

CRISTIANE CARNEIRO VITAL CINTRA

**HIDROXIAPATITA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE
COBALTO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção
do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges

Coorientadores: Fabrício Luciani Valente
Emily Correna Carlo Reis

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C575h
2020
Cintra, Cristiane Carneiro Vital, 1974-
Hidroxiapatita associada à nanopartículas de ferrita de
cobalto como sistema de liberação controlada de fármaco /
Cristiane Carneiro Vital Cintra. – Viçosa, MG, 2020.
144 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Andréa Pacheco Batista Borges.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Ortopedia veterinária. 2. Osteomielite. 3. Hidroxiapatita.
4. Nanopartículas. 5. Ossos - Regeneração. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.08967

CRISTIANE CARNEIRO VITAL CINTRA

HIDROXIAPATITA ASSOCIADA À NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE COBALTO COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 9 de outubro de 2020

Assentimento:

Cristiane Carneiro Vital Cintra
Autora

Andréa Pacheco Batista Borges
Orientadora

Dedicatória:
Dedico este trabalho aos meus filhos, Amanda e Daniel. Vocês são minha maior conquista! Amo vocês mais que tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Benedito e Lúcia, por todo amor e cuidado ao longo da minha vida, em especial, minha mãe que nos deixou durante o período do meu doutorado.

Ao meu marido Fábio, não somente pelo amor e incentivo, mas por todo o sacrifício feito por ele pra que além de me mudar pra Viçosa, eu tivesse as condições necessárias para eu conseguir me dedicar ao doutorado.

Aos meus filhos, por simplesmente existirem.

À minha orientadora Andréa, por sempre ter acreditado em mim, e mesmo após tantos anos do fim do meu mestrado, me receber novamente de braços abertos.

Aos meus Co orientadores Emily e Fabrício, pelos ensinamentos transmitidos, apoio e ajuda em momentos essenciais.

Ao professor José Lino do Departamento de Biologia, por não somente disponibilizar o microscópio para as fotos da histologia, como também pela ajuda prestada.

À professora Ana Cristina, da UFCG, por ter me dado a oportunidade de escrever, pela primeira vez, um capítulo de livro e também pela colaboração no artigo da biocompatibilidade.

À Pascally, pela colaboração essencial no artigo da biocompatibilidade.

À professora Cidinha, por toda a ajuda prestada com relação ao cultivo bacteriano.

Ao professor José Maurício, do Departamento de Solos, pela difração de Raios-X.

À JHS e LABSMAC, pelo material fornecido.

Ao núcleo de microscopia e microanálise da UFV, principalmente na pessoa de Cristiane Cesario, pelo auxílio com o MEV e microCT.

À Rosi, pelo carinho, atenção e disponibilidade.

Ao José de Oliveira, pela ajuda com a limpeza da coelheira.

Aos funcionários Maninha, Camilo e Claudiomiro, pela colaboração valiosa na fase cirúrgica do projeto.

Ao Cláudio e Adão, sempre atenciosos e pela ajuda na confecção das lâminas histológicas.

À minha querida amiga Fabrícia, por aceitar o desafio de ler minhas lâminas e também escutar os desabafos.

À Jéssica, pela ajuda valiosa na histologia.

À Mariana, Jéssica e Nívia pela ajuda na ativação das bactérias.

À Mariana pelo “teste de difusão em ágar”.

Aos meus colegas de pós-graduação, Dayana, Fabiana, Gabriela e André, pela amizade e ajuda em várias etapas deste trabalho. Em especial, agradeço à Dayana, que mesmo antes de eu ter sido aprovada para fazer o doutorado já estava me ajudando. E a Gabriela, que nem era da equipe, mas se dispôs inteiramente a me ajudar nas cirurgias. Sem ela teria sido muito mais difícil.

Ao Rodrigo Sepúlveda, pelo piloto que deu certo!

Aos estudantes de iniciação científica, Iara, Paula, Rafael e Breno, e os demais estudantes de graduação, Renata, Isabella e Pedro pela ajuda imprescindível nas cirurgias e cuidados com os animais.

Às colegas de pós-graduação Gabriela e Amanda pela amizade.

Às minhas funcionárias, Conceição e Bruna, sempre dedicadas, responsáveis e amorosas com meus filhos. Sem elas dando o suporte na minha casa, teria sido impossível!

À Eugênia, que também me socorreu quando precisei de alguém pra ficar com meus filhos.

Ao meu pai, por cuidar da parte das análises estatísticas e pelos conselhos.

Ao meu amigo Ítalo, pela amizade e dicas na confecção das pranchas de histologia e por ajudar a desvendar o Mendeley!

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

À UFV, onde me construí como profissional e também como pessoa, já que estudei na UFV desde os 15 anos de idade, quando ingressei no COLUNI.

Ao DVT, por tudo que vive dentro do departamento nesses anos.

A todos os professores que participaram da minha formação e que de alguma forma marcaram minha vida. Em especial, Andréa, Gonzaga, José Antônio, João Carlos, Cláudio Fonseca e professor Ricardo.

À todas as outras pessoas que de alguma forma participaram desse período, encorajando, escutando, me ajudando com meus filhos, estando perto e abençoando minha vida e minha família.

À Deus, que sempre me sustentou e me abençoou, permitindo que esse sonho se realizasse! À Ele, toda a Honra e toda a Glória, pra sempre!

RESUMO

VITAL CINTRA, Cristiane Carneiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2020. **Hidroxiapatita associada à nanopartículas de ferrita de cobalto como sistema de liberação controlada de fármaco**. Orientadora: Andréa Pacheco Batista Borges. Coorientadores: Emily Correna Carlo Reis e Fabricio Luciani Valente.

O objetivo principal deste trabalho foi testar e avaliar compósitos de hidroxiapatita associada à nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), como sistema de liberação do antibiótico ciprofloxacina, buscando a caracterização e utilização de um biomaterial, que promova liberação controlada de fármaco, para o tratamento da osteomielite seguida de uma regeneração óssea mais eficaz e em menor tempo. Foram utilizados compósitos preparados com hidroxiapatita comercial HAP-91[®], fabricada na JHS Laboratório Químico, e hidroxiapatita sintetizada no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LABSMAC) do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, sintetizadas utilizando nanopartículas de CoFe_2O_4 com o fármaco ciprofloxacina na concentração de 10%. As características físico-químicas dos biomateriais foram analisadas por meio das microscopias eletrônicas de varredura e da difração de raio-x. A confirmação da eficácia do antibiótico em inibir o crescimento bacteriano da cepa utilizada na indução da osteomielite foi testada *in vitro*. Foram realizados testes de biocompatibilidade *in vivo*. Após a realização dos testes supracitados, quatro biomateriais foram selecionados para o tratamento de infecção óssea induzida experimentalmente. Para isso, foram utilizados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 1 ano de idade e peso médio de 3,5 Kg, aleatoriamente distribuídos em cinco grupos com tamanho amostral igual a 6. Em todos os animais foi produzido um orifício córtico-medular na metáfise proximal do úmero para inoculo bacteriano de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* (cepas isoladas de mastite caprina). Após 15 dias, da inoculação bacteriana, os grupos iniciaram os tratamentos, com o desbridamento e implantação óssea dos biomateriais em procedimento cirúrgico. Em um dos grupos nenhum tipo de biomaterial foi implantado, tendo sido usado como controle. Aos dias 42 após a implantação dos compósitos, foram feitas análises radiográficas das lesões e os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica para a coleta de material para estudo histológico e tomografia microcomputadorizada. Os testes realizados com os biomateriais, mostraram que estes são biocompatíveis, degradáveis e eficazes como carreadores de drogas. O quadro de infecção óssea foi

induzido com sucesso nos animais, porém os biomateriais não pareceram exercer papel curativo, sendo que ao final do experimento, muitos animais ainda apresentavam um quadro compatível com osteomielite crônica. Com relação à formação óssea, não se observou diferença estatística significativa entre a quantidade de osso formado no grupo controle e nos grupos tratados.

Palavras-chave: Biomateriais. Regeneração Óssea. Osteomielite. Hidroxiapatita. Nanopartículas Magnéticas.

ABSTRACT

VITAL CINTRA, Cristiane Carneiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October 2020. **Hydroxyapatite associated with cobalt ferrite nanoparticles as a controlled drug release system.** Adviser: Andréa Pacheco Batista Borges. Co-advisers: Emily Correna Carlo Reis and Fabricio Luciani Valente.

The main objective of this study was to test and evaluate hydroxyapatite composites associated with cobalt ferrite nanoparticles (CoFe_2O_4) as a release system for the antibiotic ciprofloxacin, seeking the characterization and use of a biomaterial, which promotes controlled drug delivery, for the treatment of osteomyelitis followed by more effective bone regeneration in less time. Composites prepared with commercial hydroxyapatite HAP-91®, manufactured at JHS Laboratório Químico, and hydroxyapatite synthesized at the Laboratory of Ceramic Materials Synthesis (LABSMAC) of the Science and Technology Center of the Federal University of Campina Grande, were used, synthesized using nanoparticles of CoFe_2O_4 with the drug ciprofloxacin in 10% concentration. The physical-chemical characteristics of biomaterials were analyzed by scanning electron microscopy and X-ray diffraction. The confirmation of the antibiotic's efficacy in inhibiting bacterial growth of the strain used in osteomyelitis induction was tested in vitro. In vivo biocompatibility tests were performed. After the above tests, four biomaterials were selected for the treatment of experimentally induced bone infection. For that, 30 New Zealand rabbits with approximately 1 year of age and a mean weight of 3.5 kg, randomly distributed in five groups with sample size equal to 6, were used. In all animals, a cortico-medullary defect was produced in the proximal metaphysis of the humerus for bacterial inoculation of *Staphylococcus aureus* colony forming units (CFU) (isolated strains of goat mastitis). After 15 days of bacterial inoculation, the groups began treatment with debridement and bone implantation of biomaterials through a surgical procedure. In one of the groups no biomaterial was implanted and it was used as a control. On the 42nd day after the implantation of composites, radiographic analyses of the lesions were performed and the animals were euthanized by anesthetic overdose to collect material for histological study and micro computerized tomography. The tests performed with the biomaterials showed that they are biocompatible, degradable and effective as drug carriers. Bone infection was successfully induced in the animals, but the biomaterials did not seem to play a healing role, and at the end of the experiment, many animals still presented a condition compatible with chronic osteomyelitis.

Moreover, no statistically significant difference was observed between the amount of bone formed in the control group and in the treated groups.

Keywords: Biomaterials. Bone Regeneration. Osteomyelitis. Hydroxyapatite. Magnetic Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1- Cellular interactions with implanted surfaces in the living organism and osseointegration of implants.

Figure 1: Schematic of the interactions between cell and proteins adsorbed on the biomaterial surface. 23

Figure 2: Activation and migration of monocytes and the subsequent fusion of macrophages forming a giant foreign body cell. 26

Figure 3: Figure 3: Schematic diagram of osteoblastic cell adhesion process. (A) Integrins recognize RGD sequences and mediate the cell-biomaterial anchorage. Then, signs initiate the recruitment of cytoskeletal proteins resulting in the formation of focal adhesions. (B) Spreading: actin microfilaments and the cytoskeletal network rearrange and reshape cell morphology. 28

Capítulo 2- *In vitro* characterization of hydroxyapatite and cobalt ferrite biomaterials and their biocompatibility *in vivo*.

Figure 1: X-ray diffraction (XRD) of the hybrid composites: (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (HC); (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\gamma$ ($\text{C}\gamma$); (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (70:30)($\text{JCoFS}\gamma_1$); $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (70:30) ($\text{HCoFS}\gamma_1$); $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (50:50) ($\text{HCoFS}\gamma_2$) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (30:70) ($\text{HCoFS}\gamma_3$). 55

Figure 2: Photomicrographs of scanning electron microscopy of biomaterials (2000X magnification). (A) HCo1 (70:30) (B) HCo2 (50:50); (C) HCo3 (30:70); (D) JCo (70:30); (E) Co) and (F) HCo (70:30). 56

Figure 3: Petri plates showing the halos formed in the agar diffusion test. 56

Figure 4: Photomicrographs at 15 (A and B), 30 (C) and 70 (D, E and F) days after implantation of biomaterials. (A) $\text{HCo}\gamma_1$; (B) $\text{HCo}\gamma_2$; (C) $\text{HCo}\gamma_3$, (D) $\text{C}\gamma$; (E) and (F) HC. 57

Figure 5: Photomicrographs at 15 (A), 30 (B), 70 (C) and 100 (D) days after implantation of the materials. (A), (B) and (C) HC; (D) C. 58

Capítulo 3: Desenvolvimento de modelo experimental de falha óssea infectada no úmero de coelhos

Figura 1: (A) Defeito ósseo na cortical lateral do úmero direito; (B) Inoculação da solução contendo *S. aureus* no interior do canal medular através do defeito ósseo. 67

Figura 2: Exemplo de um dos gráficos e função linear obtidos a partir da análise do grau de cinza dos degraus do penetrômetro. 69

Figura 3: "Prints" da tela do computador do aparelho de μCT exemplificando o recurso subtração de região. 70

Figura 4: Radiografia do membro anterior direito na posição médio lateral de coelho obtida aos 15 dias após a indução da osteomielite	72
Figura 5: radiografias obtidas 15 dias após a indução da osteomielite.	76
Figura 6: Momento anterior à inoculação da solução contendo <i>S.aureus</i> , evidenciando o defeito ósseo e o sangramento proveniente do canal medular.	78
Figura 7: Radiografias obtidas no T2.	79
Figura 8: Imagens obtidas ao microtomógrafo.	80

Capítulo 4- Compósitos de hidroxiapatita e ferrita de cobalto como sistemas de liberação de ciprofloxacina em falha óssea infectada

Figura 1: Animal aos 15 dias de pós-operatório.	107
Figura 2: Radiografias do membro anterior direito na posição mediolateral no T1	108
Figura 3: Representação gráfica das médias da densidade óssea dos animais antes do primeiro procedimento cirúrgico (T0) e no momento imediatamente antes da cirurgia para indução do defeito ósseo (T1), com base no teste de Tukey, $p < 0,05$.	109
Figura 4: Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação da claudicação em escala de 0 a 2, durante sete dias após o T1.	110
Figura 5: Radiografias do membro anterior direito na posição mediolateral no T2 dos animais Co5 (A) e G1B (B).	112
Figura 6: Radiografias mediolaterais no T2 dos animais Co4 (A), G4E (B) e G2C (C).	113
Figura 7: Radiografias mediolaterais no T2 dos animais G1A (A) e G1E (B) no T2.	113
Figura 8: Radiografias do membro anterior direito na posição mediolateral no T2 dos animais G3A (A) e G4A (B).	114
Figura 9: Representação gráfica da média da densidade óssea dos animais antes da indução (T0), no momento imediatamente antes da cirurgia para instituição dos tratamentos (T1) e aos 42 dias de pós-operatório (T2).	115
Figura 10: Imagens obtidas ao microtomógrafo. Co2 (A); Co3 (B) e Co5 (C).	116
Figura 11: Imagens obtidas ao microtomógrafo. G1C (A); G2B (B); G3A (C) e G4F (D).	117

Figura 12: Imagens obtidas ao microtomógrafo. G1E (A) e (B); G2C (C) e G3E (D). 118

Figura 13: Boxplot mostrando a variação dos valores de Po.V nos grupos. 120

Figura 14: Boxplot mostrando os resultados estatísticos pelo teste de Kruskal-wallis do variável osso (A) e tecido conjuntivo (B). 123

Figura 15: Boxplot mostrando os resultados estatísticos pelo teste de Kruskal-wallis da quantidade de biomaterial presente em cada tratamento. 123

Figura 16: Fotomicrografias de animais tratados evidenciando a interação dos tecidos com os biomateriais. 127

Figura 17: fotomicrografias dos animais (A) G1E; (B) G3E e (C) G4F mostrando alterações significativas do tecido ósseo com perda do padrão trabecular, e da medula. 131

Figura 18: Fotomicrografias dos animais (A) e (B):Co6; (C): G4A; (D): G2C. 134

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2- *In vitro* characterization of hydroxyapatite and cobalt ferrite biomaterials and their biocompatibility *in vivo*.

Table 1: List of biomaterials, expressed in symbology and mass ratio.	48
Table 2: Crystallinity and crystallite size of hybrid composites.	48
Table 3: Biomaterials and the mean diameters of the halos formed around each of them.	48

Capítulo 3: Desenvolvimento de modelo experimental de falha óssea infectada no úmero de coelhos

Tabela 1: Número de poros fechados (Po.N), volume total de poros (Po.V) e porosidade total (PO) dos animais.	81
--	----

Capítulo 4: Hidroxiapatita associada à nanopartículas de ferrita de cobalto como sistema de liberação controlada de fármaco.

Tabela 1: Biomateriais utilizados e suas composições.	101
Tabela 2: Grupos experimentais e respectivos protocolos de tratamentos no T1.	101
Tabela 3: Valores das medianas e desvio-padrão da superfície óssea (BS), volume ósseo (BV) e reação periosteal (RP).	119
Tabela 4: Valores das medianas e desvio-padrão do número de poros fechados (Po.N), volume total de poros (Po.V) e porosidade total (PO).	119
Tabela 5: Valores das medianas (%) e desvio-padrão dos parâmetros observados em cada um dos grupos aos 42 dias após a implantação dos compósitos.	122
Tabela 6: Percentual de infiltrado inflamatório observado em cada um dos grupos tratados com os compósitos: (HCO γ 1); G2 (JCO γ); G3 (CO γ); G4 (HCO).	128

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 1	21
CELLULAR INTERACTIONS WITH IMPLANTED SURFACES IN THE LIVING ORGANISM AND OSSEOINTEGRATION OF IMPLANTS	21
Abstract:.....	21
Resumo:	21
Introduction	22
Protein adsorption.....	23
Macrophage Activation and Foreign Body Reaction (FBR).....	26
Implant Osseointegration	28
Conclusion:.....	32
Acknowledgements	32
Reference list	32
CAPÍTULO 2	38
<i>IN VITRO</i> CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE AND COBALT FERRITE NANOPARTICLES COMPOUNDS AND THEIR BIOCOMPATIBILITY <i>IN VIVO</i>	38
Abstract.....	38
1. Introduction.....	38
2. Material and Methods.....	40
2.1 Ethical aspects.....	40
2.2 Biomaterial.....	40
2.3 Characterization.....	40
2.4 Agar antibiotic diffusion test.....	41
2.5 Biocompatibility analysis of biomaterials in vivo.....	41
3. Results	42
3.1 Characterization.....	42
3.4 Agar diffusion test	43
3.5 <i>In vivo</i> biocompatibility	43
4. Discussion.....	44
4.1 Characterization.....	44
4.2 Agar diffusion test	45
4.5 <i>In vivo</i> biocompatibility	46
5. Conclusion	48
References.....	51
CAPÍTULO 3	60

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE FALHA ÓSSEA INFECTADA NO ÚMERO DE COELHOS.....	60
RESUMO	60
1 INTRODUÇÃO.....	61
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	61
2.1 Osteomielite.....	61
2.2 Indução experimental da osteomielite.....	65
3 MATERIAL E MÉTODOS:.....	66
3.1 Aspectos éticos.....	66
3.2 Indução da Osteomielite	67
3.3 Avaliação Clínica, radiográfica e densitometria radiográfica.....	68
3.4 Microtomografia computadorizada (μ CT).....	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	71
4.1 Indução da osteomielite	71
4.2 Avaliação clínica e radiográfica após a indução da osteomielite	74
4.3 Avaliação clínica e radiográfica após o segundo procedimento cirúrgico (T1)	77
4.3 Microtomografia computadorizada (μ CT).....	80
5- CONCLUSÕES:.....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
CAPÍTULO 4	88
COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA E FERRITA DE COBALTO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM FALHA ÓSSEA INFECTADA.....	88
RESUMO	88
1 INTRODUÇÃO.....	89
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	91
2.1 Biomaterial.....	91
2.2 Abordagens terapêuticas no tratamento da osteomielite	96
3 MATERIAL E MÉTODOS:.....	100
3.1 Aspectos éticos.....	100
3.2 Divisão do período experimental	100
3.3 Indução da Osteomielite	100
3.4 Tratamentos.....	101
3.5 Avaliação Clínica, radiográfica e densitometria radiográfica.....	103
3.6 Microtomografia computadorizada (μ CT).....	104
3.7 Análise histomorfométrica e histológica.....	104
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	105

4.1	Indução da osteomielite	105
4.2	Avaliação clínica e radiográfica após a indução da osteomielite	106
4.3	Avaliação clínica e radiográfica após a implantação dos biomateriais	110
4.3	Microtomografia computadorizada (μ CT).....	116
4.4	Histomorfometria.....	122
4.5	Histologia	128
5-	CONCLUSÕES:.....	135
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

INTRODUÇÃO GERAL

Biomateriais são substâncias de origem natural ou sintética, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, tratando, aumentando ou substituindo tecidos, órgãos ou restaurando funções comprometidas por processos degenerativos ou traumatismos (GUTIERRES et al., 2005; VON RECUM; LABERGE, 1995). No primeiro capítulo deste trabalho, é apresentada uma revisão de literatura na qual se procura descrever como ocorrem essas interações. Em outras palavras, como os biomateriais implantados em diversos tecidos suscitam respostas celulares e teciduais nos organismos vivos e também como ocorre a osseointegração de implantes.

Por sua importância na área médica, o desenvolvimento de novos tipos de biomateriais tem tido destaque, alavancando os estudos relacionados à engenharia tecidual ou bioengenharia que se utiliza de conhecimentos nas áreas de ciência dos materiais, biologia, química, medicina e engenharia para desenvolver novos produtos que restaurem, mantenham ou melhorem a função tecidual (GUO et al., 2015).

Particularmente, na ortopedia e odontologia, a utilização de biomateriais no reparo de partes danificadas do osso vem sendo revolucionária (CAMPANA et al., 2014; PARENT et al., 2017), tendo entre outros objetivos o de minimizar o uso de enxertos, tanto alógenos, quanto autógenos (CHIARELLO et al., 2013; GUTIERRES et al., 2005; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003; YAYLAOĞLU et al., 1999). Além disso, estes materiais também podem agir como carreadores de fármacos, o que permite a liberação da droga diretamente no tecido lesionado, sendo esta uma alternativa ao reduzido efeito terapêutico da administração parenteral de fármacos em locais pouco vascularizados (KUMAR; GOVINDAN; GIRIJA, 2014; OGAWA; PLEPIS, 2002; RAUSCHMANN et al., 2005). Dentre os vários materiais utilizados na atualidade, a hidroxiapatita (HAp) vem se destacando, por se tratar de uma material biocompatível e bioativo, ou seja, capaz de se ligar ao osso, permitindo o crescimento e diferenciação celular (BORGES et al., 2000; PARENT et al., 2017; SARATH CHANDRA et al., 2013).

Assim como a hidroxiapatita (HAp), as nanopartículas magnéticas também podem agir como transportadores de fármacos, sendo que em alguns casos, estas atuam promovendo sua liberação controlada no local da lesão através do uso de

campo magnético (GOPI et al., 2012). A síntese de nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas tem despertado a atenção nos últimos anos, especialmente em função das propriedades físicas e químicas que estes materiais apresentam (ABUDAYYAK; ALTINCEKIC GURKAYNAK; ÖZHAN, 2017; ARAÚJO et al., 2018; MAKSOUUD et al., 2019).

A incorporação de fármacos em biomateriais implantáveis e biodegradáveis apresenta a vantagem da liberação da droga diretamente no tecido alvo, sendo uma alternativa ao reduzido efeito terapêutico da administração parenteral de fármacos em locais pouco vascularizados, além de não requererem posterior cirurgia para remoção do material após a liberação da droga (OGAWA; PLEPIS, 2002). Sendo um material biocompatível, a HAp unida às nanopartículas magnéticas, forma um promissor dispositivo, com o potencial para ser usado no tratamento da osteomielite (ARAÚJO et al., 2018).

O capítulo dois deste trabalho descreve a caracterização e também o teste de biocompatibilidade *in vivo* de seis biomateriais constituídos de diferentes concentrações de nanopartículas de ferrita de cobalto e hidroxiapatita, acrescidos do fármaco ciprofloxacina. Os materiais testados, foram desenvolvidos com o objetivo de serem usados na terapia de quadros de infecção óssea (osteomielite).

A terapia de osteomielite representa um problema desafiador na medicina, já que apesar dos contínuos avanços nas técnicas de cirurgias ortopédicas e no tratamento, ela continua sendo uma patologia comum ao redor do mundo e que exige tratamento farmacológico prolongado. A osteomielite ocorre, muitas vezes, após infecções traumáticas ou em combinação com fatores predisponentes (SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014), o que justifica as pesquisas de novas formas de tratamento. O capítulo três, trata do desenvolvimento de uma técnica de indução experimental de osteomielite em coelhos. Devido às dificuldades descritas na literatura em se induzir essa patologia de forma experimental, este capítulo é importante por trazer uma alternativa eficaz e razoavelmente segura de se conseguir um modelo experimental de osteomielite crônica.

O capítulo quatro, trata da indução experimental de osteomielite em coelhos utilizando-se a técnica descrita no capítulo anterior, com o posterior tratamento utilizando-se quatro dos biomateriais apresentados no capítulo dois.

A proposta geral deste trabalho foi testar biomateriais constituídos de hidroxiapatita associados à nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4). Essa

associação funcionaria como um sistema de liberação controlada de drogas no tratamento da osteomielite, promovendo também uma regeneração óssea em menor tempo. Com isso, se tem uma alternativa segura e eficaz para o tratamento da osteomielite, inclusive na espécie humana, onde essa enfermidade ocorre com maior frequência.

REFERENCIAS

- ABUDAYYAK, M.; ALTINCEKIC GURKAYNAK, T.; ÖZHAN, G. In Vitro Toxicological Assessment of Cobalt Ferrite Nanoparticles in Several Mammalian Cell Types. **Biological Trace Element Research**, v. 175, n. 2, p. 458–465, 2017a.
- ARAÚJO, P. M. A. G. et al. Estudo do efeito da modificação de superfície de Fe₃O₄ e CoFe₂O₄ para aplicação como carreador de fármaco. **Cerâmica**, v. 64, n. 372, p. 466–476, 2018.
- BORGES, A. P. B. et al. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 616–620, 2000.
- CAMPANA, V. et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 10, p. 2445–2461, 2014.
- CHIARELLO, E. et al. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 25, n. 1 SUPPL., p. 101–103, 2013.
- GOPI, D. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 87, p. 245–250, 2012.
- GUO, B. et al. Functionalized scaffolds to enhance tissue regeneration. **Regenerative Biomaterials**, v. 2, n. 1, p. 47–57, 2015.
- GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153–162, 2005.
- KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, 2003.
- KUMAR, G. S.; GOVINDAN, R.; GIRIJA, E. K. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 31, p. 5052–5060, 2014.

MAKSOU, M. I. A. A. et al. **Antibacterial, antibiofilm, and photocatalytic activities of metals-substituted spinel cobalt ferrite nanoparticles**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2019. v. 127

OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. G. Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. **Polímeros**, v. 12, n. 2, p. 115–122, 2002.

PARENT, M. et al. Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 1–17, 2017.

RAUSCHMANN, M. A. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2677–2684, 2005.

SARATH CHANDRA, V. et al. Effect of irradiation of Si⁵⁺ ion on fe doped hydroxyapatite. **Advanced Materials Letters**, v. 4, n. 6, p. 438–443, 2013.

SCHLICKWEI, C. W.; YARAR, S.; RUEGER, J. M. Eluting antibiotic bone graft substitutes for the treatment of osteomyelitis in long bones. A review: Evidence for their use? **Orthopedic Research and Reviews**, v. 6, p. 71–79, 2014.

VON RECUM, A. F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. **Journal of applied biomaterials**, v. 6, n. 2, p. 137–144, 1995.

YAYLAOĞLU, M. B. et al. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. **Biomaterials**, v. 20, n. 8, p. 711–719, 1999.

CAPÍTULO 1 CELLULAR INTERACTIONS WITH IMPLANTED SURFACES IN THE LIVING ORGANISM AND OSSEOINTEGRATION OF IMPLANTS

Authors: Cristiane Carneiro Vital Cintra, Rodrigo Viana Sepúlveda, Fabrício Luciani Valente, Emily Correna Carlo Reis, Andréa Pacheco Batista Borges

Revista para publicação: Revista Saúde e Meio Ambiente ISSN: 2447-8822

CELLULAR INTERACTIONS WITH IMPLANTED SURFACES IN THE LIVING ORGANISM AND OSSEOINTEGRATION OF IMPLANTS

Abstract:

The surface of a biomaterial is a platform for cellular migration and growth. Every biomaterial, when implanted in vivo, causes cellular and tissue responses. These include inflammatory and foreign body reactions, wound healing response and formation of fibrous capsule to a greater or lesser degree around the implant. Tissue growth in the interface of an implanted structure is a highly complex phenomenon that involves a variety of factors, some of them related to biomaterial and include its microarchitecture, mechanical properties of the base material, topography and roughness, both on a micrometric and macrometric scale. Regarding bone tissue specifically, a structure with interconnected pores is critical to mimic the extracellular bone matrix. The size of pores, porosity and interconnectivity between them determines the performance of the material in functions such as cell fixation and nutrient diffusion. Characteristics of the implant surface, such as roughness and porosity significantly influence cell differentiation and consequently bone growth and osseointegration. The focus of this review article is on the interactions of proteins with the surface of biomaterials implanted in the organism and the consequent activation of macrophages and development of a foreign body reaction. In addition, we described the mechanisms related to osseointegration of implants.

Key words: biomaterial; foreign body reaction; macrophage; bone regeneration

INTERAÇÕES CELULARES COM SUPERFÍCIES IMPLANTADAS NO ORGANISMO VIVO E OSTEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES

Resumo:

A superfície de um biomaterial é uma plataforma para migração e crescimento celular. Todo biomaterial, quando implantado in vivo, causa respostas celulares e teciduais. Estas incluem reações inflamatórias e de corpo estranho, resposta de cicatrização de feridas e formação de cápsula fibrosa em algum grau ao redor do implante. O crescimento tecidual na interface de uma estrutura implantada é um fenômeno complexo que envolve uma variedade de fatores, alguns deles relacionados ao biomaterial e incluem sua microarquitetura, propriedades mecânicas do material de base, topografia e rugosidade, ambos em escala micrométrica e macrométrica. Em relação ao tecido ósseo especificamente, uma estrutura com poros interligados é fundamental para mimetizar a matriz óssea extracelular. O tamanho dos poros, a porosidade e a interconectividade entre eles determina o desempenho do material em funções tais como fixação celular e difusão de nutrientes. Características da superfície do implante, tais como rugosidade e porosidade influenciam significativamente a diferenciação celular e conseqüentemente o crescimento ósseo e a osseointegração. O foco deste artigo de revisão é a interação de proteínas com a superfície dos biomateriais implantados e a conseqüente ativação dos macrófagos e desenvolvimento de reação de corpo estranho. Além disso, descrevemos os mecanismos relacionados à osseointegração dos implantes.

Palavras-chave: biomaterial; reação de corpo estranho; macrófago; regeneração óssea

INTERACCIONES CELULARES CON LAS SUPERFICIES IMPLANTADAS EN EL ORGANISMO VIVO Y LA OSTEOINTEGRACIÓN DEL IMPLANTE

Resumen:

La superficie de un biomaterial es una plataforma para la migración y el crecimiento de las células. Cada biomaterial, cuando se implanta in vivo, causa respuestas celulares y tisulares. Estas incluyen reacciones inflamatorias y de cuerpos extraños, respuesta de curación de heridas y formación de cápsulas fibrosas en algún grado alrededor del implante. El crecimiento de tejido en la interfaz de una estructura implantada es un fenómeno complejo que implica una variedad de factores, algunos de los cuales están relacionados con el biomaterial e incluyen su microarquitectura, las propiedades mecánicas del material base, la topografía y la rugosidad, tanto a escala micrométrica como macrométrica. En lo que respecta al tejido óseo específicamente, una estructura con poros interconectados es fundamental para imitar la matriz ósea extracelular. El tamaño de los poros, la porosidad y la interconectividad entre ellos determinan el rendimiento del material en funciones como la fijación celular y la difusión de nutrientes. Las características de la superficie del implante, como la rugosidad y la porosidad, influyen considerablemente en la diferenciación celular y, por consiguiente, en el crecimiento y la osteointegración del hueso. El enfoque de este artículo de revisión es la interacción de las proteínas con la superficie de los biomateriales implantados y la consiguiente activación de los macrófagos y el desarrollo de la reacción de cuerpos extraños. Además, describimos los mecanismos relacionados con la osteointegración de los implantes.

Palabras clave: biomaterial; reacción de cuerpo extraño; macrófago; regeneración ósea

Introduction

Tissue growth at the interface of an implanted structure is a highly complex phenomenon involving a variety of factors encompassing a cascade of cellular and extracellular biological events¹. Blood / biomaterial interactions begin to happen simultaneously after the implantation of the biomaterial, with adsorption of proteins on its surface and the development of a transient temporary matrix sustained in the thrombus that forms at the tissue / biomaterial interface and around it²⁻⁴. When implanted in the tissues, the biomaterial will always incite a cellular immune response^{2,3}. Among the factors related to tissue growth on an implanted material, some are related to the material itself, and include its microarchitecture (existence or not of pores, relative density), mechanical properties of the base material and topography (roughness), both at macro, micro and nanometric scales^{1,5,6}. According to⁷ and⁸, the topographic characteristics of the biomaterial surface directly influence the behavior of the cells that are responsible for tissue repair through intracellular signal pathways mediated by their focal adhesion. Also, according to⁸, the architectural orientation of the natural extracellular matrix regulates several cellular behaviors, such as cell polarity, migration capacity, adhesion and proliferation changing the cytoskeleton through the reorganization of actin filaments when the cells adhere to it. Consequently, many studies in the field of tissue engineering have been conducted in the direction of mimicking the extracellular matrix of various tissue types.

Regarding bone tissue specifically, a structure with interconnected pores is critical to mimic the extracellular bone matrix^{9,10}. The size and number of the pores, besides the interconnectivity between them, determines the performance of the material in functions such as cell fixation and diffusion of nutrients, and these factors are directly related to the ingrowth of soft tissue and bone and also to the resistance of the bone-implant interface^{1,10}. According to¹, for proper bone ingrowth, the porosity of the biomaterial must be greater than 50%, and the pore size between 50 and 800 μm . However, it is widely known that the increase in the porosity of the implant leads to a decrease in its mechanical strength, although it is beneficial for tissue ingrowth⁵. Adequate mechanical stability is mandatory to obtain the necessary mechanical support during the bone repair and regeneration¹⁰. The need for stability leads us to observe that the design of the implant

and the surface characteristics of the scaffold directly influence the application or use of the biomaterial, which may be needed temporarily (absorbable materials) or permanently¹¹. Therefore, the balance between porosity and mechanical resistance is the key to the success of porous biomaterials.

Also, as previously mentioned, these characteristics are important in cellular differentiation and behavior since the biological tissues will interact mainly with the implant surface^{8,11}. The interface between the surface of a porous implant and the cells determines cellular behavior, such as cell adhesion, dissemination and proliferation^{10,12}. Therefore, much attention has been given to tissue engineering, which seeks to develop materials such as scaffolds made of biocompatible material, like hydroxyapatite, collagen-based materials, bioglass, among others, which bind mechanically to bone tissue^{5,13}.

With the expansion of research in tissue engineering and the development of new biomaterials, it is increasingly necessary to understand the interactions of tissues with implanted materials, since it is these interactions that will determine the success or failure of the implant. However, according to¹⁴ although considerable attention is given to the development of biomaterials for clinical applications, many fail to match the functional characteristics of target tissues in vivo due to their low biocompatibility. In this way, the present work meets the need for a better understanding of biomaterial-tissue interactions, helping to clarify how they occur and how the biomaterial characteristics influence them.

Protein adsorption

The host's response to an implanted material begins immediately after its introduction and covers several overlapping phases, including injury, protein adsorption, acute inflammation, chronic inflammation, foreign body reaction, granulation tissue formation and fibrous capsule formation^{6,15}. The process by which atoms, molecules or ions in a fluid are retained on the surface of solids through chemical or physical interactions is known as adsorption. In the interface region, i.e., the place of interaction between the surface of the material and the biological environment in which it is installed, physical, chemical and biological mechanisms will direct the adsorption of proteins. The nature and amount of adsorbed proteins will directly influence the adhesion, migration and subsequent cell proliferation^{4,16,17}. Thus, in contact between the biomaterial and physiological fluids, the layer of adsorbed proteins will alter the implant surface to prepare it for future cell colonization^{17,18}. In summary, when a material is involved in the physiological environment, the adsorption of proteins on its surface is the first stage before cell adhesion (Figure1), which plays a key role in its biocompatibility^{17,19,20}.

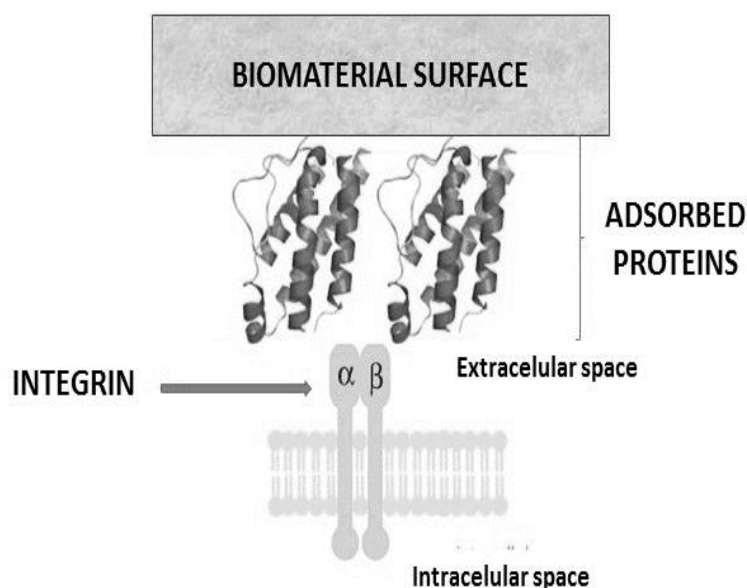


Figure 1: Schematic of the interactions between cell and proteins adsorbed on the biomaterial surface.

The events that occur at the interface between biomaterial and living tissue only a few moments after implantation are of great importance for the successful performance of the biomaterial in the organism^{15,19,21}. The adsorption of non-specific proteins to a biomaterial occurs almost instantaneously after its implantation through a thermodynamically directed process to reduce the surface energy, and a monolayer of proteins can be seen within minutes^{22,23}. After the formation of a protein monolayer on the surface of the material, the cells can adhere and proliferate within a period of up to 24 hours. There are numerous proteins in the living organism and their competitive adsorption, denaturation on surfaces and participation in blood clotting will critically influence the biocompatibility and consequently the performance of the biomaterial¹⁶.

Inflammatory cells are able to recognize implanted materials as foreign by adsorbed proteins, thus initiating the cascade of events that lead to foreign body reaction²², a process similar to opsonization. Therefore, plasma proteins play an important role in cell recruitment and tissue response to biomaterial implantation^{18–20}. It is important to consider that this process of protein adsorption by the surface of the biomaterial is inevitable and practically irreversible except under certain conditions, as in the Vroman effect, for example²⁴. In this phenomenon, observed by Vroman and Adams in 1969, a competitive protein exchange occurs on surfaces of the material, in which proteins already adsorbed from a protein mixture solution, are displaced by subsequently arriving proteins^{23,25}.

It is considered that the adsorption of proteins is a dynamic process and influenced by several factors such as the type of non-covalent interaction that will occur (hydrophobic interactions, hydrogen bonds, electrostatic forces and Van der Waals forces). It is also influenced by the characteristics of the proteins (size and structure, which in turn, influence the type of interaction), besides the biomaterial itself (roughness, chemistry and surface energy)^{17,23,26}. According to²³ there are three major forces that determine the rate of protein adsorption on the surface of a biomaterial. They are, the difference in protein concentration between the liquid phase

and the surface, the inherent affinity of the protein for the surface and the size of the protein (that is, its molecular weight).

An example of how the surface of the biomaterial influences protein adsorption is the so-called wettability. It is known that hydrophobic interaction plays a major role in protein adsorption phenomena. Protein adsorption is greater on a hydrophobic surface than on a hydrophilic one ^{2,26}. Although protein adsorption is generally low on hydrophilic materials due to their low surface energy in aqueous environments, proteins, as has been reported, may still adsorb to hydrophilic materials ²². Examples of this phenomenon are observed with fibronectin, a protein that promotes cell adhesion, and fibrinogen, important for blood coagulation. Both are adsorbed in greater quantities on hydrophilic and hydrophobic surfaces ^{17,20,22}. In the case of bone tissue, wettability can influence the first stage of osteoblast adhesion and the quality of osseointegration ^{17,20,27}, since it is known that osteoblasts recognize and adhere to the adsorbed fibronectin on the surface of the implanted material ^{17,20}.

Another characteristic of biomaterials that have an important influence on protein adsorption and consequent cellular adherence, especially in bone tissue, is the surface roughness ^{8,19,27}. The nanoscale morphology of the implant surface shows evident advantages in inducing cell proliferation and differentiation, as well as good bone formation. ²⁷ Many studies have shown that the increase in surface roughness in micro and nanoscale, exhibiting size characteristics comparable to those of the resorption pits and cellular dimensions, leads to a greater differentiation of osteoblasts and local production of factors in vitro. In this way, there is an increase in bone implant contact in vivo leading to better clinical wound healing rates. The superficial roughness in nanometric scale, which corresponds directly to the sizes of proteins and cell membrane receptors, can also play an important role in the differentiation of osteoblasts and in the regeneration of injured tissues ¹⁹.

An adhesive protein of particular interest in this field is fibrinogen, an important component of plasma, which is adsorbed to the surfaces of the biomaterial and thus participates in the acute inflammatory response to the implanted material ^{28,29}. Their function in relation to biomaterials is due to the fact that proteins are surfactants, which means that they adsorb very quickly to foreign surfaces. Therefore, almost any biomaterial that comes in contact with biological fluids such as blood plasma or peritoneal fluids will cause a rapid adsorption of fibrinogen ²⁹. Besides fibrinogen, other proteins can adsorb to the surface of biomaterials, such as vitronectin and fibronectin. These proteins and others involved in cellular adhesion are rich with the tripeptide sequence, Ar-Gly-Asp (RGD), which has been shown to bind to a number of integrins ²⁸. In the bone tissue, the presence of RGD-related peptides on the implant surface accelerates the osseointegration process, as they serve as a signal and transmit instructions to the cells, such as adhering to the surface, spreading, differentiating and inducing bone tissue formation ^{28,30,31}.

Plasma proteins, and also those present at the interstitial site of the implant, that are adsorbed on biomaterial, undergo changes in its structure, including denaturation on the implant surface, supporting subsequent cellular adhesion ^{3,16}. In addition, platelets release chemotactic signals that stimulate cell migration. With respect to platelets, their adhesion on the implant surface is also influenced by the characteristics cited in the previous paragraphs ³²⁻³⁴. Authors ³², demonstrated that platelet adhesion on the surface of a biomaterial is directly related to its complexity, with more irregular

surfaces favoring the adhesion of the same. Specifically, platelets activated by contact with a material surface may release cytokines that activate other cells, including other platelets, in the implant surface, modulating the degree of platelet activation ³³.

