

3. Compósitos de colagénio/apatite de origem marinha para aplicação em engenharia de tecidos mineralizados.

G.S. Diogo^{1,2}, M. Almeida^{1,2}, E. López-Senra³, R.P. Pirraco^{1,2}, R.I. Pérez-Martín⁴,
C.G. Sotelo⁴, J. Serra³, P. González³, T.H. Silva^{1,2} and R.L. Reis^{1,2,5}

¹3B's Research Group, I3B's – Research Institute on Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics of University of Minho, Guimarães, Portugal.

²ICVS/3B's—PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

³New Materials Group, Department of Applied Physics, Instituto de Investigación Sanitaria Galicia Sur IISGS, University of Vigo, Vigo, Spain.

⁴Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Vigo, Spain.

⁵The Discoveries Centre for Regenerative and Precision Medicine, University of Minho, Guimarães, Portugal.

gabriela.carlos@i3bs.uminho.pt
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3961355>

Devido ao aumento de lesões associadas ao envelhecimento da população, a regeneração do tecido ósseo tem sido alvo de estudo. Apesar da vasta investigação neste sentido, os auto-enxertos continuam a prevalecer como tratamento de primeira linha, apesar das suas limitações.

A extração de compostos de recursos marinhos para uso em abordagens de engenharia de tecidos emerge como uma alternativa promissora para regeneração de lesões ósseas. Neste capítulo apresenta-se um biomaterial promissor para aplicação em engenharia de tecidos duros tendo como base uma estratégia de valorização de sub-produtos marinhos, nomeadamente pele e dentes de tubarão.

1. Introdução

O aumento da esperança média de vida e o conseqüente aumento da incidência de lesões associadas ao tecido ósseo tem motivado a procura por estratégias mais eficazes para este desafio terapêutico. Apesar de existirem diversas abordagens na reparação destas lesões, como os enxertos, estas apresentam-se associadas a um elevado risco de rejeição, infeção e dor, sendo por isso necessário encontrar alternativas (Lichte et al., 2011).

A engenharia de tecidos e o desenvolvimento de matrizes tridimensionais (3D), biocompatíveis e biodegradáveis, emergem como alternativas promissoras uma vez que conferem propriedades mecânicas e biológicas capazes de mimetizar a composição e estrutura nativa do tecido ósseo, promovendo a adesão e proliferação celular necessárias para a regeneração do mesmo. Apesar dos progressos atingidos, não existe ainda uma abordagem que garanta completamente a complexidade necessária para essa regeneração e que permita ultrapassar as várias dificuldades até à transição para a prática clínica. Neste sentido, existe uma procura cada vez maior por novos materiais e técnicas de processamento no sentido de desenvolver estruturas com elevado nível de complexidade e aplicabilidade (Maia et al., 2019).

Diversos polímeros e cerâmicos naturais ou sintéticos têm sido amplamente explorados para produzir estas estruturas. No entanto, a reduzida biocompatibilidade de compostos de origem sintética e o risco de imunogenicidade associado aos compostos extraídos de mamíferos têm levantado questões de sustentabilidade.

Assim, os recursos marinhos surgem como uma alternativa promissora para obtenção destes compostos, apresentando várias vantagens. Não estão associados a doenças de origem mamífera (como a BSE) ou, até ao momento, à transmissão de outro tipo de doenças, ao mesmo tempo não apresentam restrições religiosas (Silva et al., 2012). Além disso, alguns dos materiais de origem marinha mais relevantes para a área biomédica podem ser isolados de sub-produtos de pesca, a baixo custo, criando valor a produtos considerados resíduos para a indústria de

transformação de peixe, representando uma oportunidade com enorme potencial trípico – tecnológico, económico e ambiental – e, ao mesmo tempo, contribuindo para uma exploração sustentável dos recursos marinhos. Por exemplo, materiais provenientes de peixe têm uma grande quantidade de compostos bioativos com potencial para ser usado em aplicações na área da saúde. Entre estes, o colagénio e fosfatos de cálcio obtidos de pele e osso (“espinha”) de peixe, respectivamente, representam os compostos mais abundantes e dos mais explorados (Kim e Mendis, 2006).

