

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL**

MAÍRA CAVALLET DE ABREU

**Efeito sobre o reparo ósseo de campo magnético sepultado em
crânio de ratos após reconstrução com osso autógeno,
hidroxiapatita sintética e cartilagem alógena**

**LINHA DE PESQUISA: BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPÊUTICAS EM
ODONTOLOGIA**

Porto Alegre

2012

MAÍRA CAVALLET DE ABREU

**Efeito sobre o reparo ósseo de campo magnético sepultado em
crânio de ratos após reconstrução com osso autógeno,
hidroxiapatita sintética e cartilagem alógena**

**LINHA DE PESQUISA: BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPÊUTICAS EM
ODONTOLOGIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Concentração em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Edela Puricelli.

Porto Alegre

2012

Aos meus queridos pais Elisete e Getulio:

Agradeço por todo amor e carinho, por toda a dedicação com a minha educação, pelo incentivo incondicional durante a minha formação profissional. Agradeço pelo companheirismo, pelo reconhecimento e pela confiança que construímos e fortalecemos entre nós a cada dia.

Fico muito feliz em poder dedicar esse trabalho a vocês que são meus exemplos de vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Edela Puricelli, pela oportunidade de cursar este mestrado, pelo exemplo de vida e incentivo profissional. Por toda a preocupação, dedicação, disponibilidade e empenho durante os cursos de capacitação e mestrado. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e pela amizade.

À minha querida irmã Marina, pelo companheirismo, pela amizade e por toda a alegria do teu sorriso.

Ao querido Lenio Togni, pela cumplicidade e companheirismo em grande parte desta jornada, pelo incentivo profissional e pela felicidade compartilhada.

À família Togni, pela calorosa acolhida, por toda a generosidade e pela confiança em mim depositada.

À Profa. Dra. Deise Ponzoni, pela acolhida na escola de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais da UFRGS, pela dedicação e responsabilidade sempre demonstradas, pelos ensinamentos compartilhados durante a minha formação.

Aos professores da disciplina de cirurgia Dr. Carlos Eduardo Baraldi e Dr. Marcel Fasolo de Paris, pelo empenho e por todo o auxílio dedicados durante a minha formação.

Aos colegas de mestrado Felipe Artuzi e Renan Langie, pela amizade e confiança estabelecidas durante este importante período de nossas vidas.

Aos alunos bolsistas da disciplina de cirurgia Alessandra Junges e Rafael Braga, pela disponibilidade e auxílio na confecção deste trabalho.

À colega Viviane Pacheco, pela amizade, pela disponibilidade e pela espontaneidade sempre manifestada. Ao colega Jules Bemfica, pelo convívio tranquilo e amistoso.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFRGS, na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. Manoel Sant'ana Filho, pela qualidade do curso oferecido, pelo empenho e preocupação durante todo esse importante período.

À maravilhosa equipe da Unidade de Experimentação Animal do HCPA, Enfa. Marta Giotti Cioato, Veterinária Fabíola Meyer, técnicos Rosa, Eduardo e Juliana, equipe de apoio Ângela e Vera, por verdadeiramente tornarem este trabalho realidade, pela disponibilidade e auxílio incondicionais, pelo importante exemplo de respeito e dedicação à pesquisa.

À bióloga Isabel Lauxen, pelo incentivo e auxílio, pela dedicação e cuidado durante a fase laboratorial possibilitando a execução deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de Patologia da UFRGS, Chris e Alessandra, pelo auxílio durante a execução deste trabalho, pela disponibilidade e responsabilidade demonstradas.

À equipe de Patologia experimental do HCPA, em especial à Profa. Dra. Luise Meurer e à técnica Flávia Giusti, pela fundamental contribuição na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Gustavo Pereira, pela disponibilidade e pela possibilidade de realização de parte deste trabalho nas dependências do Laboratório de Magnetismo da UFRGS.

Ao setor de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, em especial à Profa. Dra. Heloísa da Silveira, pela contribuição durante minha formação profissional e pela atenção e pela possibilidade de realização de etapas deste trabalho no setor de Radiologia.

À Profa. Dra. Anna Chistina Medeiros Fossati, pelo incentivo e pela confiança durante a fase de iniciação científica, período que contribuiu enormemente para minha formação e opção por cursar o Mestrado na UFRGS.

Aos meus queridos padrinhos Dilson e Diana, pelo carinho, pela amizade e pelo apoio sempre importante, fico imensamente feliz por fazerem parte da minha vida.

À TPD Andresa Fedrigo Silveira do PRO-SER Centro Profissional, pela responsabilidade, competência e eficiência, pelo ambiente de trabalho saudável e estimulante.

A todos os meus familiares e amigos, que sempre acreditaram em mim e incentivaram meus passos.

Sintam-se parte desta conquista, e recebam o meu caloroso...

Muito Obrigada!