Macrophage Activation and Foreign Body Reaction (FBR)

The implantation of a biomaterial within the body initiates in the host a series of immune reactions collectively called foreign body response (FBR), which try to eliminate and / or isolate the implanted material ^{14,35-37}. Inflammatory cells are thought to recognize implanted materials as foreign through the adsorbed proteins, thus initiating a cascade of events that lead to the FBR ²². The most prominent cells in the FBR are macrophages, which attempt to phagocytose the material, though complete engulfment and degradation are often difficult. The macrophages, activated in the process of interacting with a biomaterial, may elaborate cytokines which stimulate inflammation or fibrosis ³⁵.

As described above, after the implantation of a biomaterial, an influx of blood and interstitial fluid proteins creates a random protein coating on the surface of the biomaterial (blood-based provisional matrix) ^{15,38,39}. This matrix is formed by fibrinogen, vitronectin, complement, and fibronectin. In response for this formation, platelet activation occurs with the constitution and proliferation of thrombus and activation of cells of the inflammatory response ³⁹. Protein adsorption and chemotaxis of neutrophils and mast cells to the implant site direct the acute inflammatory phase. The formation of these provisional matrix can take from a few hours to days ¹⁴. The inflammatory cells interact with the adsorbed proteins and are activated. This process induces recruited macrophages to the implant site, as well as resident macrophages. In fact, although neutrophils arrive early, they are quickly replaced by macrophages, the orchestrators of FBR ⁴⁰. Then, they begin to secrete chemotactic cytokines and other signaling molecules, which contribute to the development of FBR ^{15,28,38}.

Adsorbed fibrinogen promotes adhesion of platelets and monocytes/macrophages, playing a key role in the foreign body reaction associated with biomaterial implants ²⁹. It is important to mention the importance of Mac-1, a leukocyte integrin present in macrophages that binds to fibrinogen when it is adsorbed. This integrin is responsible for the direct adhesion of macrophages and their activation on the implant surface ^{28,29}. Integrins are transmembrane receptors that act as bridges in cell-cell and matrix-cell interactions. This allows quick and flexible responses to events on the cell surface. Integrins contain two sub-units, α and β (Figure 1). During the process of attachment to any surface these subunits group together and recruit other cytoplasmic proteins ¹⁸. Then occurs the formation of a complex called "focal contact" or "focal adhesion" which measures cell adhesion and migration ^{11,18}.

Macrophages are activated while they are participating in local tissue responses including the FBR, wound healing, and certain diseases ⁴¹. The two best studied macrophage phenotypes are M1 or classically activated and M2, or alternatively activated. Regarding the role played by each phenotype, M1 macrophages are known to secrete pro-inflammatory cytokines such as IL-12, IL-23 and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) ^{38,42,43}. M1 macrophages are critical for the initiation of angiogenesis and osteogenesis ⁴⁴. M2 macrophages promote extracellular matrix synthesis and cell proliferation, being considered as an anti-inflammatory phenotype and pro-wound

healing^{14,38,42,43}. M2 macrophages secrete large amounts of anti-inflammatory and pro-fibrotic cytokines such as IL-10 and transforming growth factor (TGF- β)³⁸. In addition, the transition (balance) between the phenotypes M1 and M2 plays an important role in the formation and thickness of the fibrous capsule around implanted biomaterials¹⁵. In normal tissue repair, macrophages exhibit a pro-inflammatory phenotype (M1) at early stages and a pro-healing phenotype (M2) at later stages⁴¹⁻⁴³. Macrophage polarization can be influenced by both wettability of the implant surface³⁸ and pore size in the case of porous implants⁴¹. Many studies have linked the macrophage polarization with FBR outcome. It is well known that the FBR is a dynamic series of events, and macrophage polarization earlier and later, may play an important role on it^{41,42}.

Macrophages can be found during the first weeks after the implantation of a biomaterial and in the final phase of the resorption process. This final step depends on the degradation time of the one in question^{2,36,40}. Macrophages are considered the main cellular mediators of FBR in biodegradable materials. They coordinate a complexity of cellular reactions, which integrate inflammatory cytokines, growth factors and complement components with various cell types, including other macrophages, neutrophils, lymphocytes, endothelial cells and fibroblasts³⁶⁻³⁸. Macrophages are sensitive to minimal changes in the biological environment and set up a rapid response to implanted materials. They can also fuse under the influence of cytokines IL-4 and IL-13, released by mast cells (Figure 2), forming foreign body giant cells (FBGCs). Macrophages and FBGCs stimulate immune (e.g., lymphocytes) and stromal cells (e.g., fibroblasts), leading to inflammation and fibrosis involving the implant^{38,39,45}. The macrophages activation is directly related to the development of FBR, since macrophages alternatively activated (M2) are responsible for the formation of the fibrous capsule and also of the FBGC⁴⁰. The intensity of this inflammatory reaction and fibrosis is related to many factors linked to the implant, as previously described^{5,8,10}. Changes in the roughness of the implant surface, in micrometric and nanometric scales, influence the orientation, adhesion, spreading and formation of the macrophage cytoskeleton and also the thickness of the fibrous capsule formed around the implant¹⁵. Small particles are phagocytosed by macrophages, large particles stimulate the formation of FBGC^{38,45}.

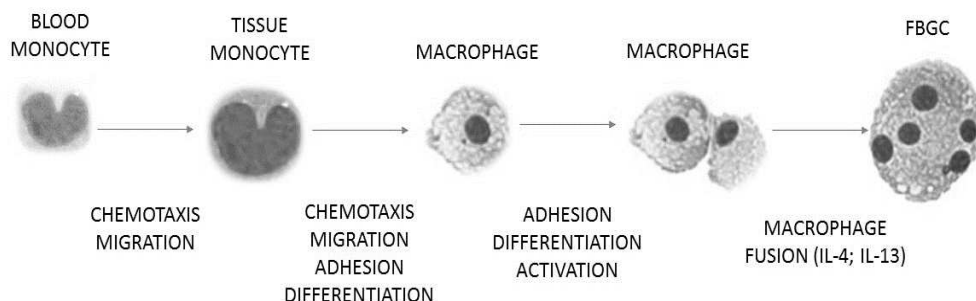


Figure 2: Activation and migration of monocytes and the subsequent fusion of macrophages forming a giant foreign body cell

FBGCs are considered a hallmark of FBR and can cause degradation of the implanted biomaterial, leading to its poor performance at the implantation site. Being

more specific, FBGCs secrete reactive oxygen species, degradation enzymes, and create an acidic environment at the interface of the biomaterial. After these events, the formation of a collagenous and largely avascular capsule occurs, involving the biomaterial within 2 to 4 weeks after being implanted. Pro-fibrotic signals at the implant site are responsible for this phenomenon. The confinement of the material within this capsule prevents the actual integration of the implant with the surrounding tissue^{3,37}. The formation of this capsule is directly linked to the action of macrophages^{2,3,39} and FBGCs that secrete pro-migratory molecules and TGF- β , which leads to the recruitment of fibroblasts that deposit extracellular matrix and encapsulate the implant. These foreign body capsules can reach a thickness of 50 to 200 μm and completely envelop the implant in a largely avascular space, which consists of dense and highly organized collagen fibers³. The fibrous capsule formation is also related to several factors associated to the implant, such as its size, shape and texture, as well as its chemical properties, porosity, implant location, and chemical and physical stimuli caused by the implant^{13,37,46}.

Implant Osseointegration

As described above, the biocompatibility of a material is closely related to the behavior of cells in contact with its surface, especially cell adhesion. Immediately after the insertion of the implant into the bone tissue, the cellular mechanisms that culminate in osseointegration are initiated. In this phase the characteristics of the implant surface have a great influence. The material's surface properties affect the adsorption of proteins and modulate cell proliferation and differentiation, influencing not only the osteoblast adhesion process but also the tissue response. Surface characteristics such as roughness, porosity, chemistry and energy significantly influence cell differentiation and, consequently, bone growth and osseointegration of the implant^{1,8,11} because they play an important role in osteoblast adhesion on biomaterials³¹.

Osteoblasts adhere to implanted surfaces and to ECM (extracellular matrix) through adhesion molecules, as previously described^{21,47}. The cell-matrix adhesions mechanically connect the internal actin filaments to the matrix. The complex is known as a focal adhesion, focal plaque or focal contact⁴⁷. Focal adhesions mediate intracellular signaling pathways as they are directly linked to the cytoskeleton, thus influencing cellular behavior (Figure 3)^{8,31}. Therefore, fixation, adhesion and spreading are part of the first phase of cell/material interactions and the quality of this first phase will direct the cell's ability to proliferate and to differentiate itself in contact with the implant³¹. This means that stable cell adhesion is essential for further proliferation and differentiation⁴⁸.

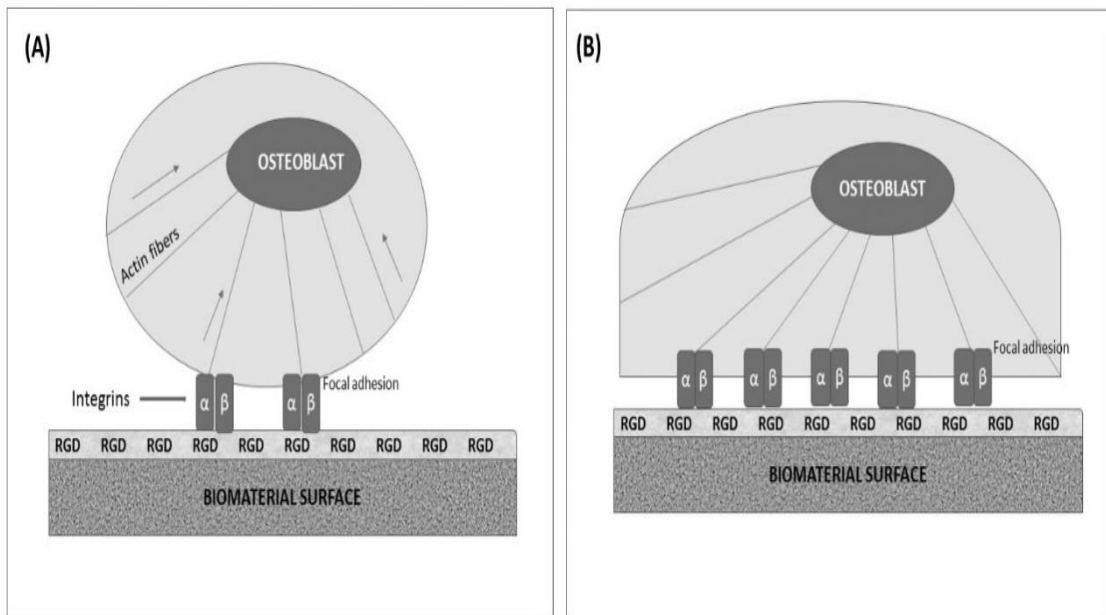


Figure 3: Schematic diagram of osteoblastic cell adhesion process. (A) Integrins recognize RGD sequences and mediate the cell-biomaterial anchorage. Then, signs initiate the recruitment of cytoskeletal proteins resulting in the formation of focal adhesions. (B) Spreading: actin microfilaments and the cytoskeletal network rearrange and reshape cell morphology.

The recruitment and migration of a population of potentially osteogenic cells is the first step to promote bone formation on the implant surface, then it is necessary to differentiate this population into mature secretory cells, i.e., osteoblasts. Osteogenic cells migrate through the blood clot formed at the site of the fracture or bone defect and reach the surface of the implant or the bone where it was implanted. They then differentiate and form the new bone¹⁷. In order to favor the mechanisms involved in bone formation around an implanted material, it is necessary that the implant has micro and nanotopographical characteristics that allow the connections of the extracellular matrix proteins with its surface. Studies show that both micrometric and nanometric characteristics influence cell adhesion, proliferation and osseointegration^{7,18,27}. Depending on the implant surface morphology, on the first day of implantation, mesenchymal cells, preosteoblasts and osteoblasts adhere to the implant surface¹⁷.

In recent decades, several studies have suggested that distinct micro and/or nanoscale structural characteristics that result from different surface modification techniques can play a significant role in influencing the behavior of target cells and thus define the quality of bone integration. Despite many pre-clinical *in vitro* and *in vivo* studies on the evaluation of new implant biomaterials, there is still scarce knowledge about the link between the specific characteristics of an implant surface and the cellular response that occurs at its interface with the surrounding tissue^{8,21,48}. Many authors stated that osteoblastic cells adhere more rapidly on rough surfaces where there is more pronounced proliferation of extracellular matrix synthesis than on smooth surfaces^{11,49,50}. However, there is no consensus on this issue since cell behavior depends on the degree of roughness. These might explain differences in studies, as roughness parameters vary from one study to another⁵¹. In addition, there is no

uniformity in the cell lines used in the experiments and cells with different phenotypes may show different responses to the surface of the materials^{19,21,51}. Studies show that changes in cell shape, which occur after its attachment to the surface of the biomaterial, are directly linked to its phenotypic characteristics. And these shape changes can alter cell metabolism, leading therefore to different results depending on the cell type used⁴⁷.

Regarding the surface wettability of the implants, it was observed by⁵¹ that hydrophilic surfaces were more likely to favor the adhesion of osteoblasts than fibroblasts. And according to²¹, cells adhere more easily to hydrophilic surfaces. Authors²⁷ observed greater cellular adhesion in titanium implants as their surface wettability increased. As described above, wettability affects not only protein adsorption, but also platelet adhesion, thus influencing the subsequent phase, that is, the colonization of the implanted surface by osteogenic cells³⁴.

After adhesion and migration, cells divide and proliferate across the surface. They further differentiate which means that they synthesize the molecules they normally synthesize in their tissue of origin. Osteoblasts will synthesize collagen and the other proteins (non-collagenous proteins) normally found in bone tissue²¹. Most of these (especially fibronectins, osteopontins, bone sialoproteins, type I collagen, vitronectins) are involved in the process of cell adhesion and chemotaxis^{52,53} due to the RGD sequence present in its molecules^{28,30,52}. Fibronectin and vitronectin adsorption are important in osseointegration since they induce the reorganization of actin microfilaments promoting adhesion and scattering, which in turn affects cell morphology and migration^{30,52}. In addition, osteoblasts recognize and adhere to the adsorbed fibronectin on the surface of the biomaterial^{30,53}.

Adhesion molecules are characterized by the ability to interact with specific binders, which may be located in the membrane of neighboring cells or be proteins in the extracellular matrix. These adhesion molecules belong to different families. However, in relation to osteoblasts, the most important are integrins^{11,18,30}. After binding to specific sites within the extracellular matrix proteins, especially to the sequence of RGD tripeptides, integrins quickly associate with the cytoskeleton modifying it to form focal adhesions (Figure 3). This interaction of integrins with the extracellular matrix proteins is necessary for the gene expression of osteoblasts. Together with growth factor receptors, focal adhesions signal pathways for cell proliferation^{30,53}. Both the chemical composition of the material and its topography influence the interaction of integrins with the substrate and integrins with cellular behavior^{11,18,49}. Cell migration requires an integration between cell, substrate and cytoskeleton. First, the cells develop a protrusion forming the lamellipod and then use the adhesive interactions to generate traction and energy for movement. Finally, the release of the adhesion points occurs, followed by the detachment and retraction¹⁸.

Not only osteoblasts, but also osteoclasts play a role in bone healing, development and remodeling and their complementary activities are important in bone-biomaterial interaction^{11,54}. For many applications, it would be beneficial to identify the surface characteristics that would be ideal to promote bone formation by osteoblasts, suppressing the resorptive activity of osteoclasts. If the biomaterial is to be used as a synthetic bone substitute, then the degradation rate should be comparable to bone. However, if the intended application is a permanent implant, then the resorption rate should be minimized¹¹. An ideal, bioactive material for bone substitution should be able to be resorbed and

replaced by new bone, before having its stability compromised. In other words, the ideal bone substitution material should be osteoinductive, osteoconductive and only stay in the body as long as necessary to replace the defect by newly formed bone⁵⁵. Therefore, considering the importance of osteoclasts for bone remodeling and for responses triggered by trauma or functional demands, the understanding of the mutual interactions of osteoblasts, osteocytes, osteoclasts and biomaterials is of great interest⁵⁴.

The reabsorption of bone and mineral substrates depends on the formation of a transient resorption complex, which is composed of actin rings and a ruffled plasma membrane⁵⁶. This ring is associated with a “sealing zone”, that constitutes the place where the osteoclasts firmly adhere to the bone forming a diffusion barrier, which in turn establishes a resorption compartment in which proteolytic enzymes are secreted^{54,56}. In the case of synthetic apatite biomaterials, acidification of this compartment causes mineral dissolution and formation of a resorption pit. Therefore, the resorption of ceramic materials by osteoclastic activity occurs similarly to bone resorption^{11,54}. Authors¹¹ observed that surface topography also affects the activity of osteoclasts, and more activity is observed on smoother surfaces. In their study they also observed that the topography affects the capacity of the osteoclasts to resorb hydroxyapatite, since they did not observe osteoclastic resorption pits in the rougher material. Apparently, the smoother surface is a facilitator of the connection of these cells with the biomaterial.

Authors⁵⁷ observed osteoclasts and FBGCs in close proximity during foreign body reactions. According to the authors⁵⁸ FBGCs may resorb bone substitutes in collaboration with osteoclasts during the process of involvement into bone. In accordance to the authors, when biodegradable implants are implanted in bone defects, their degradation and osteogenesis occur simultaneously, and FBGCs and / or osteoclasts can contribute to the replacement of implants by bone. Unlike FBGCs, osteoclasts are physiologically essential for bone metabolism and even if there is no pathological stimulation of osteoclastic activity, which is usually induced by inflammation, osteoclasts can contribute to the regeneration of bone defects that received biodegradable implants.

A relevant factor in the osseointegration of an implant is the ability of the material to provide a sufficient supply of nutrients and oxygen to the implant site^{42,59}. This means that ideally, the implant should be able to promote blood vessel ingrowth from the surrounding host tissue, connecting the scaffold to the host vasculature⁴². Vascularization is crucial for the development and the repair of most tissues, and is a precondition for the healing of bone defects. A functional vascularization is necessary for bone formation and the substitution of biomaterials with osseous tissue⁵⁹. The growth of new blood vessels is critical not only to stimulate osteogenesis, but also to support cell viability^{42,60}. In developing bone, differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into osteoblasts is coupled with the invasion of capillaries, and the capillary network serves as a template for the bone ingrowth^{42,61}. The natural inflammatory response to injury or to an implanted biomaterial determines the course of angiogenesis, healing, and repair^{2,42}.

It is well known that porous bone substitutes permit vessel ingrowth and thus facilitate osteogenesis^{1,60,61}. Several studies have been performed in order to evaluate the pore size influence on bone and blood vessels ingrowth through porous biomaterials. Authors⁵⁹ observed, in their study using a porous, biphasic calcium phosphate ceramics, that the onset of blood-vessel formation occurred after a shorter

time period, and the functional capillary density (FCD) was higher in association with ceramics whose pore sizes exceeded 140 μm than with either those whose pore sizes were smaller than 140 μm or dense particles. They conclude that the observed differences in angiogenesis and vascularization were a function of pore size. The minimum pore size that is required to generate mineralized bone is considered to be 50 μm ^{1,59}. As previously exposed, larger pores are better for vascular growth and bone formation; however, they compromise mechanical stability^{1,5,59}.

Conclusion:

The ideal biomaterial should provide a biomimetic environment to ensure cell survival and also direct cell migration in order to that relevant cells migrate and adhere to the implant, thus ensuring its effectiveness. The type of cellular and tissue response to implanted biomaterials is dependent on their features. The main characteristics that influence the success of a biomaterial after its implantation are related to the surface that comes into contact with the tissues, such as topography (roughness), wettability and surface chemistry. These characteristics will guide the protein adsorption and the inflammatory response related to the implant. For biomaterials implanted in bone, the most important features influencing implant osseointegration and osteoconduction are surface roughness, wettability and porosity. Thus, the manipulation of the surface characteristics of implants has been increasingly the target of research, with the aim of improving to the maximum the performance of biomaterials in the various tissues in which they are used.

Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel), CNPQ (National Council for Scientific and Technological Development) and FAPEMIG (Research Support Foundation of the State of Minas Gerais) for financial support.

Reference list

1. Arabnejad S, Burnett Johnston R, Pura JA, Singh B, Tanzer M, Pasini D. High-strength porous biomaterials for bone replacement: A strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints. *Acta Biomater* [Internet]. 2016;30:345–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.048>
2. Gretzer C, Emanuelsson L, Liljensten E, Thomsen P. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. *J Biomater Sci Polym Ed* [Internet]. 2006;17(6):669–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1163/156856206777346340>
3. Moore LB, Kyriakides TR. Molecular Characterization of Macrophage-Biomaterial Interactions. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2015;865:109–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-18603-0_6
http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-18603-0_6

0%0Ahttp://www.nature.com/doi/10.1038/nri1461

4. Gui N, Xu W, Myers DE, Shukla R, Tang HP, Qian M. The effect of ordered and partially ordered surface topography on bone cell responses: A review. *Biomater Sci.* 2018;6(2):250–64.
5. Kadkhodapour J, Montazerian H, Darabi AC, Anaraki AP, Ahmadi SM, Zadpoor AA, et al. Failure mechanisms of additively manufactured porous biomaterials: Effects of porosity and type of unit cell. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2015;50:180–91.
6. Veisoh O, Doloff JC, Ma M, Vegas AJ, Tam HH, Bader AR, et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat Mater.* 2015;14(6):643–51.
7. Reis ECC, Borges APB, Oliveira PM, Bicalho SMCM, Reis AM, Da Silva CL. Desenvolvimento e Caracterização de Membranas Rígidas, Osteocondutoras e Reabsorvíveis de Polihidroxibutirato e Hidroxiapatita para Regeneração Periodontal. *Polimeros.* 2012;22(1):73–9.
8. Lee MS, Lee DH, Jeon J, Oh SH, Yang HS. Topographically Defined, Biodegradable Nanopatterned Patches to Regulate Cell Fate and Acceleration of Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2018;10(45):38780–90.
9. Carlo EC, Borges APB, Del Carlo RJ, Martinez MMM, Oliveira PM, Morato GO, et al. Comparison of in vivo properties of hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites assessed for bone substitution. *J Craniofac Surg.* 2009;20(3):853–9.
10. Kim CS, Jung KH, Kim H, Kim CB, Kang IK. Collagen-grafted porous HDPE/PEAA scaffolds for bone reconstruction. *Biomater Res [Internet].* 2016;20(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40824-016-0071-5>
11. Costa DO, Prowse PDH, Chrones T, Sims SM, Hamilton DW, Rizkalla AS, et al. The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials [Internet].* 2013;34(30):7215–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>
12. Zhang Q, Dong H, Li Y, Zhu Y, Zeng L, Gao H, et al. Microgrooved Polymer Substrates Promote Collective Cell Migration to Accelerate Fracture Healing in an in Vitro Model. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(41):23336–45.
13. Carlo EC, Borges APB, Rezende CM de F, Moreira J do CL, Fonseca CC, Pontes KCS, et al. Avaliação Do Efeito Osteoindutor Da Hidroxiapatita E Do Biovidro Implantados Em Tecido Subcutâneo De Cão. *Rev Ceres.* 2007;54(316):492–500.
14. Rahmati M, Silva EA, Reseland JE, Heyward C, Haugen HJ. Biological responses to physicochemical properties of biomaterial surface. *Chem Soc Rev.* 2020;49(15):5178–224.

15. Hachim D, LoPresti ST, Yates CC, Brown BN. Shifts in macrophage phenotype at the biomaterial interface via IL-4 eluting coatings are associated with improved implant integration. *Biomaterials*. 2017;112:95–107.
16. Zdolsek J, Eaton JW, Tang L. Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *J Transl Med*. 2007;5:1–6.
17. Kopf BS, Ruch S, Berner S, Spencer ND, Maniura-Weber K. The role of nanostructures and hydrophilicity in osseointegration: In-vitro protein-adsorption and blood-interaction studies. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2015;103(8):2661–72.
18. Rahman ZU, Haider W, Pompa L, Deen KM. Electrochemical & osteoblast adhesion study of engineered TiO₂ nanotubular surfaces on titanium alloys. *Mater Sci Eng C*. 2016;58:160–8.
19. Gittens RA, McLachlan T, Cai Y, Berner S, Tannenbaum R, Schwartz Z, et al. The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation. *Biomaterials*. 2012;32(13):3395–403.
20. Lin M, Wang H, Ruan C, Xing J, Wang J, Li Y, et al. Adsorption Force of Fibronectin on Various Surface Chemistries and Its Vital Role in Osteoblast Adhesion. *Biomacromolecules*. 2015;16(3):973–84.
21. Anselme K, Ponche A, Bigerelle M. Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med*. 2010;224(12):1487–507.
22. Swartzlander MD, Barnes CA, Blakney AK, Kaar JL, Kyriakides TR, Bryant SJ. Linking the foreign body response and protein adsorption to PEG-based hydrogels using proteomics. *Biomaterials*. 2015;41:26–36.
23. Kim J. Systematic approach to characterize the dynamics of protein adsorption on the surface of biomaterials using proteomics. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2020;188(December 2019):110756. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110756>
24. Penna MJ, Mijajlovic M, Biggs MJ. Molecular-level understanding of protein adsorption at the interface between water and a strongly interacting uncharged solid surface. *J Am Chem Soc*. 2014;136(14):5323–31.
25. Hirsh SL, McKenzie DR, Nosworthy NJ, Denman JA, Sezerman OU, Bilek MMM. The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2013;103:395–404.
26. Kim J, Yoon J-Y. Protein adsorption on polymer particles. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 2002;21(2):4373–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3818679>
27. Kang Y, Ren X, Yuan X, Ma L, Xie Y, Bian Z, et al. The effects of combined

- micron-scale surface and different nanoscale features on cell response. *Adv Mater Sci Eng.* 2018;2018.
28. Zaveri TD, Lewis JS, Dolgova N V., Clare-Salzler MJ, Keselowsky BG. Integrin-Directed Modulation of Macrophage Responses to Biomaterials. *Biomaterials.* 2014;35(11):3504–15.
 29. Horbett TA. Fibrinogen adsorption to biomaterials. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2018;106(10):2777–88.
 30. Rivera-Chacon DM, Alvarado-Velez M, Acevedo-Morantes CY, Singh SP, Gultepe E, Nagesha D, et al. Fibronectin and vitronectin promote human fetal osteoblast cell attachment and proliferation on nanoporous titanium surfaces. *J Biomed Nanotechnol.* 2013;9(6):1092–7.
 31. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials.* 2000;21(7):667–81.
 32. Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies JE. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials.* 2005;26(26):5285–95.
 33. Park JY, Gemmell CH, Davies JE. Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials [Internet].* 2001;22:2671–82. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961201000096%5Cnpapers2://publication/uuid/5B75B3C8-E6D3-4F39-8094-5C0BF96639D5>
 34. Liu Y, Zhang X, Hao P. The effect of topography and wettability of biomaterials on platelet adhesion. *J Adhes Sci Technol.* 2016;30(8):878–93.
 35. Rezaie HR, Bakhtiari L, Öchsner A. *Biomaterials and Their Applications.* 1st ed. SPRINGER BRIEFS IN MATERIALS. Springer International Publishing; 2015.
 36. Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;107:153–62.
 37. Bank RA, Zandstra J, Room H, Petersen AH, Van Putten SM. Biomaterial Encapsulation Is Enhanced in the Early Stages of the Foreign Body Reaction during Conditional Macrophage Depletion in Transgenic Macrophage Fas-Induced Apoptosis Mice. *Tissue Eng - Part A.* 2017;23(19–20):1078–87.
 38. Rostam HM, Singh S, Salazar F, Magennis P, Hook A, Singh T, et al. The impact of surface chemistry modification on macrophage polarisation. 2016;221(11):1237–46.
 39. Chu C, Liu L, Rung S, Wang Y, Ma Y, Hu C, et al. Modulation of foreign body reaction and macrophage phenotypes concerning microenvironment. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2020;108(1):127–35.
 40. Saleh LS, Bryant SJ. In Vitro and In Vivo Models for Assessing the Host Response to Biomaterials. *Drug Discov Today Dis Model.* 2017;24:13–21.
 41. Sussman EM, Halpin MC, Muster J, Moon RT, Ratner BD. Porous implants

- modulate healing and induce shifts in local macrophage polarization in the foreign body reaction. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(7):1508–16.
42. Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials* [Internet]. 2015;37:194–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.017>
 43. Alhamdi JR, Peng T, Al-Naggar IM, Hawley KL, Spiller KL, Kuhn LT. Controlled M1-to-M2 transition of aged macrophages by calcium phosphate coatings. *Biomaterials* [Internet]. 2019;196:90–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.012>
 44. Spiller KL, Koh TJ. Macrophage-based therapeutic strategies in regenerative medicine Kara. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;122:74–83.
 45. Yang J, Jao B, McNally AK, Anderson JM. In vivo quantitative and qualitative assessment of foreign body giant cell formation on biomaterials in mice deficient in natural killer lymphocyte subsets, mast cells, or the interleukin-4 receptor α and in severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2014;102(6):2017–23.
 46. Sepúlveda RV, Borges APB, Conceição LG, Valente FL, Carlo Reis EC, Bohnenberger IB. Composite synthetic hydroxyapatite 30%, in two physical states, as dermal filler. *Rev Ceres.* 2013;60(4):458–64.
 47. Meyer U, Büchter A, Wiesmann HP, Joos U, Jones DB. Basic reactions of osteoblasts on structured material surfaces. *Eur Cells Mater.* 2005;9:39–49.
 48. Rabel K, Kohal RJ, Steinberg T, Tomakidi P, Rolaufts B, Adolfsson E, et al. Controlling osteoblast morphology and proliferation via surface microtopographies of implant biomaterials. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69685-6>
 49. Zhuang XM, Zhou B, Ouyang JL, Sun HP, Wu YL, Liu Q, et al. Enhanced MC3T3-E1 preosteoblast response and bone formation on the addition of nano-needle and nano-porous features to microtopographical titanium surfaces. *Biomed Mater.* 2014;9(4).
 50. Mendonça G, Mendonça DBS, Simões LGP, Araújo AL, Leite ER, Duarte WR, et al. The effects of implant surface nanoscale features on osteoblast-specific gene expression. *Biomaterials.* 2009;30(25):4053–62.
 51. Martinez MAF, Balderrama Í de F, Karam PSBH, de Oliveira RC, de Oliveira FA, Grandini CR, et al. Surface roughness of titanium disks influences the adhesion, proliferation and differentiation of osteogenic properties derived from human. *Int J Implant Dent.* 2020;6(1).
 52. Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2015;65:20–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.008>

53. Chen S, Guo Y, Liu R, Wu S, Fang J, Huang B, et al. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2018;164:58–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.022>
54. Nakamura M, Hiratai R, Hentunen T, Salonen J, Yamashita K. Hydroxyapatite with High Carbonate Substitutions Promotes Osteoclast Resorption through Osteocyte-like Cells. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(2):259–67.
55. Schilling AF, Linhart W, Filke S, Gebauer M, Schinke T, Rueger JM, et al. Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts. 2004;25:3963–72.
56. Han G, Zuo J, Holliday LS. Specialized roles for actin in osteoclasts: Unanswered questions and therapeutic opportunities. *Biomolecules*. 2019;9(1).
57. Khan UA, Hashimi SM, Khan S, Quan J, Bakr MM, Forwood MR, et al. Differential expression of chemokines, chemokine receptors and proteinases by foreign body giant cells (FBGCs) and osteoclasts. *J Cell Biochem*. 2014;115(7):1290–8.
58. Ahmed GJ, Tatsukawa E, Morishita K, Shibata Y, Suehiro F, Kamitakahara M, et al. Regulation and biological significance of formation of osteoclasts and foreign body giant cells in an extraskeletal implantation model. *Acta Histochem Cytochem*. 2016;49(3):97–107.
59. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2008;85(3):777–86.
60. Vital CC, Borges APB, Fonseca CC, Tsiomis AC, Carvalho TB, Fontes EB, et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2006;58(2):175–83.
61. Borges APB, Rezende CMF, Ribeiro MFB, Melo EG, Nóbrega Neto PI. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2000;52(6):616–20.

CAPÍTULO 2

In Vitro* Characterization of Hydroxyapatite and Cobalt Ferrite Nanoparticles Compounds and their Biocompatibility *In Vivo

Revista para publicação: Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. ISSN: 2296-4185

Cristiane C. Vital Cintra¹, Dayana A. C. Ferreira-Ermita¹, Fabrícia H. Loures¹, Pascally M. A. G. Araújo², Iara M. Ribeiro¹, Fabiana R. Araújo³, Fabiana R. Araújo², Fabrício L. Valente¹, Emily C. Carlo Reis¹, Ana Cristina F. M. Costa³, Andréa P. B. Borges¹, Sheila M. C. M. Bicalho⁴

¹Veterinary Department, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,

²Laboratory of Synthesis of Ceramic Materials, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Brasil

³Veterinary Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil

⁴JHS Chemical Laboratory Ltda, Sabará, Brasil

*** Correspondence:**

Corresponding Author

crisvital@gmail.com

Keywords: biomaterial, cobalt ferrite nanoparticles, hydroxyapatite, biocompatibility

Abstract

Bioactive materials in combination with antibiotics have been widely developed for the treatment of bone infection. Thus, this work aims to characterize six biomaterials formulated with different concentrations of hydroxyapatite and cobalt ferrite nanoparticles, in addition to the antibiotic ciprofloxacin, using X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and the antibiotic diffusion test on agar. Furthermore, *in vivo* biocompatibility and the reabsorption process of these materials were analyzed. XRD showed that both hydroxyapatite and cobalt ferrite present high crystallinity. The photomicrographs obtained by SEM revealed that composites have a complex surface, evidenced by the irregular arrangement of the hydroxyapatite and cobalt ferrite granules, besides demonstrating interaction between their components. The antibiotic diffusion test showed that all biomaterials produced an inhibition halo in *Staphylococcus aureus* cultures. For the biocompatibility study, composites were surgically implanted in the dorsal region of rabbits. At 15, 30, 70 and 100 days, biopsies of the implanted regions were performed. The biomaterials were easily identified during histological analysis and no significant inflammatory process, nor histological signs of toxicity or rejection by the adjacent tissue were observed. We can conclude that the biomaterials analyzed are biocompatible, degradable and effective in inhibiting the *in vitro* growth of *Staphylococcus aureus*.

1. Introduction

Biomaterials are substances of natural or synthetic origin, used in biomedical applications and that interact with biological systems, treating, increasing or replacing tissues, organs or restoring functions compromised by degenerative processes or trauma (1). Due to its importance in the medical field, the development of new types of biomaterials has been highlighted, leveraging studies related to tissue engineering or bioengineering that uses knowledge in the areas of materials science, biology, chemistry, medicine and engineering to develop new products that restore, maintain or improve tissue function (2).

Especially in orthopedics and dentistry, the use of biomaterials to repair damaged parts of the bone has been revolutionary (3–5). The group of biomaterials that most resemble bone composition is the group of calcium phosphate ceramics (6,7), among which the most widespread is hydroxyapatite (HAp) (3). It has been used because it is a bioactive, non-toxic substance that causes little tissue reaction (8–10) and is biocompatible with bone, once both have the same type of crystalline structure (9,10). Besides that, it has a porous structure, which is an advantage for bone ingrowth (11–13).

Knowing a biomaterial's crystallinity is important considering that it influences in vivo performance as it affects the resorption and its mechanical properties, since amorphous regions are reabsorbed faster than crystalline regions (14). Porosity, on the other hand, is related to the angiogenesis, which is an important step for tissue regeneration after an injury. The porous structure of HAp works as a passive support for the angiogenesis process to occur. At this stage, a sequence of events is initiated to repair injured tissues, in which new blood vessels are formed from pre-existing vessels (15–17). HAp provides an additional substrate for this process to occur, leading to the proliferation of bone tissue (18–20), and allowing the proliferation, migration and phenotypic expression of bone cells, i.e., it is osteoconductive (14,21). In addition to biomaterials presenting a microstructure of interconnected pores, they must also have surface complexity (surface roughness and topography) suitable for tissue growth. These factors influence cell adhesion and activity, and angiogenesis, that is, they are directly related to the biocompatibility of the material (14,22).

Iron oxide-based nanoparticles are potential candidates for biomedical applications, as they feature magnetic moment dependent on nanoparticle size, high colloidal stability, simple surface functionality, chemical stability, and reactive surfaces to attach biological molecules. (23,24). Currently, various iron oxide systems in biological applications have been reported. Among the most common, magnetite (Fe_3O_4) and hematite (Fe_2O_3) stand out for presenting non-toxic characteristics and magnetizing force suitable for biological applications (24). In the magnetite category, which presents a spinel-like crystalline structure, cobalt ferrite (CoFe_2O_4) has been widely researched due to its low toxicity characteristics, excellent water solubility, physiological pH stability, and magnetic behavior suitable for use in biosensors (25). CoFe_2O_4 has been used in several biomedical applications as a catalyst, in hyperthermia treatment, magnetic resonance imaging, in biosensors, among others. According to Amiri & Shokrollahi (26), CoFe_2O_4 can be functionalized with drugs and applied in drug delivery systems (DDS), especially in the area of chemotherapy, and treatment of various infections.

As a biocompatible material, HAp combined with cobalt ferrite nanoparticles is a promising device for drug delivery and regeneration of bone tissue (27,28). From this

context, the objective of this study was to characterize the biomaterials formulated with HAp and CoFe_2O_4 and evaluate their biocompatibility and resorption processes aiming at the subsequent use of these materials in bone regeneration processes in cases of infection.

2. Material and Methods

2.1 Ethical aspects

All procedures adopted in this work are in accordance with the Code of Professional Ethics of Veterinarians and the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and with the current legislation. The methodology was approved by the Ethics Committee on Animal Use of Federal University of Viçosa (CEUA/UFV), under the protocol 67/2016.

2.2 Biomaterial

2.2.1 Materials used

- Magnetic nanoparticles (MNPs) of cobalt ferrite (CoFe_2O_4) obtained by the combustion reaction technique in batches of 10g of product/reaction.
- Hydroxyapatite (HAp) obtained through the precipitation process and calcined at 900°C according to the methodology proposed by Medvecky et al., (29).
- Commercial hydroxyapatite produced by JHS Ltda laboratory (HAP 91[®]).

2.2.2 Preparation of biomaterials:

The methodology proposed by Araújo (25) was used to obtain the biomaterials. The procedure is summarized as follows: i) 2.5 g of CoFe_2O_4 MNPs and 100 mL of ethanol, under ultrasonic agitation for 30 min, were coated with TEOS (tetraethylortosilicate) and APTS (3-aminopropyltrimethoxysilane) resulting in a core-shell type structure with reactive -OH and NH_2 groups; ii) after obtaining the $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ hybrid, it was physically mixed with hydroxyapatite (HAp), resulting in a HAp: $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ composite. Then, ciprofloxacin was incorporated at a mass concentration of 10% in hybrid materials. The different compositions and mass proportions of the biomaterials produced are described in **Table 1**. All the biomaterials were prepared in the Ceramic Materials Synthesis Laboratory (LABSMAC) of the Federal University of Campina Grande (UFCG).

2.3 Characterization

For the biomaterials characterization, scanning electron microscopy (SEM) and X-ray diffraction (XRD) techniques were used. Surface topography, morphology, as well as the presence of clusters and pores were analyzed by SEM using a LEO 1430VP microscope at a voltage of 15 kV. The compounds surfaces were coated with gold and images were taken at 200x, 500x, 1000x, 2000x and 30000x magnifications, from which qualitative data of the surface topography of the materials were obtained. The present phases, the crystallinity and crystallite size in the samples were determined

from X-ray diffraction (XRD) data obtained with a D2 Phaser, Bruker diffractometer; radiation CuK α . The average crystallite size was determined from the Scherrer equation and the crystallinity was determined from the ratio between the integrated peak area for the crystalline phase and the area for the amorphous fraction.

2.4 Agar antibiotic diffusion test

The biomaterials were tested for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* using the agar diffusion assay. The test was carried out according to the principle of drug diffusion, using a disc containing ciprofloxacin (positive control) and the compressed biomaterials in the form of 5 mg tablets.

A bacterial inoculum was prepared from the stock culture of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) strains, maintained at -80 °C, from the bacterioteca of the Laboratory of Bacterial Diseases of the Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Viçosa (UFV) and with laboratory proven virulence. A small aliquot of the frozen culture was transferred to the Brain and Heart Infusion (BHI) broth with the aid of an autoclaved wooden stick under sterile conditions. The tube with the inoculated broth was placed in an oven at 37 °C for 18-24 hours. Turbidity was adjusted to D.O.550 0,08-0,1 (equivalent to McFarland 0,5 scale), resulting in a suspension containing approximately $1-2 \times 10^8$ CFU/mL.

After obtaining the inoculum, two Petri dishes containing Mueller-Hinton agar were sown with the bacterial culture. Then, holes were produced in the agar with the aid of a sterile pipette tip. Subsequently, the sterile biomaterial tablets and the disc containing ciprofloxacin were placed in these holes. The test was performed in duplicate. After the application of the biomaterials and the disc, the plates were incubated under aerobiosis for 24 hours at 37°C. The reading was performed by measuring the diameters of the inhibition halos formed around the biomaterial "tablets" and the disk containing ciprofloxacin and obtaining the mean between the halos formed in three tests.

2.5 Biocompatibility analysis of biomaterials in vivo

Six New Zealand rabbits from the rabbit breeding sector of Animal Science Department at UFV were randomly chosen for in vivo biocompatibility analysis. In order to implant the biomaterials, the animals were sedated using an intramuscular association of the drugs Ketamine and Midazolam at doses of 12.5 mg/kg and 1 mg/kg, respectively. Then, anesthetic induction and maintenance were performed using the inhalation drug isoflurane in 100% oxygen administered through a mask.

One animal was used for each biomaterial to be implanted, and these were surgically implanted in quadruplicate, in the dorsal region, between the fascia and the muscle tissue of each rabbit. Immediately before being implanted, each material, in the approximate amount of 2.0 mg, was moistened with 0.5 mL of sterile saline solution in order to form a moldable paste. The paste was then molded into a 5 mm diameter tablet, which was then implanted as previously described. After implantation, the tissues were sutured with 2-0 nylon.

The animals were submitted to daily observations of the surgical wound for one week after the surgical procedure, assessing the degree of inflammatory reaction based on the presence of edema and pain, by visual inspection and digital pressure of the operated area. The presence of hemorrhage, purulent secretion, and dehiscence of the suture was also visually evaluated. At 15, 30, 70 and 100 days, a sample of each animal was obtained for routine histological processing (10% formaldehyde fixation, dehydration, paraffin inclusion, microtomy, and hematoxylin-eosin staining). Fragments of approximately 2.0 x 2.0 cm were collected, containing skin, subcutaneous tissue, fascia, muscle tissue, and biomaterial. On the 100th day (last harvest) the animals were euthanized by anesthetic overdose.

