

GEISSIANE DE MORAES MARCONDES

**Avaliação da interação biológica entre compósito de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita e tecido ósseo**

São Paulo

2019

## RESUMO

MARCONDES, G. M. **Avaliação da interação biológica entre compósito de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita e tecido ósseo.** [Assessment of biological interaction between carbon nanotube, chitosan and hydroxyapatite composite and bone tissue]. 2019. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Atualmente têm se desenvolvido substitutos ósseos, com propósito de auxiliar na regeneração óssea em casos de perda tecidual. Para avaliação da biocompatibilidade e osteocondução, é necessária sua implantação *in vivo*, em animais de laboratório e grandes animais, para aprovação em uso clínico futuro. Ratos e ovinos são modelos experimentais em engenharia tecidual. Podem ser adicionados aos biomateriais, células-tronco mesenquimais para potencialização do efeito regenerativo ósseo. O objetivo desse estudo foi avaliar a biocompatibilidade e osteocondução de compósito de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita (CNQH), enriquecidos ou não com células-tronco mesenquimais oriundas de medula óssea de ovino (CTMO) em ratos e ovinos. Inicialmente, sessenta ratos foram divididos em grupos, sendo que o implante de CNQH com ou sem CTMO, em subcutâneo, foi realizado em 20 animais (submetidos a eutanásia após 7 e 30 dias da cirurgia), comparando com 10 animais controle, e em 20 animais em defeito na calvária (submetidos a eutanásia após 20 e 60 dias da cirurgia) comparando com 10 animais controle. Foram realizadas avaliações histológicas de tecido subcutâneo e calvária, após eutanásia, comparando-se os grupos. Posteriormente, dezoito ovelhas foram submetidas à ostectomia em tíbia e osteossíntese com placa de compressão bloqueada. Seis animais não tiveram suas falhas preenchidas (Grupo I), seis animais tiveram suas falhas preenchidas com CNQH (Grupo II) e seis animais com CNQH com CTMO (Grupo III), sendo avaliados até 90 dias após a cirurgia. No período pré e pós-operatório (30, 60 e 90 dias) os animais foram submetidos às avaliações radiográficas, sendo as imagens analisadas em relação a efetividade da osteossíntese e a preenchimento da falha por escore, comparando-se os grupos. Após 90 dias, as ovelhas foram submetidas à eutanásia. Observou-se ausência de sinais de toxicidade ou necrose em subcutâneo dos ratos, denotando a biocompatibilidade do compósito e não reação imunogênica às CTMO. A análise histomorfológica por escore da calvária dos ratos demonstrou, em relação ao infiltrado inflamatório que o Grupo Controle apresentou escores mais baixos que os demais grupos, somente aos 20 dias, denotando a diminuição da reação inflamatória ao

longo do tempo. O Grupo Controle apresentou pontuações mais baixas de escore aos 20 e 60 dias, para tecido de granulação e neoformação óssea, respectivamente, em relação aos grupos com compósito, que não apresentaram diferenças estatísticas significativas, sugerindo que o compósito auxiliou no processo regenerativo dos defeitos em calvária. Nas avaliações radiográficas em ovinos, os escores de preenchimento de falha nos Grupo I foi menor ao longo do tempo em relação aos Grupos II e III, que apresentaram escores semelhantes. As avaliações histológicas no tecido ósseo de ovinos demonstraram ausência de tecido ósseo neoformado em Grupo I e nos Grupos II e III ausência de reação de corpo estranho, com trabéculas ósseas de tecido neoformado entremeadas ao compósito, em conectividade com tecido pré-existente. Na histomorfometria dos Grupos II e III, observou-se porcentagens semelhantes em relação de tecido ósseo neoformado. Foi possível concluir que o CNQH apresenta biocompatibilidade e perfil osteocondutor para ser utilizado como coadjuvante em casos de perda tecidual óssea.

**Palavras-chave:** Ratos. Ovinos. Biomateriais. Osteocondução. Biocompatibilidade.

## ABSTRACT

MARCONDES, G. M. **Assessment of biological interaction between carbon nanotube, chitosan and hydroxyapatite composite and bone tissue.** [Avaliação da interação biológica entre compósito de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita e tecido ósseo]. 2019. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Research on bone substitutes and bone healing enhancers for critical defects has expanded considerably in recent years. Pre-clinical evaluation of biocompatibility and the osteoconductive potential using *in vivo* animal models is paramount. Sheep and rats are considered standard models in tissue engineering. Enhancement of bone regeneration can be achieved by using mesenchymal stem cells. The purpose of this study was to evaluate the biocompatibility and osteoconductivity of carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite (CNT/CS/HA) composite scaffolds enriched or not with ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) in murine and ovine models. Initially, sixty rats were divided into 2 groups. The CNT/CS/HA composites with or without (MSCs) were implanted in the subcutaneous tissue of 20 animals (euthanized 7 and 30 days after surgical implantation). They were compared to 10 control animals. The CNT/CS/HA composites with or without (MSCs) were also implanted in the calvarial bone defects of another 20 rats (euthanized 20 and 60 days after surgical implantation). They were compared to 10 control animals. *Post-mortem* histology examinations were performed to compare results between subcutaneous and calvarial tissue groups. At a second moment, we performed tibial osteotomy on eighteen sheep followed by osteosynthesis using locked compression plate. The bone void was left empty on six animals (Group I), filled with CNT/CS/HA on six animals (Group II), and filled with CNT/CS/HA enhanced with MSCs on six animals (Group III). Assessment was performed up to 90 days after surgery. Radiographic assessments were performed before surgery and on days 30, 60 and 90 after surgery. Effectiveness of osteosynthesis and void filling score were compared between groups. The animals were euthanized 90 days after surgery. On *post-mortem* evaluation the rats' subcutaneous tissues were free of any toxicity signs or necrosis. The absence of immunogenic reactions to MSCs denotes the composite's biocompatibility. Histomorphological analysis of the rat calvarial score (considering inflammatory infiltrate) showed that Control Group presented lower scores only at the assessment performed on the 20<sup>th</sup> day after surgery. This finding denotes a decrease trend on the inflammatory reaction over time. Animals from Control Group had lower granulation

tissue and bone neoformation scores at days 20 and 60, respectively, when compared to composite groups. Lack of statistically significant differences suggest that the composite material assisted the regeneration of the calvarial defects. On radiographic assessment of the sheep, the void filling scores of Group I were lower than Groups II and III over time. Groups II and III had similar scores. Histological evaluations of the sheep's bone tissues denoted absence of bone neoformation in Group I. Foreign body reaction was not encountered on Groups II and III. Newly formed bone trabeculae entangled to composite and connected to pre-existing tissue were observed. Histomorphometry analysis showed similar newly formed bone tissue ratios in Groups II and III. We concluded the CNT/CS/HA composite is biocompatible and has osteoconductive profile that enables its use as bone enhancer in cases of critical sized bone defects causes by bone tissue loss.

**Keywords:** Rats. Ovine. Biomaterials. Osteoconduction. Biocompatibility.