O colagénio é uma das principais proteínas estruturais encontrada em tecidos animais, como estruturas ósseas e cartilágneas, sendo um dos polímeros mais utilizados em engenharia de tecidos, tendo sido já demonstradas diversas aplicações do colagénio marinho no desenvolvimento de materiais biomédicos (Silva et al., 2014). Por exemplo, colagénio isolado de pele de salmão foi mineralizado e utilizado para a produção de compósitos 3D e colagénio extraído de tubarão foi usado na preparação de hidrogéis, tendo sido demonstrada a capacidade destas estruturas para regeneração de tecido ósseo e cartilagem, respectivamente (Hoyer et al., 2012, Fernandes-Silva et al., 2013).

Os fosfatos de cálcio de origem marinha têm excelentes propriedades para aplicação em tecidos duros, dada a sua semelhança à composição mineral do tecido ósseo humano. Este é maioritariamente composto por fosfatos de cálcio sob a forma de hidroxiapatite, 60 a 70% do peso do osso, e a parte restante maioritariamente colagénio, sendo que ambos são importantes para conferir flexibilidade e resistência à compressão (Reznikov et al., 2014). Recentemente demonstrou-se que fosfatos de cálcio obtidos de dentes de tubarão azul apresentam propriedades interessantes dado que são compostos por hidroxiapatite, o cerâmico mais utilizado em regeneração de tecido duro, mas também têm fluorapatite. A presença de flúor, bem como de outros elementos como magnésio e estrôncio, conferem pistas químicas que estimulam a atividade de células osteoblásticas (López-Álvarez et al., 2016).

A presença de iões destes elementos em partículas de bioapatite marinha, e a incorporação destas partículas numa matriz de colagénio marinho tipo I, a proteína mais abundante em tecidos duros, obtidos do mesmo recurso marinho, pode ser uma combinação ideal para produção de estruturas com bom desempenho na regeneração de tecidos duros, sendo relevante proceder a esta avaliação.

2. Desenvolvimento de compósitos de colagénio e bioapatite de origem marinha

2.1. Obtenção e caracterização de materiais de subprodutos da pesca de tubarão

Numa perspetiva de valorização de subprodutos marinhos sugeriu-se a preparação de estruturas 3D combinando colagénio extraído da pele de tubarão (*Prionace glauca*) e bioapatite extraída de dentes de tubarão (*Prionace glauca* e *Isurus oxyrinchus*).

Resumidamente, iniciou-se o processo de extração de colagénio com um pré-tratamento das peles de tubarão com uma solução alcalina de hidróxido de sódio para garantir uma maior purificação da amostra (remoção de proteínas não colagenosas). Seguidamente, extraiu-se o colagénio por solubilização numa solução de ácido acético e prosseguiu-se com a diálise da solução resultante, finalizando-se o processo com liofilização. Para determinar o tipo de colagénio obtido foi realizada uma análise do perfil proteico confirmando-se que o colagénio extraído é maioritariamente colagénio tipo I, o mais abundante na pele de organismos marinhos (Sotelo et al., 2015).

Para a obtenção da bioapatite utilizaram-se dentes provenientes de duas espécies de tubarão, *Isurus oxyrinchus* e *Prionace glauca*; a sua caracterização foi efetuada em estudos anteriores a este trabalho por López-Álvarez *et al.* (López-Álvarez et al., 2016, 2017). O processo consistiu na limpeza manual dos dentes para eliminação de restos de tecidos orgânicos, seguindo-se trituração para redução de tamanho das amostras, calcinação (a 950 °C) para remoção da parte orgânica e finalmente peneiração para obtenção de partículas com dimensão controlada. Estas foram então analisadas recorrendo a uma combinação de diferentes técnicas de caracterização (difração de raios-X (XRD), microscopia electrónica de varrimento (SEM) e espectrometria de emissão ótica por plasma (ICP-OES)). As partículas resultantes apresentaram um tamanho médio de poro de 50 µm, constituído por duas fases: fase apatítica (65-70%, hidroxiapatite e fluorapatite) e não apatítica (25-30% de whitlockite e fosfato tricálcico (TCP)) e compostas por cálcio (Ca), fósforo (P) na forma de fosfato, seguido por flúor (F), sódio (Na) e magnésio (Mg). Esta composição revelou elevada semelhança com fosfatos de cálcio extraídos de outros organismos marinhos, como espinhas de bacalhau (Piccirillo et al., 2013). Comparando a composição elementar dos dentes de tubarão com a do osso humano, pode-se observar uma maior concentração dos elementos Ca, P, F e Na nas apatites de origem marinha (Kokubo et al., 2003).