The presence of the biomaterial, its morphology, tissues and cells in contact with the biomaterial, the presence or absence of a fibrous capsule and its thickness, when present, were evaluated and described. Hyperemia, inflammatory infiltration, presence of hemorrhagic regions, tissue infiltration within the biomaterial and evidence of phagocytosis were also evaluated and described. Regarding fibroplasia, hyperemia and inflammatory infiltration, the slides were evaluated in relation to the intensity of the alterations, being classified as slight, moderate, or intense.

3. Results

3.1 Characterization

Figure 1 illustrates the X-ray diffraction graphs of hybrid composite HC (Figure 1a), hybrid composite C_γ (Figure 1b) and of hybrid composites JCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 and HCoFS γ_3 , (Figure 1c). In Figure 1a, for the hybrid composite HC, the presence of four phases can be observed, with the main phase of HAp $Ca_5(PO_4)_3OH$, according to the standard form JCPDF 09-0432 and the second phase of traces of $CoFe_2O_4$, corresponding to the crystallographic card JCPDF 22-1086, Fe_2O_3 referring to the crystallographic card 33-0664 and peaks referring to Fe_3O_4 in 62.63; 57.21 and 43.20° corresponding to the crystallographic card 88-0315. Figure 1b shows the formation of the phase of $CoFe_2O_4$ and Fe_2O_3 ferrite (hematite) and traces of Fe_3O_4 magnetite identified by means of the crystallographic cards JCPDF 22-1086, JCPDF 33-0664 and JCPDF 88-0315, respectively.

It can be observed in the diffractograms of Figure 1c, for the hybrid composite synthesized with the commercial hydroxyapatite from JHS Biomaterials (JCoFS γ_1) in the concentration of 70:30 HAp: $CoFe_2O_4@SiO_2$ and in the systems HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 and HCoFS γ_3 in the concentrations of 70:30; 50:50 and 30:70, in general, the presence of four phases. The main phase of HAp $Ca_5(PO_4)_3OH$, according to the standard plug JCPDF 09-0432 and the second phase of traces of $CoFe_2O_4$, Fe_2O_3 corresponding to the crystallographic plugs JCPDF 22-1086, 33-0664 and peaks of Fe_3O_4 around 62.63; 57.21 and 43.20° referring to Fe_3O_4 corresponding to the crystallographic plug 88-0315.

In **Table 2**, the crystallinity and crystallite size of hybrid composites (HC; C_γ ; JCoFS γ_1 ; HCoFS γ_1 ; HCoFS γ_2 and HCoFS γ_3) are described.

Figure 2 illustrates the photomicrographs obtained by SEM of biomaterials. Crystals in various formats of hydroxyapatite granules and cobalt ferrite can be

observed, characterizing a complex surface topography, and showing interaction between material components. In all the SEM images it is possible to observe a structure composed of heterogeneous and highly agglomerated grains. The existence of pores in the biomaterials was also observed.

As can be seen from the photos, it is not possible to differentiate between HAp and cobalt ferrite particles. Although they are not exactly the same, they have very similar structure (size and shape of the granules), making their differentiation impossible due to their SEM appearance. Nanosized CoFe_2O_4 particles could not be detected.

3.4 Agar diffusion test

The halos resulting from the diffusion test are described in **Table 3** and can be seen in **Figure 3**. The values presented are the mean of the halos observed in each test, by biomaterial tested. Despite not having ciprofloxacin in its composition, there was formation of a halo around the biomaterial HC, and the average value of these halos was 20.5 mm.

3.5 *In vivo* biocompatibility

No evidence of pain or discomfort was observed, neither edema, hemorrhage nor dehiscence after the implantation of biomaterials, since there was no evidence that the animals interfered with the surgical wounds. In all animals surgical wound healing occurred by first intention, and was completed at 15 days postoperatively.

The biomaterials were easily identified during all histological analysis, as an amorphous, granular, acellular and well-defined material. CoFe_2O_4 was visualized in blackish or grayish tones with no affinity for the dye used (HE). HAp exhibited a purplish color, as it has a greater affinity for hematoxylin. In all observations the biomaterial interacted with the surrounding tissue (**Figure 4 and 5**).

At 15 days after implantation of composites, proliferation of inflammatory cells of monocytic lineage was observed around biomaterials. Figure 5B shows this proliferation around the $\text{HCo}\gamma_2$ biomaterial. At 30 days, the samples still contained moderate to intense amounts of mononuclear inflammatory infiltrate, except in the HC treatment, which contained an infiltrate considered discrete to absent. Only in this sample, evidence of phagocytosis of the implanted material was observed. At 70 days, the inflammatory infiltrate had disappeared in the $\text{HCo}\gamma_1$ sample and was classified as mild in the other samples, except in the $\text{HCo}\gamma_3$ sample, which presented moderate infiltration. In the $\text{HCo}\gamma_2$, $\text{JCo}\gamma$ and $\text{C}\gamma$ samples at 100 days, a discrete inflammatory infiltrate was observed, as described above.

At 15 postoperative days, besides the presence of a moderate to intense number of inflammatory cells, it was possible to observe proliferation of connective tissue around the biomaterial (Figure 5A). At 30 days, a decrease in fibroblasts could be seen in the newly formed connective tissue. This tissue was more visually organized than at 15 days, that is, the presence of collagen fibers was already noticed. On this date, all samples exhibited a moderate to intense degree of fibroplasia. At 70 days, fibroplasia was classified as medium to intense in all samples. At 70 and 100 days, this tissue was more organized and less vascularized. At 100 days the fibrous tissue showed a

more organized appearance, with a predominance of collagen fibers and a reduction in the number of fibroblasts.

At 15 days, it was possible to identify evidence of blood vessels proliferation in the region implanted in all animals. At 30 days, blood vessels were observed in greater number than in the previous observation, showing neovascularization, classified then as medium to intense, corroborating the studies of Day et al. (30), who describe the stimulation of neovascularization by HAp when implanted in subcutaneous tissue. Only in the $\text{JCo}\gamma_1$ sample, hyperemia was classified as mild. In subsequent observations, the degree of hyperemia decreased until it was no longer evident in $\text{HCo}\gamma_1$, $\text{HCo}\gamma_3$ and HC treatments at 100 days. This fact is linked to the maturation of the fibrous tissue, which gradually becomes more organized, with the predominance of collagen fibers. The neovascularization observed at implantation sites is expected as part of a natural wound healing process (31) and is also due to the way in which iron oxides and HAp are degraded in the body (32).

In $\text{HCo}\gamma_2$ and $\text{HCo}\gamma_3$ treatments, a yellowish-brown pigment (hemosiderin deposition) was observed in the proximities of the biomaterial at 15 and 30 days after implantation, respectively. Hemosiderin was also visualized at 70 days after implantation in HC treatment (Fig. 5C), and in $\text{HCo}\gamma_1$ and $\text{HCo}\gamma_3$ treatments, hemosiderin accumulations were visualized up to 100 post surgery days. In the samples obtained at this time, the observed amount of biomaterial was reduced compared to the samples collected at 15, 30 and 70 days.

4. Discussion

4.1 Characterization

It can be observed in Figure 1 and Table 2 that all compounds showed crystalline characteristics, which according to Reis et al. (14), is extremely important, since crystallinity influences *in vivo* performance by affecting the resorption and mechanical properties of biomaterials.

The presence of peaks with high intensity and high basal width for all reflections is also observed (figure 1), demonstrating the crystallinity of the samples and their nanostructural characteristics. However, as the HAp concentration decreases it is observed that the intensity of the HAp peaks decreases, increasing the intensities of the peaks referring to hybridized MNP's and absence of peaks referring to the drug. The absence of peaks corresponding to the drug agrees with the diffractogram of Figure 1b of the hybrid $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2: \gamma$ ($\text{C}\gamma$). The crystals size in nanometers, shown in table 2, is an important feature since the nanostructural characteristics of an implant are related to its surface complexity (33).

The complexity of the surface of each biomaterial, evidenced by the irregularity in the arrangement of hydroxyapatite and cobalt ferrite granules, is an important fact, as it can facilitate cell adhesion on the material. This was observed by Kikuchi et al. (33) using titanium implants coated with calcium phosphate and Carlo et al. (34), who observed the tissue reaction to the implantation of HAp in dogs subcutaneous tissue.

Regarding the porosity of the samples, as reported by Rodrigues et al. (19), Woodard et al. (20) and Carlo et al. (35), the presence of pores is important for the

formation of new bone, as they allow the migration and proliferation of osteoblasts and mesenchymal cells. Moreover, the porous structure of hydroxyapatite works as a passive support for vascular neof ormation (angiogenesis) making the repair process more dynamic. Chow (36) concluded in his review on calcium phosphate-based biomaterials that the presence of pores can accelerate the process of replacing the material with bone tissue. These conclusions are in line with several studies, including Orr et al. (11) and El-Aziz et al. (10) that highlight the fact that a porous surface considerably improves the union between the implant and bone surfaces while allowing its gradual replacement by bone tissue.

We can notice in all SEM images, structures composed of heterogeneous and highly agglomerated grains. These characteristics were observed by Sadighian et al. (37) when analyzing magnetite nanoparticles to SEM. Houshiar et al. (38) also observed a complex structure of agglomerated grains and different particle sizes, depending on the way cobalt ferrite was prepared (combustion, precipitation or co-precipitation) in their work.

Considering the above, all compounds demonstrated desirable characteristics of a biomaterial for bone implants, as cited by Arabnejad et al. (22) and Reis et al. (14) such as superficial complexity and porosity. These characteristics are known to favor cell adhesion on the material, neovascularization and therefore the transport of cells and nutrients needed for tissue regeneration (11,22,32).

4.2 Agar diffusion test

As reported above, all the compounds showed antimicrobial activity against *S. aureus* evidenced by the formation of the halos around them. This result are in line with that described by Zalneravicius et al. (39) who observed size-dependent antimicrobial activity of CoFe_2O_4 MNPs against some microorganisms. Tran et al. (40) also reported antimicrobial activity of iron oxide MNPs against *S. aureus*, suggesting that at 9 nm size, iron oxide MNPs can penetrate the bacterial cell and generate reactive oxygen species. In a 2018 study, Zalneravicius et al. (41), demonstrated the antimicrobial activity of CoFe_2O_4 MNPs specifically against *S. aureus*, and described this activity as a function of the Co^{2+} ion. Annapoorani et al. (42), studied the antibacterial activity of CoFe_2O_4 MNPs against fungi (*C. albicans*) and multi-resistant bacteria (*E. coli* and *K. pneumoniae*). The authors concluded that CoFe_2O_4 diffuses on agar and then exerts inhibitory activity on the growth of fungal and bacterial colonies.

As can be seen in **Table 3** biomaterials that contained ciprofloxacin in their composition formed halos larger than 21 mm and, therefore, larger than the halo formed by the paper disc impregnated with the drug and the halo formed by the HC biomaterial. These results suggest that the presence of CoFe_2O_4 may have had an antimicrobial effect in addition to that of ciprofloxacin. Ramanavicius et al. (43), who also performed a test similar to the one described here, using paper discs impregnated with MNPs of CoFe_2O_4 functionalized with oleic acid ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Ole}$) or L-lysine ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Lys}$), observed the formation of halos indicating inhibitory activity against *C. albicans*. These authors also reported antimicrobial activity of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Lys}$ and $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Ole}$ hybrids against *S. aureus*, *C. parapsilosis* and *E. coli*. Maksoud et al. (44), working with MNPs of CoFe_2O_4 observed antimicrobial potential against several

types of bacteria after 24 hours of bacterial incubation in agar plates. These authors observed that the antimicrobial efficacy of cobalt ferrite is enhanced when these nanoparticles are doped with metal ions, such as Zn. Therefore, the results obtained in the test are according to several publications, such as Ramanavicius et al. (43) and Sanpo et al. (45), which state that MeFe_2O_4 ferrites, where $\text{Me} = \text{Co}, \text{Zn}, \text{Cu}, \text{Ni}$, are able to fight human pathogens more effectively than antibiotics.

In the work of Ramanavicius et al. (43) in which a test similar to the one done in this work was described, the measurement of halos was not performed, once their formation already indicates antibacterial activity of the tested materials. Therefore, for the purposes of this study, the simple formation of halos around biomaterials is more important than their diameter. In summary, the test result showed that biomaterials that have ciprofloxacin in their formulation were effective in releasing the drug, that it is effective in containing the bacterial growth of the *S. aureus* strain used and also showed the antibacterial activity of cobalt ferrite.

4.5 *In vivo* biocompatibility

The postoperative observations indicated a good acceptance of the compounds, since macroscopically no inflammatory reaction was observed and no rejection of the implanted compounds occurred as well. Carlo et al. (34), Yanagida et al. (46) and Sepúlveda et al. (47) obtained similar results in their studies with Hap associated with bioglass, HAp covering lactic acid and synthetic HAp for skin filling, respectively.

The implantation of a biomaterial within the living organism induces a series of immune responses collectively referred to as foreign body response (FBR), which attempt to eliminate and/or isolate the implanted material (48,49). According to Anderson et al. (50), the initial response to the implantation of a biomaterial is the observation of an acute neutrophilic inflammatory infiltrate, present for up to one week. In addition to neutrophils, other cells involved in the inflammatory reaction induced by implanted biomaterials are lymphocytes, monocytes and macrophages (51,52). The intensity and duration of the inflammatory response is quite varied and is related not only to host-linked factors, but largely to the characteristics of the implanted material, such as surface chemistry, roughness and porosity (53,54). Ye et al. (55) observed after the implantation of HAp in the middle ear of rats, an inflammatory infiltrate with predominance of lymphocytes, followed by neutrophils in smaller amounts. In the present study, because the first observations were made 15 days after the operation, the presence of neutrophils, which characterize the acute phase of the inflammatory process, was not observed.

After this initial period, the so-called chronic inflammatory phase occurs. This phase is characterized by the presence of cells of the monocytic lineage, representing an unspecific inflammatory process and is confined to the implant site, in case of biocompatibility (56), as in the present study. As explained previously, the inflammatory infiltrate observed around an implant has a variable duration. In this study, the monocytic inflammatory infiltrate was present in some animals until 100 days (Figure 4E and F; Figure 5C). However, from 30 days after implantation, it was possible to notice the gradual reduction of inflammatory cells until their complete disappearance in HCo γ_1 , HCo γ_3 and C γ . In samples in which the inflammatory infiltrate persisted until 100 days (HCo γ_2 , JCo γ and HC), it was discrete and restricted to small sections of the

slides. This fact was expected due to the biocompatibility of the biomaterials used in this study.

Abudayyak et al. (57), in a study to evaluate the behavior of CoFe_2O_4 nanoparticles in contact with mammalian cells *in vitro*, observed that at certain concentrations (0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and especially when they are not covered by some biocompatible material induce toxic responses in general, with oxidative stress, cell death and exacerbated inflammatory response. In the present study an inflammatory response was observed, but as previously described, this response was attributed to the surgical procedure to implant the biomaterial. We can infer from this result that the coating of CoFe_2O_4 nanoparticles was effective in avoiding the deleterious effects listed above. Moreover, in a normal wound healing process, an inflammatory reaction, granulation tissue formation, and extracellular matrix deposition occurs initially (31,58). Therefore, the inflammatory response observed in this study was considered compatible with what was expected and described in the literature.

Carlo et al. (34) and Sepúlveda et al. (47) observed a large amount of multinucleated giant cells around the HAp particles implanted in the subcutaneous tissue of dogs. In the present work, they were visualized only in HCo1 and HCo samples, but in small amounts and only at 15 days postoperatively. The foreign body giant cells (FBGC), are the result of the fusion of macrophages present around the biomaterial. They appear when the particles of the biomaterial are too large to be phagocyted by the macrophages. Macrophages and FBGCs induce infiltration and stimulation of immune cells (e.g., lymphocytes) and stromal cells (e.g., fibroblasts), leading to inflammation and fibrosis in the implant (52,59) with consequent encapsulation. The intensity of this inflammatory reaction and fibrosis is related to many factors linked to the implant, as previously described (53,54). Therefore, its presence in small quantities, as in the present study, or even its absence, is an indication of the biocompatibility of the implanted material.

At 15 postoperative days, besides the presence of a moderate to intense number of inflammatory cells, it was possible to observe proliferation of connective tissue around the biomaterial (Figure 5A). This tissue had characteristics of an active tissue, rich in fibroblasts and blood vessels, (hyperemia in varying degrees). These findings are characteristic of the normal reaction of the organism when in contact with an implant, prosthesis or biomaterial (50) and were also observed by Carlo et al. (34), who observed fibroblast proliferation and formation of fibrous tissue around HAp particles implanted in subcutaneous tissue of dogs and by Sepúlveda et al. (47), when implanting HAp in subcutaneous tissue of rabbits. In the HCo γ_1 sample, this fibrous tissue appeared to be more organized, tending to encapsulate the material. Other authors, such as Borges et al. (18) and Vital et al. (21) observed similar facts and concluded that the formation of fibrous tissue around HAp particles is normal, even when implanted in bone. However, it is important to note that this fibrous tissue formation is more intense when HAp is implanted in soft tissue, with a tendency to encapsulate it (33,46). When implanted in bone tissue, HAp usually makes a direct connection with the new bone formed, without the interposition of fibrous tissue (18,60). Finetti et al. (61) also observed, after placing a cobalt ferrite implant coated with a polysaccharide hydrogel in the subcutaneous tissue of rats, that after 7 days there was infiltration of fibrovascular tissue in it. In our study, the proliferation of fibrous tissue around the biomaterial was observed at all times, and it showed to be more

disorganized and cellularized, with proliferation of blood vessels until the first 30 days postoperatively.

At 30 days, all samples exhibited a moderate to intense degree of fibroplasia, which according to Kim et al. (62), corresponds to the isolation of a synthetic material when implanted in soft tissues. As described above, fibroplasia around the implanted biomaterials was considered to be average to intense at 70 days post-surgery. In addition, a maturation of the fibrous tissue was observed, which showed less vascularization and a greater predominance of collagen fibers at 100 days. This change in the characteristics of the tissue formed around the implanted biomaterials was described by other authors, as Li et al. (63), who measured the thickness of the fibrous capsule formed around HA implants in the subcutaneous tissue of rats, and by Ye et al. (55) in the middle ear.

The tissue organization around a biomaterial implanted in soft tissue, with a progressive tendency to encapsulation was observed by Li et al. (63), Sepúlveda et al. (47) and Carlo et al. (34). According to these authors, a complex surface, which is the case of the composites used in this study, may be favorable in bone to promote cell adhesion, however, in soft tissues, the same surface may cause mechanical discomfort to the tissues and, consequently, encapsulation as a defense mechanism. In this study we observed evident fibroplasia, with a tendency to encapsulate the biomaterial (Fig 5, A). This result is in accordance with that described by Borges et al. (18) and Carlo et al. (34). According to these authors, HAp resorption in bone is performed by osteoclasts. When it is implanted in soft tissues, it is encapsulated by fibrous tissue and its absorption is slower, being performed by macrophages and foreign body giant cells.

The reduction on the amount of the compounds during the observations is a fact that indicates the degradation of them (Fig 5D). In addition, the presence of hemosiderin deposits, resulting from iron metabolism by macrophages (64), suggests that CoFe_2O_4 is being degraded.

During the experimental times, the degradation and interaction of the composites with the surrounding tissue occurred without causing an evident toxic reaction and without significant inflammatory infiltration. Therefore, they are considered biocompatible. The complexity of the composite surface, observed by SEM, explains some of the events observed in histology. This complexity is extremely important for the use of these materials in bone regeneration, since this characteristic is beneficial to the cell adhesion process. In addition, surface complexity may contribute to biodegradation in a controlled manner, according to XIE et al. (65), especially when it comes to biomaterials implanted in bone tissue, once they must be reabsorbed as new bone is formed.

5. Conclusion

It can be concluded that the biomaterials analyzed are suitable to allow tissue growth on them, due to their high surface complexity, evidenced by SEM. DRX showed the high crystallinity of the materials and the presence of the main phase of cobalt ferrite for the $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ system and the C_γ carrier. The agar diffusion test showed that they are effective in inhibiting the growth of *S. aureus*, and is therefore indicative of their efficacy as implants in regions infected by this microorganism.

Histological analysis showed that biomaterials are biocompatible. There were no histological signs of rejection by the tissues where they were implanted, or even toxicity, and they induced a controlled inflammatory response. They are biodegradable; however, the degradation period is longer than 100 days.

Thus, based on the obtained results, their subsequent evaluation for bone regeneration in bone infection is indicated.

Table 1: List of biomaterials, expressed in symbology and mass ratio.

Codes	Mass ratio % and composition	m _{HAp} (g)	m _{CoFe₂O₄} (g)	m _γ (g)	m _T (g)
HCoFS _{γ1}	HAp: CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ (70:30)+γ	17,5	7,5	2,5	27,5
HCoFS _{γ2}	HAp: CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ (50:50)+γ	12,5	12,5	2,5	27,5
HCoFS _{γ3}	HAp: CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ (30:70) +γ	7,5	17,5	2,5	27,5
JCoFS _γ	HAp JHS: CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ (70:30)+γ	12,6	5,4	1,8	19,8
C _γ	CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ +γ	-	25,0	2,5	27,5
HC	HAp: CoFe ₂ O ₄ @SiO ₂ (70:30)	11,2	4,8	-	16,0

HAp: hydroxyapatite; CoFe₂O₄@SiO₂: coated cobalt ferrite; γ: ciprofloxacin; HApJHS: hydroxyapatite (JHS laboratory); m_{HAp}: mass in grams of hydroxyapatite; m_{CoFe₂O₄}: mass in grams of cobalt ferrite; m_γ: mass in grams of ciprofloxacin; m_T: total mass in grams.

Table 2: Crystallinity and crystallite size of hybrid composites

Samples	Crystallinity (%)	Crystal Size (nm)
C _γ	66,00	31,00
HC	76,40	54,10
JCoFS _{γ1}	90,40	69,70
HCoFS _{γ1}	74,99	51,14

HCoFS γ_2	89,70	37,32
HCoFS γ_3	86,90	37,49

Table 3: Biomaterials and the mean diameters of the halos formed around each of them

Material	Mean
Cipro	22,25
HCo γ_1	30,25
HCo γ_2	30
HCo γ_3	26,5
JCo γ	23,75
HC	20,75
C γ	32,5

Cipro: ciprofloxacin disc

Conflict of interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Authors Contributions

C. C. Vital Cintra: first author: PhD student, was responsible for the execution of all steps of the project, including its elaboration

D. A. C. Ferreira-Ermita: Participated in the elaboration of the project and the surgical part, acting as anesthesiologist

F. H. Loures: responsible for the histological evaluation

P. M. A. G. Araújo: Development of biomaterials and execution of DRX

I. M. Ribeiro: helped with the surgical part of the project and the care of the animals

F. R. Araújo: acted in the surgical part of the project

F. L. Valente: Coordinator of the project, participated in its elaboration and guided its execution

E. C. Carlo Reis: Participated in the elaboration of the project and guided its execution

A. C. F. M. Costa: Oriented in the elaboration of biomaterials and in the execution of their characterization

A. P. B. Borges: Main project coordinator

S. M. C. M. Bicalho: Provided the biomaterials used in the project

Funding

CNPq grant number: 311622/2018-6

FAPEMIG grant number: APQ-00984-18

Capes grant number: 88882.349630/2019-01

Acknowledgments

The authors thank CAPES, FAPEMIG and CNPq for the financial support and LABSMAC and JHS laboratories for the partnership.

References

1. von Recum AF, LaBerge M. Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. *J Appl Biomater*. 1995;6(2):137–44.
2. Guo B, Lei B, Li P, Ma PX. Functionalized scaffolds to enhance tissue regeneration. *Regen Biomater*. 2015;2(1):47–57.
3. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;(395):81–98.
4. Parent M, Magnaudeix A, Delebassée S, Sarre E, Champion E, Viana Trecant M, et al. Hydroxyapatite microporous bioceramics as vancomycin reservoir: Antibacterial efficiency and biocompatibility investigation. *J Biomater Appl*. 2016;31(4):488–98.
5. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(10):2445–61.
6. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc*. 1991;74(7):1487–510.
7. Alves EGL, Rezende CMF, Oliveira HP, Borges NF, Mantovani PF, Lara JS. Avaliação mecânica da placa de compósito de poli-hidroxibutirato e hidroxiapatita em modelos ósseos de gato. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2010;62(6):1367–74.
8. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Quim Nova*. 2010;33(6):1352–8.
9. Nakahira A, Nakamura S, Horimoto M. Synthesis of modified hydroxyapatite (HAP) substituted with Fe ion for DDS application. *IEEE Trans Magn*. 2007;43(6):2465–7.
10. Abd El-Aziz AM, El Backly RM, Taha NA, El-Maghraby A, Kandil SH.

- Preparation and characterization of carbon nanofibrous/hydroxyapatite sheets for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2017;76:1188–95.
11. Orr TE, Villars PA, Mitchell SL, Hsu HP, Spector M. Compressive properties of cancellous bone defects in a rabbit model treated with particles of natural bone mineral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*. 2001;22(14):1953–9.
 12. Vital CC. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. *Rev Ceres*. 2008;55(1):9–14.
 13. Mondal B, Mondal S, Mondal A, Mandal N. Fish scale derived hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Mater Charact [Internet]*. 2016;121:112–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchar.2016.09.034>
 14. Reis ECC, Borges APB, Oliveira PM, Bicalho SMCM, Reis AM, Da Silva CL. Desenvolvimento e Caracterização de Membranas Rígidas, Osteocondutoras e Reabsorvíveis de Polihidroxibutirato e Hidroxiapatita para Regeneração Periodontal. *Polimeros*. 2012;22(1):73–9.
 15. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: Uma revisão. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci*. 2005;41(1):27–51.
 16. Everts PAM, Knape JTA, Weibrich G, Schönberger JPAM, Hoffmann J, Overdevest EP, et al. Platelet-rich plasma and platelet gel: A review. *J Extra Corpor Technol*. 2006;38(2):174–87.
 17. Nguyen A, Hoang V, Laquer V, Kelly KM. Angiogenesis in cutaneous disease: Part I. *J Am Acad Dermatol [Internet]*. 2009;61(6):921–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.05.052>
 18. Borges APB, Rezende CMF, Ribeiro MFB, Melo EG, Nóbrega Neto PI. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 2000;52(6):616–20.
 19. Rodrigues CVM, Serricella P, Linhares ABR, Guerdes RM, Borojevic R, Rossi MA, et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(27):4987–97.
 20. Woodard JR, Hildore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JAC, et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials*. 2007;28(1):45–54.
 21. Vital CC, Borges APB, Fonseca CC, Tsiomis AC, Carvalho TB, Fontes EB, et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2006;58(2):175–83.
 22. Arabnejad S, Burnett Johnston R, Pura JA, Singh B, Tanzer M, Pasini D. High-strength porous biomaterials for bone replacement: A strategy to assess the interplay between cell morphology, mechanical properties, bone ingrowth and manufacturing constraints. *Acta Biomater [Internet]*. 2016;30:345–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.048>
 23. Sharifi I, Shokrollahi H, Amiri S. Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications. *J Magn Magn Mater [Internet]*. 2012;324(6):903–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2011.10.017>
 24. Khanna L, Verma NK, Tripathi SK. Burgeoning tool of biomedical applications - Superparamagnetic nanoparticles. *J Alloys Compd [Internet]*. 2018;752:332–

53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2018.04.093>
25. Araújo PMAG, Araújo NG, Silva MR, Bicalho SMCM, Costa ACFM. Estudo do efeito da modificação de superfície de Fe₃O₄ e CoFe₂O₄ para aplicação como carreador de fármaco. *Cerâmica*. 2018;64(372):466–76.
 26. Amiri S, Shokrollahi H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. *Mater Sci Eng C [Internet]*. 2013;33(1):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.09.003>
 27. Sarath Chandra V, Elayaraja K, Suganthi R V., Ahymah Joshy MI, Sulania I, Kulriya PK, et al. Effect of irradiation of Si⁵⁺ ion on fe doped hydroxyapatite. *Adv Mater Lett*. 2013;4(6):438–43.
 28. Froughi F, Hassanzadeh-Tabrizi SA, Amighian J. Microemulsion synthesis and magnetic properties of hydroxyapatite-encapsulated nano CoFe₂O₄. *J Magn Magn Mater*. 2015;382:182–7.
 29. Medvecky L, Sopcak T, Girman V, Briancin J. Amorphous calcium phosphates synthesized by precipitation from calcium D-gluconate solutions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp [Internet]*. 2013;417:191–200. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.11.015>
 30. Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, et al. Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25(27):5857–66.
 31. Slatter DH. *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 3th ed. São Paulo: Ed Manole; 2007. 2806 p.
 32. Ferreira-Ermita DAC, Valente FL, Carlo-Reis EC, Araújo FR, Ribeiro IM, Cintra CCV, et al. Characterization and in vivo biocompatibility analysis of synthetic hydroxyapatite compounds associated with magnetite nanoparticles for a drug delivery system in osteomyelitis treatment. *Results Mater*. 2020;5(December 2019):100063.
 33. Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies JE. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials*. 2005;26(26):5285–95.
 34. Carlo EC, Borges APB, Rezende CM de F, Moreira J do CL, Fonseca CC, Pontes KCS, et al. Avaliação Do Efeito Osteoindutor Da Hidroxiapatita E Do Biovidro Implantados Em Tecido Subcutâneo De Cão. *Rev Ceres*. 2007;54(316):492–500.
 35. Carlo EC, Borges APB, Vargas MIV, Martinez MM, Eleotério RB, Dias AR, et al. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. *Arq Bras Med Vet e Zootec*. 2009;61(4):844–52.
 36. Chow LC. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J [Internet]*. 2009;28(1):1–10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 37. Sadighian S, Rostamizadeh K, Hosseini-Monfared H, Hamidi M. Doxorubicin-conjugated core-shell magnetite nanoparticles as dual-targeting carriers for anticancer drug delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;117:406–13.
 38. Houshiar M, Zebhi F, Razi ZJ, Alidoust A, Askari Z. Synthesis of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles using combustion, coprecipitation, and precipitation methods: A comparison study of size, structural, and magnetic properties. *J Magn Magn Mater [Internet]*. 2014;371:43–8. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.06.059>
39. Žalnėravičius R, Paškevičius A, Kurtinaitiene M, Jagminas A. Size-dependent antimicrobial properties of the cobalt ferrite nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 2016;18(10).
 40. Tran N, Mir A, Mallik D, Sinha A, Nayar S, Webster TJ. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Int J Nanomedicine.* 2010;5(1):277–83.
 41. Žalnėravičius R, Paškevičius A, Mažeika K, Jagminas A. Fe(II)-substituted cobalt ferrite nanoparticles against multidrug resistant microorganisms. *Appl Surf Sci.* 2017;435:141–8.
 42. Annapoorani CL, Mahalakshmi K, Sankari L. BIOCOMPATIBILITY STUDIES ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF UNCOATED COBALT FERRITE NANOPARTICLES Annapoorani. *Int J Pure Appl Math.* 2018;119(12):15659–65.
 43. Ramanavičius S, Žalnėravičius R, Niaura G, Drabavičius A, Jagminas A. Shell-dependent antimicrobial efficiency of cobalt ferrite nanoparticles. *Nano-Structures and Nano-Objects.* 2018;15:40–7.
 44. Maksoud MIAA, El-Sayyad GS, Ashour AH, El-Batal AI, Elsayed MA, Gobara M, et al. Antibacterial, antibiofilm, and photocatalytic activities of metals-substituted spinel cobalt ferrite nanoparticles. Vol. 127, *Microbial Pathogenesis.* Elsevier Ltd; 2019. 144–158 p.
 45. Sanpo N, Berndt CC, Wen C, Wang J. Transition metal-substituted cobalt ferrite nanoparticles for biomedical applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2013;9(3):5830–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.037>
 46. Yanagida H, Okada M, Masuda M, Ueki M, Narama I, Kitao S, et al. Cell adhesion and tissue response to hydroxyapatite nanocrystal-coated poly(L-lactic acid) fabric. *J Biosci Bioeng* [Internet]. 2009;108(3):235–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.04.003>
 47. Sepúlveda RV, Borges APB, Conceição LG, Valente FL, Carlo Reis EC, Bohnenberger IB. Composite synthetic hydroxyapatite 30%, in two physical states, as dermal filler. *Rev Ceres.* 2013;60(4):458–64.
 48. Bank RA, Zandstra J, Room H, Petersen AH, Van Putten SM. Biomaterial Encapsulation Is Enhanced in the Early Stages of the Foreign Body Reaction during Conditional Macrophage Depletion in Transgenic Macrophage Fas-Induced Apoptosis Mice. *Tissue Eng - Part A.* 2017;23(19–20):1078–87.
 49. Zaveri TD, Lewis JS, Dolgova N V., Clare-Salzler MJ, Keselowsky BG. Integrin-Directed Modulation of Macrophage Responses to Biomaterials. *Biomaterials.* 2014;35(11):3504–15.
 50. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. FOREIGN BODY REACTION TO BIOMATERIALS. *Semin Immunol* [Internet]. 2008;20(2):86–100. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 51. Hachim D, LoPresti ST, Yates CC, Brown BN. Shifts in macrophage phenotype at the biomaterial interface via IL-4 eluting coatings are associated with improved implant integration. *Biomaterials.* 2017;112:95–107.
 52. Rostam HM, Singh S, Salazar F, Magennis P, Hook A, Singh T, et al. The

- impact of surface chemistry modification on macrophage polarisation. 2016;221(11):1237–46.
53. Kim CS, Jung KH, Kim H, Kim CB, Kang IK. Collagen-grafted porous HDPE/PEAA scaffolds for bone reconstruction. *Biomater Res* [Internet]. 2016;20(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40824-016-0071-5>
 54. Lee MS, Lee DH, Jeon J, Oh SH, Yang HS. Topographically Defined, Biodegradable Nanopatterned Patches to Regulate Cell Fate and Acceleration of Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(45):38780–90.
 55. Ye Q, Ohsaki K, Li K, Li DJ, Zhu CS, Ogawa T, et al. Histological reaction to hydroxyapatite in the middle ear of rats. *Auris Nasus Larynx*. 2001;28(2):131–6.
 56. Rezaie HR, Bakhtiari L, Öchsner A. *Biomaterials and Their Applications*. 1st ed. SPRINGER BRIEFS IN MATERIALS. Springer International Publishing; 2015.
 57. Abudayyak M, Altincekic Gurkaynak T, Özhan G. In Vitro Toxicological Assessment of Cobalt Ferrite Nanoparticles in Several Mammalian Cell Types. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2017;175(2):458–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0803-3>
 58. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mechanisms involved in wound healing: A revision. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci*. 2005;41(1):27–51.
 59. Yang J, Jao B, McNally AK, Anderson JM. In vivo quantitative and qualitative assessment of foreign body giant cell formation on biomaterials in mice deficient in natural killer lymphocyte subsets, mast cells, or the interleukin-4 receptor and in severe combined immunodeficient mice. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(6):2017–23.
 60. Carlo EC, Borges APB, Del Carlo RJ, Martinez MMM, Oliveira PM, Morato GO, et al. Comparison of in vivo properties of hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites assessed for bone substitution. *J Craniofac Surg*. 2009;20(3):853–9.
 61. Finetti F, Terzuoli E, Donnini S, Uva M, Ziche M, Morbidelli L. Monitoring endothelial and tissue responses to cobalt ferrite Nanoparticles and Hybrid Hydrogels. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(12):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0168727>
 62. Kim J. Protein adsorption on polymer particles. 2002;4373–81.
 63. Li DJ, Ohsaki K, Li K, Cui PC, Ye Q, Baba K, et al. Thickness of fibrous capsule after implantation of hydroxyapatite in subcutaneous tissue in rats. *J Biomed Mater Res*. 1999;45(4):322–6.
 64. Grotto HZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30(5).
 65. Xie Z, Cui X, Zhao C, Huang W, Wang J, Zhang C. Gentamicin-loaded borate bioactive glass eradicates osteomyelitis due to *Escherichia coli* in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):3293–8.

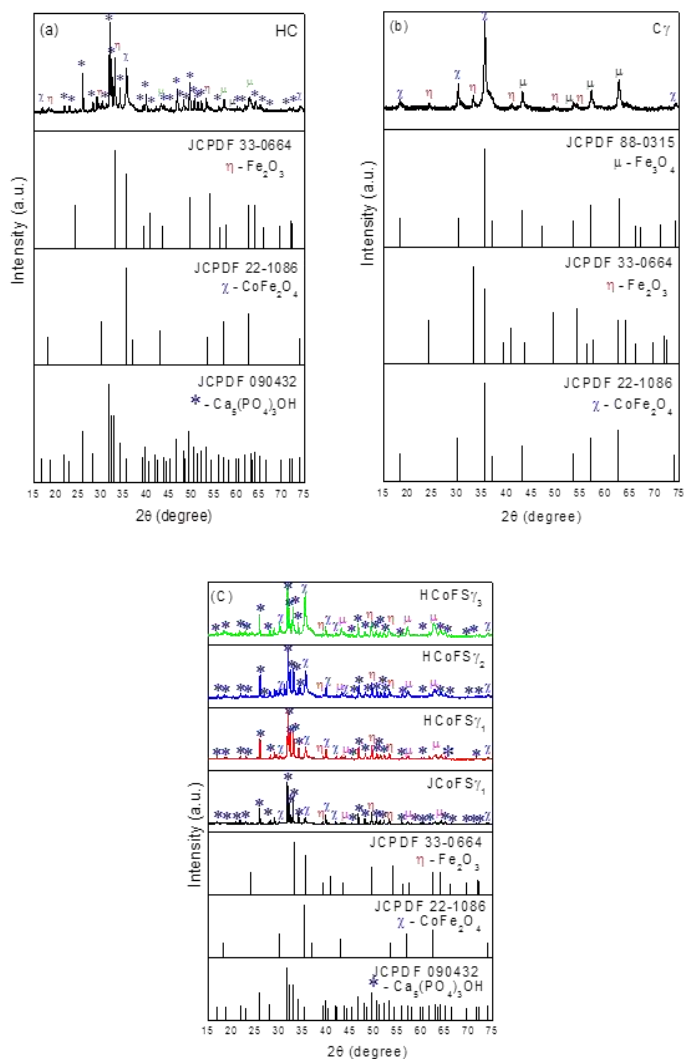


Figure 1: X-ray diffraction (XRD) of the hybrid composites: (a) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (HC); (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\gamma$ ($C\gamma$); (c) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (70:30) ($\text{JCoFS}\gamma_1$); $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (70:30) ($\text{HCoFS}\gamma_1$); $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (50:50) ($\text{HCoFS}\gamma_2$) e $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2:\text{HAp}$ (30:70) ($\text{HCoFS}\gamma_3$).

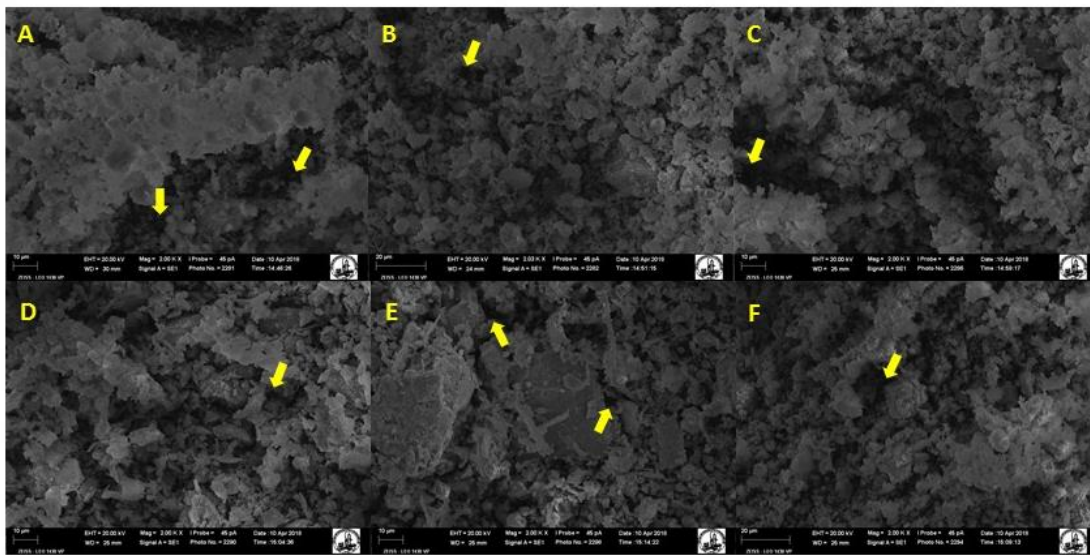


Figure 2: Photomicrographs of scanning electron microscopy of biomaterials (2000X magnification). (A) HCoFS γ_1 (70:30) (B) HCoFS γ_2 (50:50); (C) HCoFS γ_3 (30:70); (D) JCoFS γ (70:30); (E) C γ and (F) HC (70:30). The arrows highlight the pores

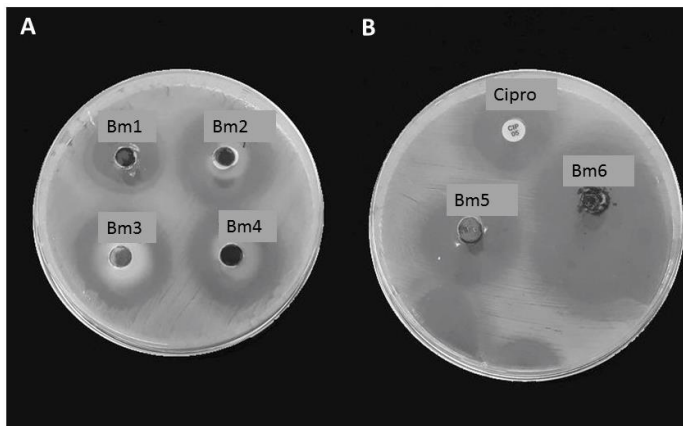


Figure 3: Petri plates showing the halos formed in the agar diffusion test. Bm1: HC; Bm2: HCoFS γ_2 ; Bm3: HCoFS γ_1 ; Bm4: HCoFS γ_3 ; Bm5: JCoFS γ_1 ; Bm6: C γ ; Cipro: ciprofloxacin disc

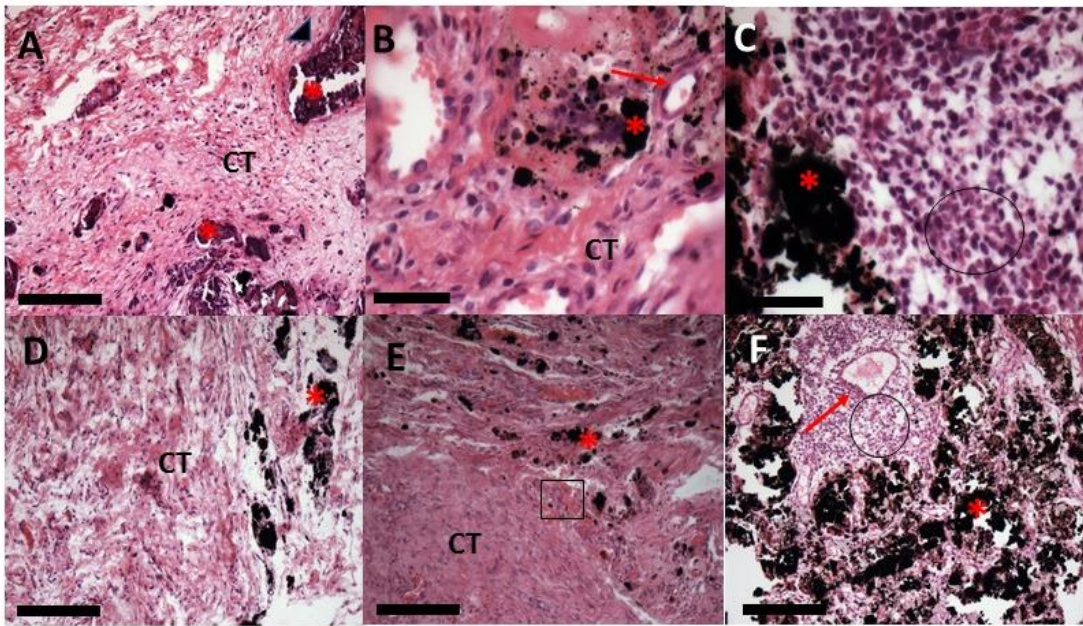


Figure 4: Photomicrographs at 15 (A and B), 30 (C) and 70 (D, E and F) days after implantation of biomaterials. (A) HCo γ_1 ; (B) HCo γ_2 ; (C) HCo γ_3 , (D) C γ ; (E) and (F) HC. Asterisk: biomaterial; red arrow: hyperemia; arrowhead: fibrous capsule formation; circle: inflammatory infiltrate; square: bleeding; CT: conjunctive tissue. (A), (C), (D) and (F): 100x magnification; (B) and (E): 400x magnification. HE. Bar: 40 μ m.