RESUMO

A compreensão dos fenômenos de reparo ósseo representa parte fundamental da odontologia e da cirurgia bucomaxilofacial. **Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da estimulação de campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo em calvária de ratos após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem, comparados entre si e aos controles sem estimulação magnética. **Materiais e métodos:** foram utilizados 95 ratos *Wistar* machos, divididos em grupos constituídos por 5 animais. Foram realizados defeitos ósseos críticos na calvária dos animais, sendo os mesmos imediatamente reconstruídos, isoladamente com, enxerto ósseo autógeno, hidroxiapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem, sob influência ou não de campos magnéticos sepultados. Foram realizadas avaliações aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Apenas um grupo não sofreu intervenção cirúrgica (Naive), para fornecer os dados para obtenção da atividade fisiológica das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida. Em todos os tempos experimentais foi realizada a quantificação da neoformação óssea por meio da histomorfometria. A avaliação da intensidade de expressão da proteína osteopontina, foi obtida somente aos 60 dias. **Resultados:** a avaliação histomorfométrica evidenciou interação significativa entre grupos e tempos com $p=0,008$. Aos 60 dias, nos animais que receberam reconstrução com osso autógeno o grupo sob influência do campo magnético apresentou percentual de preenchimento ósseo superior ao grupo sem influência do estímulo magnético. A mensuração da atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida evidenciou interação significativa entre grupos e tempos com $p=0,02$ e $p=0,005$ respectivamente. Aos 60 dias, todos os grupos apresentaram atividade de ambas enzimas significativamente inferior ao grupo Naive. A análise imunoistoquímica realizada não evidenciou diferença significativa na expressão da enzima osteopontina com a metodologia empregada. **Conclusão:** o presente trabalho contribuiu para o entendimento da influência do campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo em crânio de rato. A partir dos resultados encontrados, novas metodologias podem ser propostas para complementar os resultados obtidos e fortalecer a presente linha de pesquisa.

Palavras-chave: Odontologia. Cirurgia bucomaxilofacial. Terapia de campo magnético. Materiais para reconstrução óssea.

ABSTRACT

Objective: the comprehension of the phenomenon of bone repair represents a fundamental part of dentistry and of oral and maxillofacial surgery. The present work has as its objective, to evaluate the influence of a stimulated magnetic field implanted on the calvarial bone of rats after its reconstruction with autogeneous bone graft, synthetic hydroxyapatite crystals or with the insertion of allogeneic cartilage, in comparison to no magnetic stimulation. **Materials e methods:** 95 *Wistar* male rats were used, divided into groups with 5 animals in each. The autogeneous bone graft, the synthetic hydroxyapatite crystals and the insertion of allogeneic cartilage were each used separately in the performed interventions of reconstruction with or without the influence of implanted magnetic fields. Evaluations were performed in 15, 30 and 60 days after surgery. Only one group did not suffer surgical intervention (Naïve); this group provided data for the physiological activity of the alkaline and acid phosphatase enzymes. Also, quantification of bone neoformation was obtained through histomorphometry in all experimental time periods, and evaluation of the osteopontin protein expression of intensity in 60 days. **Results:** the histomorphometry 60-day evaluation, showed evidence of a significant interaction between the groups and the time of $p=0,008$ on the animals that received reconstruction with autogeneous bone. The group that was influenced by the magnetic field presented a percent of bone reconstruction superior to that of the group which did not receive magnetic stimulation. In 60 days, activity mensuration of the alkaline and acid phosphatase enzymes, showed evidence of significant interaction between the groups and the times of $p=0,02$ and $p=0,005$, respectively. In all groups, activity of both enzymes was present and significantly inferior to the Naive group. The immunohistochemistry analysis performed did not show evidence of any significant difference in the oseopontin enzyme expression with the applied methodology. **Conclusion:** this work contributed to the understanding of the influence that an implanted magnetic field has on bone reconstruction. From the results found, new methodologies can be proposed as a complementary to obtained results and can strengthen the present line of research.

Key-words: Dentistry. Oral and maxillofacial surgery. Magnetic field therapy. Bone replacement materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Apresentação comercial da HAP®, hidroxiapatita granulada sintética utilizada no estudo.....	30
Figura 2 –	Grupo Naive. Acesso cirúrgico para remoção da cartilagem do osso esterno.....	31
Figura 3 –	Dispositivos metálicos utilizados no estudo.....	32
Figura 4 –	Gaussímetro.....	32
Figura 5 –	Técnica operatória.....	33
Figura 6 –	Crânio seco de rato.....	34
Figura 7 –	Tempos cirúrgicos.....	35
Figura 8 –	Tomadas radiográficas.....	36
Figura 9 –	Obtenção da peça para processamento histológico.....	37
Figura 10 –	Técnica do mosaico utilizada para agrupar as fotomicrografias...	39
Figura 11 –	Análise imunohistoquímica: quantificação das lâminas marcadas por imunohistoquímica.....	40
Figura 12 –	Representação dos intervalos de confiança do percentual de preenchimento ósseo.....	44
Figura 13 –	Representação gráfica do percentual de neoformação óssea em função do tempo para todos os grupos experimentais.....	45
Figura 14 –	Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	46
Figura 15 –	Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	46
Figura 16 –	Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	47
Figura 17 –	Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico,	

	com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	47
Figura 18 –	Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	48
Figura 19 –	Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	48
Figura 20 –	Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	49
Figura 21 –	Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	49
Figura 22 –	Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	50
Figura 23 –	Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	50
Figura 24 –	Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	51
Figura 25 –	Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	51
Figura 26 –	Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico,	