2.2. Combinação de colagénio e bioapatite de origem marinha para produção de compósitos

Para a produção das estruturas tridimensionais solubilizou-se o colagénio extraído (mCol) e adicionou-se à solução as partículas de bioapatite provenientes de dentes de tubarão (mBAp), testando-se diferentes concentrações destes dois compostos (mCol:mBAp; 100:0; 70:30; 50:50 e 30:70). Analisou-se a influência de dois reticulantes, a diferentes concentrações, na formação e estabilidade das misturas: etil(dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS) (12,5 e 25%) e hexametilendiisocianato (HMDI) (1 e 5%). Os compósitos de colagénio e bioapatite foram produzidos por congelamento e liofilização obtendo-se esponjas porosas (Fig. 3.1). Esta técnica permite a formação de cristais durante o congelamento das misturas, com o tamanho e forma previamente definida, que por sublimação durante a liofilização dão origem a poros, originando assim uma estrutura porosa.



FIGURA 3.1. Compósitos de colagénio e bioapatite.

2.2.1 Avaliação da estabilidade e desempenho biológico

De forma a analisar a viabilidade das estruturas produzidas para abordagens em engenharia de tecidos duros, efetuou-se XRD, SEM e microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT) para analisar a morfologia do material. Foram também efetuados testes para avaliar a sua resistência à compressão.

A estabilidade das estruturas, que permite inferir sobre a eficácia dos agentes reticulantes na reação de reticulação, foi medida macroscopicamente após incubação durante 14 dias a 37 °C

em meio de cultura, método que permite simular as condições de cultura a que estas estruturas serão sujeitas. Verificou-se que as estruturas beneficiaram da presença de partículas de bioapatite, em concordância com estudos anteriores que demonstraram que a incorporação de apatite na matriz de colagénio diminui a degradação das estruturas e aumenta as propriedades mecânicas, em comparação com estruturas apenas de colagénio (Johnson et al., 2011). Estes resultados foram confirmados também pelos ensaios de compressão que demonstraram o aumento das propriedades mecânicas com a incorporação de bioapatite (valores entre 75 a 400 Pa), embora abaixo das descritas para o osso humano (100–1000 MPa). No entanto, os ensaios de tensão-deformação mostraram materiais dúcteis, sugerindo propriedades interessantes para manuseamento em cirurgia e fixação no local do defeito (Kane et al., 2015). Verificou-se uma estabilidade semelhante para as estruturas reticuladas com as duas formulações de EDC/NHS e apenas para a estrutura reticulada com 5% HDMI. No entanto, observou-se perda da integridade estrutural com o aumento da concentração do reticulante EDC/NHS, confirmado por SEM como perda de porosidade.

A reconstrução tridimensional das estruturas revelou uma distribuição homogénea das partículas de bioapatite na matriz de colagénio, mostrando a viabilidade da metodologia usada para a produção dos compósitos e confirmou que o aumento da concentração dos agentes reticulantes diminui o tamanho do poro, porosidade e interconectividade. Esta análise evidenciou também estruturas mais compactas com o reticulante EDC/NHS, sendo este mais eficaz na reticulação de estruturas com colagénio.

Assim, considerando os resultados da estabilidade e reconstrução tridimensional, prosseguiu-se para a análise do desempenho biológico com as estruturas reticuladas com 12,5% EDC/NHS e com 5% HDMI. Estas mostraram um tamanho de poro adequado ($>100\mu\text{m}$) para promover a adesão, migração e proliferação celular e porosidade próxima da porosidade do osso (cerca de 80%) (Jones et al., 2009).