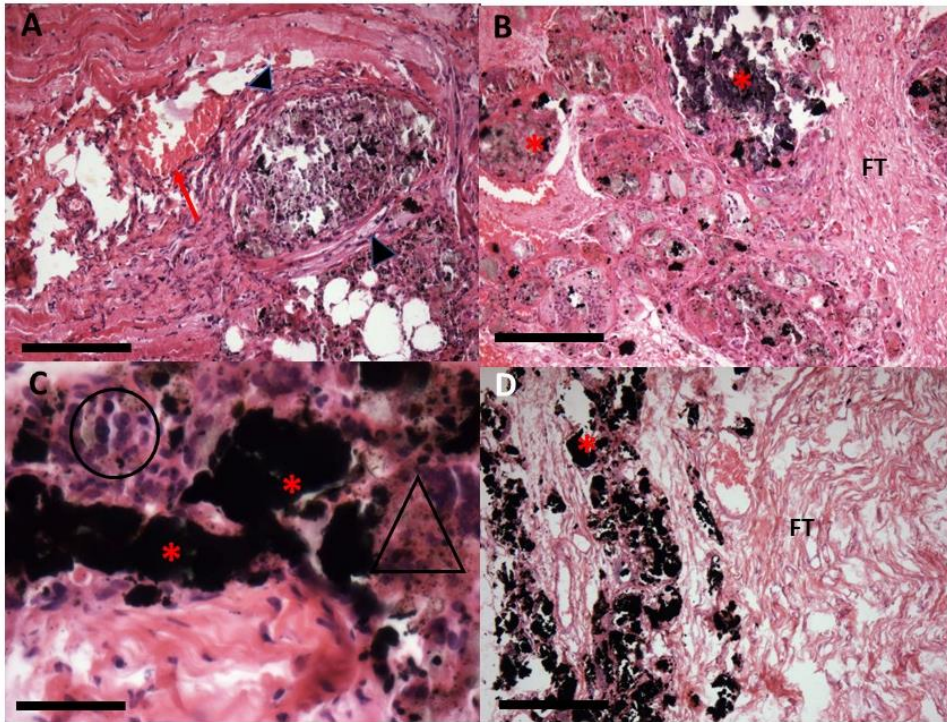


Figure 5: Photomicrographs at 15 (A), 30 (B), 70 (C) and 100 (D) days after implantation of the materials. (A), (B) and (C) HC; (D) C γ . Asterisk: biomaterial; arrowhead: fibrous capsule; triangle: hemosiderin deposit; circle: inflammatory infiltrate; FT: organized fibrous tissue (collagen fibers). (A), (B) and (D):100x; (C): 400x. HE. Bar: 40 μ m.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL DE FALHA ÓSSEA INFECTADA NO ÚMERO DE COELHOS

RESUMO

A osteomielite é um sério problema de saúde que afeta milhares de pessoas todos os anos ao redor do mundo. Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico e tratamento, a terapia da osteomielite ainda é desafiadora. Portanto, é necessária a pesquisa e desenvolvimento de novas formas de tratamento da doença. Para isso, muitas vezes é necessário o uso de modelos animais. Apesar de existirem várias técnicas para o desenvolvimento de infecção óssea em animais de laboratório, as técnicas descritas são agressivas ou se valem do uso de agentes esclerosantes. Desta forma, o objetivo deste trabalho, foi desenvolver uma técnica segura e de fácil execução para a indução de infecção óssea em coelhos, para o posterior uso em estudos de novas formas de tratamento da osteomielite. Para isso, foram utilizados seis coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 1 ano de idade e peso médio de 3,5 Kg. Em todos os animais foi produzido um orifício córtico-medular na metáfise proximal do úmero para se obter acesso ao canal medular e proceder a inoculação de uma solução contendo $2 \cdot 10^6$ unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* (cepas isoladas de mastite caprina) induzindo um quadro de osteomielite nos animais. Após 15 dias da inoculação bacteriana, os animais foram submetidos à lavagem e desbridamento da ferida. Foram realizadas radiografias do membro manipulado cirurgicamente, imediatamente antes da indução da osteomielite, aos 15 dias e aos 57 dias de pós-operatório. Nesta data, os animais foram submetidos à eutanásia para a coleta do úmero e realização da microtomografia computadorizada. Em todas as radiografias se utilizou um penetrômetro de alumínio com o objetivo de se medir a densidade óssea. A avaliação radiográfica e a densitometria demonstraram sinais compatíveis com um quadro de osteomielite. A microtomografia computadorizada revelou alterações significativas na arquitetura óssea, com a presença de reação periosteal, áreas de lise óssea e aumento significativo da porosidade do osso cortical.

Palavras-chave: osteomielite, modelo animal, *staphylococcus aureus*, microtomografia computadorizada

1 INTRODUÇÃO

A terapia de osteomielite representa um problema desafiador na medicina. Ela ocorre, muitas vezes, após infecções traumáticas ou em combinação com fatores predisponentes (SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014), o que justifica as pesquisas de novas formas de tratamento. Para se realizar essas pesquisas, muitas vezes é necessário o uso de modelos animais para se induzir a doença com o objetivo posterior de testar terapias ou medicamentos em estudo.

Muitos modelos de infecção óssea são descritos na literatura. Na grande maioria deles, se usam substâncias esclerosantes, que causam danos vasculares ao osso, tornando-o mais frágil e facilitando a colonização bacteriana. O uso de agentes esclerosantes produz um modelo de osteomielite aguda, que possui aspectos diferentes da osteomielite crônica observada na medicina (PATEL et al., 2009; WORLOCK et al., 1988). Como alternativa, autores descrevem a utilização de pinos ou parafusos introduzidos no canal medular, para funcionarem como corpo estranho e fornecerem superfície para a formação de colônias bacterianas (BROWN et al., 2017; GAUDIN et al., 2011). Entretanto, estas técnicas muitas vezes são de difícil execução e além disso podem gerar quadros graves com supuração e formação de abscessos no local, tornando o uso deste tipo de técnica muitas vezes inviável, principalmente quando se objetiva usar um grande número de animais.

Portanto, a proposta deste trabalho é desenvolver e descrever uma técnica de indução de infecção óssea que seja relativamente simples de ser executada e reprodutível em um grande número de animais. Além disso, se objetivou que a técnica desenvolvida fosse segura para os animais utilizados, não ocasionando morte por sepse ou um quadro de infecção grave que acabaria levando à necessidade de se descartar os animais do experimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Osteomielite

Os defeitos ósseos podem ser causados por traumas graves e se existe fratura exposta, é possível que ocorra uma infecção, que continua a ser uma das complicações mais graves no tratamento de fraturas ortopédicas abertas. A osteomielite persistente pode levar à necessidade de amputação se não for tratada

com sucesso. Apesar dos contínuos avanços nos procedimentos cirúrgicos e terapias antimicrobianas, a osteomielite continua sendo uma séria complicação de traumas ósseos e cirurgias ortopédicas (BROWN et al., 2017; PRICE et al., 1996; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014). Além da osteomielite proveniente de processos traumáticos, essa patologia também pode ocorrer em decorrência de úlceras associadas ao chamado “pé diabético”. Segundo Sybenga et al. (2020), cerca de 25% dos pacientes diabéticos desenvolvem úlceras de extremidade nos membros inferiores em algum momento, e destes, até 72% desenvolvem osteomielite crônica. Esta entidade da doença tem vários fatores contribuintes: as consequências metabólicas da diabetes; isquemia óssea e dos tecidos moles, devido à má perfusão; e neuropatia periférica motora, sensorial e autonômica (LEW; WALDVOGEL, 2004).

Outra forma de apresentação da doença, que apesar de não ser comum, também não é de ocorrência rara, é a osteomielite hematogênica aguda (HWANG et al., 2016). A osteomielite hematogênica é vista principalmente em crianças pré-púberes e se caracteriza pela nidificação de bactérias dentro do osso, às vezes apenas ligeiramente lesionados, presumivelmente semeados por bactérias não aparentes, mas presentes na corrente sanguínea (KAVANAGH; O'BRIEN; KERRIGAN, 2018; LEW; WALDVOGEL, 2004). Normalmente, esse tipo de osteomielite ocorre na metáfise de ossos longos em crianças e nos corpos das vértebras em qualquer idade (BIRT et al., 2017; HWANG et al., 2016; LEW; WALDVOGEL, 2004).

Em cães, a osteomielite hematogênica aguda afeta com maior frequência neonatos ou indivíduos jovens. Assim como no ser humano, as infecções em cães imaturos localizam-se na região metafisária (SLATTER, 2007).

Há diferentes sistemas de classificação para categorizar a osteomielite. Historicamente, ela tem sido rotulada como aguda, subaguda, ou crônica, dependendo de seu curso clínico, achados histológicos e duração da doença, mas não há um acordo consensual sobre a escala temporal utilizada ou conclusões específicas. Como resultado, alguns pesquisadores têm proposto sistemas de classificação mais detalhados para a doença (PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009; STUPINA et al., 2019).

2.1.1 Fisiopatologia da osteomielite

Para a osteomielite se estabelecer, deve ocorrer contaminação bacteriana inicial e aderência, seguida por infecção e a subsequente cronicidade. Como visto

acima, as bactérias atingem o osso por via hematológica, através de inoculação direta (via exógena) ou a partir dos tecidos moles adjacentes. Esta última via, embora comum no homem, é relativamente rara na medicina veterinária. No homem, uma variedade de fatores predisponentes relacionada ao paciente foi identificada (CLEGG, 2011; LEW; WALDVOGEL, 2004; PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009), nas espécies veterinárias existe menos compreensão de tais fatores de risco, além daqueles relacionados ao imunocomprometimento (CLEGG, 2011).

Na medicina veterinária, normalmente a rota exógena ocorre durante a redução aberta de uma fratura fechada ou está associada a uma fratura exposta (CLEGG, 2011; SIQUEIRA et al., 2014). Nesses casos, a contaminação bacteriana é a causa mais prevalente da osteomielite e, mais comumente associadas às espécies de estafilococos, particularmente *Staphylococcus intermedius* e *S. aureus* (SIQUEIRA et al., 2014). Em seres humanos, o microrganismo mais prevalente nos casos de osteomielite aguda e crônica é o *S. aureus* (DE MESY BENTLEY et al., 2017; KISHOR et al., 2016; LEW; WALDVOGEL, 2004). Segundo Birt et al. (2017), o *S. aureus* é responsável por 80-90% dos casos de osteomielite piogênica. Quando a osteomielite está relacionada ao uso de implantes ortopédicos, o *S. epidermidis* tem sido implicado, por ser muito presente na flora bacteriana da pele. Entretanto, estudos recentes mostram que o *S. aureus* é a bactéria mais prevalente em casos de infecção associada à implantes (KAVANAGH; O'BRIEN; KERRIGAN, 2018; MASTERS et al., 2019). Estreptococos e microrganismos Gram negativos, como enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como bactérias anaeróbias também podem causar osteomielite (BIRT et al., 2017; JORGE; CHUEIRE; BAPTISTA ROSSIT, 2010; LEW; WALDVOGEL, 2004). Segundo Kavanagh; O'Brien; Kerrigan (2018), ao contrário da osteomielite hematogênica, normalmente causada por *S. aureus* ou *E. coli*, a osteomielite de ocorrência decorrente de traumas, é geralmente polimicrobiana.

Fungos (*Candida spp* e *Aspergillus spp*) e micobactérias não tuberculosas podem ser agentes causadores alternativos de osteomielite, especialmente em pacientes imunossuprimidos (FANTONI; TACCARI; GIOVANNENZE, 2019).

O *S. aureus* possui uma extraordinária capacidade de se adaptar a um ambiente hostil, e tem habilidade comprovada de desenvolver resistência à antibióticos (BIRT et al., 2017; BRADY et al., 2018; KISHOR et al., 2016). Ele é capaz de colonizar e danificar o hospedeiro ao mesmo tempo em que se evade do sistema imunológico devido ao seu extenso repertório de fatores de virulência. Os isolados de

S. aureus são normalmente resistentes a uma ou mais classes de antibióticos (BRADY et al., 2018; LEW; WALDVOGEL, 2004). Entre os fatores de virulência, estão as adesinas bacterianas, que promovem a ligação da bactéria à matriz extracelular (LEW; WALDVOGEL, 2004) e em consequência, aos implantes ósseos através da fibronectina adsorvida na superfície dos mesmos (BIRT et al., 2017). Além disso, o *S. aureus* é capaz de formar biofilme e criar subpopulações de pequenas colônias variantes (SCV) de crescimento lento (MASTERS et al., 2019). Como resultado, as infecções causadas pelo *S. aureus* podem ser um grande desafio terapêutico, sendo que as chances de insucesso e de recidivas são razoáveis, mesmo quando se procede à um extenso desbridamento do local infectado (BENTLEY et al., 2018). Kishor et al. (2016) citam como principais fatores contribuintes para a falha terapêutica, a formação de biofilme, baixos níveis de antibióticos alcançados no tecido ósseo e atividade reduzida dos antibióticos no osso e medula óssea.

Além dos fatores citados no parágrafo anterior, estudos recentes têm mostrado infecção de osteoblastos, osteócitos e também osteoclastos por *S. aureus*, implicando em persistência intracelular dentro das células ósseas como um mecanismo de evasão imune e infecção crônica (DE MESY BENTLEY et al., 2017, 2018; KAVANAGH; O'BRIEN; KERRIGAN, 2018). Outro fator relevante, é a presença de uma proteína na parede celular do *S. aureus*, a proteína A que é responsável pela ligação ao osso e indução de sinais que desencadeiam a perda e destruição óssea (KAVANAGH; O'BRIEN; KERRIGAN, 2018).

Quando a bactéria invade o osso, ela induz uma resposta inflamatória aguda (BIRT et al., 2017). As mudanças iniciais no osso após a inoculação de bactérias são basicamente alterações no pH e na permeabilidade capilar que contribuem para a formação de edema regional, liberação de citocinas, dano tecidual, recrutamento de leucócitos, diminuição da tensão de oxigênio, aumento da pressão local, trombose de pequenos vasos, e deterioração óssea (PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009). Os vasos sanguíneos também podem ser obliterados e comprimidos pelo infiltrado inflamatório, piorando a isquemia e a necrose óssea. Segmentos de osso desprovidos de suprimento sanguíneo podem se separar e formar sequestros que por sua vez podem continuar a abrigar bactérias, apesar do tratamento com antibióticos. Antibióticos e células inflamatórias não conseguem alcançar esta área avascular, portanto, o tratamento médico da osteomielite falha (LEW; WALDVOGEL, 2004; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014).

Na periferia dessas regiões, há uma hiperemia reativa que está associada ao aumento da atividade osteoclástica (LEW; WALDVOGEL, 2004). A liberação de citocinas pelas células inflamatórias também estimulam os osteoclastos a absorverem osso com conseqüente perda óssea localizada. Entretanto, pode ocorrer também aposição óssea, em alguns casos exuberantemente, causando aposição periosteal (reação periosteal) e a formação de osso novo (BIRT et al., 2017; LEW; WALDVOGEL, 2004). Essas alterações, associadas à sintomas clínicos mínimos ou ausentes, fibrose de medula e infiltrado inflamatório linfoplasmático, são características da cronicidade do quadro (MASTERS et al., 2019). Como a infecção se espalha para a cavidade medular, o aumento da pressão causa sua extensão para o córtex pelos canais de Havers e de Volkmann, com subseqüente propagação para o espaço subperiosteal e, finalmente, ao perióstio e tecidos moles adjacentes (PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009).

Devido à baixa penetração no osso, a terapia antibiótica sistêmica é ineficaz para erradicar a bactéria no estágio crônico da osteomielite, situação que leva à necessidade de tratamentos localizados (MASTERS et al., 2019; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014). Outro ponto importante é que em seres humanos, a osteomielite associada ao uso de implantes ortopédicos ainda representa um problema recorrente (LEW; WALDVOGEL, 2004; MASTERS et al., 2019), apesar da grande evolução nas formas de prevenção de infecções cirúrgicas (LEW; WALDVOGEL, 2004). Além da contaminação no momento do procedimento cirúrgico, infecções tardias podem ocorrer por via hematogena (WINKLER, 2017). Com mais de 1,5 milhão de procedimentos de substituição total do quadril e joelho realizados a cada ano, a infecção óssea continua sendo o risco mais grave e devastador associado aos implantes ortopédicos (MASTERS et al., 2019). Portanto, formas mais eficazes de tratar a enfermidade também nesses casos, são necessárias.

2.2 Indução experimental da osteomielite

O coelho tem sido usado como modelo experimental para indução de osteomielite há várias décadas. Na grande maioria dos estudos, se usam substâncias esclerosantes, em geral o morruato de sódio, para causar danos vasculares ao osso, tornando-o mais frágil e susceptível à colonização bacteriana (PATEL et al., 2009; WORLOCK et al., 1988). Os agentes esclerosantes são reconhecidos como capazes

de produzir necrose óssea asséptica, proporcionando condições para proliferação bacteriana e provavelmente facilitando a infecção óssea por ocluir a microvasculatura (FUKUSHIMA et al., 2005; YOSHII et al., 2001). Porém, segundo Worlock et al. (1988), os agentes esclerosantes produzem um modelo de osteomielite aguda, diferente da comumente observada, que é a osteomielite crônica em decorrência de fraturas.

Como alternativa ao morruato de sódio, autores descrevem a utilização de pinos ou parafusos introduzidos no canal medular, para funcionarem como corpo estranho e fornecerem superfície para a formação de colônias bacterianas ou mesmo de biofilme, produzindo assim, um modelo reprodutível de osteomielite crônica (BROWN et al., 2018; GAUDIN et al., 2011). Porém, como descrito acima, muitas vezes essas técnicas levam ao desenvolvimento de um quadro grave de infecção limitando a quantidade de animais no estudo, pela dificuldade imposta ao manejo destes no período pós-operatório. Também existe a possibilidade de ocorrência de morte por sepse e de ser necessário se proceder à eutanásia de animais, devido à gravidade das alterações desenvolvidas, que tornam inviável a manutenção dos animais no experimento.

Segundo Schulz; Steinhart; Mutters, (2001), também já foram feitas tentativas de indução de osteomielite empregando-se técnicas em que não foram utilizados métodos para causar danos ao tecido ósseo, empregando-se somente a deposição da bactéria, em maior concentração, no canal medular do osso íntegro. Entretanto, estes autores relacionam o aumento da concentração bacteriana com a ocorrência de morte por septicemia.

Portanto, a pesquisa por novas técnicas de indução experimental da osteomielite se faz necessária, permitindo em consequência, o desenvolvimento de formas mais eficazes de tratar a doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos adotados neste trabalho estão de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

(COBEA) e com a legislação vigente. A metodologia foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), no âmbito do protocolo 67/2016.

3.2 Indução da Osteomielite

Para a indução da osteomielite, foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite, com virulência comprovada e cultivada conforme o descrito por Smeltzer et al. (1997) e Gaudin et al. (2011) e inoculada no interior do canal medular de 6 coelhos da raça Nova Zelândia. Os animais, provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV, foram escolhidos aleatoriamente e tiveram um mês para aclimação e adaptação ao ambiente, tendo sido alojados em gaiolas individuais, recebendo ração uma vez ao dia e água *ad libitum*. Amostras da cepa selecionada foram colocadas para crescer em 9 ml de caldo de soja (tryptic soy) à 37°C, “overnight”. A cultura foi centrifugada, lavada com volume igual de solução salina estéril e ressuspensas em solução salina para densidade óptica de 60% de transmitância usando espectofotômetro. A suspensão foi semeada em ágar tryptic soy para garantir densidade celular de aproximadamente 2.10^8 UFC/ml.

Para a inoculação da solução contendo *S. aureus*, os animais foram sedados com uma combinação de quetamina e midazolan nas doses de 12,5 mg/Kg e 1 mg/Kg, respectivamente. Em seguida, foi realizada a indução e manutenção anestésica usando-se o fármaco inalatório isoflurano diluído em oxigênio 100% e administrados por meio de máscara. Foi feito o bloqueio do plexo braquial utilizando-se uma combinação de bupivacaína e lidocaína nas doses de 3 mg/kg e 7 mg/kg, respectivamente.

O campo operatório foi preparado de maneira rotineira. Foi feita uma incisão na face lateral no terço cranial do membro torácico direito, expondo o úmero por meio de incisão longitudinal da pele e afastamento do tecido muscular. Em seguida, foi produzido um orifício córtico-medular na metáfise proximal lateral do úmero utilizando-se uma broca trefina de 4,0 mm de diâmetro (fig. 1A). Durante a perfuração, o local foi irrigado com solução fisiológica estéril para evitar aquecimento.

Após a retirada do fragmento ósseo, o canal medular foi submetido à raspagem de seu conteúdo usando-se um fio de aço inoxidável retorcido. Após este procedimento, o canal medular foi repetidamente lavado com solução fisiológica estéril e aspirado até a diminuição do sangramento e se constatar que todo o conteúdo

medular havia sido removido. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta estéril, 10 μ l da solução contendo 2.10⁶ UFC de *S. aureus* foi inoculada no interior do canal (fig. 1B). Após a inoculação, o fragmento ósseo obtido durante a perfuração foi introduzido no canal medular. Os tecidos incisados foram suturados com fio de náilon absorvível em padrão simples contínuo. A pele foi aproximada em padrão de Wolff ou “U” deitado, também com fio de náilon não absorvível.

Para a analgesia no período pós-operatório, os animais foram medicados com morfina, na dose de 0,5 mg/Kg, aplicada por via subcutânea, de 12 em 12 horas, durante 3 dias. Os animais foram acompanhados diariamente durante 15 dias (período de tempo entre os procedimentos cirúrgicos) onde se observou a presença de edema, secreção purulenta e deiscência de sutura. Também foi observada a interferência ou não dos animais na ferida cirúrgica e se apoiavam ou não o membro operado.

A confirmação da osteomielite se deu pela avaliação das imagens obtidas na radiologia, pela alteração da densidade do osso, determinada pela densitometria óssea e pela microtomografia computadorizada.

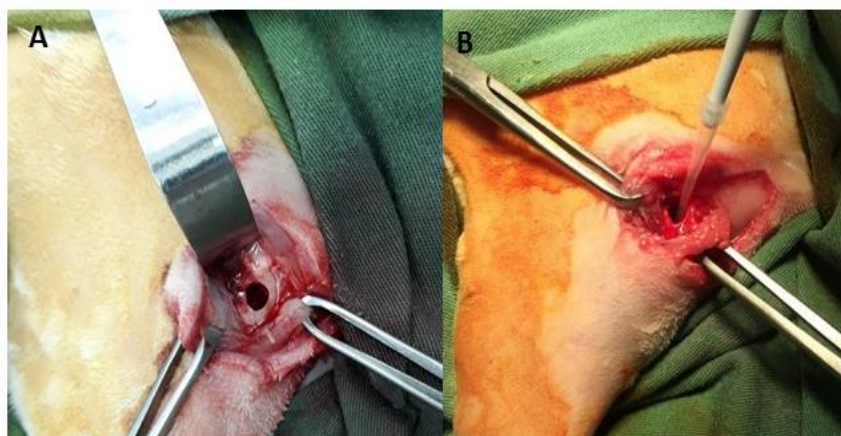


Figura 1: (A) Defeito ósseo na cortical lateral do úmero direito. (B) Inoculação da solução contendo *S. aureus* no interior do canal medular através do defeito ósseo.

3.3 Avaliação Clínica, radiográfica e densitometria radiográfica

Os animais foram submetidos a exame clínico diariamente durante 15 dias, ou seja, até o procedimento de lavagem e desbridamento. Durante os primeiros sete dias, os animais foram avaliados com relação aos seguintes parâmetros: (1) claudicação, sendo observados após estímulo sem retirá-los das gaiolas, aplicando-se os escores 0 para ausência de claudicação, 1 para apoio com claudicação e 2 para ausência completa de apoio; (2) deiscência, avaliada como presente ou ausente; e (3) reação

inflamatória exsudativa da ferida cirúrgica, presente ou ausente. Para fins estatísticos, as características observadas nos primeiros sete dias foram tabeladas. Os resultados foram interpretados com auxílio de análise gráfica e estatística descritiva (mediana e porcentagem).

Durante o período experimental, os animais foram submetidos à exames radiográficos do membro operado, com o objetivo de se comprovar a integridade do mesmo, analisar as variações de densidade óssea e de se observar as alterações radiológicas provenientes do procedimento cirúrgico. As radiografias foram realizadas anteriormente à cirurgia de confecção do defeito ósseo e inoculação bacteriana (T0), imediatamente antes do procedimento de lavagem e desbridamento (T1) e ao final do experimento, aos 57 dias de pós-operatório (T2). Para a realização do exame radiográfico, cada animal foi sedado com quetamina e midazolam nas mesmas doses utilizadas para os procedimentos cirúrgicos. Em seguida, cada animal foi posicionado em decúbito lateral direito (posicionamento mediolateral), com o membro torácico direito estendido e a cabeça tracionada caudalmente. A técnica radiográfica foi padronizada para a distância de um metro da fonte de emissão dos raios X pelo aparelho ao filme radiográfico, com kilovoltagem de 45 Kv, 100 miliamperes e tempo de exposição de 0,07 segundos.

Todas as radiografias foram tomadas com um penetrômetro de alumínio, constituído por cinco níveis, cada um deles com espessura de 3 mm, posicionado próximo ao úmero. Foi utilizado sistema de radiografia computadorizada, modelo X, Fugifilm e realizada avaliação qualitativa observando-se a integridade óssea (ausência de fratura), presença de reação periosteal, esclerose óssea e/ou regiões de perda óssea. Em seguida, as imagens foram analisadas no programa computacional ImageJ e pela ferramenta de análise de histograma foi construída uma curva de densidade (Fig. 2) com base no penetrômetro, obtendo-se uma fórmula em que a densidade, em milímetros de alumínio, seja função do nível de cinza da imagem. A região do defeito foi então selecionada e o nível de cinza foi convertido em milímetros de alumínio, representando a densidade óssea do local. Os resultados foram interpretados com auxílio do teste t-pareado e ANOVA com nível de significância de 5%.

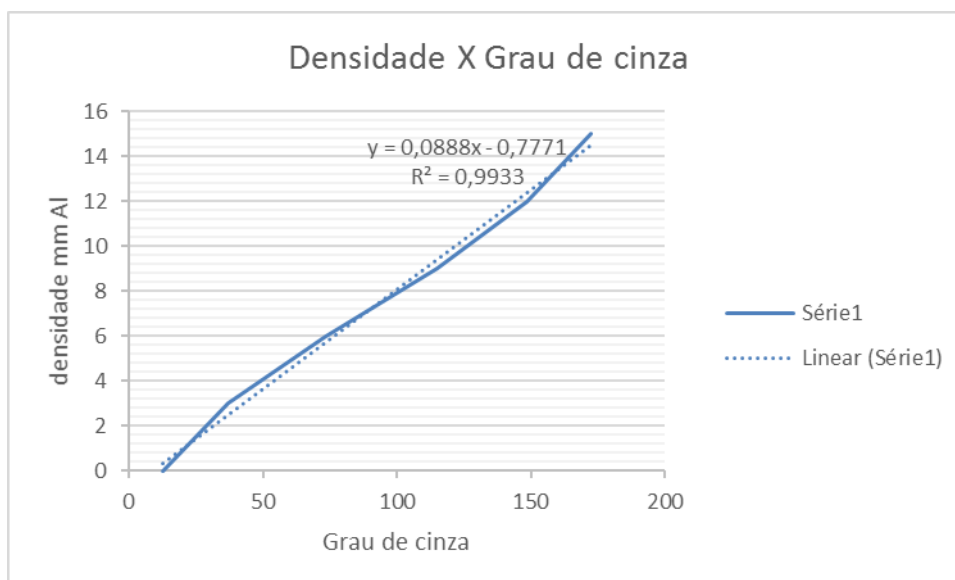


Figura 2: Exemplo de um dos gráficos e função linear obtidos a partir da análise do grau de cinza dos degraus do penetrômetro.

3.4 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Todos os ossos foram escaneados pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) utilizando resolução de 11.2 μ m, 50 kV e 800 μ A, e filtro de alumínio de 0,5 mm. As imagens obtidas foram reconstruídas pelo *software* NRecon (SkyScan, versão 1.7.0.4) e analisadas através do *software* CTAn (SkyScan, versão 1.16) para os seguintes parâmetros: BV (volume ósseo), BS (superfície óssea), Po.N (número de poros fechados), Po.V (volume total de poros) e PO (percentual de porosidade total). Para a realização das análises foi definido um valor limiar para binarização (*threshold*). Após obter o *threshold* que mais se assemelhou à imagem original para cada amostra, foi feita a média dos valores obtidos. Dessa forma, foi determinado um limite inferior em 43 e um limite superior em 168 (*grayscale threshold* 0 – 255), sendo a mesma binarização utilizada para todas as amostras.

Foi medida a reação periosteal formada ao longo do eixo longitudinal dos ossos. Para tal, foi usado o recurso “subtração da região”. Foi definido o limite externo do osso cortical, ao corte transversal, e em sua volta foi delineado uma linha acompanhando o contorno do osso. Toda a imagem localizada internamente a esse delineamento, foi então subtraída, e o aparelho analisou somente o que estava externo a ele. Esta análise foi realizada ao longo de 500 cortes, começando imediatamente após a epífise proximal e seguindo distalmente em relação à

articulação escapulo-umeral (Figura 3). Para a análise da intensidade da reação periosteal, se utilizou o parâmetro volume ósseo (BV).

O recurso “subtração da região” também foi usado para medir a quantidade de osso presente na cortical de cada amostra. Foi definido o limite externo do osso cortical, ao corte transversal, e em sua volta foi delineado uma linha acompanhando o contorno do osso. Esse procedimento também foi realizado na face interna, com a seguida subtração de todas as imagens externas aos dois delineamentos (Figura 3). Para o cálculo da quantidade de osso cortical utilizou-se os parâmetros volume ósseo (BV) e superfície óssea (BS). Além disso, foi calculada a porosidade do osso cortical utilizando-se os parâmetros número de poros fechados (Po.N), volume total de poros (Po.V) e percentual de porosidade total (PO).

Os resultados obtidos foram analisados de maneira descritiva.

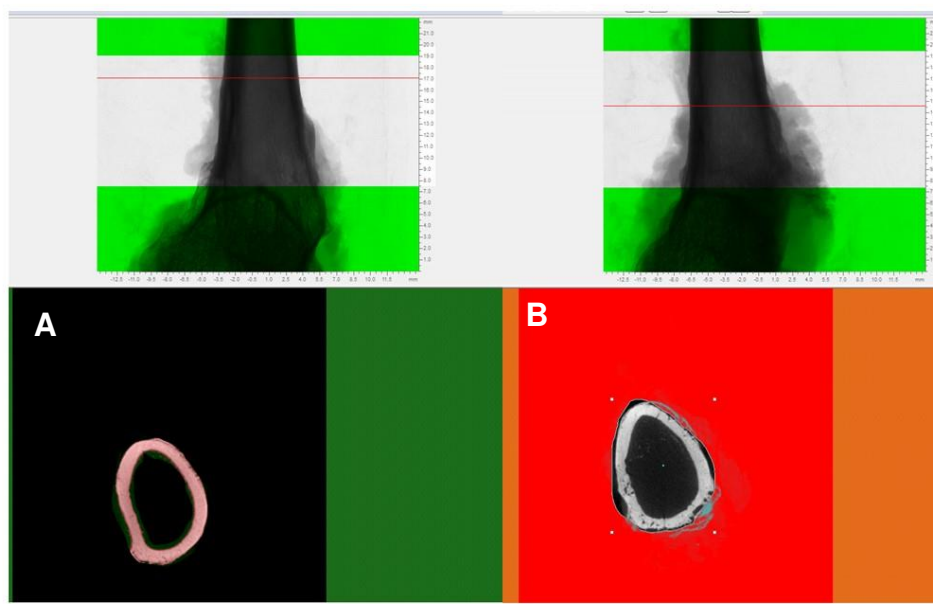


Figura 3: “Prints” da tela do computador do aparelho de μ CT exemplificando o recurso subtração de região. As figuras superiores mostram a posição no osso em que o aparelho estava realizando a leitura (linha vermelha). As figuras inferiores mostram a delimitação da área de osso cortical (A) e sua subtração em (B) para medição da reação periosteal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Indução da osteomielite

Até se chegar ao modelo de infecção óssea utilizado neste trabalho, foram realizados vários pilotos, com técnicas variadas, porém sem sucesso em produzir um

quadro de infecção óssea que fosse passível de ser reproduzido e usado como modelo experimental. Foram testadas técnicas com uso de pinos e parafusos, em diferentes locais, como fêmur, ulna e úmero, semelhantes às técnicas descritas por Worlock et al. (1988) e Gaudin et al. (2011). Nenhuma dessas técnicas pode ser reproduzida, pelo fato de os animais desenvolverem sepse, ou um quadro de infecção tão severa na região operada que era necessário proceder à eutanásia dos mesmos.

A inoculação bacteriana em ossos íntegros, por outro lado, não resultou em infecção óssea, necessitando de um aumento da concentração bacteriana, o que levava à sepse. Este fato está de acordo com Andriole et al. (1973 apud SCHULZ; STEINHART; MUTTERS, 2001) que relacionaram o aumento da concentração bacteriana inoculada no canal medular com elevada taxa de mortalidade por sepse. Esta dificuldade de se encontrar uma técnica adequada é descrita na literatura. Segundo Patel et al. (2009) e Gaudin et al. (2011), os modelos animais de osteomielite têm várias limitações, incluindo baixas taxas de sucesso para a indução de osteomielite, a eliminação das bactérias causadoras pelo sistema imunológico do hospedeiro e a necessidade de administração de agentes esclerosantes.

Nesse trabalho, foi realizada a raspagem do canal medular, com lavagem subsequente e aspiração de seu interior, danificando assim, a medula óssea com destruição dos vasos sanguíneos, causando então, isquemia local, o que facilitaria a colonização bacteriana. Esta técnica resultou em sucesso, comprovado pelo exame radiográfico, que mostrou alterações sugestivas de osteomielite, inclusive com fratura espontânea do úmero, causada pela fragilidade óssea devida ao quadro infeccioso. Além da imagem radiográfica, a densitometria óssea comprovou o aumento expressivo de densidade do osso tratado (de 3,35 mm Al para 6,87 mm Al), o que também corrobora o sucesso da indução. A figura 4 mostra a radiografia do úmero de um dos animais 15 dias após a indução da osteomielite.

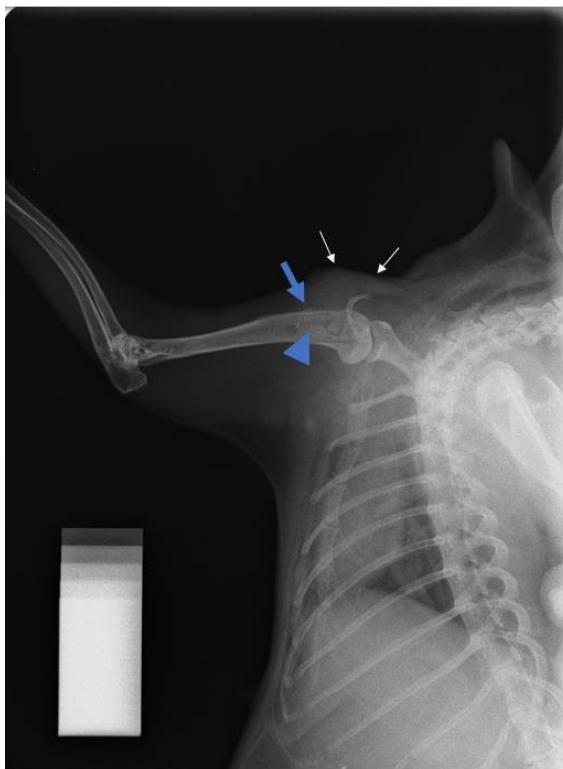


Figura 4: Radiografia do membro anterior direito na posição médio lateral de coelho obtida aos 15 dias após a indução da osteomielite mostrando uma discreta área de reação periosteal (seta azul). A cabeça de seta evidencia região sugestiva de lise óssea. As setas brancas mostram áreas de tecido mole edemaciado e com aumento de radiopacidade.

A confirmação da osteomielite se deu 15 dias (T1) após o procedimento cirúrgico através da avaliação qualitativa das radiografias obtidas e da densidade radiográfica média dos úmeros dos animais. Outro fato relevante na confirmação da existência de osteomielite se deu 57 dias (T2), quando as imagens radiográficas mostravam alterações ósseas mais evidentes, fato comprovado à μ CT, corroborando o sucesso da indução da doença.

Nas radiografias obtidas no T0, os animais apresentaram densidade óssea na região em que seria produzido o defeito ósseo de $4,0 \text{ mm Al} \pm 0,36 \text{ mm Al}$. Aos 15 dias após a indução, a média geral foi de $5,4 \text{ mm Al} \pm 0,3 \text{ mm Al}$, representando um aumento significativo ($p < 0,05$) da densidade. Este aumento era esperado e está relacionado ao acometimento dos tecidos moles, que se tornam visualmente mais radiopacos, portanto mais densos, devido à intensa reação inflamatória nos mesmos, incrementando assim, a densidade óssea (LEE et al., 2016; PINEDA; ESPINOSA;

PENA, 2009) e também em consequência da reação periosteal e aumento da densidade do canal medular (KOORT et al., 2005; KUNDU et al., 2012).

Segundo Kealy; Mcallister; Grahan (2011) a aparência radiográfica da osteomielite é extremamente variável, sendo muitas vezes difícil, ou mesmo impossível diferenciá-la com certeza de neoplasia (osteossarcoma). Porém, neste trabalho, a osteomielite foi induzida em animais com comprovada integridade óssea, sem haver, portanto, a necessidade de se proceder um diagnóstico diferencial.

A confirmação da osteomielite se deu 15 dias após o procedimento cirúrgico através da avaliação qualitativa das radiografias obtidas e da densidade radiográfica média dos úmeros dos animais. Outro fato relevante na confirmação da existência de osteomielite se deu ao final do experimento, quando as imagens radiográficas mostravam alterações ósseas mais evidentes, fato comprovado à tomografia microcomputadorizada (μ CT), corroborando o sucesso da indução.

4.2 Avaliação clínica e radiográfica após a indução da osteomielite

4.2.1 Avaliação clínica

As avaliações clínicas dos animais após o T0 foram realizadas com os mesmos dentro de suas respectivas gaiolas. Apesar de não ser o usual ao se avaliar procedimentos ortopédicos, este cuidado foi necessário para se evitar a movimentação excessiva dos animais, o que poderia ocasionar fraturas devido à uma possível fragilidade óssea decorrente da infecção óssea induzida.

Durante os primeiros três dias após o procedimento de indução da falha óssea e inoculação bacteriana (T0), os animais se alimentaram pouco, sendo que nas primeiras 24 horas, nenhum consumo evidente de ração foi observado. Todos se mostraram apáticos evitando se movimentar. Após esse período o consumo de alimentos foi se normalizando e após três dias os animais estavam mais ativos, se movimentando com mais vigor quando estimulados. Com relação à claudicação, durante os primeiros sete dias, nenhum deles apoiou o membro operado (claudicação grau 2). Este resultado difere de outros estudos, como o de Vital et al. (2008) e Carlo et al. (2009), que observaram claudicação grau 1 após a indução de falha óssea semelhante à do presente trabalho, com completa recuperação aos 7 dias de pós-operatório. Como os autores citados induziram o defeito ósseo em ossos íntegros, a

diferença observada no presente trabalho provavelmente se deve ao quadro infeccioso instalado após a cirurgia.

Foi observado aumento de volume próximo à ferida cirúrgica em todos os animais, sendo que ele persistiu até os 15 dias de pós-operatório, sendo acentuado ao longo da incisão, e restrito à face lateral do braço. Dois animais continuaram sem apoiar até o décimo quinto dia, quando ao exame radiográfico ficou constatada a fratura completa do úmero de um deles, que foi retirado do experimento e submetido à eutanásia. Aos 15 dias após o T0, todos os animais apresentavam grau 1 de claudicação, que provavelmente está associada ao processo inflamatório causado pela presença do *S. aureus* como descrito por Idelevich et al. (2016).

O apoio do membro e a claudicação são parâmetros importantes para se avaliar a dor nos animais (CARLO et al., 2009). Porém, como citado acima, os animais foram observados somente em suas gaiolas. Além disso, durante os primeiros 5 dias do período pós-operatório todos receberam medicação analgésica, o que altera a percepção dolorosa dos animais. Outro aspecto importante com relação à avaliação da dor em coelhos, é a alteração do padrão alimentar. Segundo Weaver et al. (2010), um importante indicador comportamental de dor aguda em coelhos é a anorexia. Além disso, coelhos são presas (servem de alimento para outras espécies de animais) e estão predispostos a mascarar sinais de dor, dificultando a identificação dos níveis de dor e desconforto, tornando assim a avaliação desafiadora (BENATO et al., 2020). Dessa forma, sabemos que os animais sentiram dor em diferentes graus ao longo do tempo, mas a sensação dolorosa não foi quantificada.

