 Imagem microtomográfica do grupo HAAIlgGel, defeito ósseo crítico calvária, exertado com biomaterial, mesmo animal e pontos biológicos distintos



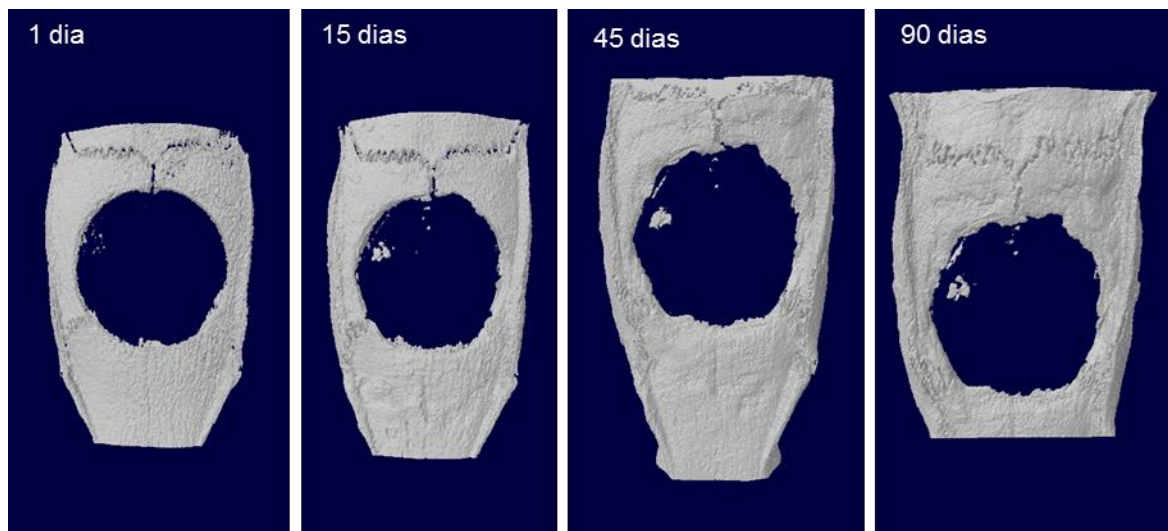
Fonte: Arquivos da pesquisa (2019).

Figura 2 Imagem microtomográfica do grupo Bio-Oss®, defeito ósseo crítico na calvária enxertado com biomaterial, mesmo animal e pontos biológicos distintos



Fonte: Arquivos da pesquisa (2019).

Figura 3 Imagem microtomográfica do grupo controle, defeito ósseo crítico na calvária vazio, mesmo animal e pontos biológicos distintos



Fonte: Arquivos da pesquisa (2019).

Análise morfométrica por μ CT

Após comparação dos valores obtidos, observou-se que em todos os parâmetros avaliados no grupo HAAIgGel, do primeiro aos 15 dias, houve uma redução dos valores. Mas a partir dos 15 dias, quase todas as medidas aumentaram de valor progressivamente até os 90 dias (Tabela 1). Nos grupos Bio-Oss® e

controle percebeu-se que quase todas as variáveis aumentarão progressivamente ao longo dos pontos biológicos avaliados (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1 Medidas morfométricas obtidas pela μ CT do grupo HAAIgGel

Grupo HAAIgGel	1 dia		15 dias		45 dias		90 dias	
	média	Dp	média	dp	média	dp	média	dp
Volume tecido ósseo (mm³)	11,22	5,16	8,38	5,33	11,06	5,93	11,84	6,28
Porcen. tecido ósseo (%)	16,15	6,98	11,68	7,47	15,55	8,34	16,68	8,84

Fonte: Dados extraídos da pesquisa.

Tabela 2 Medidas morfométricas obtidas pela μ CT do grupo Bio-Oss®

Grupo Bio-Oss®	1 dia		15 dias		45 dias		90 dias	
	média	Dp	média	dp	média	dp	média	dp
Volume tecido ósseo (mm³)	18,00	9,59	18,91	11,06	20,57	14,58	23,20	14,32
Porcen. tecido ósseo (%)	25,36	13,50	26,68	15,59	28,96	20,53	32,67	20,16

Fonte: Dados extraídos da pesquisa.

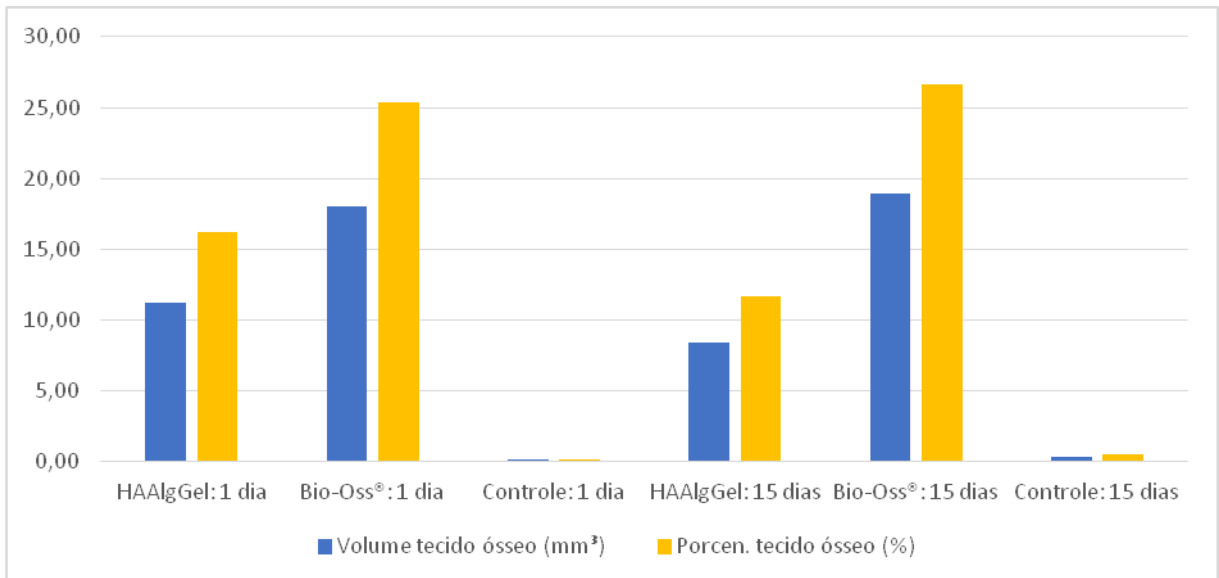
Tabela 3 Medidas morfométricas obtidas pela μ CT do grupo controle