Seguiu-se a avaliação biológica para determinar a natureza bioactiva das estruturas produzidas, após incubação em fluido corporal simulado (SBF). Imagens obtidas por SEM dos compósitos reticulados com 12,5% EDC/NHS e 5% HDMI, após 14 dias de incubação em SBF, mostram deposição de minerais nas estruturas que combinam colagénio e bioapatite, revelando a natureza bioactiva das estruturas produzidas com a incorporação deste cerâmico (Johnson et al., 2011) (Fig. 3.2).

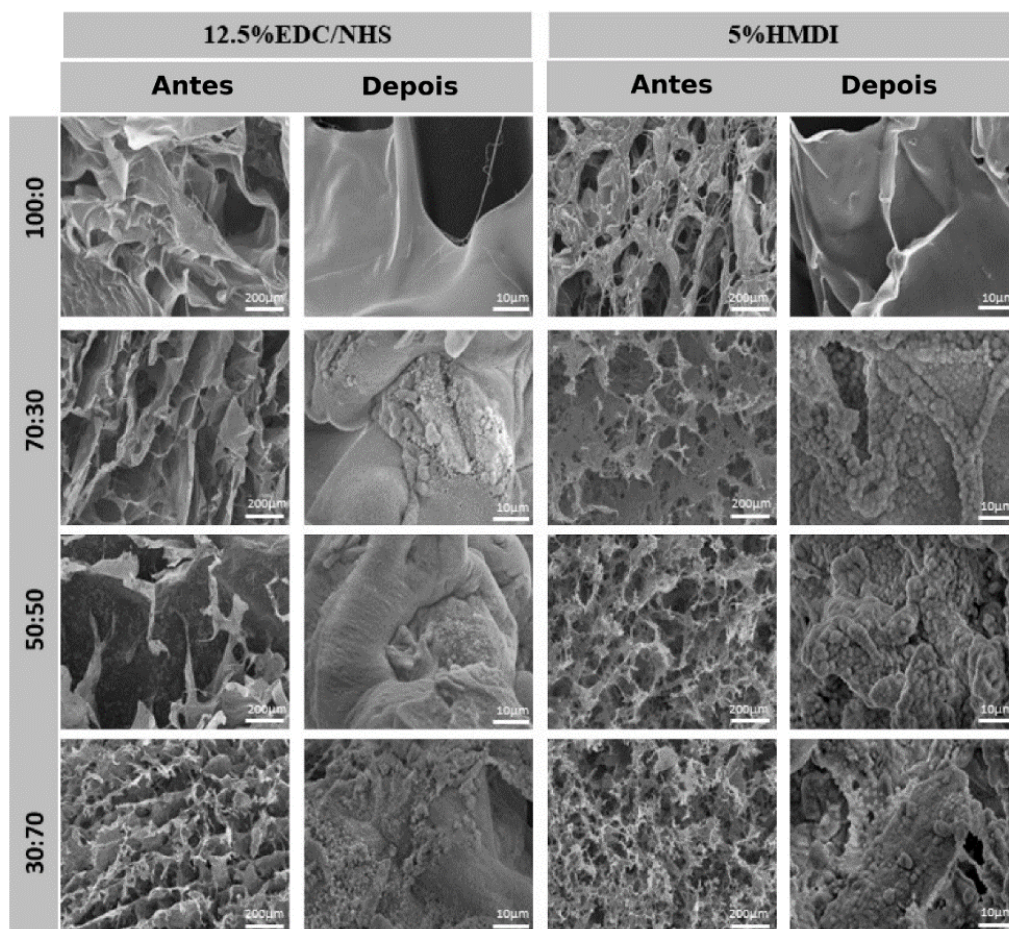


FIGURA 3.2. Imagens obtidas por microscopia electrónica (SEM) dos compósitos produzidos com diferentes rácios de colagénio e bioapatite e reticulados com formulações diferentes de EDC/NHS e HMDI antes e após 14 dias de incubação em fluido corporal simulado (SBF).

Para avaliar a citotoxicidade e desempenho biológico selecionou-se uma linha celular de osteoblastos, Saos-2, e colocou-se em contacto com as estruturas produzidas. A análise mostrou maior atividade metabólica nas misturas reticuladas com 12,5% EDC/NHS, com resultados semelhantes para as diferentes formulações testadas (Fig. 1.3) e células viáveis após 72 horas em contacto com estas estruturas.