	com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	52
Figura 27 –	Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	52
Figura 28 –	Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	53
Figura 29 –	Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	53
Figura 30 –	Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	54
Figura 31 –	Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato.....	54
Figura 32 –	Comparação entre os grupos que receberam enxerto alógeno de cartilagem.....	55
Figura 33 –	Comparação entre os grupos que receberam implante de hidroxiapatita granulada sintética.....	56
Figura 34 –	Comparação entre os grupos que receberam enxerto ósseo autógeno.....	57
Figura 35 –	Representação dos intervalos de confiança da atividade da enzima fosfatase alcalina.....	59
Figura 36 –	Representação gráfica da atividade da enzima fosfatase alcalina em função do tempo para todos os grupos experimentais.....	60
Figura 37 –	Representação dos intervalos de confiança da atividade da enzima fosfatase ácida.....	62
Figura 38 –	Representação gráfica da atividade da enzima fosfatase ácida em função do tempo para todos os grupos experimentais.....	63
Figura 39 –	Fotomicrografias ilustrando as regiões selecionadas para análise imunoistoquímica.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos de estudo.....	30
Tabela 2 – Percentual de preenchimento ósseo em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios.....	43
Tabela 3 – Atividade da enzima fosfatase alcalina em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios.....	59
Tabela 4 – Atividade da enzima fosfatase ácida em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs: proteínas morfogenéticas ósseas
C: celcius
cm: centímetro
CT: cartilagem
CT+Í: cartilagem com magnetismo
CTBMF: Cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial
FO: Faculdade de Odontologia
G: gauss
g: grama
HA: hidroxiapatita
HA+Í: hidroxiapatita com magnetismo
HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE: hematoxilina e eosina
IC: intervalo de confiança
ICC: coeficiente de correlação intraclassa
kg: quilograma
kVp: kilovoltagem
l: litro
mA: miliampère
mg: miligrama
ml: mililitro
mm: milímetro
mmol: milimol
nm: nanômetro
OA: osso autógeno
OA+Í: osso autógeno com magnetismo
OPN: osteopontina
UAMP: Unidade de Análises Moleculares e Celulares
UEA: Unidade de Experimentação Animal
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul
µl: microlitros
µm: micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Tecido ósseo e reparo ósseo.....	16
2.2	Magnetismo e reparo ósseo.....	18
2.3	Recursos para reconstrução óssea.....	20
2.4	Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo.....	23
2.5	Modelo animal e métodos de avaliação do reparo ósseo.....	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1	Tipo e modelo de estudo.....	28
4.2	Considerações éticas.....	28
4.3	Locais de realização.....	28
4.4	Hipótese.....	28
4.5	Cálculo amostral.....	29
4.6	Grupos de estudo e delineamento experimental.....	29
4.7	Técnica operatória.....	32
4.8	Tomadas radiográficas.....	36
4.9	Preparo histológico e imunoistoquímico.....	36
4.10	Calibração.....	37
4.11	Análise histomorfométrica.....	38
4.12	Análise imunoistoquímica.....	39
4.13	Atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida.....	40

4.14	Análise estatística.....	41
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Histomorfometria.....	42
5.2	Marcadores bioquímicos.....	57
5.2.1	Fosfatase alcalina.....	57
5.2.2	Fosfatase ácida.....	60
5.3	Análise imunoistoquímica.....	63
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXO A – Código Estadual de Proteção aos Animais.....	82
	ANEXO B – Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA.....	84
	AÊNDICE A – Artigo elaborado a partir da dissertação.....	85

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é mineralizado e de natureza conjuntiva, quando lesado é capaz de sofrer reparação (TORTORA; GRABOWSKI, 2002; KATCHBURIAN; ARANA, 2004). A compreensão do processo de reparo ósseo é parte fundamental da cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial. A esta especialidade odontológica cabe a reconstrução dos defeitos dos ossos faciais resultantes de ressecção de condições patológicas, trauma, infecções e deformidades congênitas (JIANG et al., 2009). Reconstruções bem sucedidas de defeitos ósseos bucomaxilofaciais são possíveis devido aos avanços no entendimento da fisiologia óssea juntamente com o aprimoramento das técnicas cirúrgicas (PETERSON et al., 2005), estas devem promover o estabelecimento de mecanismos biológicos reparadores, evoluindo para o reestabelecimento da função do tecido lesado (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000; FINI et al., 2002; PETERSON et al., 2005).

Muitos estímulos biológicos, químicos e físicos vêm sendo testados com o objetivo de influenciar positivamente o crescimento, a remodelação e o reparo ósseo (FINI et al., 2002). Dentre estes, destacam-se os estudos que avaliam a estimulação de campos eletromagnéticos e magnéticos em relação a seus efeitos em níveis tecidual, celular e molecular (FINI et al., 2002; AARON et al., 2004; PURICELLI et al., 2006; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009). O sepultamento de magnetos conceituado por Puricelli e colaboradores (PURICELLI et al., 2006; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009) consiste na aplicação do campo magnético sepultado no interior dos tecidos, diretamente ativo na área de interesse e será objeto de estudo do presente trabalho. Outro recurso bastante utilizado com o intuito de promover e guiar a reparação óssea é a utilização de biomateriais como substitutos ósseos. Esses atuam, ainda, de forma a reduzir a morbidade de determinados procedimentos, uma vez que a opção por sua utilização pode eliminar a necessidade de abordagem de um segundo sítio cirúrgico, o que é necessário para os enxertos ósseos autógenos. A utilização de outros tecidos do organismo, como a cartilagem, também é uma opção nas reconstruções bucomaxilofaciais. Este tecido, assim como o tecido ósseo, pode ser de origem autógena, alógena ou xenógena (PURICELLI, 2002; CORSETTI; LEITE, 2008).