Não foi observada secreção purulenta ou sangramento nas feridas cirúrgicas. Porém, 2 animais apresentaram deiscência de sutura (33,3% dos animais). Apesar da deiscência, não se observou ferida aberta nos primeiros 7 dias de pós-operatório. Provavelmente a deiscência ocorreu devido à interferência dos animais na ferida cirúrgica. No T1, um dos animais apresentou deiscência com a abertura da ferida cirúrgica. Em outro animal se observou a formação de fístula com a presença de secreção purulenta. Os demais, estavam com a ferida cirúrgica aparentemente cicatrizada, porém era possível observar edema evidente ao longo da ferida cirúrgica, sendo que ao toque digital, se notou calor na região e dor local, demonstrada no retraimento do membro.

4.2.2 Avaliação radiográfica e densitometria radiográfica

Nas radiografias obtidas no T1, em alguns animais era possível notar-se uma região circular radiotransparente de visibilidade variável, na região metafisária proximal, correspondente à falha óssea produzida no T0. Somente nos animais 03 e 05, era possível visibilizar a folha óssea com facilidade (Figura 5). Nos demais, ela era pouco ou mesmo nada visível. Este fato era esperado e é devido não somente ao coágulo formado no local, mas também pela presença de tecidos moles (conjuntivo e osteóide) que participam da regeneração óssea (CARLO et al., 2009; VITAL et al., 2006). Além disso, o processo inflamatório presente no local torna os tecidos moles mais radiopacos (LEE et al., 2016; PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009).

O exame radiológico é bastante útil para a caracterização da infecção óssea (HATZENBUEHLER; PULLING, 2011; PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009; SMITH; BUCHANAN; SHULER, 2016). Apesar de não ser considerado o melhor método para o diagnóstico definitivo da osteomielite, a radiografia é um exame barato e acessível, e seu uso é indicado sempre que há suspeita da enfermidade (HANKIN et al., 2011; HATZENBUEHLER; PULLING, 2011; SMITH; BUCHANAN; SHULER, 2016). Segundo Hankin et al. (2011), a radiografia é inicialmente, o exame de imagem de escolha, por ser barato, rápido e fácil de ser executado, e envolver baixa dose de radiação. Porém, este exame pode não revelar nenhum tipo de alteração antes das primeiras duas ou três semanas de início da doença (LEE et al., 2016; PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009; SMITH; BUCHANAN; SHULER, 2016; WU et al., 2019).

As radiografias obtidas aos 15 dias (T1) após a indução da infecção óssea confirmam o exposto, já que nas mesmas as alterações observadas são sutis ou mesmo ausentes, como é possível observar na figura 5 (A, B e C). Na figura 5 A e B, é possível notar-se alterações nos tecidos moles circundantes. Também em A e B pode-se notar áreas sugestivas de lise óssea (osteólise). Essas alterações estão de acordo com os achados relatados na literatura. Segundo Heitzmann et al. (2019), as alterações radiográficas observadas nos quadros de osteomielite podem ser bastante variadas, principalmente nas fases iniciais. Os achados mais comuns são reação periosteal inespecífica e osteólise (HATZENBUEHLER; PULLING, 2011; HEITZMANN et al., 2019; WU et al., 2019). Além disso, pode ocorrer aumento da densidade do canal medular, adelgaçamento da cortical, presença de sequestros ósseos (HEITZMANN et al., 2019; WU et al., 2019), osteopenia, perda do padrão trabecular e aposição de osso novo (PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009; SMITH; BUCHANAN; SHULER, 2016). Há também as alterações relacionadas ao

acometimento dos tecidos moles circundantes. São eles, aumento de volume muscular e perda de definição dos planos teciduais (LEE et al., 2016; PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009).

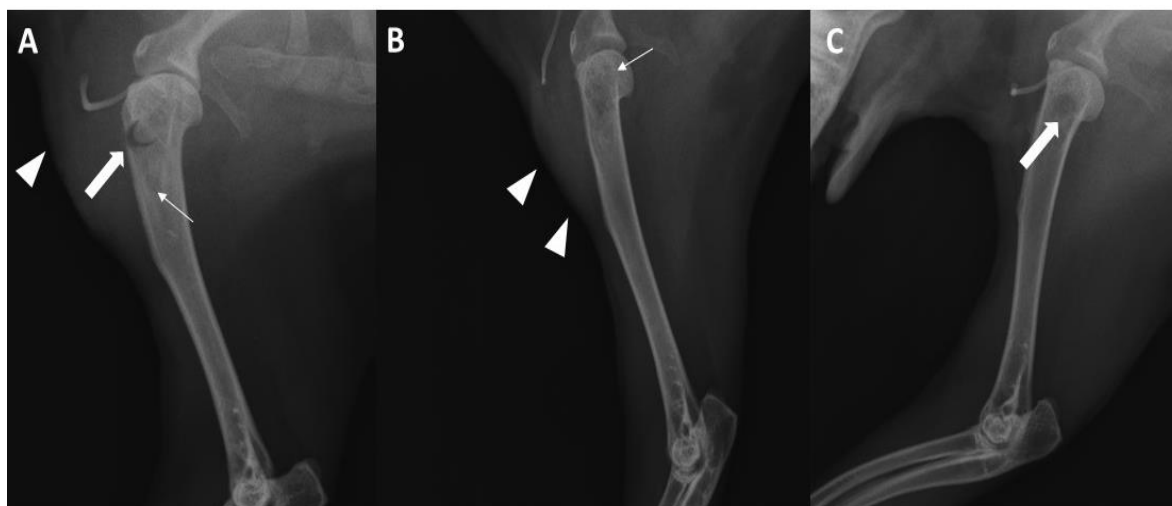


Figura 5: radiografias obtidas 15 dias após a indução da osteomielite. As setas largas evidenciam a falha óssea; as setas finas mostram regiões sugestivas de lise óssea; as cabeças de seta mostram alterações nos tecidos moles. (A) animal 03; (B) animal 04 e (C) animal 05.

Como descrito acima, do T0 para o T1 houve um aumento significativo da densidade óssea pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. Kundu et al. (2012) observaram aumento da radiopacidade após induzirem osteomielite em tíbia de coelhos, e relacionaram esse aumento à reação periosteal ocorrida no local. A proliferação óssea (reação periosteal) e também o aumento de densidade do canal medular, acrescidos do aumento de radiopacidade dos tecidos moles levam a um incremento de radiopacidade óssea mesmo na presença de osteólise e perda óssea. Cabe lembrar que a região selecionada para se medir a densidade no T1 foi a região da falha óssea, local com radiopacidade menor que a do osso, como descrito por Vital et al. (2008) e Reis et al. (2010). Portanto seria esperada uma diminuição de densidade pelo simples fato de haver uma falha no osso cortical. Este fato, apesar de não poder ser quantificado, torna o aumento de densidade mais expressivo.

4.3 Avaliação clínica e radiográfica após o segundo procedimento cirúrgico (T1)

4.3.1 Avaliação clínica

Aos 15 dias, os animais foram novamente anestesiados para uma nova avaliação radiográfica e para os procedimentos de desbridamento e lavagem do local onde foi realizada a inoculação bacteriana no T0.

Após a incisão da pele, observou-se a presença de um exsudato purulento espesso, em quantidades variáveis, em todos os animais. Além disso, foi observado que os tecidos estavam desvitalizados, apresentando uma coloração acinzentada e com uma presença expressiva de fibrose. Estes achados são característicos da infecção de tecidos moles causada por *S. aureus* e correspondem a um quadro de piomiosite, que segundo Idelevich et al. (2016) é a infecção aguda dos músculos esqueléticos, caracterizada primariamente por uma coleção de pus. Segundo Roberts; Chambers (2005), os sinais clínicos da piomiosite são dor muscular localizada, rigidez e edema local com o desenvolvimento de uma coleção de pus. Ao longo de sua evolução ocorre a formação de abscesso (COMEGNA et al., 2016; IDELEVICH et al., 2016), fato observado no presente trabalho.

A raspagem seguida de aspiração do conteúdo do canal medular, realizada com o objetivo de reduzir o sangramento oriundo do interior do osso com consequente diminuição do extravasamento do inóculo, não eliminou por completo o sangramento. Assim, após a inoculação todos os animais o apresentaram em algum grau através do orifício produzido na cortical. Por este motivo, houve extravasamento de *S. aureus* para os tecidos circundantes, o que explica a intensa reação inflamatória observada nos tecidos moles. A figura 6 ilustra o sangramento imergindo do defeito ósseo.

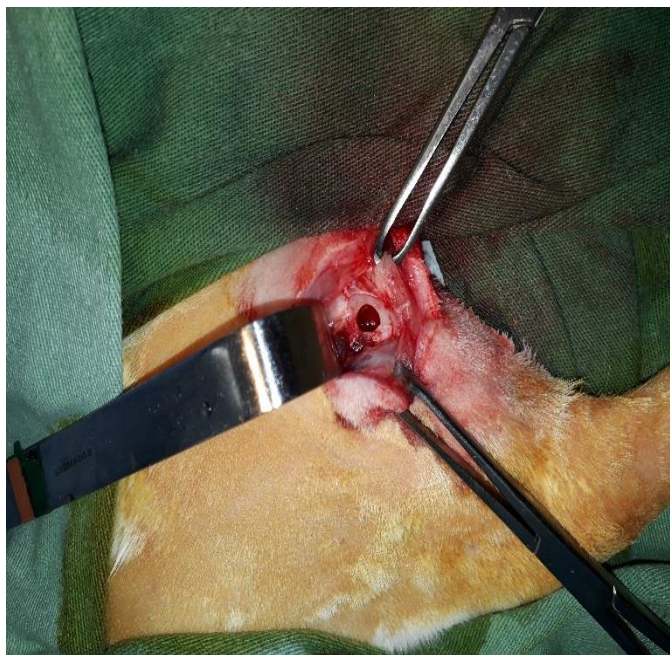


Figura 6: Momento anterior à inoculação da solução contendo *S.aureus*, evidenciando o defeito ósseo e o sangramento proveniente do canal medular.

Nas primeiras 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico (T1), novamente os animais não se alimentaram, sendo que maioria deles retornou ao padrão normal de alimentação no terceiro dia do pós-operatório. Como observado após o primeiro procedimento cirúrgico (T0), os animais se mostraram apáticos e relutantes em se movimentar nos primeiros três dias após a cirurgia. Somente um dos animais apoiou o membro operado no dia seguinte à cirurgia (claudicação grau 1). Os demais foram passando a apoiar o membro após o sétimo dia de pós-operatório, sendo que um deles, somente apoiou o membro operado 10 dias após a cirurgia.

A cicatrização das feridas após o T1 ocorreu por primeira intenção na maioria dos animais. Somente um dos animais teve deiscência de sutura e um animal apresentou secreção purulenta na ferida cirúrgica, sem ocorrência de deiscência.

Aos 57 dias (T2) após o T0, os animais sofreram eutanásia e à necropsia, se observou, a presença de uma pequena quantidade de secreção purulenta nos tecidos moles ao redor do local onde foi produzida a falha óssea, sem formação de tecido fibrótico ou abscessos, observados nas cirurgias no T1.

4.3.2 Avaliação radiográfica e densitometria radiográfica

No T2, na maioria das radiografias, é possível observar alterações ósseas mais evidentes do que no T1, demonstrando que a osteomielite ainda estava presente apesar da lavagem e desbridamento realizadas (Figura 7). Este fato era esperado, já que se sabe que apesar destes procedimentos fazerem parte do tratamento da osteomielite crônica, eles não são suficientes para a resolução do quadro, sendo necessária a terapia antibiótica conjuntamente ao tratamento cirúrgico (LEW; WALDVOGEL, 2004; MASTERS et al., 2019; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014).

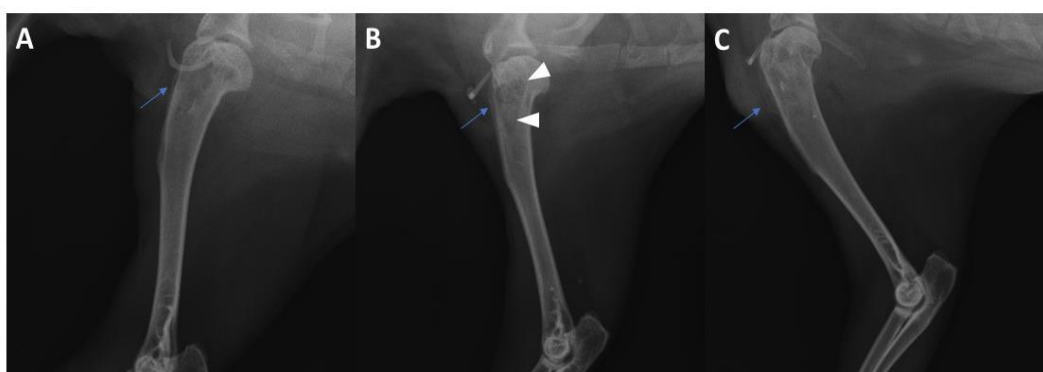


Figura 7: radiografias obtidas no T2. As setas azuis mostram reação periosteal. Também é possível notar, em A e B, perda de definição do osso cortical nas regiões com reação periosteal. As cabeças de seta branca mostram uma região bem delimitada de lise óssea. (A) animal 02; (B) animal 03 e (C) animal 06

4.3 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Apesar da comprovada eficácia da radiografia para caracterização e acompanhamento da evolução de quadros de infecção óssea, as imagens obtidas ao microtomógrafo foram superiores às radiografias para a avaliação das alterações ósseas ocorridas no presente trabalho. Este fato está consonante com a afirmação de Smith; Buchanan; Shuler (2016) de que a tomografia é um exame superior para o estudo da arquitetura óssea, já que permite a reconstrução tridimensional da microestrutura óssea (BOUXSEIN et al., 2010). Segundo Hankin et al. (2011) e Wu et al. (2019), a tomografia computadorizada produz imagens com alta resolução espacial em escala micrométrica e de contraste dos ossos e tecidos moles e excelente detalhamento do osso cortical. É útil para visualizar a erosão ou destruição cortical, proliferação periosteal, formação de invólucros e sequestros e gás intramedular, um raro, mas confiável sinal de osteomielite.

Durante a avaliação qualitativa das imagens, foi possível observar alterações ósseas compatíveis com um quadro de infecção óssea nos animais (Figura 8) em diferentes intensidades. Nas imagens é possível notar áreas de adelgaçamento do osso cortical, que também se apresenta erodido em sua estrutura, indicando a ocorrência de lise óssea. Reação periosteal também foi observada em vários animais. Tanto a lise óssea, como a reação periosteal são características radiográficas observadas em quadros de osteomielite aguda e crônica (THRALL, 2013; WITTMACK et al., 2015; WU et al., 2019).

Em todos os animais foram observadas reação periosteal em graus variados, inclusive na região contralateral ao defeito ósseo, e também alterações no osso cortical (Figura 8), além de neoformação óssea no interior do canal medular, nos limites do defeito ósseo e externamente ao osso (Figura 8C). O osso cortical sofreu lise óssea em diversos pontos, e em algumas regiões se mostra bastante frágil, com adelgaçamento consistente e muitas falhas, chegando a se mostrar fragmentado em alguns trechos. Nos locais onde se observou uma fragmentação mais expressiva, é possível observar a descontinuidade do osso.

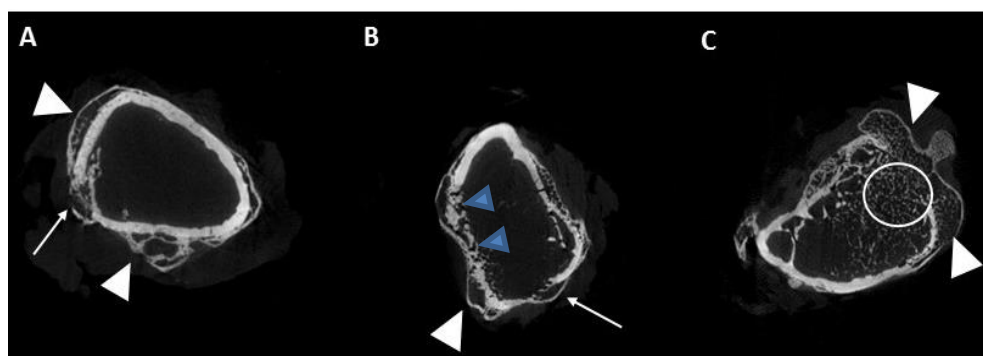


Figura 8: Imagens obtidas ao microtomógrafo. Animal 2 (A); Animal 03 (B) e animal 06 (C). As cabeças de seta branca evidenciam regiões com reação periosteal; as cabeças de seta azuis mostram uma região de cortical fragmentada; as setas mostram o defeito ósseo; o círculo evidencia formação óssea no interior do canal medular.

A reação periosteal (RP) foi observada em algum grau em todas as amostras analisadas. Mesmo nos animais em que ela não foi observada ao Raio-x, à μ CT foi possível delimitá-la e quantificá-la. A reação periosteal é uma alteração comum em quadros de osteomielite crônica e corresponde à uma tentativa do osso de compensar

o volume ósseo perdido ou mesmo restaurar regiões de descontinuidade óssea (BIRT et al., 2017; LEW; WALDVOGEL, 2004; SLATTER, 2007).

A porosidade do osso cortical está diretamente relacionada à resistência do osso (BOUSSON et al., 2000; JORGENSON et al., 2015; SCHAFFLER; BURR, 1988). A diminuição na resistência óssea cortical é principalmente uma consequência do aumento da porosidade, mais do que das mudanças na mineralização ou nas propriedades mecânicas da matriz óssea (BECKER et al., 2018; RAJAPAKSE et al., 2015). A porosidade do osso cortical saudável em humanos não passa de 15% (SCHAFFLER; BURR, 1988). Em um estudo em coelhos, Hirano et al. (2000) mediram a porosidade do osso cortical de animais adultos saudáveis e obtiveram resultados próximos à 1,3%. Dentre todos os animais do presente estudo, nenhum apresentou porosidade total inferior à 63% (Tabela 1). O volume dos poros Po.V mostra um dado interessante, que é a importância do tamanho dos poros no percentual de porosidade do osso. O animal 05, que possui a menor quantidade de poros apresenta uma porosidade total elevada (65,4%), valor próximo do observado para o animal 06, que possui uma quantidade de poros muito superior.

Tabela 1: Número de poros fechados (Po.N), volume total de poros (Po.V) e porosidade total (PO) dos animais

GRUPOS	Po.N	Po.V mm³	PO (tot) %
<i>Animal 01</i>	MORREU	-	-
<i>Animal 02</i>	98	507,3	66,06
<i>Animal 03</i>	103	495	63
<i>Animal 04</i>	76	596,3	66,6
<i>Animal 05</i>	57	534,1	65,4
<i>Animal 06</i>	261	662,1	69,6

Um aumento na porosidade cortical, em especial dos poros vasculares (por exemplo, canais osteonais/Haversianos e espaços de reabsorção associados), é uma manifestação física da perda óssea que surge como resultado de um desequilíbrio na remodelação cortical com a reabsorção óssea superando a formação de osso (HARRISON et al., 2020). Portanto, os valores observados neste trabalho refletem

uma arquitetura óssea fragilizada pelo processo infeccioso, o que poderia levar à ocorrência de fraturas.

5- CONCLUSÕES:

- A técnica utilizada para a indução de um quadro de infecção óssea foi eficaz, sendo comprovada pelos exames radiográficos e pela avaliação densitométrica dos ossos acometidos. Em um segundo momento, o sucesso da indução foi confirmado pela técnica de microtomografia computadorizada
- A microtomografia se mostrou superior à radiografia na análise das alterações ósseas, devido não somente ao fato de gerar imagens com maior detalhamento da estrutura óssea, mas principalmente por permitir uma análise da microestrutura do osso, ao avaliar o volume ósseo e os dados relativos à porosidade.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BECKER, M. et al. Bone quality evaluation of experimental osteometabolic disease in Pantanal alligators (*Caiman yacare*) by High Resolution Computerized Microtomography (μ CT). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 981–990, 2018.

BENATO, L. et al. Analgesia in pet rabbits: A survey study on how pain is assessed and ameliorated by veterinary surgeons. **Veterinary Record**, v. 186, n. 18, p. 603, 2020.

BENTLEY, K. L. DE M. et al. Chronic Osteomyelites with *Staphylococcus aureus* deformation in submicron canaliculi of osteocytes. **JBJS Case Connect.**, v. 8, n. 1, 2018.

BIRT, M. C. et al. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. **Journal of Orthopaedics**, v. 14, n. 1, p. 45–52, 2017.

BOUSSON, V. et al. CT of the Middiaphyseal Femur: Cortical Bone Mineral. **Radiology**, v. 217, n. 1, p. 179–87, 2000.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

BRADY, R. A. et al. Comparison of the immune response during acute and chronic *Staphylococcus aureus* infection. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–13, 2018.

BROWN, M. E. et al. Testing of a bioactive, moldable bone graft substitute in an infected, critically sized segmental defect model. **Journal of Biomedical Materials**

Research - Part B Applied Biomaterials, v. 106, n. 5, p. 1878–1886, 2017.

CARLO, E. C. et al. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-hidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 844–852, 2009.

CLEGG, P. D. Osteomyelitis in the Veterinary Species. In: PERCIVAL, S. L. (Ed.). . **Biofilms and Veterinary Medicine**. 6. ed. Berlim: Springer Series on Biofilm, 2011. v. 6p. 111–128.

COMEGNA, L. et al. Pyomyositis is not only a tropical pathology: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2016.

DE MESY BENTLEY, K. L. et al. Evidence of Staphylococcus Aureus Deformation, Proliferation, and Migration in Canaliculi of Live Cortical Bone in Murine Models of Osteomyelitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 5, p. 985–990, 2017.

DE MESY BENTLEY, K. L. et al. Chronic Osteomyelitis with Staphylococcus aureus Deformation in Submicron Canaliculi of Osteocytes: A Case Report. **JBJS case connector**, v. 8, n. 1, p. e8, 2018.

FANTONI, M.; TACCARI, F.; GIOVANNENZE, F. Systemic antibiotic treatment of chronic osteomyelitis in adults. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, n. 2, p. 258–270, 2019.

FUKUSHIMA, N. et al. Establishment of rat model of acute staphylococcal osteomyelitis: Relationship between inoculation dose and development of osteomyelitis. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 125, n. 3, p. 169–176, 2005.

GAUDIN, A. et al. A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus in rabbit. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 253–257, 2011.

HACHIM, D. et al. Shifts in macrophage phenotype at the biomaterial interface via IL-4 eluting coatings are associated with improved implant integration. **Biomaterials**, v. 112, p. 95–107, 2017.

HANKIN, D. et al. Critically Evaluating the Role of Diagnostic Imaging in Osteomyelitis. **Foot & Ankle Specialist**, v. 4, n. 2, p. 100–105, 2011.

HARRISON, K. D. et al. Cortical Bone Porosity in Rabbit Models of Osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2020.

HATZENBUEHLER, J.; PULLING, T. J. Diagnosis and management of osteomyelitis. **American Family Physician**, v. 84, n. 9, p. 1027–1033, 2011.

HEITZMANN, L. G. et al. Postoperative chronic osteomyelitis in the long bones - Current knowledge and management of the problem. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 54, n. 6, p. 627–635, 2019.

HIRANO, T. et al. Changes in geometry and cortical porosity in adult, ovary-intact

rabbits after 5 months treatment with LY333334 (hPTH 1-34). **Calcified Tissue International**, v. 66, n. 6, p. 456–460, 2000.

HWANG, H. J. et al. Acute Primary Hematogenous Osteomyelitis in the Epiphysis of the Distal Tibia: A Case Report With Review of the Literature. **Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 55, n. 3, p. 600–604, 2016.

IDELEVICH, E. A. et al. Staphylococcus aureus-Associated Musculoskeletal Infections. In: BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R. . G. G. (Ed.). . **Staphylococcus aureus. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1. ed. [s.l.] Springer, Cham., 2016. v. 409p. 229–261.

JORGE, L. S.; CHUEIRE, A. G.; BAPTISTA ROSSIT, A. R. Osteomyelitis: a current challenge. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 310–315, 2010.

JORGENSON, B. L. et al. A comparison of methods for in vivo assessment of cortical porosity in the human appendicular skeleton. **Bone**, v. 73, p. 167–175, 2015.

KAVANAGH, N.; O'BRIEN, F. J.; KERRIGAN, S. W. Staphylococcus aureus protein A causes osteoblasts to hyper-mineralise in a 3D extracellular matrix environment. **PLoS ONE**, v. 13, n. 6, p. 1–18, 2018.

KEALY, J. K.; MCALLISTER, H.; GRAHAN, J. P. **Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat**. 5th. ed. St Louis: Elsevier Inc, 2011.

KISHOR, C. et al. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model. **Indian Journal of Medical Research**, v. 143, n. JANUARY, p. 87–94, 2016.

KOORT, J. K. et al. Efficacy of ciprofloxacin-releasing bioabsorbable osteoconductive bone defect filler for treatment of experimental osteomyelitis due to Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1502–1508, 2005.

KUNDU, B. et al. Systematic approach to treat chronic osteomyelitis through ceftriaxone-sulbactam impregnated porous β -tri calcium phosphate localized delivery system. **Ceramics International**, v. 38, n. 2, p. 1533–1548, 2012.

LEE, Y. J. et al. The imaging of osteomyelitis. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 6, n. 2, p. 184–198, 2016.

LEW, D. P.; WALDVOGEL, F. A. Osteomyelitis. p. 369–379, 2004.

MASTERS, E. A. et al. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. **Bone Research**, v. 7, n. 1, 2019.

PATEL, M. et al. Animal Models for the Study of Osteomyelitis. **Seminars in Plastic Surgery**, v. 23, n. 02, p. 148–154, 2009.

PINEDA, C.; ESPINOSA, R.; PENA, A. Radiographic Imaging in Osteomyelitis: The Role of Plain Radiography, Computed Tomography, Ultrasonography, Magnetic Resonance Imaging, and Scintigraphy. **Seminars in Plastic Surgery**, v. 23, n. 02, p.

080–089, 2009.

PRICE, J. S. et al. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 30, n. 3, p. 281–286, 1996.

RAJAPAKSE, C. S. et al. Volumetric cortical bone porosity assessment with MR imaging: Validation and clinical feasibility. **Radiology**, v. 276, n. 2, p. 526–535, 2015.

REIS, E. C. C. et al. Biocompatibility, osteointegration, osteoconduction, and biodegradation of a hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 817–826, 2010.

ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of Staphylococcus aureus infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. SUPPL. 2, 2005.

SCHAFFLER, M. B.; BURR, D. B. Stiffness of compact bone: Effects of porosity and density. **Journal of Biomechanics**, v. 21, n. 1, p. 13–16, 1988.

SCHLICKWEI, C. W.; YARAR, S.; RUEGER, J. M. Eluting antibiotic bone graft substitutes for the treatment of osteomyelitis in long bones. A review: Evidence for their use? **Orthopedic Research and Reviews**, v. 6, p. 71–79, 2014.

SCHULZ, S.; STEINHART, H.; MUTTERS, R. Chronic osteomyelitis in a new rabbit model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 14, n. 2, p. 121–131, 2001.

SIQUEIRA, E. G. M. et al. Exogenous bacterial osteomyelitis in 52 dogs: a retrospective study of etiology and in vitro antimicrobial susceptibility profile (2000–2013). **Veterinary Quarterly**, v. 34, n. 4, p. 201–204, 2014.

SLATTER, D. H. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3th. ed. São Paulo: Ed Manole, 2007.

SMELTZER, M. S. et al. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 3, p. 414–421, 1997.

SMITH, B. J.; BUCHANAN, G. S.; SHULER, F. D. A comparison of imaging modalities for the diagnosis of osteomyelitis. **Marshall Journal of Medicine**, v. 2, n. 3, 2016.

STUPINA, T. A. et al. Applicability of histopathological osteomyelitis evaluation score (HOES) in chronic osteomyelitis of the foot — A feasibility study. **Foot and Ankle Surgery**, 2019.

SYBENGA, A. B. et al. Diagnosing Osteomyelitis: A Histology Guide for Pathologists. **Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 59, n. 1, p. 75–85, 2020.

THRALL, D. E. **TEXTBOOK OF VETERINARY DIAGNOSTIC RADIOLOGY**. 6th. ed. St Louis: Elsevier Saunders, 2013.

VITAL, C. C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 175–183, 2006.

VITAL, C. C. et al. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. **Revista Ceres**, v. 55, n. 1, p. 9–14, 2008.

WEAVER, L. A. et al. A model for clinical evaluation of perioperative analgesia in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 845–851, 2010.

WINKLER, H. Treatment of chronic orthopaedic infection. **EFORT Open Reviews**, v. 2, n. 5, p. 110–116, 2017.

WITTMACK, M. C. N. et al. Esqueleto Apendicular-Afecções. In: FELICIANO, M. A. R.; CANOLA, J. C.; VICENTE, W. R. R. (Eds.). . **Diagnóstico por Imagem em cães e gatos**. 1a. ed. São Paulo: Editora MedVet, 2015. p. 768.

WORLOCK, P. et al. An experimental model of post-traumatic osteomyelitis in rabbits. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 69, n. 2, p. 235–244, 1988.

WU, Z. et al. **Research Progress on Diagnosis and Treatment of Chronic Osteomyelitis** *Chinese Medical Sciences Journal*, 2019.

YOSHII, T. et al. Therapeutic possibilities of long-term roxithromycin treatment for chronic diffuse sclerosing osteomyelitis of the mandible. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 631–637, 2001.

CAPÍTULO 4

COMPÓSITOS DE HIDROXIAPATITA E FERRITA DE COBALTO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE CIPROFLOXACINA EM FALHA ÓSSEA INFECTADA

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de testar e avaliar compósitos de hidroxiapatita associada à nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), como sistema de liberação do antibiótico ciprofloxacina em falha óssea infectada de coelhos. Foram utilizados compósitos preparados com hidroxiapatita comercial HAP-91[®], fabricada na JHS Laboratório Químico, e hidroxiapatita sintetizada no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LABSMAC) do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, sintetizadas utilizando nanopartículas de CoFe_2O_4 adicionadas do fármaco ciprofloxacina na concentração de 10%. Para isso, foram utilizados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente 1 ano de idade e peso médio de 3,5 Kg, aleatoriamente distribuídos em cinco grupos com tamanho amostral igual a 6. Em todos os animais foi produzido um orifício córtico-medular na metáfise proximal do úmero para se obter acesso ao canal medular e proceder a inoculação de uma solução contendo unidades formadoras de colônia (UFC) de *Staphylococcus aureus* (cepas isoladas de mastite caprina) induzindo um quadro de osteomielite nos animais. Após 15 dias, da inoculação bacteriana, os grupos iniciaram os tratamentos, com o desbridamento e implantação óssea dos biomateriais em procedimento cirúrgico. Em um dos grupos nenhum tipo de biomaterial foi implantado, tendo sido usado como controle. Foram realizadas radiografias do membro manipulado cirurgicamente, imediatamente antes da indução da osteomielite e após 15 dias, ao se implantar os compósitos. Aos 42 dias após a implantação dos mesmos, os animais foram novamente radiografados e na sequência sofreram eutanásia por sobre dose anestésica para a coleta de material para estudo histológico e tomografia microcomputadorizada. As avaliações radiográficas e densitométricas mostraram sinais compatíveis com osteomielite. Aos 15 dias após a inoculação bacteriana se observou um aumento significativo da densidade óssea, porém com poucas alterações ósseas (reação periosteal, lise óssea e adelgaçamento da cortical). Aos 42 dias, essas alterações podiam ser visibilizadas mais claramente nas radiografias. Nas imagens da microtomografia computadorizada

foi possível notar um alto grau de destruição do osso cortical. A análise da microestrutura não revelou diferenças significativas entre os grupos controle e tratados, mostrando em todos uma alta porosidade do osso cortical. No estudo histomorfométrico, não se observou diferença significativa na quantidade de osso, medula e tecido conjuntivo entre grupos controle e tratados. À histologia, se observou deposição de osso novo em todos os grupos e presença de infiltrado inflamatório monocítico e células gigantes multinucleadas nos animais dos grupos tratados. Os biomateriais não pareceram exercer papel curativo durante o período avaliado, sendo que ao final do experimento, muitos animais ainda apresentavam um quadro compatível com osteomielite crônica.

Palavras-chave: Biomateriais, hidroxiapatita, nanopartículas magnéticas, osteomielite

1 INTRODUÇÃO

Quando ocorre uma injúria em tecido saudável, o organismo muitas vezes consegue por si só reparar o dano, ocorrendo regeneração e substituição gradual dos tecidos lesionados. No entanto, em casos de lesão grave, com grandes perdas teciduais, e/ou a existência de um quadro patológico em conjunto, o processo normal de cicatrização é prejudicado. Defeitos ósseos causados por ressecção tumoral, fratura traumática, necrose asséptica, periodontite e fusão espinhal, para citar apenas alguns, normalmente requerem remediação cirúrgica usando biomateriais ósseos (CHEN et al., 2016). Nesses casos, a reparação pode ser feita com o auxílio dos conhecimentos da engenharia de tecidos, uma área em franca expansão que vem trazendo uma grande revolução no desenvolvimento de biomateriais. Uma das abordagens para a engenharia de tecidos é usar suporte estrutural para facilitar a regeneração das partes lesadas do corpo. Este tipo de suporte mecânico é conhecido como “scaffold”, e tem sido muito usado no tecido ósseo. Neste contexto, os biomateriais porosos têm sido extensamente pesquisados. Uma estrutura porosa interconectada facilita a colonização celular e a formação subsequente de matriz óssea (MONDAL et al., 2016).

Nas últimas décadas, a utilização de biomateriais no reparo de partes danificadas do osso vem sendo bastante pesquisada, revolucionando a ortopedia e

odontologia à medida que novos biomateriais vêm sendo desenvolvidos (CAMPANA et al., 2014; CHIARELLO et al., 2013; PARENT et al., 2017). Vários materiais vêm sendo usados com sucesso na reparação de fraturas e em lesões onde há perda significativa de tecido ósseo. Entre eles, a hidroxiapatita (HAp) vem se destacando, por se tratar de um material biocompatível e bioativo, ou seja, capaz de se ligar ao osso, permitindo o crescimento e diferenciação celular (BORGES et al., 2000; PARENT et al., 2017; SARATH CHANDRA et al., 2013).

Além de atuar na regeneração tecidual, os biomateriais podem também agir como carreadores de fármacos, permitindo a liberação de drogas diretamente no tecido alvo (OGAWA; PLEPIS, 2002; PARENT et al., 2017). A incorporação de fármacos em biomateriais implantáveis e biodegradáveis apresenta a vantagem da liberação da droga diretamente no tecido alvo, sendo uma alternativa ao reduzido efeito terapêutico da administração parenteral de fármacos em locais pouco vascularizados, além de não requererem cirurgia posterior para remoção do material após a liberação da droga (ARAÚJO et al., 2018; OGAWA; PLEPIS, 2002). O sistema de administração de drogas através de implantes, portanto, também é de grande utilidade após a cirurgia ortopédica (MOGHADDAM et al., 2016), pois a circulação sanguínea é danificada no tecido ósseo quando se realiza cirurgias para estabilização de fraturas e um importante volume de medicamento pode ser necessário durante o tratamento pós-cirúrgico (MOGHADDAM et al., 2016; SLATTER, 2007).

A síntese de nanopartículas magnéticas para aplicações biomédicas tem despertado a atenção nos últimos anos, especialmente em função das propriedades físicas e químicas que estes materiais apresentam. As nanopartículas magnéticas têm sido utilizadas com diferentes objetivos, dentre os quais, como transportador de fármacos (GOPI et al., 2012). Sendo um material biocompatível, a hidroxiapatita (HAp) em associação às nanopartículas magnéticas, forma um promissor dispositivo ou compósito, com o potencial para ser usado como transportador de fármaco para o uso no tratamento de diversas enfermidades ósseas, entre elas, a osteomielite (ARAÚJO et al., 2018).

A terapia de osteomielite representa um problema desafiador na medicina. Ela ocorre, muitas vezes, após infecções traumáticas ou em combinação com fatores predisponentes (SCHLICKEWEI; YARAR; RUEGER, 2014), o que justifica as pesquisas de novas formas de tratamento.

A proposta geral deste trabalho foi testar compostos de hidroxiapatita e nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), como sistemas de liberação do antibiótico ciprofloxacina no tratamento da osteomielite, promovendo também uma regeneração óssea em menor tempo. Com isso, se tem uma alternativa segura e eficaz para o tratamento da osteomielite, inclusive na espécie humana, onde essa enfermidade ocorre com maior frequência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomaterial

Biomaterial é qualquer substância de origem natural ou sintética, utilizado em aplicações biomédicas e que interage com sistemas biológicos, tratando, aumentando ou substituindo tecidos, órgãos ou restaurando funções comprometidas por processos degenerativos ou traumatismos (VON RECUM; LABERGE, 1995). O biomaterial deve ter características tais que permitam seu uso de forma transitória ou permanente. De acordo com a resposta induzida ao meio biológico, o biomaterial pode ser classificado em bioinerte, biotolerável ou bioativo, sendo que é desejável que ele seja bioativo, já que essa característica possibilita a interação direta entre implante e o tecido onde ele foi implantado (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). O biomaterial pode ser de uso permanente ou ser degradável/absorvível, e no caso de ser usado junto ao tecido ósseo, deve favorecer o crescimento do osso. Essas características dependem das propriedades químicas e físicas do material que devem ser compatíveis com as reações fisiológicas do tecido ou órgão (BORGES, 1998; YAYLAOĞLU et al., 1999).

O desenvolvimento de biomateriais tem sido de grande importância na cirurgia ortopédica, inclusive com o objetivo de minimizar o uso de enxertos, tanto alógenos, quanto autógenos. A coleta de osso autógeno danifica partes saudáveis do corpo e a quantidade que se consegue coletar é limitada. Além disso, este tipo de procedimento aumenta o tempo anestésico e cirúrgico, trazendo, portanto, mais riscos para o paciente. O uso de enxertos alógenos, assim como os xenoenxertos, aumentam os riscos de infecção podendo ocorrer rejeição do implante e em adição a isso, a quantidade de osso alogênico disponível é limitada (CAMPANA et al., 2014; GUTIERRES et al., 2005; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003; YAYLAOĞLU et al., 1999).

O uso de biomateriais sintéticos na regeneração do tecido ósseo, como uma alternativa aos enxertos, é de grande relevância devido à diversas vantagens, dentre elas, não envolver a coleta de material em tecido saudável. Além disso, os materiais sintéticos não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de terem a grande vantagem de serem disponibilizados comercialmente. Podem, ainda, no caso de materiais biodegradáveis, serem facilmente degradados e absorvidos, ao mesmo tempo em que permitem e/ou estimulam a formação óssea (CAMPANA et al., 2014; CHIARELLO et al., 2013).

Algumas particularidades devem ser levadas em conta ao se desenvolver um substituto ósseo, e estas direcionam para quais características o biomaterial deve ter para ser usado com esta finalidade. As propriedades mais desejáveis são biocompatibilidade, capacidade de estimular a osteogênese, e composição e propriedades mecânicas semelhantes às do osso; em resumo, o biomaterial deve imitar o osso natural (CAMPANA et al., 2014; CHIARELLO et al., 2013; YAYLAOĞLU et al., 1999). Além disso, é desejável que esses materiais sejam absorvíveis, com degradação e taxa de absorção controláveis (DORATI et al., 2017).

Materiais artificiais implantados em defeitos ósseos são geralmente encapsulados por tecido fibroso e se tornam isolados do osso circunvizinho. Conseqüentemente, eles não se aderem ao osso, podendo ocorrer até mesmo o deslocamento do implante (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003). Este problema tem sido solucionado através do uso de cerâmicas bioativas (biocerâmicas) que espontaneamente se ligam ao osso (CHOW, 2009; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003).

2.1.1 Hidroxiapatita (HAp)

O grupo dos biomateriais que mais se assemelham à composição do osso é o grupo das cerâmicas de fosfato de cálcio, dentre as quais a mais difundida é a hidroxiapatita (LEGEROS, 2002). Sua estrutura química é representada pela fórmula $C_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, podendo ter origem nos corais e algas, ser derivado de mineral ósseo natural ou ainda desenvolvido sinteticamente (BORGES, 1998). A hidroxiapatita é um dos mais importantes compostos de cálcio para a aplicação biológica, visto que pode ser encontrada em tecidos duros naturais como uma fase mineral. Ela age como um

reforço nestes tecidos e é responsável pela rigidez dos ossos, dentes e esmalte dos dentes (KUMAR; GOVINDAN; GIRIJA, 2014).

As propriedades da hidroxiapatita sintética (HAp) são bem documentadas na literatura. Ela tem sido estudada por se tratar de uma substância bioativa que provoca pouca reação tecidual (BORGES et al. 2000; LEGEROS, 2002; MOREIRA et al., 2003) e é biocompatível com o osso, pelo fato de possuir a mesma estrutura química (LEGEROS, 2002; NAKAHIRA; NAKAMURA; HORIMOTO, 2007).

As propriedades mais desejáveis dos materiais de fosfato de cálcio, são a similaridade nas características químicas e físicas do osso (ALVES et al., 2010), a bioatividade, que é a habilidade do material de formar uma ligação direta e forte com o tecido ósseo, além da habilidade de prover um molde para a formação de osso novo, processo denominado de osteocondução (LEGEROS, 2002).

A HAp apresenta absorção muito lenta, o que leva a que se mantenha no organismo durante anos, fato que pode limitar sua utilização (GUASTALDI; APARECIDA, 2010; GUTIERRES et al., 2005). Sua degradação é influenciada por vários fatores, tais como porosidade, área de superfície específica, local de implantação e pressão biomecânica sobre o implante (GOTO et al., 2001). Outro fator importante que influencia a absorção da HAp, é a temperatura usada em sua fabricação (BORGES et al., 2000; GOTO et al., 2001; RAUSCHMANN et al., 2005). O tratamento térmico dos fosfatos de cálcio em temperaturas superiores à 500°C aumenta sua cristalinidade, e causa redução em sua área de superfície específica e da porosidade, com ganho em resistência (AZEVEDO; STRECKER; GORGULHO, 2015; PARENT et al., 2016). Materiais cristalinos são absorvidos mais lentamente que materiais amorfos (AZEVEDO; STRECKER; GORGULHO, 2015; REIS et al., 2012). A hidroxiapatita sinterizada (temperatura de processamento superior à 1000°C) não é absorvível e possui cristalinidade elevada, enquanto a não sinterizada (sintetizada em temperaturas mais baixas) é degradada por macrófagos e osteoclastos (RAUSCHMANN et al., 2005).

A estrutura porosa da hidroxiapatita funciona como um suporte passivo para a neoformação vascular (angiogênese) e parece fornecer um substrato adicional à proliferação do tecido ósseo (BORGES, 1998; RODRIGUES et al., 2003), permitindo a junção, proliferação, migração e expressão fenotípica de células ósseas, o que resulta em formação de novo osso, em oposição direta ao biomaterial (LEGEROS, 2002; VITAL et al., 2006).