Sumariando, das várias formulações testadas considerando os dois agentes reticulantes e os dois materiais, a avaliação conjunta da integridade estrutural e da actividade metabólica das células demonstrou que os compósitos beneficiaram com a incorporação de bioapatite, e que os sistemas reticulados com 12,5% EDC/NHS foram os que apresentaram melhores propriedades estruturais e biológicas, nomeadamente estruturas coesas, com maior porosidade, tamanho do poro e interconectividade. A maior área disponível promove a adesão e migração de

osteoblastos, facilitando o crescimento e proliferação das células e a capacidade de induzir a mineralização, ao mesmo tempo que um estrutura coesa exibe maior resistência à compressão.

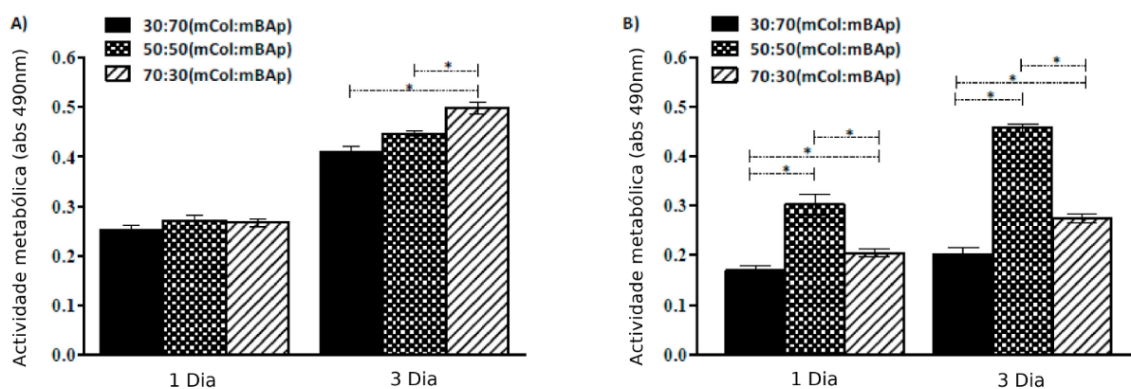


FIGURA 3.3. Actividade metabólica de linhas celulares osteoblásticas humanas (Saos-2) avaliada após contacto com os compósitos de colagénio (Col) e bioapatite (BAP) reticulados com A) 12,5% EDC/NHS e B) 5% HDMI.

2.2.2 Ensaios *in vivo*

Apesar do aumento de estudos que reportam o desenvolvimento de estruturas com colagénio de origem marinha, são poucos os que apresentam resultados *in vivo* da avaliação do seu desempenho em modelos animais. Geralmente, o colagénio extraído de organismos marinhos, nomeadamente de peixes, é caracterizado por uma temperatura de desnaturação baixa relativamente ao extraído de outras fontes, o que tem vindo a limitar o seu uso em experiências *in vivo* devido à grande probabilidade de desnaturação à temperatura fisiológica do modelo animal selecionado (Alves et al., 2017; Miki et al., 2015). Contudo, diferentes técnicas de processamento têm vindo a ser exploradas de modo a aumentar a sua estabilidade térmica. Hassanbhai e colaboradores (2017) demonstraram que o uso do reticulante glutaraldeído influenciou a estabilidade das membranas criadas por electrofiação, nomeadamente na temperatura de desnaturação que foi consideravelmente maior quando comparada com o produto Bio-Gide® (membranas de colagénio com origem porcina, comercializadas pela empresa Suíça Geistlich Pharma). As membranas não apresentaram citotoxicidade, ainda que *in vivo* tenham sofrido uma degradação mais rápida (Hassanbhai et al., 2017).