Grupo controle	1 dia		15 dias		45 dias		90 dias	
	média	Dp	média	dp	média	dp	média	dp
Volume tecido ósseo (mm³)	0,05	0,05	0,35	0,32	1,47	2,25	2,78	3,82
Porcen. tecido ósseo (%)	0,07	0,07	0,50	0,46	2,06	3,17	3,91	5,37

Fonte: Dados extraídos da pesquisa.

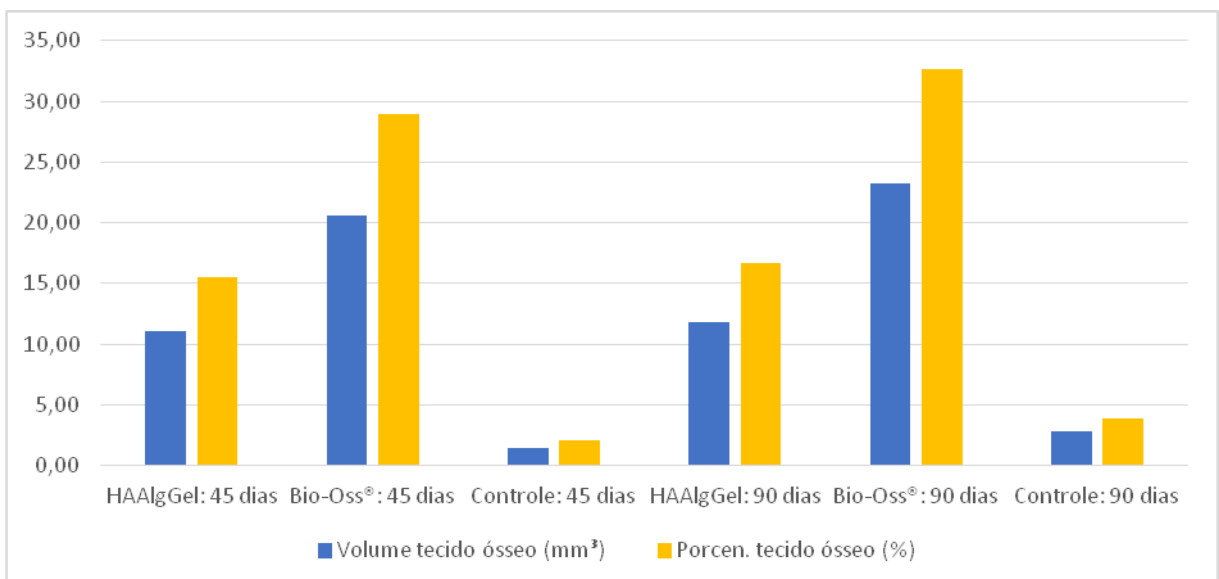
Ao avaliar os parâmetros entre os grupos experimentais ao longo dos tempos biológicos, notou-se que o grupo Bio-Oss® possui os maiores valores de volume ósseo, percentual de tecido ósseo, comparado aos demais grupos (Tabelas 1, 2 e 3; Figuras 4 e 5).

Figura 4 Médias dos valores morfométricos obtidos por μ CT, grupos experimentais, 1 dia e 15 dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 Médias dos valores morfométricos obtidos por μ CT, grupos experimentais 45 e 90 dias



Fonte: Elaborada pelo autor.