A utilização de modelos animais para o estudo de intervenções visando acelerar o reparo ósseo e restabelecer forma e função deste tecido tem se mostrado

pertinente (FAGUNDES; TAHA, 2004). Diversos estudos utilizam a calvária de ratos para avaliação do reparo ósseo através de defeitos ósseos experimentais. São utilizados defeitos ósseos críticos, com tamanho pré-determinado, que impossibilitam o reparo espontâneo durante todo o período experimental (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; FURLANETO et al., 2007; MESSORA et al., 2008a). Tal conceito tem o objetivo de avaliar o real potencial osteogênico de um estímulo. Como método de quantificação e comparação dos tecidos presentes nos cortes histológicos, a histomorfometria é amplamente utilizada (FINI et al., 2002; PRYOR et al., 2005a; FURLANETO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Pode-se utilizar também métodos como a imunistoquímica, que possibilita uma avaliação histológica específica, através da utilização de anticorpos como marcadores celulares (MATSUBARA et al., 2008; JIANG et al., 2009).

Na literatura que estuda os efeitos de tratamentos com a utilização de campos magnéticos há uma carência de metodologias apuradas para avaliar o real potencial deste estímulo no reparo tecidual. Além disso, a inexistência de estudos que utilizam metodologias semelhantes dificulta a comparação dos resultados encontrados. A literatura existente ainda é insuficiente na determinação da forma mais eficaz de aplicação de estimulação magnética e das intensidades de campo para a geração de estímulo suficiente. Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que vem evoluindo no entendimento da influência do campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo e reparo ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo composto por células e matriz extracelular. A matriz extracelular do tecido ósseo é caracterizada por uma porção mineral, constituída de fosfato de cálcio, sob forma de cristais de hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – associados à matriz orgânica. Esta, no osso maduro, contém 85% de colágeno tipo I, o restante é composto por líquido intersticial e moléculas não colágenas, como fosfoproteínas, Gla-proteínas (osteocalcina), glicoproteínas acídicas (osteonectina), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea, proteoglicanas/glicosaminoglicanas, proteínas séricas, lipídios e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada ligadora de cálcio e sua expressão está associada à regulação do processo de mineralização do tecido ósseo. A OPN pode ser evidenciada em células ósseas (osteoblastos e osteócitos) e em células osteoprogenitoras em proliferação e diferenciação (JÄGER et al., 2008). Ainda, podemos encontrar expressão da OPN em osteoclastos, condrócitos, macrófagos, células da musculatura lisa e células epiteliais; e em vários tecidos e órgãos como osso, dentina, cimento, cartilagem hipertrófica, rins, placenta, músculo liso e epitélio secretor (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; CHOI et al., 2004; COHEN JR; 2006).

As células do tecido ósseo secretam OPN fisiologicamente durante o processo de remodelação, os osteoclastos podem ser a fonte desta proteína durante a remodelação óssea. A função da OPN nos osteoclastos pode estar associada à adesão e sinalização celular durante a reabsorção óssea. Encontramos expressão da OPN em osteoblastos, em vários estágios de diferenciação, e na matriz extracelular mineralizada durante as ossificações intramembranosa e endocondral. (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; CHOI et al., 2004; COHEN JR; 2006).

A matriz óssea mineralizada é coberta por duas membranas não calcificadas, de natureza conjuntiva. Estas possibilitam uma gradual relação entre o tecido mineralizado e o restante do organismo. Cobrindo a superfície óssea externa está o perióstio. No perióstio ativo, envolvido em fenômenos de reparação e remodelação, a camada de células indiferenciadas é bem mais evidente sendo que suas células

mais internas estão em processo de ativação ou apresentam-se constituindo osteoblastos ativos. Revestindo a superfície interna do osso, as cavidades de osso esponjoso, os canais de Havers e de Volkmann e as cavidades medulares encontra-se o endóstio composto por uma camada contínua e geralmente única de osteoblastos e/ou células de revestimento ósseo (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

As células ósseas mantêm a sua capacidade funcional por toda a vida. A origem mesenquimal dessas células faz com que por intermédio da ativação da camada osteogênica do perióstio, do endóstio, da medula óssea e ainda da invasão do sítio lesado por capilares, tenhamos uma disponibilidade constante de células capazes de responder pela regeneração e remodelação do tecido ósseo (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