Prosseguiu-se com a avaliação *in vivo* das estruturas desenvolvidas com colagénio e bioapatite de tubarão, para avaliar a sua capacidade de promover a regeneração de tecido ósseo. Para tal, estruturas preparadas com diferentes formulações de colagénio e bioapatite foram produzidas e

implantadas em animais com defeitos induzidos nos joelhos direito e esquerdo durante 12 semanas. As estruturas foram preparadas com tamanho adequado aos defeitos induzidos nos animais, utilizando as seguintes formulações: colagénio extraído da pele de tubarão e fosfatos de cálcio extraídos dos dentes (mCol:mBap (30:70), Grupo I)), colagénio extraído de pele de bovino com hidroxiapatite obtida comercialmente (bCol:cAp (30:70), Grupo II)), apenas colagénio marinho (mCol, Grupo III) e um grupo que serviu de controlo (animais com defeito mas sem implantação de estruturas, Grupo IV).

A regeneração do defeito foi analisada recorrendo à técnica de μ -CT e os resultados preliminares mostram diferenças entre os diferentes grupos testados, sendo de realçar que a região sem tecido ósseo (onde tinha sido criado o defeito) nos animais pareceu diminuir de tamanho para as condições que combinam colagénio com fosfatos de cálcio, independentemente da fonte (grupos I e II) (Fig. 3.4), o que poderá ser indicativo da capacidade dos referidos biomateriais para estimular a regeneração dos tecidos nessa região. O trabalho prossegue com a análise histológica para avaliar a resposta inflamatória, a formação de novo osso e a produção de colagénio, no sentido de propor um novo biomaterial para regeneração de osso, perspetivando a sua utilização em estratégias de engenharia de tecidos e medicina regenerativa.

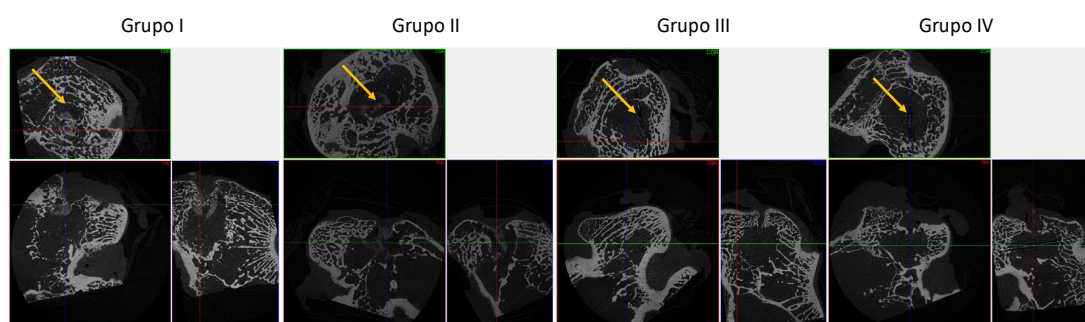


FIGURA 3.4. Imagens 2D obtidas por microtomografia computadorizada de raios-X (μ -CT). Grupo I (mCol:mBap), Grupo II (bCol:cAp), Grupo III (mCol) e Grupo IV (defeito vazio). Seta de cor amarela realça a área do defeito.

3. Conclusão

Os organismos marinhos emergem como uma fonte atrativa para obtenção de compostos bioativos, apesar do processamento destes compostos com elevado grau de pureza e a baixo custo constituir atualmente um desafio. Neste trabalho conseguiu-se produzir estruturas estáveis e bioativas com capacidade de suportar a cultura de osteoblastos e promover a regeneração de

tecido ósseo. O desenvolvimento de compósitos de colagénio/bioapatite a partir de subprodutos da indústria pesqueira, com viabilidade para abordagens terapêuticas em engenharia de tecidos duros é aqui sugerida, possibilitando ainda a combinação com células estaminais, perspetivando-se novos biomateriais e medicamentos de terapia avançada (*ATMP – Advanced Therapy Medicinal Products*) para aplicação clínica num novo paradigma de Medicina Regenerativa.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro recebido da União Europeia através do Programa INTERREG—POCTEP, no âmbito dos Projetos 0687_NOVOMAR_1_P e 0245_IBEROS_1_E, através do Programa de cooperação transnacional Espaço Atlântico, no âmbito do Projeto MARMED (2011-1/164) e através do 7º Programa-Quadro de Investigação e Desenvolvimento Tecnológico (FP7), através do Projeto POLARIS (REGPOT-CT2012-316331). Os autores gostariam de agradecer também ao Centro Tecnológico del Mar (CETMAR, Vigo, Espanha) e COPEMAR SA (Espanha) pelo fornecimento dos subprodutos de tubarão. G.S.D agradece ao Programa Norte2020 (Portugal2020) pela bolsa de doutoramento (NORTE-08-5369-F SE-000044) e R.P. agradece à Fundação para a Ciência e a Tecnologia pelo contrato IF/00347/2015.