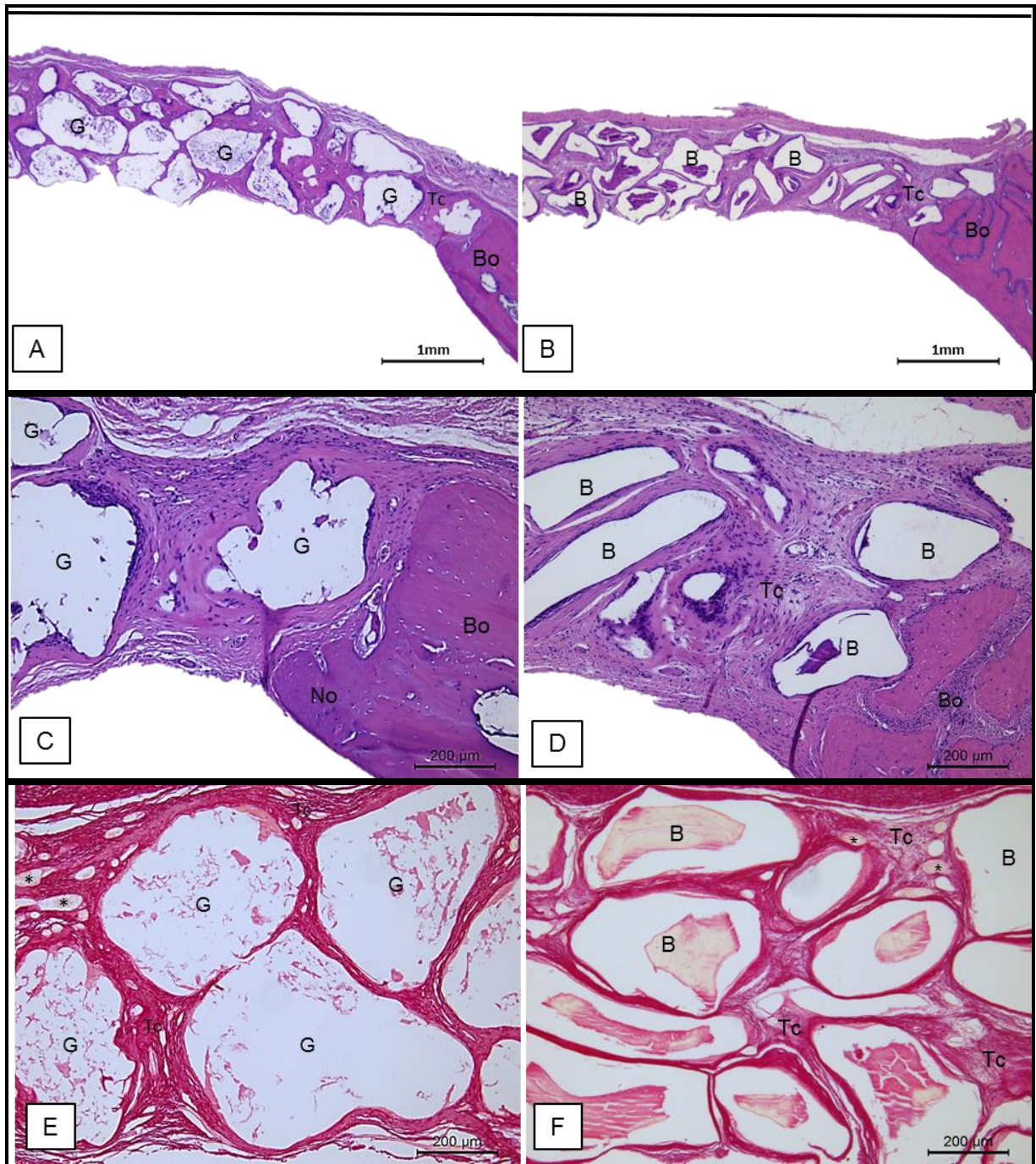
Análise histológica

No grupo experimental HAAIlgGel, observou-se a borda do defeito com o osso organizado, o defeito preenchido com o biomaterial de tamanhos variados, em tripla camada, e tecido conjuntivo fibroso circunjacente às partículas do biomaterial (Figura 6A). A borda óssea é visualizada com uma neoformação óssea reacional, os grânulos do compósito circundados por uma reação granulomatosa discreta, constituída por macrófagos, células gigantes mononucleares, fibroblastos e fibrose de permeio ao biomaterial (Figura 6C). Nota-se o biomaterial decompondo-se em fragmentos menores, tecido conjuntivo exuberante (fibrose) e presença de capilares sanguíneos. Houve formação intensa de fibras colágenas, resultantes da proliferação de fibroblastos (Figura 6E).

No grupo experimental Bio-Oss[®], visualizou-se a borda óssea com neoformação óssea reacional, defeito crítico completamente preenchido pelo biomaterial com formas geométricas irregulares e em multicamada (Figuras 6B e 6D). Observou-se uma grande quantidade de tecido conjuntivo e tecido de granulação exuberante, contudo apresentou-se uma quantidade menor de formação de fibras colágenas, quando comparado ao grupo HAAIlgGel. Ademais, observa-se uma qualidade do tecido conjuntivo inferior ao grupo HAAIlgGel, por possuir colágeno de menor densidade e maior espaço intersticial (Figura 6F).

Nos grupos experimentais HAAIlgGel e Bio-Oss[®], houve neoformação óssea reacional, mas o grupo constituído por compósito de alginato e gelatina foi superior ao Bio-Oss[®] no tocante à quantidade de fibras colágenas e tecido fibroso. Nota-se uma diferença no padrão de interstício do grupo HAAIlgGel para o grupo Bio-Oss[®]. O grupo controle apresenta-se com a neoformação óssea reacional, restrita às bordas (Figura 7A), delgado septo de tecido conjuntivo fibroso, que ocupa todo o defeito crítico (Figura 7B).

