

## Nanocompósito é eficiente para regeneração de fraturas em animais de grande porte

A Redação do Boletim APAMVET entrevistou Dra. Geissiane Moraes Marcondes, CRMV-SP 25.439, e Dra. Nicole Fidalgo Paretsis médica-veterinária CRMV-SP 30742 a respeito do uso de um nanocompósito a base de carbono.

É um trabalho multidisciplinar que foi realizado sob orientação do Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

### 01 – O que motivou a linha de pesquisa? Quando esta linha de pesquisa começou?

Atualmente, o reparo de fraturas em grandes animais continua sendo um desafio devido ao tamanho do animal, particularidades das espécies e disponibilidade de equipamentos e instrumentais especializados. Com o avanço da ciência e da medicina veterinária, a eutanásia deixou de ser a única opção nestes casos de fratura, e hoje em dia é possível avaliá-los e com melhor prognóstico, tanto para a função esportiva, como para a manutenção da qualidade de vida. O universo dos biomateriais vem auxiliar neste desafio para tentar assistir o reparo ósseo com tecido de qualidade no tempo adequado.

A linha de pesquisa começou no ano de 2010 na tentativa de produzir um biomaterial para este fim. Desde então, o grupo de pesquisa se dedica desde à escolha dos constituintes do material ideal para a regeneração óssea, à produção de substituto ósseo e os métodos de avaliação para a validação do uso do mesmo, assim como avaliação dos seus resultados frente ao tecido ósseo remanescente, neoformado e ao organismo.

### 02 – O que há no momento para o tratamento das fraturas de grandes animais no Brasil?

A capacitação técnica para a realização de osteossínteses considerando particularidades das espécies hoje em dia é uma realidade. Com o avanço dos exames de imagem, é possível avaliar o pré, trans e pós-operatório do paciente, o que facilita desde o planejamento cirúrgico até a possível resolução do caso. A disponibilidade de equipamentos, instrumentais e implantes ortopédicos para estas espécies, também tem sido motivo de estudo e dedicação dos grupos de pesquisa, mas ainda longe da realidade internacional.

Ainda, a engenharia de biomateriais vem evoluindo quanto aos implantes metálicos para a realização da osteossíntese desde o material no qual é formado, assim como a configuração do implante para adaptação a estes animais.

Os biomateriais absorvíveis ainda não fazem parte da rotina em grandes animais e por isso é nosso material de estudo. Estes apresentam a função de auxiliar no reparo ósseo, formando um tecido de qualidade e quantidade em tempo adequado. Este tipo de biomaterial funciona também, como arcabouço para tecido neoformado ou até mesmo

para associá-los com células-tronco, na tentativa de modular o processo inflamatório e potencializar a regeneração óssea.

### 03 – Para o desenvolvimento da pesquisa, quais colaborações receberam e qual papel de cada?

Esta é uma pesquisa multidisciplinar no qual há a necessidade de diferentes competências:

O Instituto de Química de São Carlos (IQCS), da Universidade de São Paulo são nossos parceiros, no qual a Profa. Dra. Ana Maria de GuzziPlepis e a Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins são responsáveis pela produção e caracterização do biomaterial.

O Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo no qual nos auxiliaram quanto as avaliações de biocompatibilidade e citotoxicidade do biomaterial sob orientação da Profa. Dra. Claudia Madalena Cabrera Mori, Dra. Nicolle Gilda Teixeira de Queiroz Hazarbassanov e Dr. Vagner Gonçalves Junior.

O Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob orientação da Profa. Dra. Raquel Yvonne Arantes Baccarin e Dra. Joice Fülber, contribuem para o cultivo das células-tronco utilizadas em associação ao biomaterial de estudo.

O Departamento de Biologia Oral, da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob orientação do Prof. Dr. Victor Arana-Chavez processaram e analisaram as amostras histológicas ópticas e ultraestruturais. O Laboratório de Patologia Experimental do Departamento da Estomatologia da mesma faculdade também nos auxiliou sob orientação da Profa. Dra. Luciana Correia com análises de microscopia óptica.