Os eventos que ocorrem durante a cicatrização de lesões em tecidos moles – inflamação, fibroplasia e remodelação – também ocorrem durante a reparação óssea (PETERSON et al., 2005). Após a lesão óssea, e pela ação das BMPs, ocorre a diferenciação das células do perióstio e endóstio em osteoblastos, que vão depositar uma matriz óssea a uma velocidade de 50 $\mu\text{m}/\text{dia}$. Esta matriz é mais celular, com menor teor mineral e apresenta suas fibras de colágeno dispostas aleatoriamente, formando o tecido ósseo imaturo ou primário. Após este padrão preencher a lesão e restabelecer a continuidade tecidual, a remodelação ocorrerá pela ação conjunta de osteoblastos e osteoclastos, que formarão uma matriz óssea mais organizada, a uma velocidade de 1 $\mu\text{m}/\text{dia}$. Esta matriz é menos celular, com maior teor mineral, com fibras colágenas dispostas paralelamente, formando lamelas que vão definir as trabéculas do osso medular ou os sistemas de Havers, lamelas circunferenciais e intersticiais do osso compacto (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

O tecido fibroso que se forma no local do reparo ósseo necessita de alto grau de vascularização, para que a ossificação ocorra. Quando há comprometimento desse suprimento pode não ocorrer a ossificação. Além disso, o osso necessita de alguma tensão para estimular a contínua formação osteoblástica (PETERSON et al., 2005). O osso se forma perpendicularmente às linhas de tensão para resistir às forças exercidas sobre ele (TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

2.2 Magnetismo e reparo ósseo

O magnetismo é um fenômeno que existe espontaneamente na natureza, especificamente em estruturas chamadas ferro-magnéticas, que possuem forças de atração e repulsão localizadas em suas extremidades ou pólos (CONSTANTINO et al., 2007). O pólo norte é aquele do qual as linhas de campo magnético emergem do ímã para o espaço circunjacente, penetrando novamente o ímã pelo pólo sul (HALLIDAY, 1994).

Os principais campos magnéticos estudados são os eletromagnéticos e os magnéticos. Os mecanismos de atuação desses estímulos sobre os tecidos são diferentes: os primeiros criam um campo de imantação gerado pela corrente elétrica, enquanto os últimos resultam de um campo magnético originado por ímãs (BRUCE; HOWLETT; HUCKSTEP, 1987). Os campos eletromagnéticos podem ser gerados por meio de um solenóide metálico acoplado e conectado a um gerador de pulsos. Quando o gerador é ligado, há a passagem de corrente elétrica estabelecendo um campo magnético entre as espiras do solenóide (DUTRA, 2005). Há evidência que os efeitos biológicos dos campos eletromagnéticos são efetivos na formação óssea alterando a permeabilidade iônica da membrana celular (AARON et al., 2004; FREDERICKS et al., 2003; SHARRARD, 1990; YAN; TOMITA; IKADA, 1998).

Além dos campos eletromagnéticos, podemos encontrar na natureza os campos magnéticos gerados por magnetos (ímãs), chamados de campos magnéticos estáveis e espontâneos. Os magnetos podem ser constituídos de diferentes materiais, com influência direta sobre suas propriedades, sendo os mais comuns e amplamente utilizados os compostos por samário-cobalto e por neodímio-ferro-boro. Os campos magnéticos comumente usados na medicina são de baixa intensidade, 5-100 gauss (G). A eficiência dos tratamentos propostos com ímãs naturais depende de alguns parâmetros: intensidade do campo, dimensão do magneto, superfície do corpo em contato com o magneto e tempo de exposição ao campo (CONSTANTINO et al., 2007).

Campos magnéticos podem ser aplicados interna ou externamente ao organismo. Estudos relacionados à aplicação de campos magnéticos estáticos nos tecidos evidenciaram diversos efeitos. A penetração do campo magnético através da pele gera estímulos no ferro presente na hemoglobina, influenciando o transporte de oxigênio (CONSTANTINO et al., 2007). No tecido ósseo, o campo magnético parece

provocar estímulo à osteogênese através da ativação de osteoblastos e aumento de aporte sanguíneo (PURICELLI et al., 2006; CONSTANTINO et al., 2007; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009). Além disso, resultados sugerem que o campo magnético aumenta a concentração de fatores de crescimento, fato que acelera o processo de reparação óssea (AARON et al., 2004).

Camilleri e McDonald, em 1993, propuseram a utilização de magnetos de neodímio-ferro-boro fixados com cianoacrilato à calvária de roedores, a fim de estudar os efeitos deste campo magnético estático. Os autores sugeriram que o mesmo afetou a atividade mitótica celular.

Yan, Tomita e Ikada (1998), por meio da utilização de ímãs sepultados em fêmures de ratos gerando um campo magnético de 1800 G sugeriram que o campo magnético é capaz de influenciar positivamente o metabolismo do reparo ósseo, devido a observação de maior quantidade de cálcio e densidade mineral nos fêmures dos animais sob campo magnético.

Kotani e colaboradores (2002) investigaram os efeitos de campo magnético de alta intensidade (80000 G) na formação óssea utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*. Demonstraram, *in vitro*, a orientação dos osteoblastos paralelamente à direção do campo magnético enquanto as células não expostas ao campo dispuseram-se aleatoriamente. Alterações na proliferação celular não foram observadas, apesar disso, evidenciaram, também *in vitro*, regulação positiva do magnetismo na diferenciação celular e na síntese de matriz. *In vivo*, observaram formação óssea ectópica, orientada paralelamente ao campo magnético, por meio da implantação de BMP-2 em tecido subcutâneo de camundongos. Os autores ainda sugeriram a aplicação da formação óssea guiada por campo magnético no tratamento de fraturas e de defeitos ósseos.