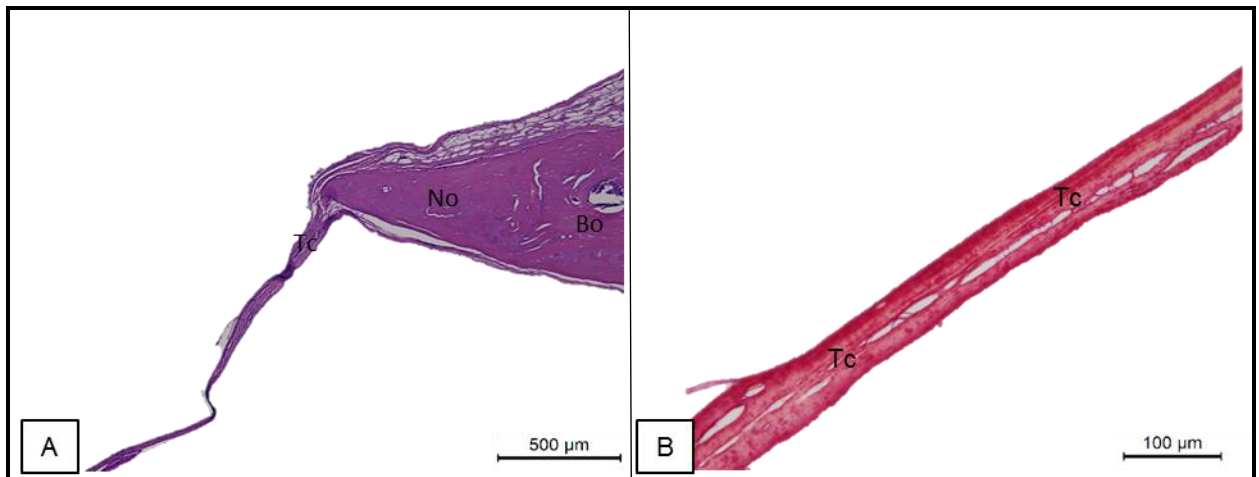
Figura 6 Fotomicrografia dos grupos: HAAIlgGel (8A,8C e 8E) e Bio-Oss® (8B,8D e 8F), 90 dias



Grupo HAAIlgGel (A, C e E): Bo - Região de borda óssea (A e E), TC - Tecido conjuntivo fibroso, G- grânulos de HAAIlgGel multifragmentado (A,C e E), No – Neoformação óssea reacional (C). HE (A e C), PIFG (E). Aumento 1mm (A) e 200µm (C e E). **Grupo Bio-Oss® (B,D e F):** Bo - Região de borda óssea (B e D), TC - Tecido conjuntivo fibroso, B- grânulos de Bio-Oss® (B,D e F), No – Neoformação óssea reacional (D). HE (B e D), PIFG (F). Aumento 1mm (B) e 200µm (D e F).

Fonte: Arquivos da pesquisa, 2018.

Figura 7 Fotomicrografia do grupo controle, 90 dias



Bo - Região de borda óssea (A), **No** – Neoformação óssea reacional (A), **TC** - Tecido conjuntivo fibroso (A e B), Septo delgado de tecido fibroso (B). HE (A), PIFG (B). Aumento 500µm (A) e 100µm (B).

Fonte: Arquivos da pesquisa, 2018.

Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica demonstrou o grupo que o HAAIgGel apresenta uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado, quando comparado ao Bio-Oss®. Entretanto, ambos os biomateriais tiveram valores de neoformação óssea inferiores ao grupo controle, contudo, nesse parâmetro, o grupo HAAIgGel se aproxima do grupo controle e foi discretamente superior ao Bio-Oss®. Os grupos HAAIgGel e Bio-Oss® obtiveram valores semelhantes de áreas preenchidas por biomaterial e tecido conjuntivo, entretanto nesses grupos notou-se um maior valor de área preenchida por tecido conjuntivo quando comparados ao grupo controle. (Tabela 4; Figura 8).

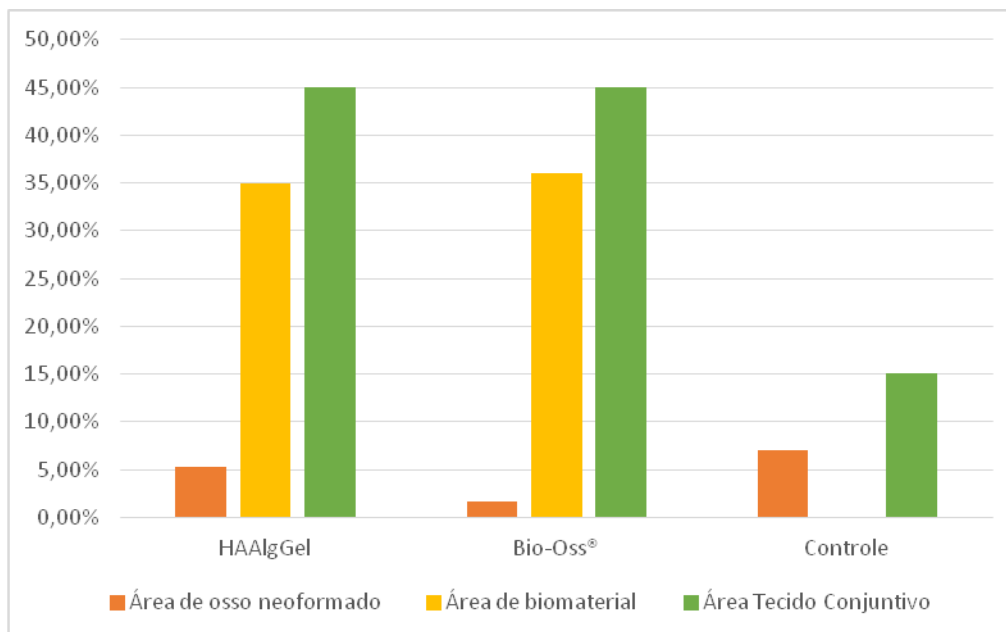
Tabela 4 Valores médios dos parâmetros obtidos pela histomorfometria aos 90 dias