2.1.2 Nanopartículas magnéticas (NPMs)

Nanotecnologia é o nome dado ao processo de desenvolvimento e produção de estruturas, dispositivos e sistemas controlando forma, tamanho e design em escala nanométrica. O desenvolvimento e o avanço nessa área vêm aumentando gradativamente graças às propriedades físicas, químicas e biológicas que estas partículas apresentam (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2011). Devido à grande relação superfície/volume, eles são vantajosos para anexar moléculas de drogas e outros compostos (DE JONG; BORM, 2008; DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2011). Devido à drástica redução de tamanho, as propriedades magnéticas intrínsecas das nanopartículas (NPs) diferem daquelas dos mesmos materiais em escala macroscópica. Além disso, novas propriedades surgem na escala nanométrica, fenômenos como, por exemplo, o superparamagnetismo (ARELARO, 2008; GUPTA; KOMPELLA, 2006).

NPs de óxido de ferro, ou ferritas, como a magnetita (Fe_3O_4) e a ferrita de cobalto (CoFe_2O_4), são as mais comumente empregadas para aplicações biomédicas por serem biocompatíveis e de baixa toxicidade no corpo humano (TARTAJ et al., 2003). Por possuírem características magnéticas, especificamente, por serem superparamagnéticas, podem ser manipuladas pela aplicação de campos magnéticos (ARAÚJO et al., 2018; ELIAS; TSOURKAS, 2009). Isso significa que elas têm uma alta susceptibilidade magnética positiva, mas na ausência de um campo magnético não exibem remanência magnética (não apresentam magnetização espontânea) (ELIAS & TSOURKAS, 2009).

Para aplicações em biomedicina, as nanopartículas magnéticas também podem ser biofuncionalizadas com moléculas biologicamente ativas, como hormônios e anticorpos, ou mesmo fármacos. O fator mais importante que influencia a aplicabilidade destas partículas magnéticas é a ligação bem-sucedida destas biomoléculas (MOHAPATRA et al., 2007). Além disso, são muitas as aplicações das nanopartículas em biologia e medicina, como a destruição de células tumorais por hipertermia produzida por um campo magnético oscilante, separação magnética de ácidos nucleicos e o uso em exames, como a ressonância magnética (ARELARO, 2008; SARATH CHANDRA et al., 2013).

Especificamente com relação à tecnologia de sistemas de liberação controlada de drogas, devido à sua versatilidade em atingir tecidos alvo, acessar moléculas profundas e controlar a liberação de drogas, as nanopartículas estão ajudando a

alavancar o desenvolvimento de sistemas de liberação de drogas cada vez mais eficazes (GUPTA; KOMPELLA, 2006). Os medicamentos são efetivamente “entregues” por nanopartículas porque elas são absorvidas pelas células. Elas penetram profundamente nos tecidos através de capilares finos e cruzam a fenestração presente no revestimento epitelial (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2011).

Neste contexto, os óxidos de ferro, em especial as ferritas, ganham muito destaque devido à sua baixa toxicidade, alta estabilidade química, dentre outros (ARELARO, 2008).

2.1.3. Nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto (CoFe_2Co_4)

As ferritas de cobalto possuem um enorme potencial para aplicações em diversas áreas tecnológicas, podendo ser utilizadas na geração de hipertermia magnética, liberação controlada de fármacos, transporte de enzimas, preparação de fluídos magnéticos, catálise e imagem por ressonância magnética (ARAÚJO et al., 2018; KIM et al., 2008).

A CoFe_2Co_4 possui excelente estabilidade química e física, sendo resistente ao desgaste e permitindo controle preciso sobre sua composição e estrutura durante sua manipulação. O sucesso de sua aplicação prática depende dessas propriedades (AMIRI; SHOKROLLAHI, 2013; DI GUGLIELMO et al., 2010). Sua estabilidade, toxicidade moderada e uma pequena porcentagem de liberação de cobalto durante um período de 30 dias *in vitro* tornam este tipo de material adequado para aplicações médicas. (KRAMER; ITZKOWITZ; WEI, 2014). Além dessas características, a CoFe_2Co_4 possui excelente solubilidade em água, estabilidade em pH fisiológico, e comportamento magnético adequado para uso em biossensores (DI GUGLIELMO et al., 2010; MOHAPATRA et al., 2007).

Nas aplicações médicas, as nanopartículas de ferrita de cobalto podem ser revestidas para garantir a estabilidade coloidal e superfícies funcionais. O encapsulamento por sílica, por exemplo, é usado para prevenir ou minimizar intoxicação por vazamento dos íons de cobalto (DIGIGOW et al., 2014; WANG et al., 2018). O revestimento é útil para conferir mais estabilidade e biocompatibilidade e também para evitar a oxidação das nanopartículas (DI GUGLIELMO et al., 2010; DIGIGOW et al., 2014; SOUZA; ARDISSON; SOUSA, 2009). Os nanocompósitos de

sílica/ferritas são particularmente interessantes, pois a camada protetora proporcionada pela sílica pode impedir a atração magnética dipolar entre as partículas das ferritas e, conseqüentemente, proporcionar uma dispersão de partículas bastante uniforme (ARAÚJO et al, 2018; SOUZA; ARDINSON; SOUSA, 2009).

Além da comprovada eficiência das NPMs de CoFe_2O_4 nas áreas previamente citadas nesta revisão, estudos têm reportado atividade antimicrobiana *in vitro* relacionada à essas nanopartículas. Tran et al. (2010), relataram atividade antimicrobiana de NPMs de óxido de ferro contra *S. aureus*, provavelmente relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio no interior da bactéria. Venkatesan et al. (2015), demonstraram atividade antimicrobiana de NPs de CoFe_2O_4 contra *E. coli*. Em um estudo de 2018, Ramanavičius et al., comprovaram a atividade antimicrobiana de NPMs de CoFe_2O_4 especificamente contra *S. aureus*, sendo que descreveram esta atividade em função do íon Co^{2+} .

2.2 Abordagens terapêuticas no tratamento da osteomielite

Quando a osteomielite já está estabelecida, a terapia antimicrobiana sistêmica deve ser acompanhada de cirurgia para desbridamento dos tecidos necróticos e desvitalizados, e para otimização do suprimento sanguíneo da região afetada (LEW; WALDVOGEN, 2004; MASTERS et al., 2019; SCHLICKWEI, YARAR & RUEGER, 2014). No caso de infecção associada a próteses, o tratamento varia desde desbridamento com lavagem e manutenção dos dispositivos ortopédicos até sua retirada e substituição em outro procedimento cirúrgico (BIRT et al., 2017; WINKLER, 2017).

A escolha do antibiótico deve ser pautada, quando possível, nos resultados da cultura tecidual e antibiograma (FANTONI; TACCARI; GIOVANNENZE, 2019; FRAIMOW, 2009). No entanto, a suscetibilidade, conforme determinado pela concentração inibitória mínima (MIC) ou teste de difusão em disco não necessariamente prevê o sucesso clínico. Isso acontece porque as interpretações de susceptibilidade baseiam-se nos níveis séricos alcançáveis e estes podem diferir significativamente dos níveis que o medicamento efetivamente consegue alcançar no osso e no tecido circundante (FRAIMOW, 2009). A presença de pequenas colônias variantes e de biofilme afetam a MIC substancialmente, tornando muitas vezes, o

tratamento sistêmico inviável pela alta dosagem necessária (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2014; WINKLER, 2017).

A penetração de antibióticos no tecido ósseo foi amplamente estudada, e os dados mostram uma variabilidade grande entre os medicamentos e entre diferentes estudos do mesmo medicamento. Em geral, a penetração óssea é baixa, mesmo quando administrado em altas doses, alcançando uma relação de concentração no osso em relação ao soro de no máximo 30% para a maioria dos antibióticos (FANTONI; TACCARI; GIOVANNENZE, 2019). Segundo Fraimow (2009), esse valor é menor, variando de 10 a 20% em osso saudável. Em tecidos doentes, essa taxa seria ainda menor. Para superar o problema da difusão no osso infectado, os antibióticos no tratamento da osteomielite têm sido administrados classicamente por via endovenosa, à fim de atingir as maiores concentrações plasmáticas possíveis e subsequente penetração no tecido. Como o tratamento da osteomielite crônica pode se estender por muitas semanas, ou até mesmo por meses, a administração de endovenosa de medicamentos se torna um problema considerável.

Com relação aos antibióticos recomendados para o uso sistêmico, as fluoroquinolonas têm sido consideradas as drogas de escolha para o tratamento da osteomielite crônica devido à sua penetração favorável em locais de infecção pouco vascularizados, seus vantajosos efeitos bactericidas contra todos os prováveis patógenos da osteomielite crônica e a falta de reações adversas graves (KOORT et al., 2005). Além das fluoroquinolonas, outros medicamentos com boa penetração óssea são as sulfonamidas, macrolídeos, rifamicinas e oxazolidinonas. Esses medicamentos também possuem a vantagem de ter boa bioviabilidade quando administrados oralmente, sendo, portanto, bons candidatos em tratamentos prolongados (FANTONI; TACCARI; GIOVANNENZE, 2019; FRAIMOW, 2009).

Outros medicamentos utilizados rotineiramente no tratamento da osteomielite são cefalosporinas de amplo espectro, vancomicina, aminoglicosídeos e carbapenêmicos. Entretanto, esses medicamentos só podem ser administrados por via endovenosa (FANTONI; TACCARI; GIOVANNENZE, 2019; FRAIMOW, 2009). Para o tratamento inicial da osteomielite crônica causada por estafilococos, gentes β -lactâmicos parenterais anti-estafilocócicos, isto é, oxacilina, nafcilina e cefazolina, são opções adequadas (FANTONI; TACCARI; GIOVANNENZE, 2019; LEW; WALDVOGEL, 2004).

O desbridamento é considerado uma peça-chave no sucesso do tratamento da osteomielite (BIRT et al., 2017; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014). Como previamente mencionado, se não houver uma remoção efetiva de tecidos necróticos, o tratamento antimicrobiano irá falhar. Fantoni; Taccari; Giovannenze (2019), descrevem a necessidade de uma desbridação agressiva seguida de antibioticoterapia por um longo período de tempo para se alcançar a cura da osteomielite crônica. Infelizmente, quando se usa terapia antimicrobiana sistêmica, mesmo com uma desbridação ampla, os níveis de antibiótico no local podem não ser suficientes para debelar a infecção, ocorrendo recidivas e cronicidade, o que afeta consideravelmente a qualidade de vida do paciente. Quadros graves podem ser indicativos de amputação do membro afetado. Por este motivo, o DDS tem sido bastante pesquisado e recomendado em casos de osteomielite, principalmente nos quadros crônicos.

2.2.1 Liberação controlada de drogas no tratamento da osteomielite

Infecções ósseas prolongadas são caracterizadas como osteomielite crônica. Ao atingir um estado crônico, a infecção muitas vezes requer uma ressecção cirúrgica radical, e isso leva em muitos casos a uma grande perda de osso e tecido mole. Além disso, a ressecção inadequada de tecido infectado aumenta a taxa de reinfecção (KUMAR; GOVINDAN; GIRIJA, 2014; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014).

A terapia antibiótica sistêmica tem a desvantagem da necessidade de tratamento em longo prazo devido à incapacidade de criar uma elevada concentração local da droga e o risco resultante de toxicidade. A vascularização prejudicada do osso infectado torna necessário o uso de doses mais elevadas, aumentando as desvantagens. Como consequência, a liberação direta da droga no local poderia constituir uma abordagem mais efetiva e menos onerosa para a terapia de doenças ósseas (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2011; KUMAR; GOVINDAN; GIRIJA, 2014; RAUSCHMANN et al., 2005; YAYLAOĞLU et al., 1999).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos desde o século passado, sobre materiais poliméricos para o carreamento de drogas (GRAHAM; WOOD, 1978; OGAWA; PLEPIS, 2002; SMITH; HUNNEYBALL, 1986; WINKLER, 2017). Diversos tipos de materiais poliméricos já foram testados na terapia da osteomielite via DDS, tanto polímeros naturais, como sintéticos (DORATI et al., 2017; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014; WINKLER, 2017). Polímeros naturais, como o colágeno,

ácido hialurônico e quitosana possuem boa compatibilidade, porém apresentam risco de rejeição do implante, além possuírem pouca resistência mecânica. Polímeros sintéticos, como o ácido polilactico (PLA) e ácido poliglicólico (PLGA) são mais versáteis, podendo ter suas características manipuladas para melhor se adequarem à função que devem desempenhar (BIRT et al., 2017; DORATI et al., 2017).

Além dos polímeros, trabalhos com experimentos em animais mostraram que sistemas de liberação de drogas suportadas em biocerâmicas é promissor para o controle de infecções ósseas (KUMAR; GOVINDAN; GIRIJA, 2014; OGAWA; PLEPIS, 2002; YAYLAOĞLU et al., 1999).

Tanto polímeros, quanto cerâmicas e mais recentemente, materiais nanoparticulados vêm sendo usados e pesquisados para a terapia da osteomielite, principalmente dos quadros crônicos, proporcionando uma grande revolução no tratamento dessa doença (DORATI et al., 2017; YAYLAOĞLU et al., 1999; WANG et al., 2018). Para um biomaterial ser usado no tratamento da osteomielite, ele deve proporcionar a liberação de uma grande quantidade de medicamento inicialmente, seguida por um longo período de liberação lenta (MASTERS et al., 2019; WINKLER, 2017). Idealmente, um perfil bifásico de liberação deve ser alcançado, consistindo em uma dispensação de medicamento em bolus para atingir imediatamente altas concentrações de antibióticos e assim erradicar qualquer bactéria, seguido por uma liberação sustentada de droga acima da concentração inibitória mínima (MIC) que irá matar qualquer bactéria remanescente (ou seja, bactérias emergindo de biofilmes) (MASTERS et al., 2019).

Um dos antibióticos mais comumente usados em DDS são a gentamicina, que usada localmente não apresenta os efeitos adversos de quando usada sistemicamente, e apresenta efeitos positivos contra *S. aureus* sensível à meticilina (MASTERS et al., 2019; STOIAN; DEMETRESCU; IONITA, 2020), além de ser efetiva contra microrganismos gram positivos e negativos (STOIAN; DEMETRESCU; IONITA, 2020). Outros antibióticos citados na literatura para uso em DDS são a vancomicina, tobramicina, doxiciclina, rifampina, ciprofloxacina, dentre outros (DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2011; MASTERS et al., 2019; PARENT et al., 2016; WINKLER, 2017).

A ciprofloxacina (CPX), 1-ciclopropil 6-fluoro-1, 4-diidro-4-oxo-7- (1-piperazinil) - 3-quinolina ácido carbolítico é um agente antibacteriano fluorquinolona de amplo espectro usado no tratamento de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos

(DEVANAND VENKATASUBBU et al., 2011). Dentre os vários antibióticos, a ciprofloxacina é preferida para o tratamento da osteomielite, uma vez que sua concentração inibitória mínima (MIC) é baixa ($0,25-2 \mu\text{g ml}^{-1}$) para a maioria dos patógenos que causam osteomielite (KUMAR; GOVINDAN; GIRIJA et al., 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS:

3.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos adotados neste trabalho estão de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a legislação vigente. A metodologia foi aprovada pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV), no âmbito do protocolo 67/2016.

3.2 Divisão do período experimental

Durante o experimento, os animais foram submetidos à dois procedimentos cirúrgicos. No primeiro deles, foram realizados os procedimentos de indução da osteomielite. No segundo, realizado após 15 dias das primeiras cirurgias, foram implementados os tratamentos dos grupos. Em um terceiro momento, aos 42 dias após os tratamentos, os animais foram submetidos à eutanásia.

À fim de tornar mais clara a organização dos procedimentos ao longo do tempo e para melhor compreensão do período experimental, se convencionou denominar o dia 0, onde se produziu a falha óssea com a indução de osteomielite de T0. O dia em que os tratamentos foram instituídos de T1 e o dia da eutanásia de T2.

3.3 Indução da Osteomielite

Para a indução da osteomielite, foi utilizada a técnica apresentada no capítulo três desta tese e descrita aqui resumidamente. Foram utilizados 30 coelhos da raça Nova Zelândia, provenientes do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da UFV. Os animais foram alojados em gaiolas individuais, recebendo ração uma vez ao dia e água *ad libitum*. Imediatamente antes do procedimento cirúrgico, eles foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos, com seis animais em cada grupo e cada um deles teve o membro torácico direito radiografado.

Foi utilizada uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite, com virulência comprovada e cultivada conforme o descrito por Smeltzer et al. (1997) e Gaudin et al. (2011) e inoculada no interior do canal medular dos animais.

Para a inoculação da solução contendo *S. aureus*, os animais foram sedados com uma combinação de quetamina e midazolam e anestesiados com isoflurano diluído em oxigênio 100% e administrados por meio de máscara. Foi feito o bloqueio do plexo braquial utilizando-se uma combinação de bupivacaína e lidocaína.

O campo operatório foi preparado de maneira rotineira. Após a exposição do terço cranial lateral do úmero, foi produzido um orifício córtico-medular na metáfise utilizando-se uma broca trefina de 4,0 mm de diâmetro. Durante a perfuração, o local foi irrigado com solução fisiológica estéril para evitar aquecimento.

Após a retirada do fragmento ósseo, o canal medular foi submetido à raspagem de seu conteúdo, lavado com solução fisiológica estéril e aspirado até a diminuição do sangramento e se constatar que todo o conteúdo medular havia sido removido. Em seguida, 10µl da solução contendo $2 \cdot 10^6$ UFC de *S. aureus* foi inoculada no interior do canal. Após a inoculação, o fragmento ósseo obtido durante a perfuração foi introduzido no canal medular. Os tecidos incisados foram suturados de forma rotineira.

Para a analgesia no período pós-operatório, os animais foram medicados com morfina, na dose de 0,5 mg/Kg, aplicada por via subcutânea, de 12 em 12 horas, durante 3 dias. Os animais foram acompanhados diariamente durante 15 dias (período de tempo entre os procedimentos cirúrgicos) onde se observou a presença de edema, secreção purulenta e deiscência de sutura. Também foi observada a interferência ou não dos animais na ferida cirúrgica e se apoiavam ou não o membro operado.

3.4 Tratamentos

Quinze dias após o primeiro procedimento cirúrgico (T0), todos os animais passaram por um novo exame radiográfico na projeção mediolateral do membro direito para se avaliar as alterações radiográficas e a densidade óssea. Em seguida, foram submetidos a um segundo procedimento (T1), seguindo o mesmo protocolo anestésico e cirúrgico usado na indução da osteomielite, para acessar a região do úmero onde foi produzida a falha óssea. Os tecidos neste local foram submetidos à desbridamento e lavagem com solução salina visando a remoção de tecidos

desvitalizados e secreção purulenta à fim de permitir a implantação dos biomateriais relacionados na tabela 1. Imediatamente antes de serem implantados, cada material, na quantidade aproximada de 0,2 mg, foi umedecido com 0,2 ml de solução salina estéril para formar uma pasta moldável. Em seguida, a pasta foi modelada em forma de comprimido de aproximadamente 5 mm de diâmetro, que foi então implantado conforme a tabela 2. Os animais do grupo controle não receberam implantes, tendo sido submetidos apenas à lavagem e desbridamento. Após a implantação, os tecidos foram suturados conforme descrito no procedimento anterior.

Tabela 1: Biomateriais utilizados e suas composições

Códigos	Amostras (Híbridos)	Concentração (Proporção mássica%)	M(g) de HAP	M(g) CoFe ₂ O ₄	γ (g)	MT (g)
HCoγ	HAP:CoFe ₂ O ₄ +γ	HAP:CoFe ₂ O ₄ (70:30)	17,5	7,5	2,5	27,5
JCoγ	HAP JHS:CoFe ₂ O ₄ +γ	HAP JHS:CoFe ₂ O ₄ (70:30)	12,6	5,4	1,8	19,8
Coγ	CoFe ₂ O ₄ +γ	-	-	25,0	2,5	27,5
HCo	HAP:CoFe ₂ O ₄	HAP:CoFe ₂ O ₄ (70:30)	11,2	4,8	-	16,0

M(g) de HAP: massa em grama de hidroxiapatita; M(g) CoFe₂O₄: massa em grama de ferrita de cobalto; γ: fármaco ciprofloxacina em gramas (g); MT: massa total em gramas (g); HAPCoFe₂O₄γ: hidroxiapatita sintética, ferrita de cobalto e ciprofloxacina (LABSMAC); HAPJHSCoFe₂O₄γ: hidroxiapatita sintética, ferrita de cobalto e ciprofloxacina (JHS); CoFe₂O₄γ: ferrita de cobalto e ciprofloxacina (LABSMAC); HAPCoFe₂O₄: hidroxiapatita e ferrita de cobalto (LABSMAC).

Tabela 2: Grupos experimentais e respectivos protocolos de tratamentos no T1.

GRUPOS	TRATAMENTOS
G1	Desbridamento, lavagem e implantação do biomaterial HCoγ
G2	Desbridamento, lavagem e implantação do biomaterial JCoγ
G3	Desbridamento, lavagem e implantação do biomaterial Coγ
G4	Desbridamento, lavagem e implantação do biomaterial HCo
Co	Desbridamento e lavagem sem implantação de biomaterial

Novamente, para a analgesia no período pós-operatório, os animais foram medicados com morfina, de acordo com o protocolo descrito anteriormente.

3.5 Avaliação Clínica, radiográfica e densitometria radiográfica

Os animais foram submetidos a exame clínico diariamente nos primeiros 15 dias nos dois períodos de pós-operatório. Durante a primeira semana após os dois procedimentos cirúrgicos (T0 e T1), os animais foram avaliados com relação aos seguintes parâmetros: (1) claudicação, sendo avaliados após estímulo sem retirá-los das gaiolas, aplicando-se os escores 0 para ausência de claudicação, 1 para apoio com claudicação e 2 para ausência completa de apoio; (2) deiscência, avaliada como presente ou ausente; e (3) reação inflamatória exsudativa da ferida cirúrgica, presente ou ausente. Os resultados foram interpretados com auxílio de análise gráfica e estatística descritiva (mediana e porcentagem).

Durante o período experimental, os animais foram submetidos à exames radiográficos do membro operado, com o objetivo de se comprovar a integridade do mesmo, analisar as variações de densidade óssea e de se observar as alterações radiológicas provenientes dos procedimentos cirúrgicos. As radiografias foram realizadas nas seguintes datas: um dia antes da cirurgia de confecção do defeito ósseo e inoculação bacteriana (T0), imediatamente antes do desbridamento e implantação dos biomateriais (T1) e no dia da eutanásia (T2). Para a realização do exame radiográfico, cada animal foi sedado com quetamina e midazolam nas mesmas doses utilizadas para os procedimentos cirúrgicos. Em seguida, cada animal foi posicionado em decúbito lateral direito, com o membro torácico direito estendido e a cabeça tracionada caudalmente. A técnica radiográfica foi padronizada para a distância de um metro da fonte de emissão dos raios X pelo aparelho ao filme radiográfico, com kilovtagem de 45 Kv, 100 miliamperes e tempo de exposição de 0,07 segundos.

Todas as radiografias foram tomadas com um penetrômetro de alumínio. As radiografias foram reveladas digitalmente e as imagens foram analisadas visualmente, observando-se a integridade óssea (ausência de fratura), presença de reação periosteal, esclerose óssea e/ou regiões de perda óssea. Em seguida, as imagens foram analisadas no programa computacional ImageJ e pela ferramenta de análise de histograma foi construída uma curva de densidade com base no penetrômetro, como

descrito no capítulo três. Os resultados foram interpretados com auxílio do teste t-pareado e ANOVA com nível de significância de 5%.

Aos 42 dias após o segundo procedimento cirúrgico (T2), os animais foram submetidos a um novo exame radiográfico, e em seguida sofreram eutanásia por sobredose de propofol e cloreto de potássio de acordo com as normas exigidas pela Resolução 1000/2012 do CFMV. Na sequência, foi realizada a coleta do úmero, o qual foi dissecado e separado da ulna e da escápula com o auxílio de uma serra manual. Os tecidos moles foram removidos e em seguida, os ossos foram acondicionados em frascos individuais e fixados em formol 10% por 72 horas. Após este período, os ossos foram lavados em água corrente e acondicionados individualmente em frascos contendo álcool 70%.

3.6 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Todos os ossos foram escaneados pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Kontich, Belgium) utilizando resolução de 11.2 μ m, 50 kV e 800 μ A, e filtro de alumínio de 0,5 mm. As imagens obtidas foram reconstruídas pelo *software* NRecon (SkyScan, versão 1.7.0.4) e analisadas através do *software* CTAn (SkyScan, versão 1.16) para os seguintes parâmetros: BV (volume ósseo), BS (superfície óssea), Po.N (número de poros fechados), Po.V (volume total de poros) e PO (percentual de porosidade total). Para a realização das análises foi definido um valor limiar para binarização (*threshold*). Após obter o *threshold* que mais se assemelhou à imagem original para cada amostra, foi feita a média dos valores obtidos. Dessa forma, foi determinado um limite inferior em 43 e um limite superior em 168 (*grayscale threshold* 0 - 255), sendo a mesma binarização utilizada para todas as amostras.

Foi medida a reação periosteal, a quantidade de osso cortical e sua porosidade usando-se as técnicas descritas no capítulo três.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Kruskal-wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas, com 5% de nível de significância.

3.7 Análise histomorfométrica e histológica

Após a realização da μ CT, os ossos foram descalcificados em solução de ácido fórmico e citrato de sódio e processados segundo técnicas histológicas de rotina, sendo desidratados em soluções crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Cortes de 5 μ m de espessura foram obtidos em micrótomo de rotação e corados em hematoxilina e eosina.

As avaliações histológicas foram conduzidas por dois examinadores independentes e às cegas. Observou-se a presença de tecido ósseo neoformado no local do defeito e sua interação com o biomaterial implantado. Também foram observadas as características das trabéculas ósseas e remodelação das mesmas, e as células ósseas presentes. Com relação aos tecidos moles adjacentes, foi avaliada a presença ou ausência de cápsula fibrosa e se existente, sua espessura. Outras características também foram avaliadas e descritas como hiperemia, infiltrado inflamatório, presença de regiões hemorrágicas, infiltração tecidual dentro do biomaterial e evidências de fagocitose. No tocante à fibroplasia, hiperemia e infiltrado inflamatório, as lâminas foram avaliadas com relação à intensidade das alterações, sendo classificadas como discreta, moderada ou intensa.

Para a análise histomorfométrica, as lâminas histológicas foram fotografadas utilizando-se uma câmera acoplada ao microscópio óptico na objetiva de 10x. As imagens foram submetidas à planimetria por contagem de pontos utilizando-se o programa ImageJ com o objetivo de calcular a proporção dos parâmetros biomaterial, osso, espaço vazio (medula) e tecido conjuntivo. Cada parâmetro analisado foi transformado em porcentagem de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Tecido analisado (\%)} = \frac{\text{Pontos coincidentes com o tecido}}{\text{Pontos totais}} \times 100$$

Os resultados obtidos em cada parâmetro foram então submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e à testes estatísticos descritivos (mediana e desvio-padrão).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Indução da osteomielite

A confirmação da osteomielite se deu 15 dias (T1) após o procedimento cirúrgico através da avaliação qualitativa das radiografias obtidas e da densidade radiográfica média dos úmeros dos animais.

Nas radiografias obtidas no T0, os animais apresentaram densidade óssea na região em que seria produzido o defeito ósseo de $4,2 \text{ mm Al} \pm 0,33 \text{ mm Al}$. Aos 15 dias após a indução, a média geral foi de $5,6 \text{ mm Al} \pm 0,35 \text{ mm Al}$, representando um aumento significativo ($p < 0,05$) da densidade. Este aumento era esperado e está relacionado ao acometimento dos tecidos moles, que se tornam visualmente mais radiopacos, portanto mais densos, devido à intensa reação inflamatória nos mesmos, incrementando assim, a densidade óssea (PINEDA, ESPINOSA & PENA 2009; LEE et al., 2016) e também em consequência da reação periosteal e aumento da densidade do canal medular (KOORT et al. 2005; KUNDU et al., 2012).

4.2 Avaliação clínica e radiográfica após a indução da osteomielite

4.2.1 Avaliação clínica

As avaliações clínicas dos animais após o T0 foram realizadas com os mesmos dentro de suas respectivas gaiolas. Apesar de não ser o usual ao se avaliar procedimentos ortopédicos, este cuidado foi necessário para se evitar a movimentação excessiva dos animais, o que poderia ocasionar fraturas devido à uma possível fragilidade óssea decorrente da infecção óssea induzida.

Assim como o descrito no capítulo três, durante os primeiros três dias após o procedimento de indução da falha óssea e inoculação bacteriana (T0), os animais se alimentaram pouco, sendo que nas primeiras 24 horas, nenhum consumo expressivo de ração foi observado. Todos se mostraram apáticos evitando se movimentar. Após esse período o consumo de alimentos foi se normalizando e após três dias os animais estavam mais ativos, se movimentando com mais vigor quando estimulados. Com relação à claudicação, durante os primeiros sete dias, nenhum deles apoiou o membro operado (claudicação grau 2).

Foi observado edema na face lateral do terço cranial do membro torácico direito em todos os animais, sendo que ele persistiu até os 15 dias de pós-operatório, sendo acentuado ao longo da incisão. Dois animais do grupo controle continuaram sem apoiar até o décimo quinto dia, quando ao exame radiográfico ficou constatada a fratura completa do úmero em um deles. Este animal foi retirado do experimento e

imediatamente sofreu eutanásia. Aos 15 dias após o T0, todos os animais apresentavam grau 1 de claudicação, que provavelmente está associada ao processo inflamatório causado pela presença do *S. aureus* como descrito por Idelevich et al. (2016) e descrito no capítulo três.

Assim como ocorreu após a indução da osteomielite descrita no capítulo três, novamente não se observou secreção purulenta ou sangramento nas feridas cirúrgicas. Porém, 9 animais apresentaram deiscência de sutura (31% dos animais), sendo que em um deles houve abertura completa da ferida cirúrgica. Nos demais, apesar da deiscência, não se observou ferida aberta até os 10 dias de pós-operatório. É provável que a deiscência tenha ocorrido devido à interferência dos animais na ferida cirúrgica. Aos 10 dias após o procedimento, todos estavam com a ferida cirúrgica aparentemente cicatrizada, porém era possível observar edema evidente ao longo da ferida cirúrgica, sendo que ao toque digital, se notou calor na região e dor local, demonstrada no retraimento do membro.

Aos 15 dias, os animais foram novamente anestesiados para uma nova avaliação radiográfica e para os procedimentos de desbridamento e implantação dos biomateriais (T1). Nesta data, todos os animais tinham um edema significativo ao redor da ferida cirúrgica e três deles tinham trajetos fistulosos com drenagem através da pele (Figura 1A). Dois animais que aos 10 dias aparentemente estavam com a ferida cicatrizada, aos 15 dias estavam com a ferida aberta em alguns pontos, porém sem sangramento ou secreção perceptível pela avaliação clínica.

Após a incisão da pele, observou-se a presença de um exsudato purulento espesso, em quantidades variáveis, em todos os animais (Figura 1B). Este exsudato, quando em maior quantidade se organizou em forma de abscesso e como exposto acima, em alguns casos (10,7% dos animais) se formou um trajeto fistuloso até a pele. Além do exsudato purulento, foi observado que os tecidos estavam desvitalizados, apresentando uma coloração acinzentada e com uma presença expressiva de fibrose. Estes achados são característicos da infecção de tecidos moles causada por *S. aureus* e correspondem a um quadro de piomiosite, que é a infecção aguda dos músculos esqueléticos, caracterizada primariamente por uma coleção de pus (IDELEVICH et al., 2016). Os sinais clínicos da piomiosite são dor muscular localizada, rigidez e edema local com o desenvolvimento de uma coleção de pus. Ao longo de sua evolução ocorre a formação de abscesso (COMEGNA et al., 2016; IDELEVICH et

al., 2016; ROBERTS; CHAMBERS, 2005), fato observado no presente trabalho e descrito também no capítulo 3.

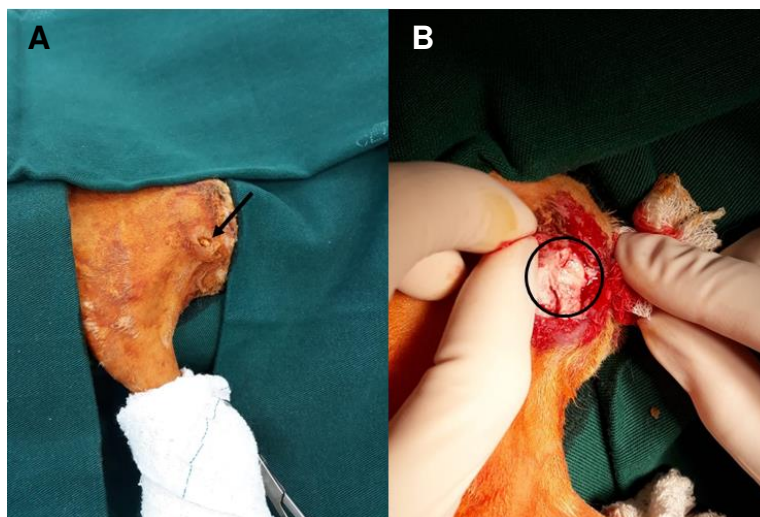


Figura 1: Animal aos 15 dias de pós-operatório. A) A seta mostra uma fístula; B) O círculo evidencia a secreção purulenta presente nos tecidos moles.

O acometimento dos tecidos moles ao redor do local onde de inoculou a solução bacteriana era esperado e foi observado no trabalho descrito no capítulo três. A piomiosite ocorreu devido ao extravasamento da solução contendo *S. aureus* através do defeito ósseo para os tecidos próximos devido ao sangramento proveniente do canal medular, que apesar de ter sido minimizado pela técnica cirúrgica utilizada, não pode ser completamente eliminado.

4.2.2 Avaliação radiográfica e densitometria radiográfica

Nas radiografias obtidas no T1 era possível notar-se uma região circular radiotransparente de visibilidade variável, na região metafisária proximal, correspondente à falha óssea produzida no T0 (Figura 2).

Conforme discutido no capítulo 3, as radiografias obtidas aos 15 dias (T1) após a indução da infecção óssea mostram alterações são sutis ou mesmo ausentes, como é possível observar na figura 2 (A, B e C). Na figura 2A, não se observam alterações ósseas claras, mas é possível notar-se alterações nos tecidos moles circundantes. Porém na figura 2B pode-se notar perda de definição córtico-medular com

adelgaçamento da cortical, aumento da radiopacidade do canal medular e lesões líticas. Essas alterações estão de acordo com os achados descritos na literatura, como por Heitzmann et al. (2018). Segundo esses autores, as alterações radiográficas observadas nos quadros de osteomielite podem ser bastante variadas, principalmente nas fases iniciais. Os achados mais comuns são reação periosteal inespecífica e osteólise (HATZENBUEHLER; PULLING, 2011; HEITZMANN et al., 2019; WU et al., 2019). Também pode-se observar aumento da densidade do canal medular, adelgaçamento da cortical, presença de sequestros ósseos (HEITZMANN et al., 2019; WU et al., 2019), osteopenia, perda do padrão trabecular e aposição de osso novo (PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009; SMITH; BUCHANAN; SHULER, 2016). Há também as alterações relacionadas ao acometimento dos tecidos moles circundantes com inchaço muscular e perda de definição dos planos teciduais (LEE et al., 2016; PINEDA; ESPINOSA; PENA, 2009).

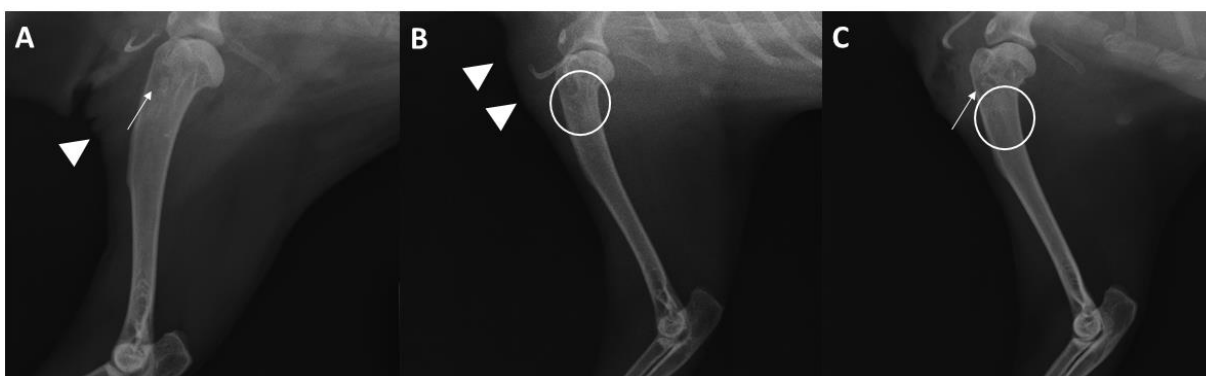


Figura 2: Radiografias do membro anterior direito na posição mediolateral no T1 dos animais Co6 (A); G1A (B) e G4E (C). As setas brancas mostram a falha óssea; as cabeças de seta mostram o tecido mole edemaciado com radiopacidade aumentada; os círculos evidenciam região com aspecto sugestivo de lise óssea.

Como descrito acima, a densidade óssea média dos úmeros antes da indução da osteomielite (T0) foi de 4,2 mm Al e aos 15 dias após a indução, a média geral foi de 5,6 mm Al, representando um aumento significativo da densidade pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade (Figura 3). Como descrito no capítulo 3, a proliferação óssea (reação periosteal) e também o aumento de densidade do canal medular, acrescidos do aumento de radiopacidade dos tecidos moles levam a um incremento de radiopacidade óssea mesmo na presença de osteólise e perda óssea. Além disso, a região selecionada para se medir a densidade no T1 foi a região da falha óssea, local com radiopacidade menor que a do osso, como descrito por Vital et al. (2008) e

Reis et al. (2010). Portanto seria esperada uma diminuição de densidade pelo simples fato de haver uma falha no osso cortical.

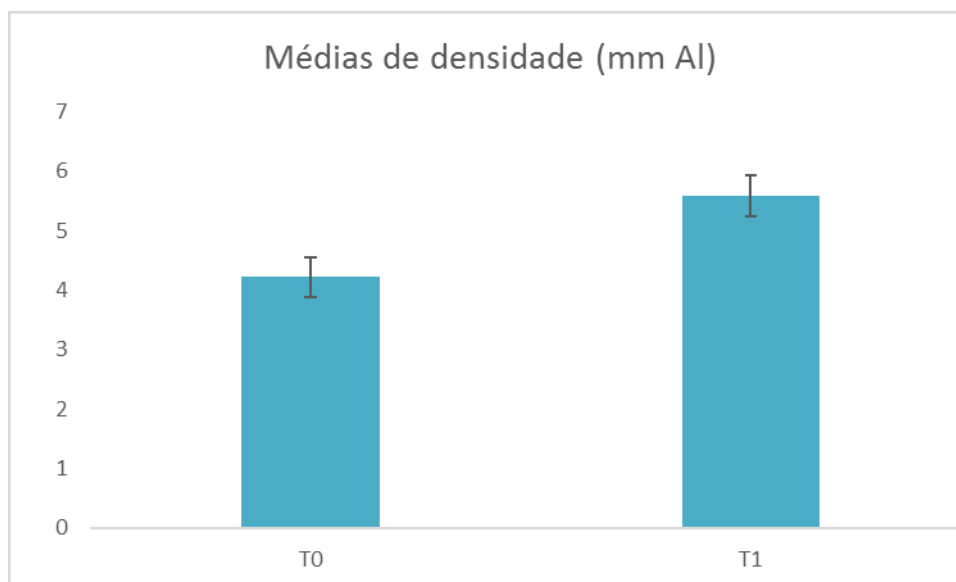


Figura 3: Representação gráfica das médias da densidade óssea dos animais antes do primeiro procedimento cirúrgico (T0) e no momento imediatamente antes da cirurgia para indução do defeito ósseo (T1), com base no teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.3 Avaliação clínica e radiográfica após a implantação dos biomateriais

4.3.1 Avaliação clínica

Após o desbridamento, com remoção dos tecidos necróticos e lavagem abundante do local operado, foram realizados os tratamentos conforme descritos na seção “Material e Métodos”. Nas primeiras 24 horas após o segundo procedimento cirúrgico (T1), novamente os animais não se alimentaram, sendo que maioria deles retornou ao padrão normal de alimentação no terceiro dia do pós-operatório. Porém ao sétimo dia após a cirurgia todos se alimentavam bem. Como observado após o primeiro procedimento cirúrgico (T0), os animais se mostraram apáticos e relutantes em se movimentar nos primeiros três dias após a cirurgia.

Ao contrário do observado após o T0, alguns animais já apoiavam, apesar de terem pouca firmeza (claudicação grau 1), o membro operado no dia seguinte à cirurgia. Os demais foram passando a apoiar o membro após alguns dias, sendo que se pôde notar diferentes comportamentos com relação ao apoio ao longo do tempo (Figura 4). Não foi observada diferença significativa entre a claudicação dos animais do Grupo Controle e dos tratados, indicando estar associada ao trauma cirúrgico, e

não aos biomateriais implantados, como também descrito por Borges et al. (2000) e Carlo et al. (2009a). A claudicação também está possivelmente ligada ao quadro infeccioso presente.

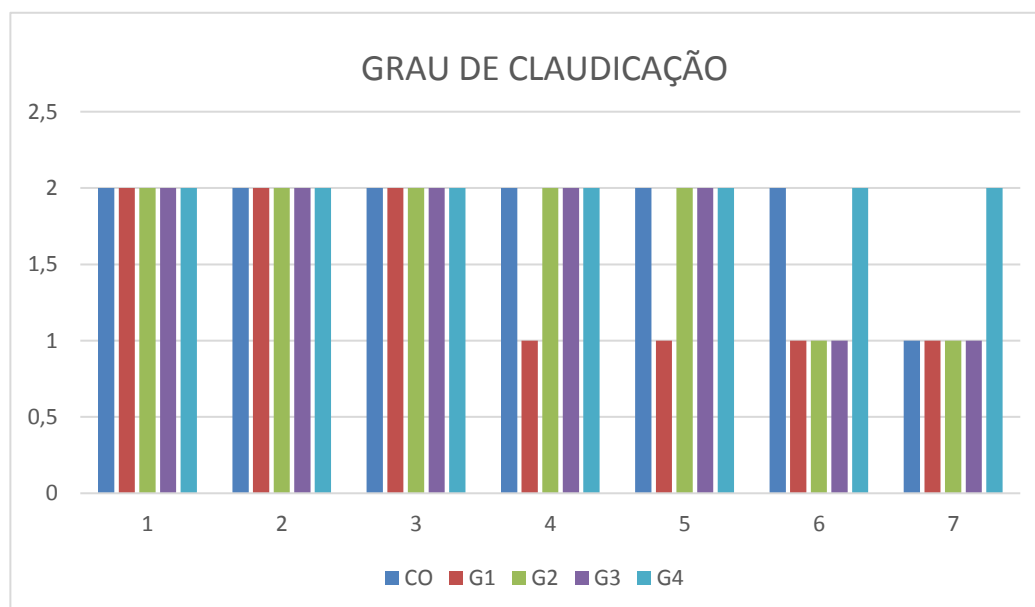


Figura 4: Representação gráfica das medianas obtidas na avaliação da claudicação em escala de 0 a 2, durante sete dias após o procedimento cirúrgico (T1). CO: grupo controle; G1: HCo γ , G2: JCo γ , G3:Co γ , G4: HCo

A cicatrização das feridas após o T1 ocorreu por primeira intenção na maioria dos animais, tendo ocorrido deiscência em 11% dos animais. Dois animais (um deles do grupo controle), tiveram secreção purulenta na ferida cirúrgica, sem ocorrência de deiscência. Essa secreção purulenta esteve presente nos dois animais, ao décimo dia de pós-operatório, tendo persistido por aproximadamente uma semana.