O Laboratório de Caracterização Tecnológica do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP, onde foram realizadas as aquisições por microtomografia computadorizada 3D do tecido ósseo, e o Laboratório de Microtomografia no Instituto de Biociências da USP onde foram analisadas as imagens microtomográficas, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno e colaboração da pós-doutoranda Simone Peixe Friedrichsdorf.

O Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde participam, Prof. Dr. Stefano Carlo Filippo Hagen e a Profa. Dra. Carla Aparecida Batista Lorigados, na área de exames de imagem; Profa. Dra. Silvia Renata GaidoCortopassi e Profa. Dra. Denise TabacchiFantoni responsáveis pelos procedimentos anestésicos nos experimentos, com contribuição dos pós-graduandos envolvidos deste departamento: Dra. Geissiane Moraes Marcondes, Dra. Nicole Fidalgo Paretsis, Dra. Fernanda Nóbrega, MSc. Mariana Baroni Selim, MSc. Cinthia Lima Lhamas, MSc. Danielle Baccarelli, MSc. Maria RaquellBellomo, Anderson Fernando de Souza, Thamires Shizue, Grazieli Monteiro, Dr. Mario Antônio Ferraro Rego, MSc. Bruno Gregnanin Pedron e Dr. Douglas Alonso.

O Prof. Dr. André Luís do Valle De Zoppa deste mesmo departamento é o idealizador e responsável pela linha de pesquisa e pelo projeto.

#### 04 – Em relação ao nanocompósito de nanotubo de carbono, quitosana e hidroxiapatita, por que ele seria benéfico? Quais suas características? Por que a associação com células-tronco?

As matérias-primas que compõe o biomaterial são utilizadas rotineiramente na odontologia em diferentes composições, no qual a hidroxiapatita tem semelhança com o tecido ósseo, atua como arcabouço e apresenta uma biodegradabilidade lenta e considerável. A quitosana apresenta propriedades antibacterianas, é facilmente moldada e auxilia nas diferenciações celulares. O nanotubo de carbono mimetiza a matriz extracelular, estimulando a interação celular e apresenta propriedades mecânicas.

Desta maneira, surgiu a ideia de investigar se a associação destes materiais tende a estimular o reparo em ossos longos. Atuando também, como enxerto ósseo temporário e arcabouço para células-tronco, assim como futuramente, liberação lenta de fármacos como antimicrobianos, por exemplo.

Neste compósito, tanto a quitosana como a hidroxiapatita foram processadas pelo Grupo de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos - USP (IQSC/USP). A hidroxiapatita foi sintetizada, a quitosana foi extraída da lula (*Doryteuthis* spp) e o nanotubo de carbono foi obtido da marca Aldrich.

As terapias celulares/regenerativas já é uma realidade na medicina veterinária e acredita-se que possam atuar de duas formas: modulando os processos inflamatórios, estimulando a angiogênese e recrutando células mesenquimais, assim como podendo se diferenciar no local.

#### 05 – Quais avaliações são realizadas para acompanhar a eficiência do nanocompósito?

Inúmeras avaliações devem ser realizadas. As avaliações devem responder questões como a escolha da composição, distribuição e configuração do próprio biomaterial, até a sua resposta frente ao tecido ósseo e ao organismo como um todo. Estas análises envolvem testes *in vitro* e *in vivo*, seguindo *ARRIVE Guidelines* as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e Comissão Ética no Uso de Animais (CEUA).