Grupo	HAAIlgGel		Bio-Oss®		Controle	
	média	dp	média	dp	média	dp
*Área tecido ósseo neoform.	0,36	0,17	0,11	0,09	0,49	0,28
Área de biomaterial	2,36	1,22	2,42	1,34	–	–
Área de Tecido Conjuntivo	3,03	0,9	3,03	1,26	1,03	0,71
**Percentual osso neoform.	5,36%	2,50%	1,62%	1%	7%	4%
Percentual biomaterial	35%	18%	36%	20%	–	–
Percentual Tecido Conjuntivo	45%	13%	45%	19%	15%	10,44%

* Valores de área em mm²

** Calculados com referência na área total estimada do defeito crítico (6,8mm²).

Fonte: dados da pesquisa

Figura 8 Percentuais dos parâmetros avaliados por histomorfometria em 90 dias

Fonte: Elaborada pelo autor.

DISCUSSÃO

A μ CT é uma ferramenta de análise que apresenta o diferencial de obter dados quantitativos e qualitativos do processo de reparo ósseo, de forma não invasiva. Os parâmetros de análises realizadas pela μ CT baseiam-se na atenuação do feixe de raios-X pelas amostras analisadas. Os fótons atenuados geram dados que são analisados por *softwares* específicos.¹⁹ Técnica muito aplicada ao estudo de imagem óssea, a μ CT destaca-se por produzir imagens em alta resolução, avaliar múltiplos parâmetros morfométricos e possibilitar a avaliação da morfologia de estruturas ósseas em estudos longitudinais de animais *in vivo*²¹, conforme visto nos resultados das imagens microtomográficas (Figuras 1, 2 e 3).

A partir da análise morfométrica pela μ CT (Tabela 1), pode-se observar que no grupo HAAIlgGel ocorreu uma redução do quantitativo percentual, do volume e do percentual de tecido ósseo, entre o *base line* e os 15 dias, o que não ocorre com os demais grupos nesse período. Este resultado sugere que houve uma bioabsorção da porção orgânica do compósito nesse período, visto que tanto o alginato quanto a gelatina são compostos orgânicos biodegradáveis, conforme citado nos estudos de Boateng, Amador, Okeke, Pawar; Catanzano *et al.*; Koshy, Ferrante, Lewin, Mooney.^{39, 52, 54}

Os dados analíticos obtidos pela μ CT são dependentes: da densidade, número atômico do material analisado e energia do feixe de raios X.²⁰ É percebido um aumento progressivo de volume ósseo e percentual de tecido ósseo, entre 15 e 90 dias no grupo HAAIlgGel, e no grupo Bio-Oss® durante os 90 dias (Tabelas 1, 2). Esta tendência indica que foi contabilizada a neoformação óssea, e o biomaterial como tecido ósseo mineralizado, devido à similaridade de densidade da hidroxiapatita com o osso. Este biomaterial é o principal componente dos grupos experimentais avaliados, o que justifica os valores apresentados (Figuras 1 e 2).

As análises histológicas demonstraram que o compósito HAAIlgGel apresentou-se como partículas fragmentadas associadas à biodegradabilidade dos compostos alginato e gelatina. Esta característica foi evidenciada no estudo de Chao, Wang, Pai, Yen, em que é avaliado um compósito de hidroxiapatita e gelatina (21%).¹⁰ Observa-se também uma intensa formação de fibras colágenas,

característica já observada nos estudo de Georgopoulou *et al.*, entretanto neste trabalho foi aplicado arcabouço constituídos de quitosana e gelatina.²⁸

Ao comparar o grupo HAAIlgGel com o Bio-Oss® ambos foram biocompatíveis, promoveram formação de arcabouço tecidual e produção de grande quantidade de tecido conjuntivo. O grupo HAAIlgGel produziu uma maior quantidade de fibras colágenas e tecido fibroso comparado ao grupo do Bio-Oss®, de acordo com Fayyazbakhsh *et al.*, a presença de gelatina nos compósitos favorece à formação de fibras colágenas.³⁰

Na avaliação descritiva histológica, visualizou-se que não houve neoformação óssea reacional restrita às bordas em todos os grupos experimentais. Este achado corrobora com os estudos de Samadikuchaksaraei *et al.*, ao avaliar a neoformação óssea com o uso de compósitos de Nano hidroxiapatita (40%) e gelatina (60%), após 7 e 30 dias de implantação, em defeito crítico de 8,0mm. Contudo, neste mesmo trabalho, aos 90 dias, a neoformação óssea ocorreu em torno de 18%.⁵⁵ Isso sugere que o percentual de componente orgânico no compósito pode interferir no potencial osteogênico, e que o biomaterial testado deve ser reformulado com outras concentrações de seus componentes.

Os valores das análises histomorfométricas indicam uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado no grupo HAAIlgGel em comparação ao grupo Bio-Oss®, contudo ambos os biomateriais tiveram menor produção de neoformação óssea quando comparado ao grupo controle. Sugere-se que a neoformação óssea quantificada em todos os grupos se refere à neoformação óssea reacional, comum às bordas do defeito, típicas de um defeito crítico não preenchido com biomaterial, conforme os autores Ezirganli *et al.*⁵⁶ Percebe-se que a quantidade de fibras colágenas é proporcional à quantidade de biomaterial presente no defeito.