Comparando-se a ocorrência de deiscência no T0 (31% dos animais) com a no T1 (11% dos animais) pode-se inferir que sua ocorrência está ligada ao procedimento cirúrgico e ao processo infeccioso e não aos biomateriais implantados. No T1, a ocorrência de deiscência foi de 20% no grupo controle e 9,1 % nos tratados, reforçando essa hipótese.

Aos 42 dias após a implantação dos biomateriais, os animais sofreram eutanásia. À necropsia, se observou, em 28% dos animais a presença de discreta quantidade de secreção purulenta nos tecidos moles ao redor do local onde foi produzida a falha óssea, sem formação de tecido fibrótico ou abscessos, observados nas cirurgias no T1. A presença de exsudato purulento à necropsia mostra que apesar

dos procedimentos de lavagem e desbridamento, alguns animais persistiram com o quadro de piomiosite, embora menos grave do que o observado no T1.

4.3.2 Avaliação radiográfica e densitometria radiográfica

Ao contrário do descrito por Carlo et al. (2009b) e Vital et al (2008) em cujos trabalhos se procedeu ao acompanhamento radiográfico ao longo do tempo, neste trabalho optamos por radiografar os animais somente ao término do período experimental à fim de evitar a manipulação dos mesmos. Este cuidado foi necessário devido à fragilidade óssea dos animais no local onde se induziu a osteomielite, demonstrado pela ocorrência de fratura patológica em dois animais.

Aos 42 dias após os tratamentos (T2), a falha óssea era menos evidente na maioria dos animais tratados, somente em 5 cinco animais ela ainda estava visível. Em três animais (60%) do grupo controle, a falha óssea ainda era visível aos 42 dias, sendo que em um deles, era mais evidente do que aos 15 dias. A figura 5 mostra falha óssea bem evidente em um animal do grupo controle (Co5) e a falha menos evidente em relação ao osso circunvizinho em um animal do grupo 2 (Figura 5B). Essa diferença dos grupos tratados em relação ao grupo controle pode ser devido à presença da HAp nos biomateriais dos grupos 1, 2 e 4 e da CoFe_2O_4 no grupo 3 e demais grupos tratados. Ambos possuem alto número atômico e radiopacidade semelhante ao osso, contribuindo, portanto, para um incremento de radiopacidade nos locais onde estão presentes, neste caso, no defeito ósseo.

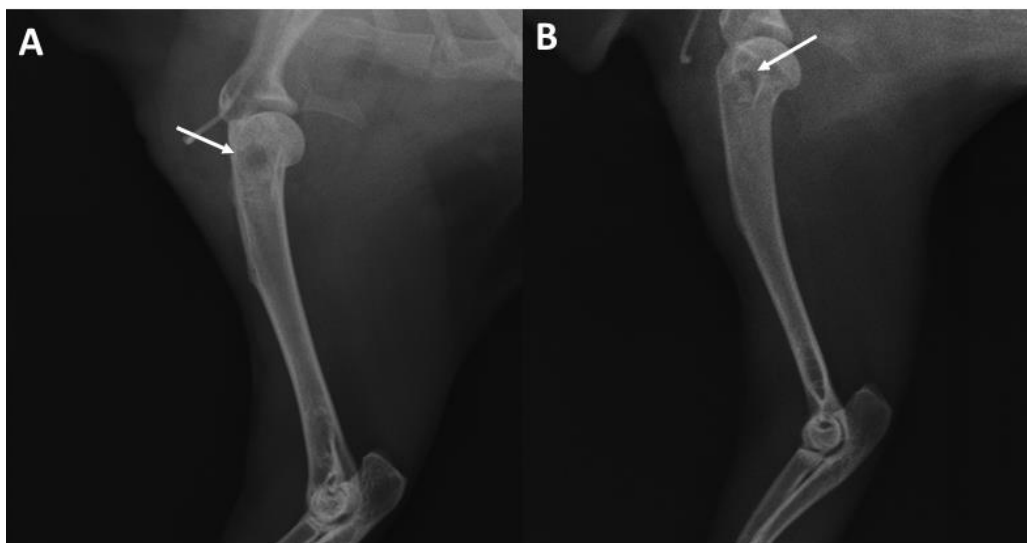


Figura 5: Radiografias do membro anterior direito na posição mediolateral no T2 dos animais Co5 (A) e G1B (B). As setas brancas evidenciam a falha óssea.

É esperado que a radiopacidade da falha óssea aumente ao longo do tempo em consequência do crescimento ósseo que ocorre de suas bordas em direção ao centro do defeito (CARLO et al., 2009b; VITAL et al., 2006). No presente trabalho, este fenômeno está alterado devido ao processo inflamatório presente não somente no osso, mas também nos tecidos moles. É importante ressaltar que as dimensões da falha óssea provocada nos animais não correspondem a um defeito crítico, ou seja, a regeneração óssea não é dificultada ou impedida pelo tamanho do defeito (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Portanto era esperado que a regeneração óssea estivesse mais avançada ao último exame radiográfico (42 dias após a implantação dos biomateriais) do que no T1, tanto no grupo controle, quanto nos tratados, mostrando então, uma radiopacidade semelhante à observada no T0. Temos então, dois fatores que influenciam de formas apostas a formação óssea, a infecção e o defeito não crítico.

No T2, na maioria das radiografias, mesmo nas dos animais dos grupos tratados, é possível observar alterações ósseas mais evidentes do que no T1, demonstrando que a osteomielite ainda estava presente (Figuras 6 e 7). Nas duas figuras é possível se observar regiões sugestivas de lise óssea em todas as radiografias, com alterações na aparência do canal medular, aumento de densidade óssea e regiões compatíveis com destruição alternadas com regiões com aparência de esclerose óssea.

Em um dos animais do grupo 4, aos 42 dias observou-se fratura do tubérculo menor (Figura 6C). Essa fratura provavelmente ocorreu devido à fragilidade óssea causada pelo quadro infeccioso. Quando acometido por um processo infeccioso, a estrutura óssea pode se tornar mais frágil devido à osteólise, levando a um aumento da porosidade óssea e predispondo à ocorrência de fraturas patológicas (BELTHUR et al., 2012; MARSHALL et al., 2018; YILDIRIM et al., 2017).

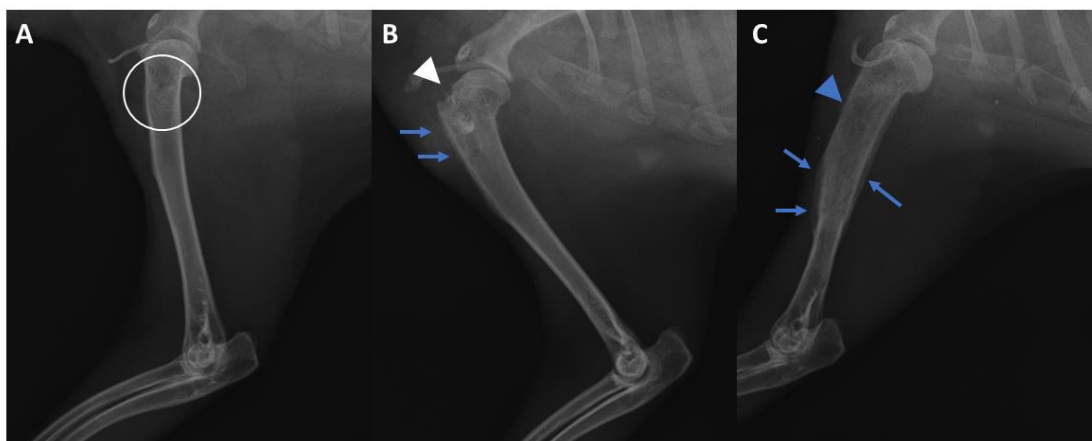


Figura 6: Radiografias mediolaterais no T2 dos animais Co4 (A), G4E (B) e G2C (C). O círculo evidencia uma região com alteração na aparência do canal medular, sugerindo lise e esclerose ósseas; as setas azuis mostram reação periosteal; a cabeças de seta branca fratura do tubérculo menor.

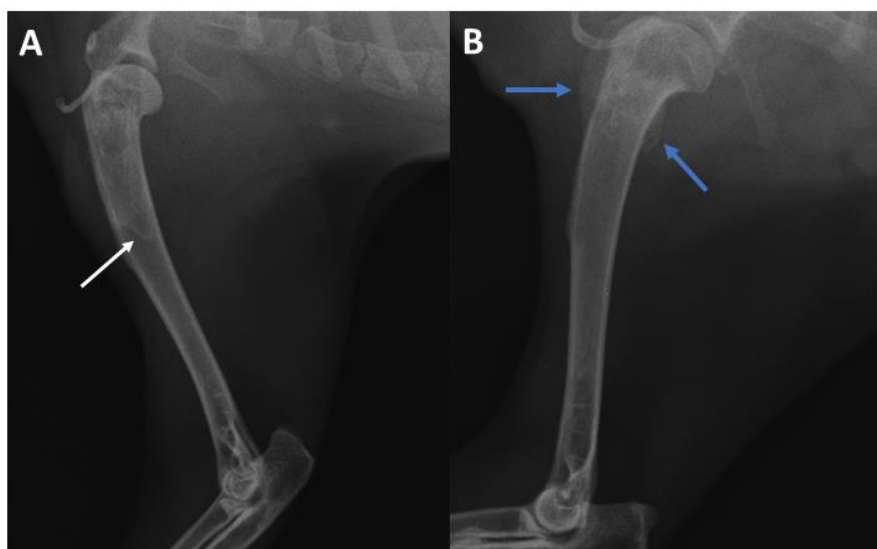


Figura 7: Radiografias mediolaterais no T2 dos animais G1A (A) e G1E (B) no T2. A seta branca mostra uma linha radiopaca que parece delimitar a região com alterações ósseas. As setas azuis evidenciam a reação periosteal. Em (A) e (B) é possível observar a perda de definição córtico-medular.

Os biomateriais utilizados no experimento são mais radiopacos do que o tecido ósseo por serem constituídos de materiais, em especial a HAp, com alto número molecular (REIS et al., 2012). Entretanto não foi possível visibiliza-lo em todas as radiografias. Este fato provavelmente se deve à formação óssea ao redor do biomaterial ao longo do tempo, o que contribui para diminuir sua radiopacidade (VITAL et al., 2006) e também por terem se espalhado pelos tecidos ao longo do osso, fato comprovado pela μ CT. É provável também, que uma parte dos biomateriais tenha sido absorvida ou degradada. No grupo 3, em que os animais receberam biomaterial sem HAp em sua constituição, ele foi visibilizado em maior quantidade no defeito ósseo e em sua proximidade (Figura 8A). Este fato pode estar ligado à constituição do biomaterial. É provável que a ausência da HAp tenha permitido uma maior agregação das NPs de CoFe_2O_4 tornando-o mais visível ao Raio-x. Este fato ocorre porque mesmo o revestimento não impede a formação dos agregados das NPs (ARAÚJO, 2017).

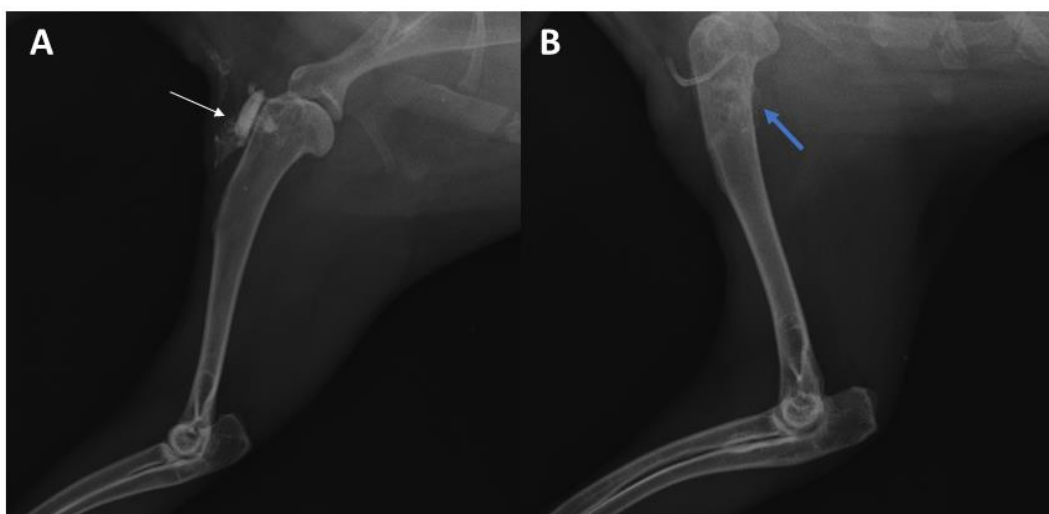


Figura 8: Radiografias do membro anterior direito na posição mediolateral no T2 dos animais G3A (A) e G4A (B). A seta branca evidencia o biomaterial, que não está visível em (B). A seta azul mostra uma área com reação periosteal.

Aos 42 dias após os tratamentos (T2), houve um aumento de densidade em relação ao T1, porém essa diferença não foi significativa (Figura 9). Além disso, no T2 não foram observadas diferenças significativas de densidade entre o Grupo Controle e os tratados ($p = 0,3705$ no teste de Kruskal-wallys).

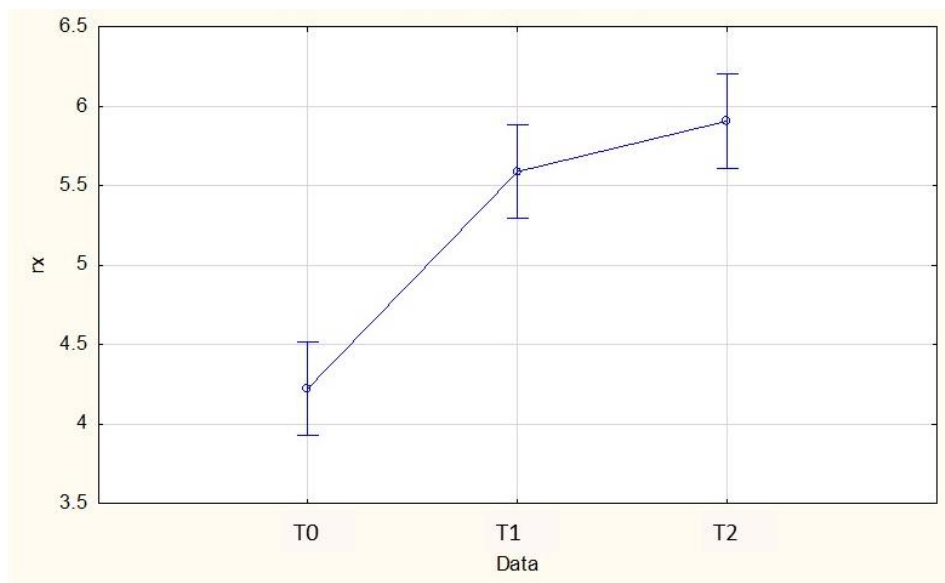


Figura 9: Representação gráfica da média da densidade óssea dos animais antes da indução (T0), no momento imediatamente antes da cirurgia para instituição dos tratamentos (T1) e aos 42 dias de pós-operatório (T2). Barras verticais mostram 95% de confiança no intervalo.

4.3 Microtomografia computadorizada (μ CT)

Durante a avaliação qualitativa das imagens, foi possível observar alterações ósseas compatíveis com um quadro de infecção óssea nos animais do grupo controle (Figura 10) e também nos animais dos grupos tratados (Figuras 11 e 12), em diferentes intensidades.

Em todos os animais do grupo controle foram observadas reação periosteal em graus variados, inclusive na região contralateral ao defeito ósseo, e também alterações no osso cortical (Figura 10), além de neoformação óssea no interior do canal medular (Figura 10C). O osso cortical sofreu lise óssea em diversos pontos, e em algumas regiões se mostra bastante frágil, com adelgaçamento consistente e muitas falhas, chegando a se mostrar fragmentado em alguns trechos.

Reação periosteal também foi observada nos grupos tratados. Tanto a lise óssea, como a reação periosteal são características radiográficas observadas em quadros de osteomielite aguda e crônica (THRALL et al., 2013; WITTMACCK et al., 2015; WU et al., 2019). Em boa parte do osso, é possível observar a cortical extremamente fragmentada e ao mesmo tempo, espessada (Figura 11C). Na figura 10C (controle) e também na figura 11, em A e C é possível também notar esclerose

óssea no interior do canal medular. Este tipo de observação é descrito por Pineda; Espinosa; Pena (2009), como comumente visto em quadros de osteomielite crônica em imagens de μ CT.

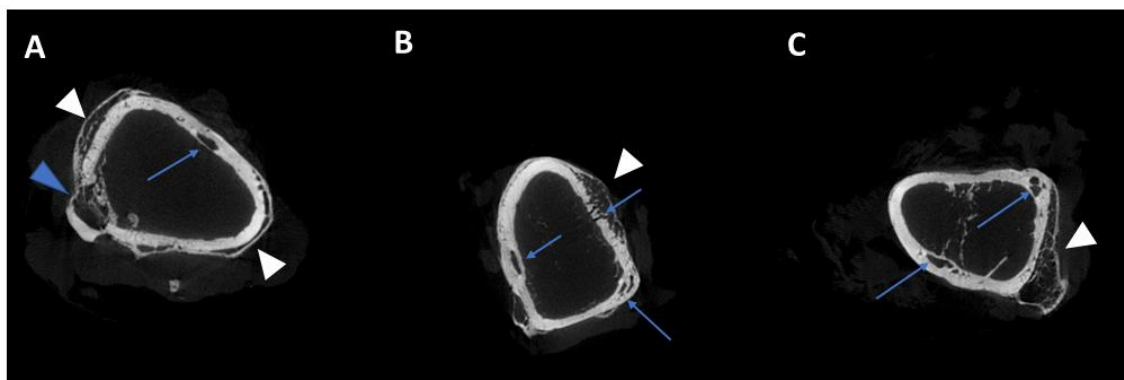


Figura 10: Imagens obtidas ao microtomógrafo. Co2 (A); Co3 (B) e Co5 (C). As cabeças de seta branca evidenciam regiões com reação periosteal; a cabeça de seta azul mostra o defeito ósseo; as setas azuis mostram regiões de fragmentação do osso cortical

Nos grupos tratados, a ocorrência de alterações ósseas foi variável dentro de cada grupo. Em 50% dos animais tratados, a ocorrência de reação periosteal foi mais localizada, próxima à região do defeito ósseo, o mesmo se observando com as alterações no osso cortical (Figura 11). Porém, os demais, mostraram alterações ósseas severas, com reação periosteal exuberante e osso cortical bastante fragilizado, como se pode observar na figura 12. Assim como no grupo controle, em alguns animais, foi observada a cortical totalmente fragmentada, com muita reação endosteal e neoformação óssea no interior do canal medular (Figura 12 A e C).

Nos cortes em que o biomaterial pôde ser identificado, ele se mostrou nas imagens como um material de aparência granular e visualmente semelhante ao osso, preenchendo a falha óssea. Porém, pelo fato de serem em pó, eles se espalharam pelo interior do canal medular e em vários cortes, o biomaterial está espalhado ao longo da face externa do osso, se confundindo com a reação periosteal ou com próprio osso em formação, não sendo possível diferenciá-los (Figuras 11 e 12).

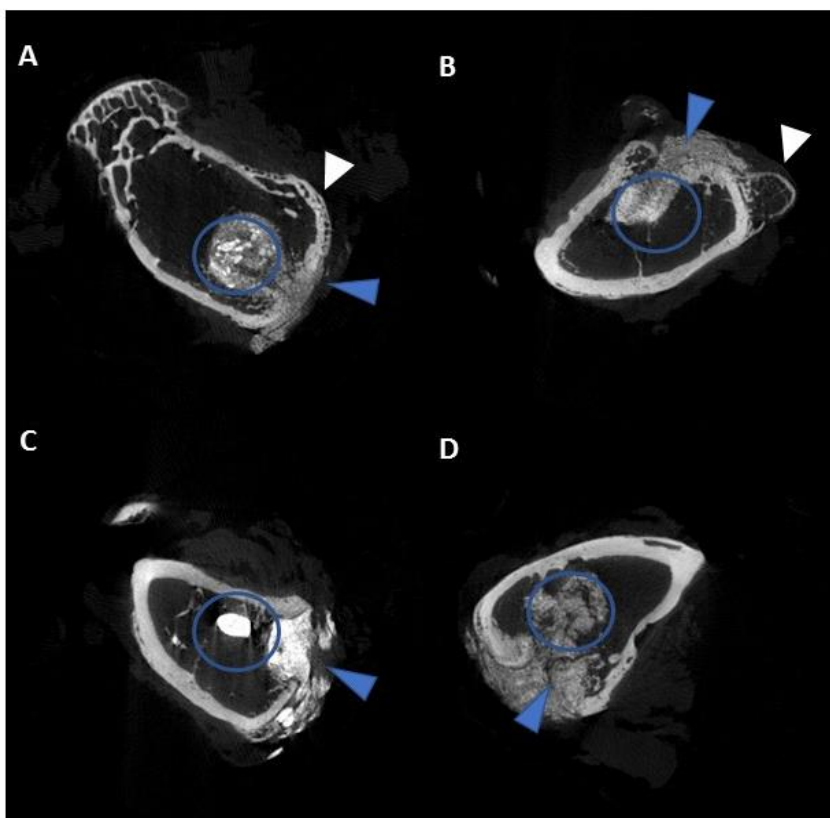


Figura 11: Imagens obtidas ao microtomógrafo. G1C (A); G2B (B); G3A (C) e G4F (D). As cabeças de seta branca evidenciam regiões com reação periosteal; a cabeça de seta azul mostra a região do defeito ósseo; o círculo evidencia o biomaterial.

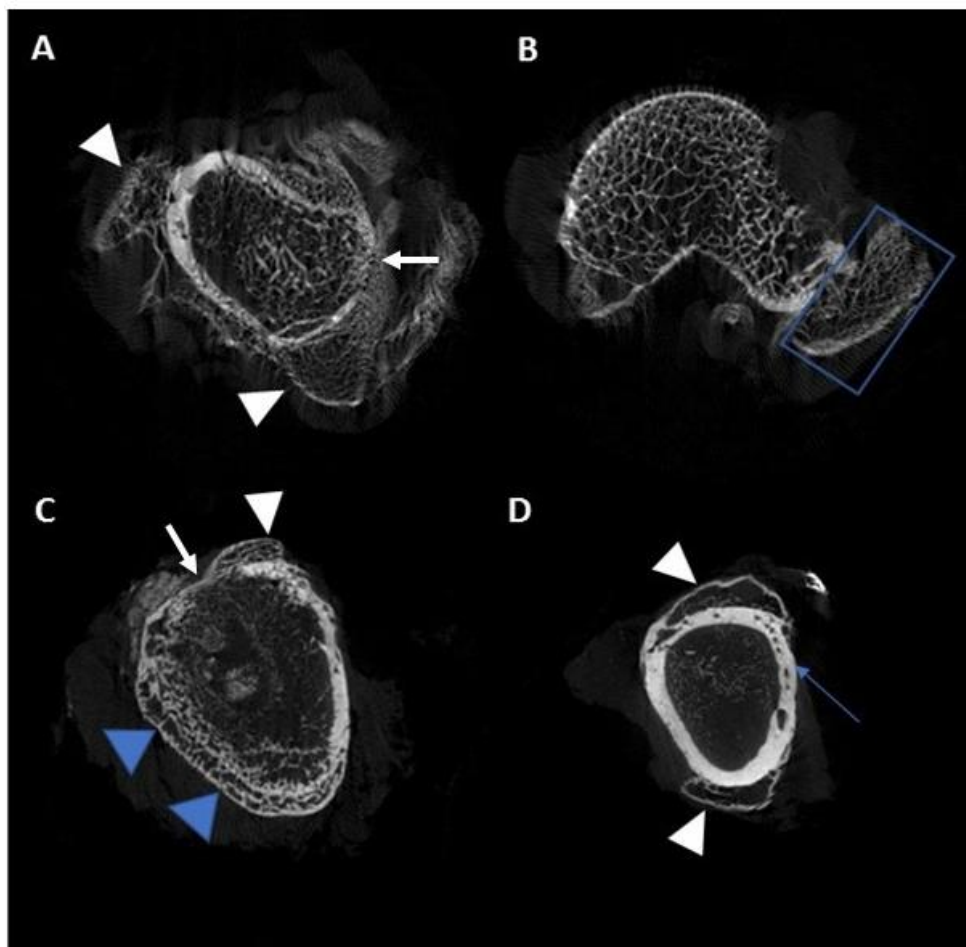


Figura 12: Imagens obtidas ao microtomógrafo. G1E (A) e (B); G2C (C) e G3E (D). As cabeças de seta branca evidenciam regiões com reação periosteal; a cabeça de seta azul mostra uma região de cortical com lise óssea severa e reação periosteal; a seta azul mostra áreas de falha óssea na cortical; o retângulo evidencia um fragmento ósseo proveniente da epífise; as setas brancas mostram o defeito ósseo.

A análise estatística não mostrou diferença significativa entre o grupo controle e os grupos tratados em relação aos parâmetros BS, BV, Po.N, Po.V e PO para osso cortical e BV para reação periosteal. Foi observada uma variação muito grande, com um grande desvio padrão dentro de cada grupo individualmente, em cada um dos parâmetros, o que explica a ausência de diferenças significativas entre os grupos (Tabelas 3 e 4 e Figura 13). A figura 13 exemplifica a grande variação de resultados dentro dos grupos no quesito Po.V.

Tabela 3: Valores das medianas e desvio-padrão da superfície óssea (BS), volume ósseo (BV) e reação periosteal (RP)

GRUPOS	BS mm²	BV mm³	RP mm³
<i>Controle</i>	1074,08±171,06	289,14±15,14	20,82±11,45
<i>G1</i>	913,84±129,1	284,18±22,49	34,36±58,96
<i>G2</i>	968,7±596,72	282,64±15,35	39,03±20,81
<i>G3</i>	908,63±231,04	277,63±38,93	12,29±24,76
<i>G4</i>	948,61±207,13	282,94±19,23	18,24±14,7

G1: HCoy1; G2: JCoy; G3: Coy; G4: HCo

Tabela 4: Valores das medianas e desvio-padrão do número de poros fechados (Po.N), volume total de poros (Po.V) e porosidade total (PO)

GRUPOS	Po.N	Po.V mm³	PO (tot) %
<i>Controle</i>	98±81,48	534,12±69,73	66,06±2,51
<i>G1</i>	139±104,12	466,58±136,77	61,58±9,51
<i>G2</i>	152±196,42	363,06±157,44	56,83±8,52
<i>G3</i>	129±72,07	538,95±84,91	66,88±5,47
<i>G4</i>	153,5±49,67	533±116,01	65,53±5,87

G1: HCoy1; G2: JCoy; G3: Coy; G4: HCo

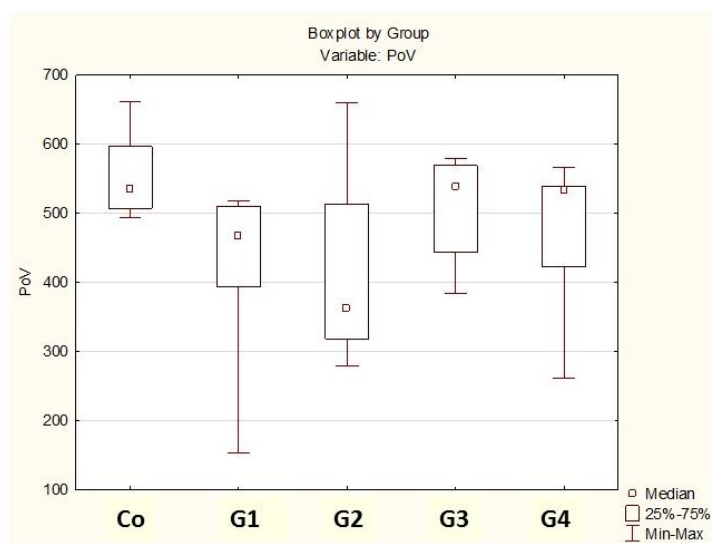


Figura 13: Boxplot mostrando a variação dos valores de Po.V nos grupos. Co: grupo controle, G1: HCo γ 1; G2: JCo γ ; G3: Co γ ; G4: HCo

O volume ósseo (BV) retrata diretamente a quantidade de osso cortical presente na amostra, portanto, animais com valor de BV maior, possuem maior volume ósseo. O fato de determinado animal ter um valor de BV alto, não indica necessariamente que o osso analisado esteja em melhores condições do que outro com BV mais baixo. Isso decorre do fato de que na osteomielite crônica também pode ocorrer deposição óssea em um mecanismo compensatório (BIRT et al., 2017). Já o parâmetro BS (superfície óssea), tem uma relação inversa, já que um material poroso possui maior área de superfície do que um material compacto (GOPI et al., 2012; PARENT et al., 2016). Assim, se observou que os animais com maior grau de destruição óssea possuíam valores maiores de BS. Portanto, os valores de BS são mais significativos para se avaliar o grau de destruição óssea. Apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos, pode-se notar que o valor de BS é mais alto no grupo controle, sendo que este grupo mostrou o segundo menor desvio padrão, sendo, portanto, mais homogêneo que os grupos 1, 2, 3 e 4. Com relação à porosidade, o volume total de poros e percentual de porosidade neste grupo também foi elevado, e novamente com valores mais homogêneos que os demais grupos.

A reação periosteal (RP) foi observada em algum grau em todas as amostras analisadas (Tabela 3). Mesmo nos animais em que ela não foi observada à imagem radiográfica, à μ CT foi possível delimitá-la e quantificá-la. A reação periosteal é uma alteração comum em quadros de osteomielite crônica e corresponde à uma tentativa

do osso de compensar o volume ósseo perdido ou mesmo restaurar regiões de descontinuidade óssea (BIRT et al., 2017; LEW; WALDVOGEL, 2004; SLATTER, 2007). Somente a presença do defeito ósseo não explica a existência de reação periosteal além dos limites do mesmo, já que o defeito foi produzido com auxílio de uma broca trefina, sem produzir lesão extensa ou fratura. Em trabalhos de nossa equipe em que também se usou a broca trefina para produção do defeito ósseo, não se observou reação periosteal nos animais ao exame radiográfico (CARLO et al., 2009b; VITAL et al., 2008). Portanto, a reação periosteal observada neste trabalho foi atribuída à osteomielite.

Como descrito no capítulo 3 desta tese, a porosidade do osso cortical está diretamente relacionada à resistência do osso (BOUSSON et al., 2000; JORGENSON et al., 2015; SCHAFFLER; BURR, 1988). A diminuição na resistência óssea cortical é principalmente uma consequência do aumento da porosidade, mais do que das mudanças na mineralização ou nas propriedades mecânicas da matriz óssea (BECKER et al., 2018; RAJAPAKSE et al., 2015). Dentre todos os animais do presente estudo, nenhum apresentou porosidade total inferior à 39%, sendo que um dos animais mostrou uma taxa de porosidade total de 70% (tabela 4). O volume dos poros $Po.V$ (Figura 16) mostra um dado interessante, que é a importância do tamanho dos poros no percentual de porosidade do osso. Neste trabalho, foi possível observar que um osso que possui um grande número de poros fechados ($Po.N$), pode ter um percentual de porosidade menor que um osso com menos poros, porém maior $Po.V$, mostrando que a quantidade de poros abertos e o tamanho desses poros influencia mais a porosidade total de um osso, do que a porosidade fechada.

Um aumento na porosidade cortical é uma manifestação física da perda óssea que surge como resultado de um desequilíbrio na remodelação cortical com a reabsorção óssea superando a formação (HARRISON et al., 2020). Portanto, os valores observados neste trabalho refletem uma arquitetura óssea fragilizada pelo processo infeccioso.

4.4 Histomorfometria

À histomorfometria foram analisados os parâmetros osso, biomaterial, tecido conjuntivo e medula, obtendo-se as quantidades aproximadas de cada um deles e assim permitindo saber qual a proporção de cada parâmetro. Os parâmetros tecido

conjuntivo e medula se relacionam ao parâmetro osso, já que a quantidade destes é proporcionalmente menor nos animais com maior quantidade de tecido ósseo. Além disso, a quantidade de espaços preenchido por medula, ao invés de tecido conjuntivo em uma lâmina mostra um processo de formação óssea mais avançado do que uma lâmina com maior quantidade de tecido conjuntivo. A histomorfometria também permitiu quantificar a presença dos biomateriais, o que não é possível de ser feito na μ CT e na radiologia. Exceto com relação ao parâmetro biomaterial, que não está presente no grupo controle, não houve diferença significativa entre os grupos nos parâmetros analisados ($p < 0,05$). Porém, dentro dos grupos, em especial o grupo 4 que corresponde ao tratamento HCo, pôde-se notar grandes diferenças de valores entre os animais, observando-se uma maior variância, com desvios padrões significativos, nas quantidades de osso e tecido conjuntivo (Tabela 5 e Figura 14 A e B).

Os resultados mostram que em relação ao grupo controle, não houve maior formação óssea nos grupos tratados, o que também foi observado através da μ CT. Dentro do Grupo Controle e no Grupo 1 as quantidades de osso foram mais homogêneas nas lâminas analisadas, com desvio padrão menor do que os dos demais grupos. Com relação à quantidade de tecido conjuntivo presente, também não foi observada diferença significativa entre o grupo controle e os tratados, indicando estágios parecidos de remodelação óssea (Tabela 5 e Figura 14).

Tabela 5: Valores das medianas (%) e desvio-padrão dos parâmetros observados em cada um dos grupos aos 42 dias após a implantação dos compósitos.

GRUPOS	OSSO	BIOMATERIAL	TEC.CONJ.	MEDULA
Controle	38,2 ± 4,0	0	23,7 ± 15,1	35,8 ± 15,8
G1	48,4 ± 7,3	12,6 ± 10,9	12,3 ± 14	22,0 ± 16,8
G2	36,1 ± 10,6	36,1 ± 15,2	10,8 ± 9,3	24,2 ± 21,3
G3	34,5 ± 12,8	23,8 ± 13,9	0,6 ± 17,7	33,4 ± 14
G4	35,5 ± 12,6	35,5 ± 12,6	0,13 ± 30,5	30,3 ± 23,6

G1 (HCoy1); G2 (JCoy); G3 (Coy); G4 (HCo)

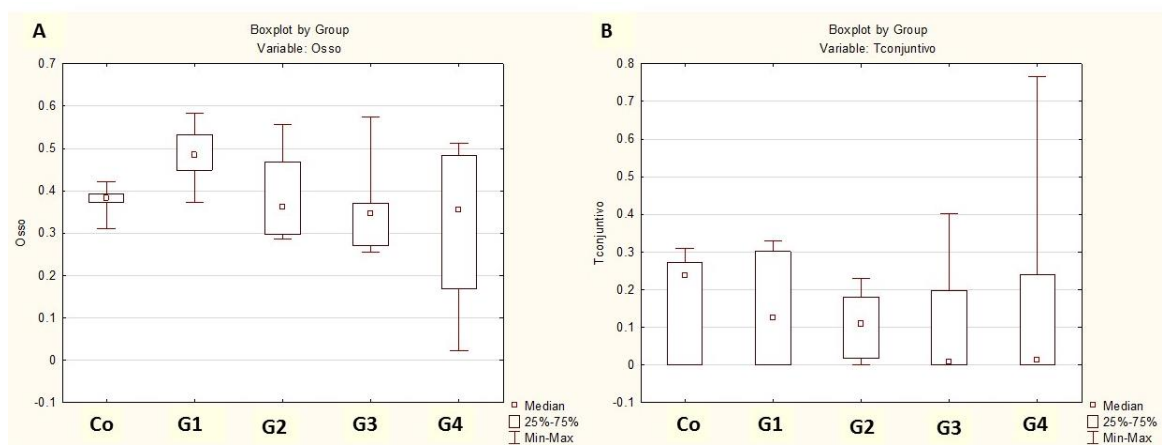


Figura 14: Boxplot mostrando os resultados estatísticos pelo teste de Kruskal-wallis do variável osso (A) e tecido conjuntivo (B). Co: Grupo controle; G1: Grupo 1 (HCo γ 1); G2: Grupo 2 (JCo γ); G3: Grupo 3 (Co γ); G4: Grupo 4 (HCo).

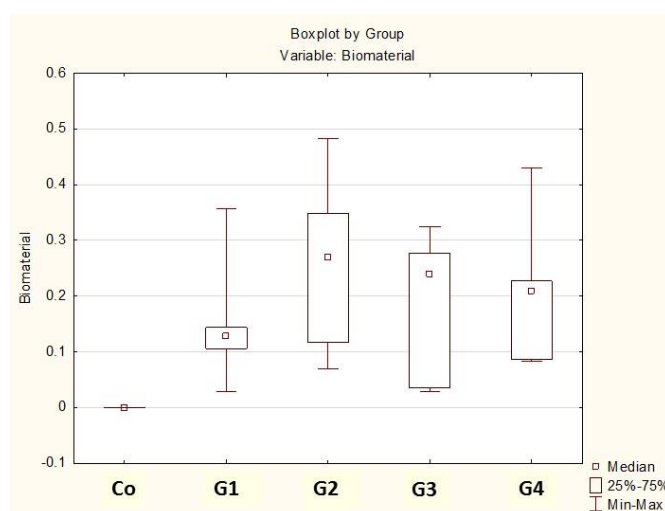


Figura 15: Boxplot mostrando os resultados estatísticos pelo teste de Kruskal-wallis da quantidade de biomaterial presente em cada tratamento. Co: Grupo controle; G1: Grupo 1 (HCo γ 1); G2: Grupo 2 (JCo γ); G3: Grupo 3 (Co γ); G4: Grupo 4 (HCo).

Com relação à quantidade de biomaterial presente em cada grupo, não houve diferença significativa entre os diferentes tipos utilizados. Como mostrado na figura 15, a composição de cada biomaterial não levou a diferenças significativas em sua absorção no local de implantação.

Em casos de osso íntegro, já é extensivamente comprovado que a HAp, tanto usada pura, como em associação à outra substância, favorece a formação de osso, levando à uma regeneração óssea precoce, com tecido ósseo mais organizado, nos animais tratados (BORGES et al., 2000; CARLO et al., 2009b; VITAL et al., 2006). Estudos mostram que existe diferença significativa de formação óssea em animais

tratados com HAp principalmente nos primeiros dias após sua implantação em um defeito ósseo, sendo que com o passar do tempo, se observa uma menor diferença entre animais tratados e controles (VALENTE et al., 2016; VITAL et al., 2008). Isto decorre do fato da capacidade osteocondutora da HAp, que leva à uma formação óssea precoce por servir de arcabouço para a neoformação óssea (KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003; REIS et al., 2010; VALENTE et al., 2016).

Não houve diferença relevante entre a formação óssea nos grupos 1, 2 e 4 (que receberam biomateriais com HAp em sua constituição) e entre os demais tratamentos (G3 e Controle), o que nos leva a inferir que a HAp não foi um diferencial em favor do crescimento ósseo. Este resultado difere do descrito por (CARLO et al., 2009b). Neste estudo, se comparou a formação óssea em animais que receberam compósitos constituídos de HAp e poli-hidroxibutirato em diferentes proporções, e se observou uma maior formação óssea no grupo que recebeu o compósito contendo maior quantidade de HAp. Entretanto, Carlo et al. (2009) não compararam a formação óssea dos grupos tratados com o grupo controle, pelo fato de que neste estudo, assim como no presente trabalho, não foi utilizado defeito crítico. Optou-se por fazer a comparação entre os grupos tratados e o grupo controle, pelo fato de que nesse trabalho, as falhas ósseas eram infectadas e os biomateriais utilizados possuíam antibiótico em sua composição (grupo 1, 2 e 3), além da CoFe_2O_4 , à qual se tem associado um papel bactericida, como descrito anteriormente e demonstrado no capítulo 2 desta tese.

A presença do antibiótico ciprofloxacina em três dos biomateriais testados não pareceu influenciar a relação osso/tecido conjuntivo nos animais tratados. Esperava-se que a presença do medicamento levaria à cura do quadro infeccioso com consequente processo de reparação óssea mais precoce se comparado aos outros dois grupos (Controle e HCo). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Koort et al. (2005), que usou implantes de poli (DL)-lactídeo racêmico PDLLA bioabsorvível com microesferas de biovidro impregnados com ciprofloxacina para tratar osteomielite induzida em coelhos. Neste estudo, os autores também não observaram diferença na formação óssea entre os grupos tratados e o grupo controle.

Para a cura de um quadro de osteomielite crônica, é necessária uma terapia antimicrobiana por um longo período de tempo (KUMAR, GOVINDAN & GIRIJA et al. 2014; SCHLICKEWEI, YARAR & RUEGER, 2014; VENKATASUBBU et al. 2011). Como descrito na revisão de literatura, para um biomaterial ser usado no tratamento da osteomielite, ele deve proporcionar a liberação de uma grande quantidade de

medicamento inicialmente, seguida por um longo período de liberação lenta (WINKLER, 2017; MASTERS et al., 2019). Nos estudos de caracterização dos biomateriais, foi observado a eficácia de todos em inibir o crescimento bacteriano, entretanto, não podemos afirmar quanto tempo o antibiótico foi liberado após a implantação dos biomateriais no tecido ósseo. Entretanto, de acordo com o fabricante dos biomateriais utilizados neste trabalho, nos testes de liberação *in vitro* do antibiótico observou-se que o mesmo foi completamente liberado das amostras no período máximo de 36 horas (ARAÚJO, 2017). Pelos resultados observados em nosso trabalho, é provável que a liberação *in vivo* também tenha sido rápida, impossibilitando, portanto, a cura da osteomielite. Da forma em que foram sintetizados, os biomateriais não são eficazes para tratar e curar a osteomielite crônica, já que a cura dos casos crônicos pressupõe o uso de antibióticos por um longo período de tempo (MASTERS et al., 2019; SCHLICKWEI; YARAR; RUEGER, 2014; WINKLER, 2017). O processo de fabricação dos mesmos deveria ser alterado de tal maneira que permita a liberação rápida inicialmente, seguida por um período de liberação mais lenta do antibiótico.