O sepultamento de magnetos conceituado por Puricelli e colaboradores (PURICELLI et al., 2006; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009) avaliou histologicamente defeitos ósseos de 2 mm em fêmures de ratos. Os autores descreveram maior formação óssea no grupo em que foi aplicado um campo magnético de 40 G, presente através de arruelas de aço inoxidável martensítico e parafusos de titânio. Sugeriram que o campo magnético criado foi capaz de acelerar o processo de reparo ósseo tanto do defeito ósseo sem reconstrução quanto do defeito preenchido com enxerto ósseo autógeno.

Um ensaio clínico realizado por Bruce, Howlett e Huckstep (1987), demonstrou que a utilização de magnetos compostos por neodímio-ferro-boro se mostrou eficaz como coadjuvante no tratamento de fraturas envolvendo mão e punho. A aplicação extra-corpórea de campo magnético com intensidade de 12.000 G, em pacientes com esse tipo de fratura, acelerou a formação do calo ósseo permitindo uma redução de cerca de 35% no tempo normal de imobilização destas fraturas.

Com o entendimento da atividade celular envolvida no processo de reparação óssea, metodologias envolvendo estímulos como campos magnéticos e eletromagnéticos (YAN; TOMITA; IKADA, 1998; FREDERICKS et al., 2003; PURICELLI et al., 2006; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009) têm sido empregadas com o propósito de influenciar este processo, aumentando a velocidade e qualidade do reparo. No entanto, a utilização de metodologias diferentes dificulta uma comparação dos resultados encontrados. Além disso, não está estabelecido na literatura conformações ou intensidades de campo magnético que podem ser mais efetivos na estimulação dos tecidos (SCHWENGBER, 2009).

2.3 Recursos para reconstrução óssea

O material utilizado para substituir a porção óssea afetada pode atuar no osso receptor por meio de três mecanismos biológicos, dependendo de sua origem e composição: osteocondução, osteoindução e osteogênese (RABIE; LIE KEN JIE, 1996; LEE, 1997). Os enxertos ósseos autógenos apresentam essas três propriedades, por isso, continuam sendo considerados o padrão-ouro nas reconstruções ósseas. No entanto, apresentam limitações importantes como a morbidade cirúrgica, a limitação de quantidade de enxerto e a reabsorção irregular no leito receptor. Dessa forma, a busca por materiais capazes de substituir o tecido ósseo e promover adequada reconstrução anatômica após traumas e cirurgias ablativas é constante (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Biomateriais são materiais biocompatíveis empregados na substituição, temporária ou permanente, de partes do corpo humano. O objetivo das pesquisas sobre biomateriais é o desenvolvimento de substâncias que induzam reparo de forma rápida, controlada, guiada e previsível (BRUNSKI; PULEO; NANJI, 2000). Os biomateriais podem ser classificados pelo tipo de resposta biológica que induzem

nos tecidos aos quais são implantados, sendo classificados como biotolerados, bioinertes e bioativos. Os diferentes níveis de biocompatibilidade reforçam o fato de que nenhum material é completamente aceito pelo organismo do receptor (SYKARAS et al., 2000). Dessa forma, os materiais empregados na substituição de osso devem apresentar propriedades físicas, químicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos do hospedeiro. Estas propriedades, responsáveis por não desencadearem uma reação de corpo estranho por parte do organismo, caracterizam a biocompatibilidade (KAWACHI; BERTRAN, 2000; CORSETTI, 2005; CORSETTI; LEITE, 2008).

Uma característica singular do tecido ósseo é sua capacidade de promover o reparo, formando um novo tecido altamente organizado a exemplo da estrutura original. Porém, esta capacidade é limitada pela extensão do dano. Assim, defeitos ósseos extensos configuram um desafio na Odontologia uma vez que não são capazes de reparo espontâneo, necessitando de técnicas auxiliares para seu tratamento (AOKI, 1991). Inúmeros materiais sintéticos foram desenvolvidos nos últimos anos com esta finalidade, sendo a hidroxiapatita (HA) um dos mais amplamente estudados (BURG; PORTER; KELLAM, 2000), principalmente devido a sua importante propriedade de osteocondução e sua capacidade de promover uma interação direta com o tecido ósseo, sendo classificada como bioativa (LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DACULSI, 2004; CORSETTI; LEITE, 2008). Por possuir similaridade química com a fase mineral dos tecidos ósseos, a hidroxiapatita é um dos materiais mais biocompatíveis conhecidos, permitindo a proliferação de fibroblastos, osteoblastos e outras células ósseas (AOKI, 1991).

A porosidade deste material também pode ser entendida como parte fundamental de sua interação com o organismo. Os poros fornecem local para o tecido ósseo crescer e fixar o implante biologicamente (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005). A porosidade do biomaterial influencia no processo de absorção do mesmo e sua substituição por tecido ósseo. Acredita-se que o tamanho ideal dos poros de um biomaterial seja semelhante ao do osso esponjoso que ainda permanece como padrão-ouro nas reconstruções ósseas (GAUTHIER et al., 1999).