CONCLUSÃO

A partir deste estudo conclui-se que os biomateriais não favoreceram a regeneração do defeito ósseo crítico, e o reparo ósseo ocorreu por fibrose. Em todos os grupos a neoformação óssea ficou restrita às bordas do defeito. O grupo HAAIlgGel formou fibras colágenas e maior densidade e tecido fibroso mais denso, quando comparado ao grupo Bio-Oss®. Os biomateriais foram bons para

preenchimento, restituíram o volume na região do defeito com uma ótima biocompatibilidade e permaneceram no sítio de implantação ao longo de todo o estudo. A microtomografia computadorizada possibilitou o acompanhamento do reparo ósseo ao longo do estudo sem a necessidade de sacrifício animal.

ABSTRACT

Objective: to evaluate, by computerized microtomography (μ CT) and histomorphometry, the critical bone defect repair, after the implantation of the hydroxyapatite composite with alginate and gelatin (HAAIlgGel), comparing it to Bio-Oss®. **Materials and Methods:** The sample consisted of 24 male Wistar rats, randomly assigned to compose 3 groups, with 8 animals each: HAAIlgGel group - critical bone defect filled with granules of the hydroxyapatite composite with 1% alginate and 1% gelatin; Bio-Oss® group - critical bone defect filled with BioOss® granules; Control group - empty critical bone defect. Samples were evaluated by μ CT at biological points: 1 day (base line), 15 days, 45 days and 90 days and histomorphometric analysis at 90 days. **Results:** The morphometric analysis by μ CT showed that the HAAIlgGel group maintained the percentage of bone tissue constant throughout the study; already in the Bio-Oss® and Control groups, this percentage increased over the period evaluated. Histological analysis revealed border-restricted bone neoformation in all experimental groups at 90 days. In the HAAIlgGel and Bio-Oss groups, there was the formation of fibrous connective tissue permeate from the biomaterial particles. In the HAAIlgGel group, these fibers were dense, compared to the other groups. Histomorphometry indicated that the HaAligGel and Control groups formed the highest percentages of bone neoformation. **Conclusion:** The biomaterials did not favor the regeneration of the critical bone defect, the fibrosis repair predominated in all the evaluated groups. The μ CT enabled the tracking of bone repair throughout the study without the need for animal sacrifice in various biological points.

Keywords: Composite. Alginate. Gelatine. Bone Repair. X- ray Microtomography.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [SUS0010/2013]

4 CONCLUSÃO

4 CONCLUSÃO

O artigo primeiro indica que os compósitos associados a alginato ou gelatina proporcionam uma gama de aplicações e estratégias promissoras aplicadas ao reparo tecidual ósseo. A associação do compósito de alginato ou de gelatina a outros biomateriais, principalmente hidroxiapatita, pode potencializar o seu efeito no reparo ósseo. Faz-se necessário o desenvolvimento de mais pesquisas baseadas nesse tipo de compósito.

A partir dos resultados apresentados no artigo segundo, o reparo do defeito por fibrose e a neoformação óssea ficaram restritas às bordas do defeito. Ambos os biomateriais foram bons para preenchimento, restituíram o volume na região do defeito com uma ótima biocompatibilidade e permaneceram no sítio de implantação ao longo de todo o estudo. A microtomografia computadorizada possibilitou o acompanhamento do reparo ósseo ao longo do estudo sem a necessidade de sacrifício animal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *Int J Biol Macromol*. 2018 nov; 119: 1228–39.
2. Dimitri P, Rosen C. The Central Nervous System and Bone Metabolism: An Evolving Story. *Calcif Tissue Int*. 2017 may; 100(5):476–85.
3. Liu H, Li D, Zhang Y, Li M. Inflammation, mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Histochem Cell Biol*. 2018 apr; 149(4):393–404.
4. Taylor BL, Limaye A, Yarborough J, Freeman JW. Investigating processing techniques for bovine gelatin electrospun scaffolds for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017 jul; 105(5):1131–40.
5. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater*. 2017 dec; 2(4):224–47.
6. Oliveira, LSAF, Oliveira, CS, Rosa, FP. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. *Rev. Ciênc. Méd. Biol*. 2010; 9(supl 1):37-44.
7. Jo Y-Y, Kim S-G, Kwon K-J, Kweon H, Chae W-S, Yang W-G, *et al*. Silk Fibroin-Alginate-Hydroxyapatite Composite Particles in Bone Tissue Engineering Applications In Vivo. *Int J Mol Sci*. 2017 apr; 18(4).
8. Kim R-W, Kim J-H, Moon S-Y. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 2016 dec; 38(1):s40902-6.
9. Lee DSH, Pai Y, Chang S. Physicochemical characterization of InterOss® and Bio-Oss® anorganic bovine bone grafting material for oral surgery – A comparative study. *Mater Chem Phys*. 2014 jul;146(1–2):99–104.
10. Chao SC, Wang M-J, Pai N-S, Yen S-K. Preparation and characterization of gelatin–hydroxyapatite composite microspheres for hard tissue repair. *Mater Sci Eng C*. 2015 dec; 57:113–22.
11. Kato E, Lemler J, Sakurai K, Yamada M. Biodegradation Property of Beta-Tricalcium Phosphate-Collagen Composite in Accordance with Bone Formation: A Comparative Study with Bio-Oss Collagen® in a Rat Critical-Size Defect Model: Biodegradability of b-TCP-Collagen Composite. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2014 apr; 16(2):202–11.
12. Rossi AL, Barreto IC, Maciel WQ, Rosa FP, Rocha-Leão MH, Werckmann J, *et al*. Ultrastructure of regenerated bone mineral surrounding hydroxyapatite–alginate composite and sintered hydroxyapatite. *Bone*. 2012 jan; 50(1):301–10.

