

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM UM SISTEMA GUIADO *IN VIVO* EM DEFEITOS ÓSSEOS DE CALVÁRIAS DE COELHOS COM O EMPREGO DE HIDROXIAPATITA, BIO-OSS® E BONEFILL® ASSOCIADOS OU NÃO COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS E/ OU PLASMA RICO EM PLAQUETAS¹

Alice Comin Prochnov Nunes², Aury Nunes de Moraes³, Luciana Alves Prati⁴

¹ Vinculado ao projeto “Neoformação Óssea Em Um Sistema Guiado In Vivo Em Defeitos Ósseos De Calvárias De Coelho Com O Emprego De Hidroxiapatita, Bio-Oss® E Bonefill® Associados Ou Não Com Células-Tronco Mesenquimais E/ Ou Plasma Rico Em Plaquetas”

² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – bolsista PROBIC/UDESC

³ Orientador e Professor do Departamento de Medicina Veterinária – CAV/UDESC – aury.morais@udesc.br

⁴ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência animal– CAV/UDESC

O objetivo do trabalho é avaliar o comportamento *in vivo* de diferentes biomateriais, sendo eles hidroxiapatita (HA), bio-oss® e bonefill® isolados e com a associação de células-tronco mesenquimais (CTM) e/ou plasma rico em plaquetas (PRP) para a neoformação óssea e osteointegração no processo de cicatrização óssea em defeitos em calvárias de coelhos, em diferentes tempos de evolução. O projeto foi encaminhado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), e será conduzido conforme normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). O projeto será realizado com 18 coelhos da raça New Zeland, machos castrados, com peso médio de 3,5kg e idade média de 6 meses, alojados de forma padrão em gaiolas de 60x60x60cm, alimentação com ração peletizada e água a vontade. Esses coelhos serão divididos em três grupos de 6 animais, sendo em cada um empregado um dos biomateriais estudados. Dentro dos grupos de 6 animais será dividido em dois grupos, sendo três animais a eutanásia após 90 dias e os outros três após 120 dias, sendo logo após a eutanásia a coleta das calvárias para os estudos onde será avaliada a osteogênese. Será feita a retirada dos fragmentos ósseos contendo os guias de crescimento, armazenamento dos mesmos em frascos individuais, identificados e preenchidos com formaldeído a 10% durante 7 dias. Após isso as amostras serão encaminhadas para análise histológica em microscopia de varredura e histomorfométrica. A calvária dos animais será dividida em três quadrantes (QI, QII e QIII), cada quadrante com um guia de crescimento ósseo de náilon que será preenchido com os seguintes componentes: QI apenas biomaterial; QII biomaterial e CTM; e QIII biomaterial, CTM e PRP. Os procedimentos cirúrgicos para a colocação dos guias de crescimento terão um preparo pré-operatório com avaliação clínica, hemograma e bioquímica sérica, jejum de 4 horas antes do procedimento anestésico. Para medicação pré-anestésica será usada a associação de morfina (5mg/kg), midazolam (2mg/kg) e cetamina (20mg/kg) intramuscular. Os animais serão induzidos à anestesia com isoflurano por máscara facial e após o relaxamento colocação da máscara laríngea para manutenção anestésica com isoflurano a 1CAM, diluído em oxigênio a 100% com fluxo variando entre 200 e 300ml/kg/min. Na linha de incisão será feita anestesia local por infiltração de lidocaína 2%. As atividades desenvolvidas até o momento consistem em um teste *in vitro* e um teste piloto *in vivo*. O teste *in vitro* foi realizado para testar a viabilidade das células-tronco mesenquimais de coelhos em contato com o biomaterial bonefill®, esse teste foi realizado no laboratório Bio Cell

(Brasília, DF). Iniciou com o preparo das CTMs, um tubo com um milhão delas foi descongelado em banho-Maria a 36°C, inserido 3ml de meio de transporte e centrifugado por 3 minutos a 1300rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e 1ml de meio adicionado, esse procedimento se repetiu três vezes. Após essas lavagens as células foram translocadas para um eppendorf com 250µl de meio de transporte e 70mg do biomaterial. As leituras da viabilidade dessas células após o contato com o biomaterial foram feitas após 30 minutos, 8 horas e 24 horas. A leitura foi feita com 0,2ml de azul de tripan e 50µl da amostra, de 10µl dessa mistura foi feito a lâmina para leitura. A cada leitura foram contadas 200 células e a porcentagem de células viáveis e mortas. A avaliação foi feita com duas variáveis e um grupo controle, a **variável 1** que consistia em biomaterial em contato com CTMs diluídas em meio de transporte e a **variável 2** que consistia em biomaterial previamente lavado com tampão fosfato salino (PBS) em contato com CTMs diluídas em meio de transporte. Os resultados foram os seguintes: no tempo de 30 minutos houve diferença considerável entre os grupos, a porcentagem de células mortas dos grupos controle, biomaterial, e biomaterial lavado com PBS foram respectivamente 5,50%, 40% e 24,50%. No tempo de 8h também houve diferença considerável entre os grupos, a porcentagem de células mortas dos grupos controle, biomaterial, e biomaterial lavado com PBS foram respectivamente 18%, 47,50% e 25,50%. E por fim na avaliação após 24 horas não houve diferença considerável entre as variáveis, apenas diferença entre ambos os grupos e o controle, a porcentagem de células mortas dos grupos controle, biomaterial, e biomaterial lavado com PBS foram respectivamente 23%, 87% e 88,50%.

O teste piloto *in vivo* foi feito em dois animais submetidos aos procedimentos pré-operatórios e operatórios descritos anteriormente. Os guias de crescimento colocados nos coelhos estavam preenchidos da seguinte maneira: coelho 1, QI hidroxiapatita, QII bonefill® e QIII bio-oss®, todos os materiais acrescidos de CTMs; coelho 2, QI hidroxiapatita, QII bonefill® e QIII bio-oss® todos os materiais acrescidos de PRP. No coelho 2 os dispositivos não ficaram bem fixados devido a porosidade do osso, então foi mantida a colocação de apenas um, contendo hidroxiapatita e PRP. Passados 90 dias após cirurgia, foi realizada eutanásia dos animais e coletadas suas calvárias com o uso de serra oscilatória. Os materiais coletados foram identificados e acondicionados em formaldeído por 48horas e lavadas com solução tampão, as análises histológicas não foram realizadas devido à paralisação das atividades do CAV-UDESC pela pandemia de Covid-19.

Palavras-chave: Cicatrização óssea. Biomateriais. Crescimento ósseo guiado.