Referências bibliográficas

- Alves A., Marques A.L.P., Martins E., Silva T.H., Reis R.L. (2017) Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. *Cosmetics*, 4: 39.
- Fernandes-Silva S., Moreira-Silva J., Silva T.H., Perez-Martin R.I., Sotelo C.G., Mano J.F., Duarte A.R.C., Reis R.L. (2013) Porous hydrogels from shark skin collagen crosslinked under dense carbon dioxide atmosphere. *Macromol. Biosci.*, 13: 1621–1631.
- Hassanbhai A.M., Lau C.S., Wen F., Jayaraman P., Goh B.T., Yu N., Teoh S.H. (2017) In Vivo Immune Responses of Cross-Linked Electrospun *Tilapia* Collagen Membrane. *Tissue Eng. Part A*, 23 (19-20): 1110-1119.
- Hoyer B., Bernhardt A., Heinemann S., Stachel I., Meyer M., Gelinsky M. (2012) Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 13: 1059–1066.

Johnson A.J.W., Herschler B.A. (2011) A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater.*, 7: 16–3.

Jones A.C., Arns C.H., Hutmacher D.W., Milthorpe B.K., Sheppard A.P., Knackstedt M.A. (2009) The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*, 30: 1440–1451.

Kane R.J., Weiss-Bilka H.E., Meagher M.J., Liu Y., Gargac J.A., Niebur G.L., Wagner D.R., Roeder, R.K. (2015) Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater.*, 17: 16–25.

Kim S.-K., Mendis E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts—Review. *Food Res. Int.*, 39: 383–393.

Kokubo T., Kim H.-M., Kawashita M. (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24: 2161–2175.

Lichte P., Pape H., Pufe T., Kobbe P., Fischer H. (2011) Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*, 42: 569–573.

López-Álvarez M., Pérez-Davila S., Rodríguez-Valencia C., González P., Serra J. (2016) The improved biological response of shark tooth bioapatites in a comparative in vitro study with synthetic and bovine bone grafts. *Biomed. Mater.*, 11: 035011.

López-Álvarez M., Vigo E., Rodríguez-Valencia C., Outeiriño-Iglesias V., González P., Serra J. (2017) In vivo evaluation of shark teeth-derived bioapatites. *Clin. Oral Implants Res.*, 28: e91–e100.

Maia R.F., Correló V.M., Oliveira, J.M., Reis, R.L. (2019) Natural Origin Materials for Bone Tissue Engineering. In: *Principles of Regenerative Medicine*. Atala A, Lanza R., Mikos A.G, Nerem R. (Eds), Academic Press, pp. 535-558.

Miki A., Inaba S., Baba T., Kihira K., Fukada H., Oda M. (2015) Structural and physical properties of collagen extracted from moon jellyfish under neutral pH conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79(10):1603-7.

Piccirillo C., Silva M., Pullar R., da Cruz I.B, Jorge R., Pintado M., Castro P.M. (2013)

Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Mater. Sci. Eng. C*, 33: 103–110.

Reznikov N., Shahar R., Weiner S. (2014) Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater.*, 10 (9): 3815-3826

Silva T.H., Alves A., Ferreira B., Oliveira J.M., Reys L., Ferreira R., Sousa R., Silva S., Mano J., Reis R.L. (2012) Materials of marine origin: A review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int. Mater. Rev.*, 57: 276–306.

Silva T.H., Moreira-Silva J., Marques A.L., Domingues A., Bayon Y., Reis R.L. (2014) Marine origin collagens and its potential applications. *Mar. Drugs*, 12: 5881–5901.

Sotelo C.G., Blanco Comesaña M., Ramos Ariza P., Pérez-Martín R.I. (2015) Characterization of collagen from different discarded fish species of the West coast of the Iberian Peninsula. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 25, 388–399.