13. Chiu C-K, Lee DJ, Chen H, Chow LC, Ko C-C. In-situ hybridization of calcium silicate and hydroxyapatite-gelatin nanocomposites enhances physical property and in vitro osteogenesis. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. fevereiro de 2015 jan; 26(2). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-015-5456-9>
14. Desterro F de P, Sader MS, Soares GDA, Vidigal Jr GM. Can Inorganic Bovine Bone Grafts Present Distinct Properties? *Braz Dent J*. 2014; 25(4):282–8.
15. Sollazzo V, Palmieri A, Scapoli L, Martinelli M, Girardi A, Alviano F, et al. Bio-Oss® acts on Stem cells derived from Peripheral Blood. *Oman Med J*. 2010 jan; 25(1):26–31.
16. Lussani FC, Vescovi RF da C, Souza TD de, Leite CAP, Giles C. A versatile x-ray microtomography station for biomedical imaging and materials research. *Rev Sci Instrum*. 2015 jun; 86(6):063705.
17. Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*. 2010 jan; 50(1):2–13.
18. Laperre K, Depypere M, van Gastel N, Torrekens S, Moermans K, Bogaerts R, et al. Development of micro-CT protocols for in vivo follow-up of mouse bone architecture without major radiation side effects. *Bone*. 2011 oct; 49(4):613–22.
19. Mizutani R, Suzuki Y. X-ray microtomography in biology. *Micron*. 2012 feb; 43(2–3):104–15.
20. Moreno-Atanasio R, Williams RA, Jia X. Combining X-ray microtomography with computer simulation for analysis of granular and porous materials. *Particuology*. 2010 apr; 8(2):81–99.
21. Birkhold AI, Razi H, Weinkamer R, Duda GN, Checa S, Willie BM. Monitoring in vivo (re)modeling: A computational approach using 4D microCT data to quantify bone surface movements. *Bone*. 2015 jun; 75:210–21.
22. Faot-F, Chatterjee-M, Camargos G-V, Duyck-J, Vandamme-K. Micro-CT analysis of the rodent jaw bone micro-architecture: A systematic review. *Bone Rep*. 2015 jun; 2:14–24.
23. Oryan A, Alidadi S, Bigham-Sadegh A, Moshiri A. Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2016 oct; 27(10). Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-016-5766-6>
24. Santana WM de, Sousa DN de, Ferreira VM, Duarte WR. Simvastatin and biphasic calcium phosphate affects bone formation in critical-sized rat calvarial defects. *Acta Cir Bras*. 2016 may; 31(5):300–7.
25. Moshaverinia A, Ansari S, Chen C, Xu X, Akiyama K, Snead ML, et al. Co-encapsulation of anti-BMP2 monoclonal antibody and mesenchymal stem

- cells in alginate microspheres for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2013 sep; 34(28):6572–9.
26. Lee JH, Ryu MY, Baek H-R, Lee KM, Seo J-H, Lee H-K. Fabrication and Evaluation of Porous Beta-Tricalcium Phosphate/Hydroxyapatite (60/40) Composite as a Bone Graft Extender Using Rat Calvarial Bone Defect Model. *Sci World J*. 2013; 2013:1–9.
 27. Hamidabadi H, Shafaroudi M, Seifi M, Bojnordi M, Behruzi M, Gholipourmalekabadi M, *et al*. Repair of Critical-Sized Rat Calvarial Defects With Three-Dimensional Hydroxyapatite-Gelatin Scaffolds and Bone Marrow Stromal Stem Cells. *Med Arch*. 2018; 72(2):88.
 28. Georgopoulou A, Papadogiannis F, Batsali A, Marakis J, Alpantaki K, Eliopoulos AG, *et al*. Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*. 2018 may 5; 29(5):59.
 29. Oliveira I, Carvalho AL, Radhouani H, Gonçalves C, Oliveira JM, Reis RL. Promising Biomolecules. *In: Oliveira JM, Pina S, Reis RL, San Roman J, organizadores. Osteochondral Tissue Engineering*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 189–205.
 30. Fayyazbakhsh F, Solati-Hashjin M, Keshtkar A, Shokrgozar MA, Dehghan MM, Larijani B. Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study. *Mater Sci Eng C*. 2017 jul; 76:701–14.
 31. Chang H-C, Yang C, Feng F, Lin F-H, Wang C-H, Chang P-C. Bone morphogenetic protein-2 loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres enhance osteogenic potential of gelatin/hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate cryogel composite for alveolar ridge augmentation. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi*. 2017 dec; 116(12):973–81.
 32. Kanda N, Anada T, Handa T, Kobayashi K, Ezoe Y, Takahashi T, *et al*. Orthotopic Osteogenicity Enhanced by a Porous Gelatin Sponge in a Critical-Sized Rat Calvaria Defect. *Macromol Biosci*. 2015 dec; 15(12):1647–55.
 33. Su K, Wang C. Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnol Lett*. 2015 nov; 37(11):2139–45.
 34. Yin B, Ma P, Chen J, Wang H, Wu G, Li B, *et al*. Hybrid Macro-Porous Titanium Ornamented by Degradable 3D Gel/nHA Micro-Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2016 apr; 17(4):575.
 35. Johari B, Ahmadzadehzarajabad M, Azami M, Kazemi M, Soleimani M, Kargozar S, *et al*. Repair of rat critical size calvarial defect using osteoblast-like and umbilical vein endothelial cells seeded in gelatin/hydroxyapatite scaffolds: Repair of Rat Critical Size Calvarial Defect. *J Biomed Mater Res A*. 2016 jul; 104(7):1770–8.