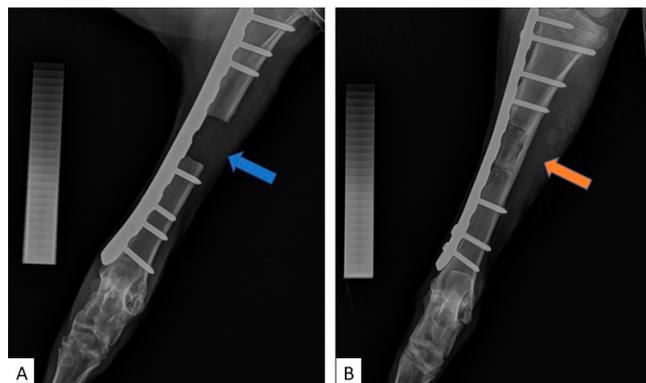
Neste contexto são realizadas as seguintes avaliações: caracterização do biomaterial, testes de biocompatibilidade, testes de citotoxicidade, análises microscópicas ópticas e eletrônicas, análises de imagem (ultrassonografia, densitometria, termografia, microtomografia), do biomaterial, do tecido pré-existente e do tecido neoformado, têm sido realizadas com resultados promissores.

#### 06 – Quais os resultados até o momento? Quais os próximos passos da pesquisa?

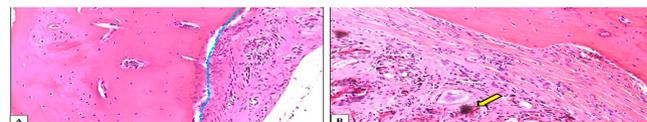
O biomaterial de estudo é compatível com o tecido ósseo, não apresentou reação de corpo estranho ou toxicidade no organismo nos testes *in vivo* e *in vitro*. Este apresenta características de biodegradabilidade e osteocondutoras que estimulam a neoformação de um tecido ósseo com resultados promissores.

A qualidade do tecido neoformado e a eficácia da regeneração óssea com a associação deste biomaterial com célula-tronco precisam ser elucidadas. Por isso, o próximo passo é acompanhar estes animais por um período mais longo e adequar a metodologia para analisarmos a ação das células-tronco *in situ*.

Abaixo imagens presentes nas teses da Dra. Nicole Paretsis e Dra. Geissiane Marcondes demonstrando o potencial de regeneração óssea.



Legenda: Projeção radiográfica do grupo controle, sem evidência de neoformação óssea (A); Projeção radiográfica do grupo tratado. Observa-se neoformação óssea e a presença do biomaterial. As duas imagens correspondem ao pós-operatório de 90 dias. Fonte: imagens adaptadas da tese de Paretsis, 2020.



Legenda: Imagens histológicas do grupo controle e do grupo tratado, da fase experimental em tecido ósseo de ratos, 60 dias após cirurgia. À Esquerda da linha pontilhada tecido ósseo pré-existente e ao lado tecido ósseo neoformado, no grupo controle (A). Observa-se neoformação óssea ao redor de resíduos do biomaterial (seta amarela), sem sinais de reação de corpo estranho (B). Fonte: imagens adaptadas da tese de Marcondes, 2019.

#### 07 – Os resultados poderão ser extrapolados para outras espécies? No que isso poderá contribuir para ortopedia de grandes animais futuramente? Qual a ideia de aplicação clínica?

Esta pesquisa, por ser multidisciplinar se enquadra em ciências básicas onde os resultados podem ser extrapolados para diferentes áreas e diferentes espécies. Um dos modelos experimentais utilizados no experimento são os ovinos, modelo também utilizado para medicina humana. Acredita-se que esta pesquisa contribua para a facilitar o entendimento e avançar pesquisas em ortopedia.

Em um objetivo inicial e específico, considerando a linha de pesquisa originária na Medicina Veterinária, a ideia é obter novas possibilidades de tratamento em fraturas em grandes animais. Este biomaterial irá atuar como adjuvante a osteossíntese como enxerto ósseo temporário, e assistir a regeneração do tecido ósseo. Desta maneira, será possível dar qualidade de vida e quem sabe retorno as atividades para os animais de grande porte, que sofrem fraturas, muitas vezes cominutivas, com perda de tecido ósseo.