Com relação ao papel da CoFe_2O_4 no processo de regeneração óssea, foi reportado por Pareta; Taylor; Webster (2008) e Žalnėravičius et al. (2016) que as nanopartículas de óxido de ferro (Fe_2O_3) teriam um papel terapêutico em infecções ósseas por estimularem o crescimento ósseo e por inibirem a infecção bacteriana. O papel antimicrobiano das NPMs de CoFe_2O_4 , já foi bem estabelecido em vários trabalhos (ANNAPOORANI; MAHALAKSHM; SANKARI, 2018; RAMANAVIČIUS et al., 2018; ŽALNĖRAVIČIUS et al., 2016, 2017) e também pôde ser observado no presente estudo no teste de liberação do antibiótico em ágar. Como foi discutido no capítulo 2 desta tese, o biomaterial constituído de HAp e CoFe_2O_4 , sem ciprofloxacina em sua composição, inibiu o crescimento do *S. aureus* no ágar, o que é indicativo de que este biomaterial seria eficaz para combater a infecção óssea induzida neste trabalho. Porém, os resultados obtidos não somente na histomorfometria, mas nos demais testes sugerem o contrário.

O pH tecidual é um fator importante na formação óssea. É sabido que a acidose metabólica causa inibição dos osteoblastos ao mesmo tempo em que estimula os osteoclastos (ARNETT, 2003; BRANDAO-BURCH et al., 2005; KRIEGER; BUSHINSKY; FRICK, 2003). O quadro infeccioso causa uma acidificação dos tecidos, podendo comprometer a regeneração óssea. Brandao-Burch et al. (2005)

relacionaram o aumento da atividade dos osteoclastos e diminuição da atividade dos osteoblastos à redução de pH, seja ela resultante de acidose metabólica, respiratória, ou algum outro fator que cause acidose localmente, como isquemia e hipóxia causadas por diabetes, inflamação e infecções. Portanto, é possível que a acidificação do local de implantação causado pela infecção local possa ter prejudicado o processo de reparação óssea mesmo na presença de HAp, já que seu papel osteocondutor depende da capacidade dos osteoblastos em sintetizar matriz óssea e do correto balanço entre a atividade de osteoblastos e osteoclastos.

Segundo Chen et al. (2016), a liberação contínua de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 α/β , IL-6) leva à um aumento na atividade osteoclástica. As imagens da μ CT mostram perda óssea mais expressiva em alguns dos animais tratados, com adelgaçamento e fragmentação do osso cortical mais evidentes do que nos animais do grupo controle, e como mostrado nos resultados da histomorfometria, levando à uma grande variação na quantidade de osso dentro dos grupos. Portanto, a presença de infecção é um fator importante no comprometimento da formação de osso, inclusive mascarando o papel osteocondutor da HAp, que não pôde ser demonstrado neste trabalho.

Todos os quatro biomateriais usados neste estudo, foram submetidos ao teste de biocompatibilidade *in vivo* (capítulo 2) e segundo os resultados obtidos, todos eles são biodegradáveis. Nas observações de 70 e 100 dias do referido teste, foi constatada a presença de hemossiderina, um indicativo de que o ferro presente nos biomateriais estava sendo degradado. Entretanto, neste trabalho, não foi observada a presença de hemossiderina em nenhuma das lâminas histológicas. Este fato não significa que os biomateriais não estejam sendo degradados, mas que após 42 dias não se nota sinais que indiquem sua degradação, não permitindo nem mesmo estimar a quantidade de ferro liberada nos tecidos e, portanto, se sua presença poderia representar algum diferencial, positivo ou negativo, na formação óssea.

Além disso, não se sabe se este ferro é biodisponível, já que as nanopartículas de CoFe₂O₄ foram revestidas com sílica. O revestimento, impede a agregação das NPs, aumenta sua biocompatibilidade e estabilidade, diminui sua toxicidade (ABUDAYYAK; ALTINCEKIC GURKAYNAK; ÖZHAN, 2017; AMIRI; SHOKROLLAHI, 2013; DI GUGLIELMO et al., 2010) e provavelmente diminui ou mesmo as protege de sofrerem degradação quando implantadas no organismo, o que faria com que este ferro não seja metabolizado.

No estudo de Ignjatovic et al. (2015) no qual se utilizou compósitos de HAp associado ao cobalto em diferentes proporções (5 e 12%) e HAp pura em falha óssea de osso osteoporótico, a formação óssea foi maior nos animais que receberam o compósito com maior concentração de Co. Os autores relacionaram essa diferença ao efeito estimulatório do cobalto sobre a neovascularização e angiogênese. Apesar da existência de cobalto nos biomateriais utilizados neste trabalho, ele está associado ao ferro. Neste caso, não se sabe se esse cobalto seria liberado durante a degradação do biomaterial e se teria algum efeito sobre o metabolismo ósseo.

4.5 Histologia

Os biomateriais foram facilmente identificados durante toda análise histológica, como um material amorfo, de aspecto granular, acelular e bem definido. A CoFe_2O_4 foi visualizada em tons enegrecidos ou acinzentados sem afinidade pelo corante utilizado (HE). Já a HAp exibiu uma coloração arroxeada, já que esta possui maior afinidade pela hematoxilina, fato observado por Vital et al. (2006) e Sepúlveda et al. (2013). Em todos os tratamentos, o biomaterial interagiu em algum grau com o tecido circundante (Figuras 16, 17 e 18).

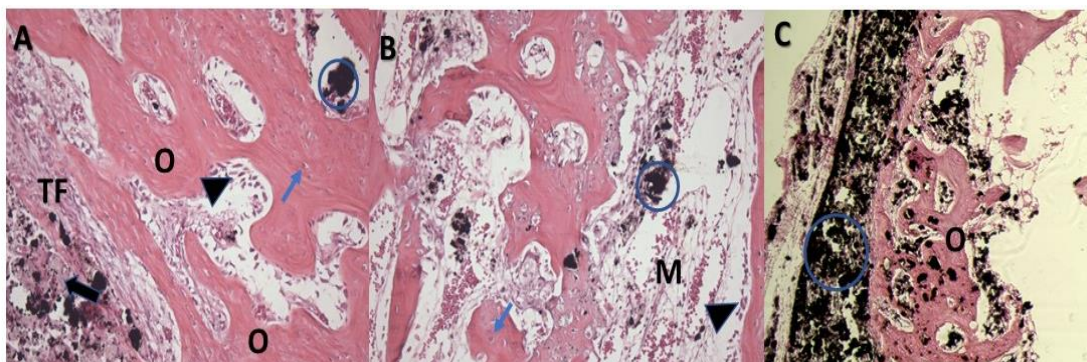


Figura 16: Fotomicrografias de animais tratados evidenciando a interação dos tecidos com os biomateriais. (A) G1F: $\text{HCo}\gamma$; (B) G2F: $\text{JCo}\gamma$; (C) G3C: $\text{Co}\gamma$. O: osso novo; M: medula óssea; TF: tecido fibroso; a cabeça de seta evidencia osteoblastos, a seta azul mostra osteócitos encerrados em lacuna, a seta preta mostra HAp e o círculo evidencia acúmulos do biomaterial. Aumento de 10X.

A maioria dos animais dos grupos tratados apresentaram um infiltrado inflamatório monocítico, em intensidade variadas (Tabela 6) e com localização focal. Somente três animais apresentaram infiltrado inflamatório multifocal. Nas lâminas de

um dos animais foi possível observar a presença de neutrófilos, mas mesmo nessas lâminas, o predomínio foi de infiltrado monocítico, característico de um processo crônico de inflamação.

Tabela 6: Percentual de infiltrado inflamatório observado em cada um dos grupos tratados com os compósitos: G1 (HCO γ 1); G2 (JCO γ); G3 (CO γ); G4 (HCO)

GRUPOS	INFILTRADO INFLAMATÓRIO			
	DISCRETO/AUSENTE	DISCRETO	MODERADO	INTENSO
G1*	-	33,3%	33,3%	16,7%
G2	-	60%	40%	
G3	80%	20%	-	-
G4	-	83,3%	16,7%	-

G1: HCO γ ; G2: JCO γ ; G3: CO γ ; G4: HCo. *Não foi observado infiltrado inflamatório em um dos animais do G1

Os exames de imagem (radiografia e μ CT) das amostras revelaram alterações ósseas compatíveis com um quadro de osteomielite, portanto, se esperava que o infiltrado inflamatório observado nas lâminas histológicas também estivesse relacionado à infecção óssea. Porém, nas lâminas dos animais do Grupo Controle não se observou a presença de infiltrado inflamatório. Essa ausência não significa que os animais não possuíam o quadro de infecção óssea, já que como descrito acima, os exames de imagem mostraram alterações expressivas relacionadas à infecção (Figuras 6A e 10). A ausência do infiltrado inflamatório nesse grupo, foi então, atribuída, entre outros fatores, às limitações da técnica histológica empregada (processamento e posição de corte do material). Essa limitação de técnica também pode ter influenciado a qualidade de algumas lâminas de animais dos grupos tratados. O animal G1E, por exemplo, que mostrou graves alterações ósseas relacionadas à osteomielite nos exames de imagem (Figura 12 A e B), mostrou ausência de infiltrado inflamatório à histologia. O mesmo ocorreu com outros quatro animais de grupos que receberam tratamento. Nos exames de imagem de todos esses animais se observaram alterações ósseas expressivas, mas suas lâminas histológicas mostraram infiltrado inflamatório discreto à ausente. O contrário também foi observado, ou seja, animais com poucas alterações nos exames de imagem, porém com infiltrado

inflamatório multifocal moderado e presença de células gigantes multinucleadas (MNGCs).

A presença do infiltrado inflamatório pode ser devido à presença do biomaterial, como também pelo quadro de osteomielite, que como comprovado pela μ CT, ainda estava presente ao final do experimento (T2). Segundo Anderson, Rodriguez & Chang (2008), a resposta inicial à implantação de um biomaterial é a observação de um infiltrado inflamatório agudo neutrofílico, presente por até uma semana. Outras células implicadas na reação inflamatória induzida por biomateriais implantados são linfócitos, monócitos e macrófagos, que são recrutados em seguida aos neutrófilos (HACHIM et al., 2017; ROSTAM et al., 2016). Na fase inflamatória crônica, o infiltrado inflamatório é composto principalmente por células da linhagem monocítica, tendo duração variável (BANK et al., 2017; LEE et al., 2018; RAMOT et al., 2016). Portanto, a presença de infiltrado inflamatório nas lâminas deste trabalho, seria esperado, mas por outro lado, está em desacordo com os resultados observados em estudos anteriores de nossa equipe (BORGES et al., 2000; VALENTE et al., 2016; VITAL et al., 2008).

Nestes estudos, nos quais se implantou HAp associada a outras substâncias, não se observou a existência de infiltrado inflamatório mesmo poucos dias após sua implantação no tecido ósseo. Citando outro estudo, Almeida et al. (2015) observaram uma discreta reação inflamatória distribuída de forma difusa aos 15 dias após a implantação de HAp em defeito crítico na calvaria de ratos. Além disso, segundo Anderson, Rodriguez & Chang (2008), a observação de infiltrado inflamatório crônico não se estende por um período longo, normalmente diminuindo após duas semanas se o biomaterial for biocompatível. Portanto, a reação inflamatória observada neste estudo (aos 42 dias após a implantação do biomaterial), pode também estar relacionada ao quadro infeccioso.

Na osteomielite crônica também é comum a presença de infiltrado inflamatório monocítico, com predomínio de plasmócitos, linfócitos e macrófagos. Este tipo de infiltrado inflamatório está presente tanto nos tecidos moles, quanto nos espaços medulares (STUPINA et al., 2019; SYBENGA et al., 2020; TIEMANN et al., 2014). Assim, o infiltrado inflamatório relacionado à presença de um biomaterial pode se confundir com o infiltrado presente em quadros de infecção óssea crônica. Como as duas situações estão presentes neste trabalho, não se pode afirmar com certeza sua

origem, apesar do fato de tal infiltrado não ter sido observado no Grupo Controle nos levar a acreditar que ele tenha relação com a ocorrência de FBR. Entretanto, segundo Anderson, Rodriguez & Chang (2008), a inflamação crônica devida à implantação de um biomaterial biocompatível, não dura mais do que duas semanas. A permanência do processo inflamatório por um período maior do que três semanas, seria um indicativo de infecção.

Outro ponto a se considerar, é que aos 15 dias após a indução do defeito ósseo e inoculação bacteriana, ao se manipular o local operado foi possível observar que todos os animais apresentaram reação inflamatória bastante evidente no local da cirurgia. Neste momento, os animais foram submetidos à lavagem e desbridamento dos locais afetados, o que pode ter diminuído consideravelmente o infiltrado inflamatório. Além do mais, segundo Gaudin et al. (2011), modelos de osteomielite crônica podem permitir recuperação espontânea do quadro infeccioso. Este fato somado ao tratamento de lavagem e desbridamento dos tecidos fibróticos e desvitalizados pode ter levado à uma resolução do quadro infeccioso em alguns dos animais.

Outro aspecto descrito na literatura é a ocorrência de um quadro conhecido como osteomielite crônica inativa. Citado por Tiemann et al. (2014) e Sybenga et al. (2020), é caracterizado pela diminuição do infiltrado inflamatório e pela absorção dos fragmentos de osso necrótico, além de sinais marcantes de osteogênese reparadora. Ademais, as observações histológicas realizadas neste trabalho se limitaram à data de 57 dias após a inoculação bacteriana. Neste período de tempo, o quadro observado equivale à osteomielite crônica, que se caracteriza em parte, pela presença de tecido ósseo reativo, com deposição de osso novo e superfície óssea rodeada por osteoblastos. Também podem estar presentes, fibrose de medula, com tecido de granulação e fibrose tecidual em graus variados juntamente com tecido de granulação também nos tecidos moles, além de infiltrado inflamatório monocítico, que pode estar presente em pequena quantidade (SAMIEE-RAD et al., 2017; STUPINA et al., 2019; SYBENGA et al., 2020; TIEMANN et al., 2014).

Stupina et al (2019) se refere ao quadro de osteomielite crônica “quiescente”, no qual há presença de escassos focos osteonecroticos e lacunas vazias de osteócitos com ausência de camada de osteoblastos nas superfícies das trabéculas ósseas. Além dessas características, nos quadros crônicos, podem ser observados fragmentos de osso desvitalizados (sequestro ósseo) rodeados por tecido fibrótico

contendo ou não infiltrado inflamatório (involocrum) (SAMIEE-RAD et al., 2017; SYBENGA et al., 2020; TIEMANN et al., 2014). Essas características aqui citadas, foram observadas nas lâminas tanto de animais do grupo controle, quanto de animais dos grupos tratados (Figuras. 17 A, B e C e 18 B). Por ter tantas características distintas, o diagnóstico histopatológico de osteomielite está longe de ser simples e consensual, exigindo experiência na área, além da confirmação por algum outro método de diagnóstico (SYBENGA et al., 2020; TIEMANN et al., 2014).

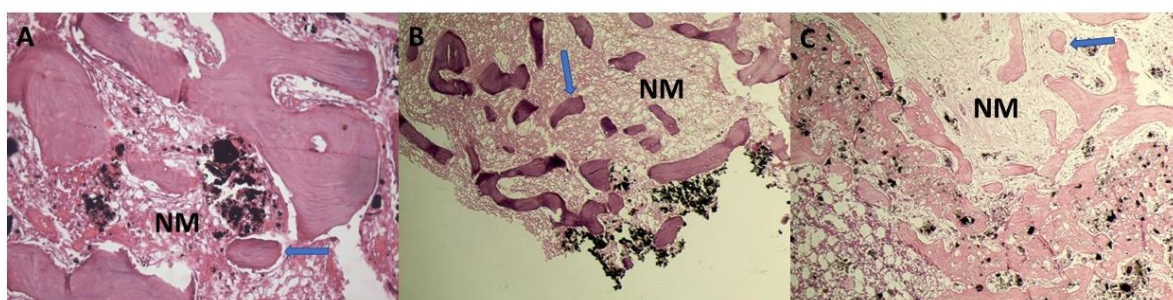


Figura 17: fotomicrografias dos animais (A) G1E; (B) G3E e (C) G4F mostrando alterações significativas do tecido ósseo com perda do padrão trabecular, e da medula. NM: necrose de medula; seta: fragmento ósseo desvitalizado (sequestro). O material negro corresponde aos biomateriais. Aumentos de 10X.

As características gerais de um quadro de osteomielite crônica, como remodelação óssea com absorção e deposição de osso novo, fibrose de medula e de tecidos adjacentes, também estão presentes em várias outras afecções ósseas e também em casos de fratura. No presente trabalho, o osso foi submetido à uma injúria. O defeito ósseo produzido não é uma fratura, mas leva à uma reação do tecido ósseo para reparar a região. E no processo de reparação, ocorre naturalmente a deposição de tecido fibroso, que é gradativamente substituído por tecido ósseo (CARLO et al., 2009b; MONDAL et al., 2016; RIBEIRO et al., 2014).

Portanto não é possível afirmar que a fibrose nos tecidos adjacentes, observada em todas as amostras analisadas seja devida à osteomielite. Entretanto, em lâminas de animais do Grupo Controle e tratados (Figura 17), foi observada uma fibrose de medula bastante expressiva, não condizente com as reações desencadeadas pela presença do biomaterial, nem tão pouco, pelo defeito ósseo. Também foi possível observar alterações ósseas esperadas em um quadro de osteomielite crônica, como a presença de fragmentos ósseos desvitalizados, perda do padrão trabecular e áreas sugestivas de reabsorção óssea, além de osso novo sendo

formado (Figura 17 e 18). A fibrose medular é uma característica importante dos quadros de osteomielite crônica e de osteomielite crônica inativa, sendo descrita por diversos autores (SAMIEE-RAD et al., 2017; STUPINA et al., 2019; SYBENGA et al., 2020; TIEMANN et al., 2014).

Semelhante ao descrito por Borges et al. (2000) e Carlo et al. (2009b) em estudos utilizando implantes contendo HAp no osso de cães e coelhos, foi observada a presença de MNGC em todos os grupos tratados ao redor do biomaterial. Somente no Grupo 3 essas células estavam presentes em menor quantidade, sendo sua presença classificada como sendo de discreta à ausente nas lâminas em que foram observadas. Apesar de Borges et al. (2000) e Carlo et al. (2009b) terem se referido à essas células como sendo osteoclastos, no presente estudo não foi possível caracteriza-las. Células gigantes podem ser de diversos tipos e ocorrem dentro de situações diferentes e assumem diferentes configurações. Estas células são formadas pela fusão de monócitos/macrófagos e são comuns em granulomas inflamatórios (MIRON; BOSSHARDT, 2018; RANJAN et al., 2019).

Os osteoclastos são considerados MNGCs fenotipicamente diferenciadas, localizadas no tecido ósseo (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). Quando localizadas em torno de biomateriais implantados, essas células recebem a denominação de células gigantes de corpo estranho (FBGCs) e são consideradas uma característica marcante da FBR (BARBECK et al., 2017; YANG et al., 2014). As FBGCs formadas próximas às superfícies ósseas diferem daquelas formadas em tecidos moles, já que tecidos diferentes geram estímulos diferentes (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008). As interações do biomaterial com o sangue no local onde ele foi implantado, leva à uma cascata de eventos, com a ativação de vários tipos celulares, entre eles, monócitos que irão se diferenciar em macrófagos (CHEN et al., 2016; HACHIM et al., 2018; ROSTAM et al. 2016). Os macrófagos são capazes de engolfar partículas de até 5 μm (ANDERSON; RODRIGUEZ; CHANG, 2008; CHEN et al., 2016). Se o tamanho da partícula for maior, os macrófagos irão coalescer, sobre a influência da IL-4 e IL-13 e formar FBGCs (AHMED et al., 2016; BARBECK et al., 2017; CHEN et al., 2016). Pelo exposto, as células gigantes observadas neste trabalho, tanto podem ser osteoclastos, quanto FBGCs. Por este motivo, elas foram classificadas como MNGCs.

No grupo controle, pôde-se observar processo típico de regeneração óssea, evidenciado por trabéculas ósseas novas, com linhas cimentantes claramente

perceptíveis e regulares em sua maior parte. Também se observou osteoblastos e osteoclastos nas bordas do defeito e uma grande quantidade de osteoblastos recentemente encerrados em lacunas. Essas características também foram observadas nos grupos tratados, sendo que em alguns locais se observou deposição de tecido ósseo ao redor de partículas do biomaterial (Figura 18). Nos grupos tratados, as linhas cimentantes tinham aparência irregular em sua maior parte, provavelmente devido à presença do biomaterial, que altera o padrão de deposição de tecido ósseo.

As características da reparação óssea em todos os grupos são compatíveis com um processo de osteogênese reparativa (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2011). Entretanto, pelo fato de haver infecção óssea, essa formação óssea não está ligada somente à reparação do defeito, mas também ao processo pelo qual o tecido ósseo reage ao processo infeccioso, com deposição de osso novo (BJORKSTÉN; BOQUIST, 1980; SAMIEE-RAD et al., 2017). Foi possível observar, que algumas lâminas continham áreas de osteogênese reparativa e áreas de osso desvitalizado com fibrose (Figura 18 B e C).

Em todas as lâminas dos grupos tratados também foi possível observar a presença de osteoclastos nas bordas do defeito. Mesmo nas lâminas dos animais onde se visualizou grandes alterações ósseas na μ CT, houve deposição de osso novo no local do defeito. Somente nas lâminas de um dos animais tratados não se observou nenhum indício de deposição óssea. De acordo com as alterações histológicas e de imagem, este foi um dos animais que mostrou um dos maiores graus de destruição do tecido ósseo.

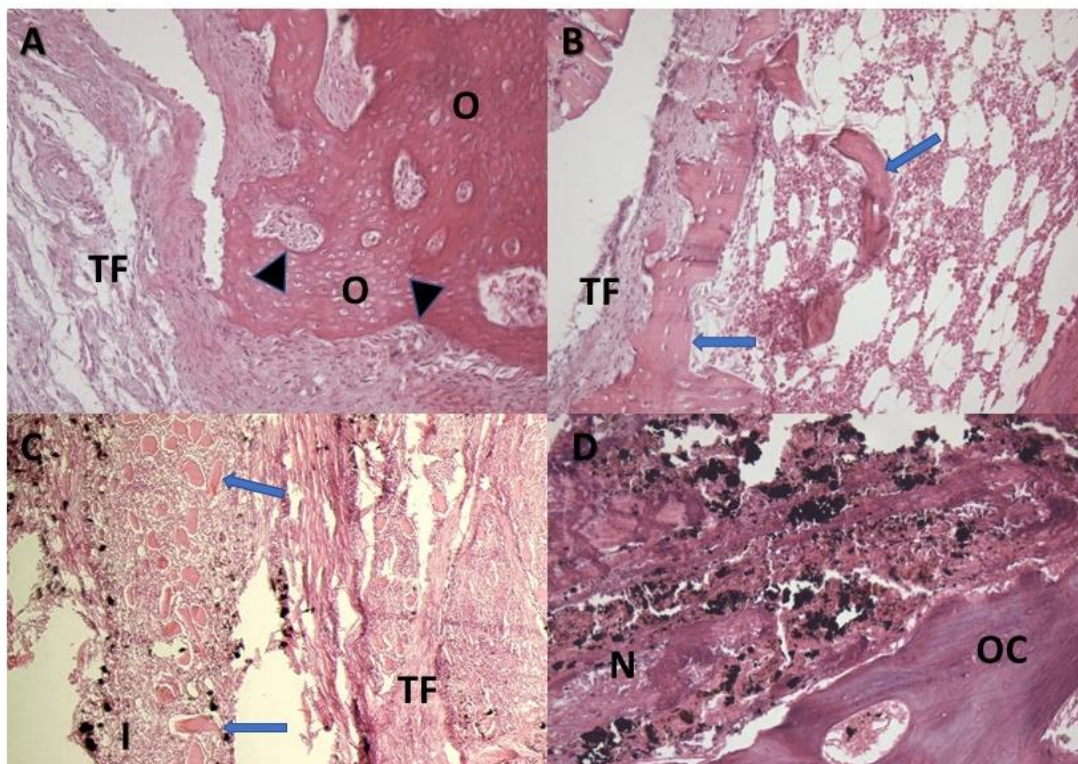


Figura 18: Fotomicrografias dos animais (A) e (B): Co6; (C): G4A; (D) G2C. Em (A) nota-se uma grande área de osteogênese reparadora, com osso novo (O) bastante celularizado; em (B) notam-se trabéculas ósseas desvitalizadas (setas azuis). A trabécula maior está sendo envolvida por tecido fibroso; em (C) notam-se vários fragmentos ósseos desvitalizados (sequestros), envoltos em infiltrado inflamatório (I); em (D) osso compacto (OC) em contato com o biomaterial (regiões de coloração preta) que está entremeado por áreas de necrose tecidual (N). As cabeças de seta evidenciam linhas cimentantes; as setas azuis mostram osso desvitalizado. TF: tecido fibroso. Aumentos de 10x.

5- CONCLUSÕES:

- A microtomografia foi essencial para se proceder ao diagnóstico de osteomielite, devido não somente ao fato de gerar imagens com maior detalhamento da estrutura óssea, mas principalmente por permitir uma análise da microestrutura do osso, ao avaliar o volume ósseo e os dados relativos à porosidade.
- Os biomateriais utilizados neste trabalho não pareceram favorecer a cura do quadro infeccioso.
- O efeito osteocondutor da HAp não foi observado neste trabalho, devido ao processo infeccioso, que ainda estava presente ao término do período experimental prejudicando o processo de neoformação óssea.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUDAYYAK, M.; ALTINCEKIC GURKAYNAK, T.; ÖZHAN, G. In Vitro Toxicological Assessment of Cobalt Ferrite Nanoparticles in Several Mammalian Cell Types. **Biological Trace Element Research**, v. 175, n. 2, p. 458–465, 2017.
- AHMED, G. J. et al. Regulation and biological significance of formation of osteoclasts and foreign body giant cells in an extraskeletal implantation model. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 49, n. 3, p. 97–107, 2016.
- ALVES, E. G. L. et al. Avaliação mecânica da placa de compósito de poli-hidroxibutirato e hidroxiapatita em modelos ósseos de gato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6, p. 1367–1374, 2010.
- AMIRI, S.; SHOKROLLAHI, H. The role of cobalt ferrite magnetic nanoparticles in medical science. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 1, p. 1–8, 2013.
- ANNAPOORANI, C. L.; MAHALAKSHM, K.; SANKARI, L. BIOCOMPATIBILITY STUDIES ON THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF UNCOATED COBALT FERRITE NANOPARTICLES Annapoorani. **International Journal of Pure and Applied Mathematics**, v. 119, n. 12, p. 15659–15665, 2018.
- ARAÚJO, P. M. A. G. **PREPARAÇÃO DE COMPÓSITOS HÍBRIDOS PARA APLICAÇÃO COMO CARREADORES DE FÁRMACO NO TRATAMENTO DA OSTEOMIELITE**. [s.l.] Universidade Federal de Campina Grande, 2017.
- ARAÚJO, P. M. A. G. et al. Estudo do efeito da modificação de superfície de Fe₃O₄ e CoFe₂O₄ para aplicação como carreador de fármaco. **Cerâmica**, v. 64, n. 372, p. 466–476, 2018.
- ARELARO, A. D. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferritas. **Dissertação**, p. 89, 2008.
- ARNETT, T. Regulation of bone cell function by acid-base balance. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 62, p. 551–520, 2003.
- AZEVEDO, A. G. D. S.; STRECKER, K.; GORGULHO, H. F. Efeito da temperatura em processos de sinterização de pós de hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 61, n. 357, p. 52–59, 2015.
- BANK, R. A. et al. Biomaterial Encapsulation Is Enhanced in the Early Stages of the Foreign Body Reaction during Conditional Macrophage Depletion in Transgenic

Macrophage Fas-Induced Apoptosis Mice. **Tissue Engineering - Part A**, v. 23, n. 19–20, p. 1078–1087, 2017.

BARBECK, M. et al. Multinucleated giant cells in the implant bed of bone substitutes are foreign body giant cells—New insights into the material-mediated healing process. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 105, n. 4, p. 1105–1111, 2017.

BECKER, M. et al. Bone quality evaluation of experimental osteometabolic disease in Pantanal alligators (*Caiman yacare*) by High Resolution Computerized Microtomography (μ CT). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 981–990, 2018.

BELTHUR, M. V. et al. Pathologic fractures in children with acute *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 94, n. 1, p. 34–42, 2012.

BIRT, M. C. et al. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. **Journal of Orthopaedics**, v. 14, n. 1, p. 45–52, 2017.

BJORKSTÉN, B.; BOQUIST, L. No Title. **J Bone Joint Surg Br**., v. 62, n. 3, p. 376–380, 1980.

BORGES, A. P. B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia, de cães (Canis familiares). Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão.** 1988. Doutorado em Ciência Animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

BORGES, A. P. B. et al. Hidroxiapatita sintética como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 616–620, 2000.

BOUSSON, V. et al. CT of the Middiaphyseal Femur: Cortical Bone Mineral. **Radiology**, v. 217, n. 1, p. 179–87, 2000.

BRANDAO-BURCH, A. et al. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts In Vitro by preventing mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 77, n. 3, p. 167–174, 2005.

CAMPANA, V. et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 25, n. 10, p. 2445–2461, 2014.

CARLO, E. C. et al. Resposta tecidual ao compósito 50% hidroxiapatita: 50% poli-

hidroxibutirato para substituição óssea em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 844–852, 2009a.

CARLO, E. C. et al. Comparison of in vivo properties of hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composites assessed for bone substitution. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 20, n. 3, p. 853–859, 2009b.

CHEN, Z. et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials. **Materials Today**, v. 19, n. 6, p. 304–321, 2016.

CHIARELLO, E. et al. Autograft, allograft and bone substitutes in reconstructive orthopedic surgery. **Aging Clinical and Experimental Research**, v. 25, n. 1 SUPPL., p. 101–103, 2013.

CHOW, L. C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. **Dent Mater J.**, v. 28, n. 1, p. 1–10, 2009.

COMEGNA, L. et al. Pyomyositis is not only a tropical pathology: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–6, 2016.

DE JONG, W. H.; BORM, P. J. A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v. 3, n. 2, p. 133–149, 2008.

DEVANAND VENKATASUBBU, G. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and zinc-doped hydroxyapatite as carrier material for controlled delivery of ciprofloxacin. **3 Biotech**, v. 1, n. 3, p. 173–186, 2011.

DI GUGLIELMO, C. et al. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: A first in vitro approach. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 2, p. 271–276, 2010.

DIGIGOW, R. G. et al. Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 362, p. 72–79, 2014.

DORATI, R. et al. Biodegradable scaffolds for bone regeneration combined with drug-delivery systems in osteomyelitis therapy. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, 2017.

ELIAS, A.; TSOURKAS, A. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 720–726, 2009.

FANTONI, M.; TACCARI, F.; GIOVANNENZE, F. Systemic antibiotic treatment of chronic osteomyelitis in adults. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 23, n. 2, p. 258–270, 2019.

FRAIMOW, H. Systemic Antimicrobial Therapy in Osteomyelitis. **Seminars in Plastic**

Surgery, v. 23, n. 02, p. 090–099, 2009.

GAUDIN, A. et al. A new experimental model of acute osteomyelitis due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rabbit. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 253–257, 2011.

GOPI, D. et al. Synthesis and spectroscopic characterization of magnetic hydroxyapatite nanocomposite using ultrasonic irradiation. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 87, p. 245–250, 2012.

GOTO, T. et al. Resorption of synthetic porous hydroxyapatite and replacement by newly formed bone. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 6, n. 5, p. 444–447, 2001.

GRAHAM, N. B.; WOOD, D. A. Polymeric inserts and implants for the controlled release of drugs. **THE BRITISH POLYMER JOURNAL**, v. 10, n. December, p. 260–266, 1978.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352–1358, 2010.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: Conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v. 19, n. 4, p. 153–162, 2005.

HACHIM, D. et al. Shifts in macrophage phenotype at the biomaterial interface via IL-4 eluting coatings are associated with improved implant integration. **Biomaterials**, v. 112, p. 95–107, 2017.

HARRISON, K. D. et al. Cortical Bone Porosity in Rabbit Models of Osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2020.

HATZENBUEHLER, J.; PULLING, T. J. Diagnosis and management of osteomyelitis. **American Family Physician**, v. 84, n. 9, p. 1027–1033, 2011.

HEITZMANN, L. G. et al. Postoperative chronic osteomyelitis in the long bones - Current knowledge and management of the problem. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 54, n. 6, p. 627–635, 2019.

IDELEVICH, E. A. et al. *Staphylococcus aureus*-Associated Musculoskeletal Infections. In: BAGNOLI, F.; RAPPUOLI, R. . G. G. (Ed.). . **Staphylococcus aureus. Current Topics in Microbiology and Immunology**. 1. ed. [s.l.] Springer, Cham., 2016. v. 409p. 229–261.

IGNJATOVIC, N. et al. Enhanced Osteogenesis of Nanosized Cobalt-substituted Hydroxyapatite. **Journal of Bionic Engineering**, v. 12, n. 4, p. 604–612, 2015.

JORGENSON, B. L. et al. A comparison of methods for in vivo assessment of cortical

porosity in the human appendicular skeleton. **Bone**, v. 73, p. 167–175, 2015.

KIM, D. et al. Journal of Magnetism and Magnetic Materials Heat generation of aqueously dispersed CoFe₂O₄ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. 2390–2396, 2008.

KOKUBO, T.; KIM, H. M.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, v. 24, n. 13, p. 2161–2175, 2003.

KOORT, J. K. et al. Efficacy of ciprofloxacin-releasing bioabsorbable osteoconductive bone defect filler for treatment of experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1502–1508, 2005.

KRAMER, E.; ITZKOWITZ, E.; WEI, M. Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders. **Ceramics International**, v. 40, n. 8 PART B, p. 13471–13480, 2014.

KRIEGER, N. S.; BUSHINSKY, D. A.; FRICK, K. K. Cellular Mechanisms of Bone Resorption Induced by Metabolic Acidosis. **Seminars in Dialysis**, v. 16, n. 6, p. 463–466, 2003.

KUMAR, G. S.; GOVINDAN, R.; GIRIJA, E. K. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, n. 31, p. 5052–5060, 2014.

LEE, M. S. et al. Topographically Defined, Biodegradable Nanopatterned Patches to Regulate Cell Fate and Acceleration of Bone Regeneration. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 45, p. 38780–38790, 2018.

LEE, Y. J. et al. The imaging of osteomyelitis. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 6, n. 2, p. 184–198, 2016.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 395, p. 81–98, 2002.

LEW, D. P.; WALDVOGEL, F. A. Osteomyelitis. p. 369–379, 2004.

MARSHALL, R. A. et al. Imaging features and management of stress, atypical, and pathologic fractures. **Radiographics**, v. 38, n. 7, p. 2173–2192, 2018.

MASTERS, E. A. et al. Evolving concepts in bone infection: redefining “biofilm”, “acute vs. chronic osteomyelitis”, “the immune proteome” and “local antibiotic therapy”. **Bone Research**, v. 7, n. 1, 2019.

MIRON, R. J.; BOSSHARDT, D. D. Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? **Tissue Engineering - Part B: Reviews**, v. 24, n. 1, p. 53–65, 2018.

MOGHADDAM, A. et al. Patients' safety: Is there a systemic release of gentamicin by gentamicin-coated tibia nails in clinical use? **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 12, p. 1387–1393, 2016.

MOHAPATRA, S. et al. A simple synthesis of amine-derivatised superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bioapplications. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 17, p. 7566–7574, 2007.

MONDAL, B. et al. Fish scale derived hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. **Materials Characterization**, v. 121, p. 112–124, 2016.

NAKAHIRA, A.; NAKAMURA, S.; HORIMOTO, M. Synthesis of modified hydroxyapatite (HAP) substituted with Fe ion for DDS application. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 43, n. 6, p. 2465–2467, 2007.

OGAWA, C. A.; PLEPIS, A. M. G. Liberação In Vitro de Cloridrato de Ciprofloxacina em Compósitos Hidroxiapatita: Colágeno. **Polímeros**, v. 12, n. 2, p. 115–122, 2002.

PARENT, M. et al. Hydroxyapatite microporous bioceramics as vancomycin reservoir: Antibacterial efficiency and biocompatibility investigation. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 4, p. 488–498, 2016.

PARENT, M. et al. Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases: A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 1–17, 2017.

PARETA, R. A.; TAYLOR, E.; WEBSTER, T. J. Increased osteoblast density in the presence of novel calcium phosphate coated magnetic nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 26, 2008.

PINEDA, C.; ESPINOSA, R.; PENA, A. Radiographic Imaging in Osteomyelitis: The Role of Plain Radiography, Computed Tomography, Ultrasonography, Magnetic Resonance Imaging, and Scintigraphy. **Seminars in Plastic Surgery**, v. 23, n. 02, p. 080–089, 2009.

RAJAPAKSE, C. S. et al. Volumetric cortical bone porosity assessment with MR imaging: Validation and clinical feasibility. **Radiology**, v. 276, n. 2, p. 526–535, 2015.

RAMANAVIČIUS, S. et al. Shell-dependent antimicrobial efficiency of cobalt ferrite nanoparticles. **Nano-Structures and Nano-Objects**, v. 15, p. 40–47, 2018.

RAMOT, Y. et al. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 153–162, 2016.

RANJAN, V. et al. Classifying Giant Cell Lesions: A Review. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v. 31, n. 1, p. 36–39, 2019.

RAUSCHMANN, M. A. et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2677–2684, 2005.

REIS, E. C. C. et al. Biocompatibility, osteointegration, osteoconduction, and biodegradation of a hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 4, p. 817–826, 2010.

REIS, E. C. C. et al. Desenvolvimento e Caracterização de Membranas Rígidas, Osteocondutoras e Reabsorvíveis de Polihidroxibutirato e Hidroxiapatita para Regeneração Periodontal. **Polimeros**, v. 22, n. 1, p. 73–79, 2012.

RIBEIRO, I. Í. DOS A. et al. Bioceramics and polymer for the regeneration of bone critical size defects. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 298–302, 2014.

ROBERTS, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of Staphylococcus aureus infections of the skin and soft tissue. **Internal Medicine Journal**, v. 35, n. SUPPL. 2, 2005.

RODRIGUES, C. V. M. et al. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 4987–4997, 2003.

ROSTAM, H. M. et al. The impact of surface chemistry modification on macrophage polarisation. v. 221, n. 11, p. 1237–1246, 2016.

SAMIEE-RAD, F. et al. Microbiologic and histopathological findings of osteomyelitis in diabetic patients. **Comparative Clinical Pathology**, v. 26, n. 4, p. 847–852, 2017.

SARATH CHANDRA, V. et al. Effect of irradiation of Si⁵⁺ ion on Fe doped hydroxyapatite. **Advanced Materials Letters**, v. 4, n. 6, p. 438–443, 2013.

SCHAFFLER, M. B.; BURR, D. B. Stiffness of compact bone: Effects of porosity and density. **Journal of Biomechanics**, v. 21, n. 1, p. 13–16, 1988.

SCHLICKEWEI, C. W.; YARAR, S.; RUEGER, J. M. Eluting antibiotic bone graft substitutes for the treatment of osteomyelitis in long bones. A review: Evidence for their use? **Orthopedic Research and Reviews**, v. 6, p. 71–79, 2014.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions. **clinical orthopaedics and Related Research**, n. 205, p. 299–308, 1986.

SEPÚLVEDA, R. V. et al. Composite synthetic hydroxyapatite 30%, in two physical states, as dermal filler. **Revista Ceres**, v. 60, n. 4, p. 458–464, 2013.

SLATTER, D. H. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3th. ed. São Paulo: Ed Manole, 2007.

SMELTZER, M. S. et al. Characterization of a rabbit model of staphylococcal osteomyelitis. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 3, p. 414–421, 1997.

SMITH, A.; HUNNEYBALL, LAN M. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 30, n. 2–3, p. 215–220, 1986.

SMITH, B. J.; BUCHANAN, G. S.; SHULER, F. D. A comparison of imaging modalities for the diagnosis of osteomyelitis. **Marshall Journal of Medicine**, v. 2, n. 3, 2016.

SOUZA, K. C.; ARDISSON, J. D.; SOUSA, E. M. B. Study of mesoporous silica/magnetite systems in drug controlled release. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 2, p. 507–512, 2009.

STOIAN, A. B.; DEMETRESCU, I.; IONITA, D. Nanotubes and nano pores with chitosan construct on TiZr serving as drug reservoir. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 185, n. September 2019, p. 110535, 2020.

STUPINA, T. A. et al. Applicability of histopathological osteomyelitis evaluation score (HOES) in chronic osteomyelitis of the foot — A feasibility study. **Foot and Ankle Surgery**, 2019.

SYBENGA, A. B. et al. Diagnosing Osteomyelitis: A Histology Guide for Pathologists. **Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 59, n. 1, p. 75–85, 2020.

TARTAJ, P. et al. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, n. February 2014, p. 182–197, 2003.

TIEMANN, A. et al. Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) - an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. **GMS Interdisciplinary plastic and reconstructive surgery DGPW**, v. 3, p. Doc08, 2014.

TRAN, N. et al. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 277–283, 2010.

VALENTE, F. L. et al. Hydroxyapatite, polycaprolactone and alendronate composites for bone regeneration in rabbits' olecranon: Histological features. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 543–547, 2016.

VENKATESAN, K. et al. Structural and magnetic properties of cobaltdoped iron oxide nanoparticles prepared by solution combustion method for biomedical applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 189–198, 2015.

- VITAL, C. C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 175–183, 2006.
- VITAL, C. C. et al. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. **Revista Ceres**, v. 55, n. 1, p. 9–14, 2008.
- VON RECUM, A. F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. **Journal of applied biomaterials**, v. 6, n. 2, p. 137–144, 1995.
- WANG, G. et al. Drug-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Fe₃O₄ composite microspheres for magnetic resonance imaging and controlled drug delivery. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 456, p. 316–323, 2018.
- WINKLER, H. Treatment of chronic orthopaedic infection. **EFORT Open Reviews**, v. 2, n. 5, p. 110–116, 2017.
- WU, Z. et al. **Research Progress on Diagnosis and Treatment of Chronic Osteomyelitis** *Chinese Medical Sciences Journal*, 2019.
- YANG, J. et al. In vivo quantitative and qualitative assessment of foreign body giant cell formation on biomaterials in mice deficient in natural killer lymphocyte subsets, mast cells, or the interleukin-4 receptor α and in severe combined immunodeficient mice. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 102, n. 6, p. 2017–2023, 2014.
- YAYLAOĞLU, M. B. et al. Development of a calcium phosphate-gelatin composite as a bone substitute and its use in drug release. **Biomaterials**, v. 20, n. 8, p. 711–719, 1999.
- YILDIRIM, A. et al. The Use of an “internal Fixator Technique” to Stabilize Pathologic Fractures Developing Secondary to Osteomyelitis. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 37, n. 3, p. 222–226, 2017.
- ŽALNĚRAVIČIUS, R. et al. Size-dependent antimicrobial properties of the cobalt ferrite nanoparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 10, 2016.
- ŽALNĚRAVIČIUS, R. et al. Fe(II)-substituted cobalt ferrite nanoparticles against multidrug resistant microorganisms. **Applied Surface Science**, v. 435, p. 141–148, 2017.
- ZHAO, L. et al. Preparation and characterization of calcium phosphate/pectin scaffolds for bone tissue engineering. **RSC Advances**, v. 6, n. 67, p. 62071–62082, 2016.