Além dos biomateriais outros tecidos do organismo podem ser usados como alternativas ao uso de enxertos ósseos autógenos. A cartilagem é um exemplo de tecido que pode ser usado para reconstruções na área bucomaxilofacial (BERCINI, 1991). Os enxertos de cartilagem, a exemplo dos enxertos ósseos, podem ser

classificados como: autoenxertos, quando doador e receptor são o mesmo indivíduo; aloenxerto quando doador e receptor são indivíduos diferentes, porém da mesma espécie; e xenoenxertos quando doador e receptor são indivíduos de espécies diferentes (PURICELLI; BERCINI, 1992).

A cartilagem é uma forma especializada de tecido conjuntivo composto por uma densa malha de fibras colágenas e elásticas, associadas a macromoléculas de proteoglicanas, ácido hialurônico e glicoproteínas. O tecido cartilaginoso maduro possui células, conhecidas como condrócitos, que podem ocorrer isolados ou agrupados nas lacunas da matriz cartilaginosa. Diferente dos outros tecidos conjuntivos, a cartilagem não possui vasos sanguíneos ou nervos, estes encontram-se no pericôndrio, membrana de tecido conjuntivo denso irregular que reveste a cartilagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; TORTORA; GRABOWSKI, 2002).

Enxertos de cartilagem são frequentemente utilizados em reconstrução do pavilhão auricular (KARIMI-YAZDI et al., 2007), em timpanoplastia (CAVALIERE et al., 2009), na reconstrução de defeitos faciais de pacientes fissurados (MOKAL; KALE, 2009), na reconstrução de assoalho de órbita pós-trauma (MENDONÇA et al., 2009), na correções de deformidades nasais (SOUZA et al., 2008), em reconstrução traqueal (SHI et al., 2009), em cirurgias ortopédicas de joelho (MCNICKLE et al., 2009) e coluna vertebral (LUK; RUAN, 2008).

No organismo há o processo de ossificação endocondral, responsável pela formação de ossos longos, vértebras e costelas. Na ossificação endocondral do tecido ósseo ocorre a substituição da cartilagem por osso através de mecanismos de morte celular programada (apoptose) dos condrócitos e calcificação da matriz cartilaginosa (BERCINI, 1991; KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

A utilização de enxerto de cartilagem apresenta algumas vantagens se comparadas ao enxerto ósseo: facilidade de modelar a forma desejada, ser não dependente de suprimento vascular para sua sobrevivência, possuir taxa de reabsorção geralmente menor do que a do osso. Apresentam também algumas desvantagens como pouca resistência a pressão e tendência a encurvamento (BERCINI, 1991; PURICELLI; BERCINI, 1992).

Dentre os enxertos autógenos, os obtidos de cartilagem são os menos vascularizados, o que aumenta a sua sobrevida. Esta particularidade torna os enxertos cartilaginosos uma boa opção em reconstruções bucomaxilofaciais (MENDONÇA et al., 2009).

2.4 Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo

Métodos que permitem avaliação do metabolismo do tecido ósseo de forma dinâmica tem sido cada vez mais utilizados, viabilizando o diagnóstico precoce de patologias ósseas (VIEIRA, 1999). Marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo podem ser empregados na prática clínica com a finalidade de se obter informações sobre a formação ou a reabsorção ósseas. A formação óssea é dependente da ação dos osteoblastos, portanto, os marcadores de formação medem produtos decorrentes da ação destas células. Da mesma forma, os marcadores de reabsorção medem a ação dos osteoclastos, células envolvidas na reabsorção da matriz óssea (GUYTON, 1989; SEIBEL, 2006).

Durante o processo de formação óssea, a produção da matriz colágena precede a mineralização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995; KATCHBURIAN; ARANA, 2004). A fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina, enquanto a mineralização coincide com uma maior produção de osteopontina. A secreção de matriz óssea pelos osteoblastos ativa muitas enzimas que são difundidas pela corrente sanguínea, permitindo a dosagem da atividade da enzima fosfatase alcalina no sangue ou no plasma sanguíneo (LEUNG et al., 1993; ROY, 1970). Dessa forma, a enzima é considerada um bom indicador do índice de formação óssea, podendo ser empregada como marcador periférico do metabolismo ósseo (GUYTON, 1989).

A fosfatase alcalina é uma ectoenzima encontrada na superfície externa dos osteoblastos onde exerce sua atividade. É produzida em várias regiões do organismo, incluindo ossos, fígado e intestinos, e é encontrada normalmente no sangue de indivíduos sadios (VIEIRA, 1999). As concentrações plasmáticas da fosfatase alcalina podem aumentar sempre que aumentar a atividade das células ósseas, por exemplo, durante o período de crescimento ou depois de uma fratura (YUE et al., 2005). Variam também como resultado de doenças ósseas, como a osteomalacia, o câncer ósseo, e a doença de Paget (SARAIVA; CASTRO, 2002).