36. Yang CY, Chiu CT, Chang YP, Wang YJ. Fabrication of Porous Gelatin Microfibers Using an Aqueous Wet Spinning Process. *Artif Cells Blood Substit Biotechnol.* 2009 jan; 37(4):173–6.
37. Ge F, Zhu L, Yang L, Li W, Wei S, Tao Y, *et al.* The Soluble and Particulate Form of Alginates Positively Regulate Immune Response. *Iran J Immunol.* 2018 jul; 15(3):228–38.
38. Catanzano O, D'Esposito V, Acierno S, Ambrosio MR, De Caro C, Avagliano C, *et al.* Alginate-hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process. *Carbohydr Polym.* 2015 oct; 131:407–14.
39. Diaz-Rodriguez P, Garcia-Triñanes P, Echezarreta López MM, Santoveña A, Landin M. Mineralized alginate hydrogels using marine carbonates for bone tissue engineering applications. *Carbohydr Polym.* 2018 sept; 195:235–42.
40. Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang K-H, Kim S-K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review. *Int J Biol Macromol.* janeiro de 2015 jan; 72:269–81.
41. Stagnaro P, Schizzi I, Utzeri R, Marsano E, Castellano M. Alginate-polymethacrylate hybrid hydrogels for potential osteochondral tissue regeneration. *Carbohydr Polym.* 2018 apr; 185:56–62.
42. Saltz A, Kandalam U. Mesenchymal stem cells and alginate microcarriers for craniofacial bone tissue engineering: A review. *J Biomed Mater Res A.* 2016 may; 104(5):1276–84.
43. Zhang Y, Wang J, Ma Y, Niu X, Liu J, Gao L, *et al.* Preparation and biocompatibility of demineralized bone matrix/sodium alginate putty. *Cell Tissue Bank.* 2017 jun; 18(2):205–16.
44. Zheng A, Cao L, Liu Y, Wu J, Zeng D, Hu L, *et al.* Biocompatible silk/calcium silicate/sodium alginate composite scaffolds for bone tissue engineering. *Carbohydr Polym.* 2018 nov; 199:244–55.
45. Bi L, Jung S, Day D, Neidig K, Dusevich V, Eick D, *et al.* Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds: Rat Calvarial Defects Implanted With Bioactive Glass Scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 2012 dec; 100A(12):3267–75.
46. Guimarães KB, Vasconcelos BCE, Limeira Júnior FA, Sousa FB, Andrade ES de S, Vasconcelos RJH. Histomorphometric evaluation of calcium phosphate bone grafts on bone repair. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2011 aug; 77(4):447–54.
47. Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dent Mater.* 2011 jan; 27(1):61–70.
48. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg.* 2014 dec; 13(4):464–70.

49. Liu H, Cheng J, Chen F, Bai D, Shao C, Wang J, *et al.* Gelatin functionalized graphene oxide for mineralization of hydroxyapatite: biomimetic and in vitro evaluation. *Nanoscale*. 2014; 6(10):5315.
50. Florczyk SJ, Leung M, Li Z, Huang JI, Hopper RA, Zhang M. Evaluation of three-dimensional porous chitosan-alginate scaffolds in rat calvarial defects for bone regeneration applications: Chitosan-Alginate Scaffolds for Bone Regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2013 oct; 101(10):2974–83.
51. Cardoso DA, Ulset A-S, Bender J, Jansen JA, Christensen BE, Leeuwenburgh SCG. Effects of Physical and Chemical Treatments on the Molecular Weight and Degradation of Alginate-Hydroxyapatite Composites: Effects of Physical and Chemical Treatments on the Molecular *Macromol Biosci*. 2014 jun; 14(6):872–80.
52. Boateng J, Burgos-Amador R, Okeke O, Pawar H. Composite alginate and gelatin based bio-polymeric wafers containing silver sulfadiazine for wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2015 aug; 79:63–71.
53. García-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015 dec; 81:112–21.
54. Koshy ST, Ferrante TC, Lewin SA, Mooney DJ. Injectable, porous, and cell-responsive gelatin cryogels. *Biomaterials*. 2014 mar; 35(8):2477–87.
55. Samadikuchaksaraei A, Gholipourmalekabadi M, Erfani Ezadyar E, Azami M, Mozafari M, Johari B, *et al.* Fabrication and in vivo evaluation of an osteoblast-conditioned nano-hydroxyapatite/gelatin composite scaffold for bone tissue regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2016; 104(8):2001–10.
56. Ezirganlı Ş, Kazancıoğlu HO, Mihmanlı A, Aydın MŞ, Sharifov R, Alkan A. The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2014 aug; 25(8):969–76.

ANEXO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado ***"REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS COM O USO DE HIDROXIAPATITA ASSOCIADA A ALGINATO E GELATINA (HAALGGEL)"***, protocolo nº 27/2016, sob a responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). **Joni Augusto Cirelli** – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 13/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Dezembro/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato – Rattus Norvegicus Wistar
Nº de animais	32
Peso/Idade	350-450 g /4-5 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
 Coordenador da CEUA