Por meio do método bioquímico de avaliação do metabolismo ósseo podemos ainda estudar fatores que possam estimular o processo de reparo ósseo em sua etapa reabsortiva. Como marcadora de reabsorção óssea, a atividade da enzima fosfatase ácida pode complementar o entendimento dos fenômenos que ocorrem

durante reparo ósseo (YAN; TOMITA; IKADA, 1998; CALCAGNOTTO, 2009; SCHWENGBER, 2009).

A fosfatase ácida é uma enzima lisossômica presente primariamente no osso, na próstata, nas plaquetas, nos eritrócitos e no baço. Como a fosfatase ácida total, apresenta diferentes isoenzimas, os métodos de dosagem sérica devem ser capazes de realizar a separação da fração óssea deste marcador. Das suas cinco isoenzimas, a isoforma óssea é tartrato resistente, portanto a atividade da enzima fosfatase ácida tartrato resistente é a utilizada para marcação bioquímica de reabsorção óssea. Existem ensaios para sua determinação no plasma e no soro, sendo os níveis séricos usualmente mais altos que os plasmáticos devido à liberação da fosfatase ácida dos eritrócitos durante a coagulação. Sua mensuração reflete mais o número do que a atividade dos osteoclastos (VIEIRA, 1999; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Os meios dinâmicos de avaliação do metabolismo ósseo como a mensuração da atividade das enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina podem auxiliar no entendimento dos fenômenos que se estabelecem no tecido ósseo após reconstrução com enxertos ou biomateriais (VIEIRA, 1999).

2.5 Modelo animal e métodos de avaliação do reparo ósseo

A utilização de animais em procedimentos de pesquisa é bastante antiga e vem evoluindo juntamente com a própria ciência (FAGUNDES; TAHA, 2004). As pesquisas relacionadas a reparo ósseo utilizaram diferentes animais com defeitos ósseos experimentais localizados principalmente em calvária. Outros sítios estudados incluem fêmur (YAN; TOMITA; IKADA, 1998; PURICELLI et al., 2006; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009), mandíbula (SOCCOL et al., 2006), maxila (PARIS, 2002) e tíbia (ANBINDER et al., 2006). Observa-se a utilização mais freqüente de ratos (AALAMI et al., 2004; PRYOR et al., 2005a; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006; FURLANETO et al., 2007; MARZOUK et al., 2007; MESSORA et al., 2008b), mini-porcos (GOSAIN et al., 2000; RUPPRECHT et al., 2003), coelhos (CLOKIE et al., 2002; HADDAD et al., 2006; ASCHERMAN et al., 2008) e ovelhas (GOSAIN et al., 2004).

Apesar da grande variedade de modelos animais já descritos e da predileção pelo rato, todos os modelos de estudo têm a preocupação em utilizar a melhor

metodologia para avaliar a intervenção proposta. Neste sentido, Schmitz e Hollinger, (1986), propuseram o conceito de “defeito ósseo crítico”. Segundo os autores, quando um estímulo é estudado em um modelo animal, o defeito ósseo criado deve ser grande o suficiente para não permitir um reparo espontâneo ao longo da vida do animal, possibilitando a avaliação do real efeito osteogênico da intervenção realizada. Em um defeito de tamanho crítico sem a presença de um enxerto ou implante, o reparo tecidual ocorrerá através da formação de tecido conjuntivo fibroso ao invés de ósseo. Posteriormente, Gosain e colaboradores (2000), propuseram uma reavaliação no conceito de defeito ósseo crítico. Os autores consideraram que a maioria dos estudos não se estende ao longo de toda a vida do animal, portanto, propuseram como defeito de tamanho crítico aquele que, durante a vigência do estudo e não mais durante toda a vida do animal, não sofra reparação completa e espontânea.

Paralelamente ao benefício da realização de estudos com períodos experimentais reduzidos, propostos pela reavaliação de defeito crítico, a possibilidade de redução do tamanho destes defeitos ósseos cirurgicamente criados trouxe vantagens como a menor morbidade para os animais envolvidos no modelo experimental e a manutenção de margens de segurança do defeito em relação a estruturas vitais, como vasos e nervos (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998). Neste sentido, é importante considerar que no momento da realização do defeito ósseo na calvária deve-se ter o cuidado de manter a integridade da dura-máter. Esta encontra-se imediatamente abaixo da estrutura óssea, sendo extremamente vulnerável a traumatismos com o uso de instrumentos rotatórios. Tal meninge é a principal responsável pela irrigação sangüínea do crânio e seu dano pode causar prejuízos ao processo reparador, comprometendo os resultados experimentais obtidos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; AALAMI et al., 2004; ASCHERMAN et al., 2008).

A metodologia empregada para a avaliação dos resultados obtidos com a utilização de estímulos ao reparo ósseo envolve principalmente o uso da histomorfometria (CLOKIE et al., 2002; HADDAD et al., 2006; FURLANETO et al., 2007; MARZOUK et al., 2007; MESSORA et al., 2008b; CALCAGNOTTO, 2009; SCHWENGBER, 2009). Trata-se de uma técnica histológica que possibilita a quantificação dos diferentes tecidos presentes em determinada área do corte histológico. A descrição histológica dos achados sem a quantificação dos diferentes

tecidos também foi utilizada por alguns estudos (INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2007; PURICELLI et al., 2006; ASCHERMAN et al., 2008; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009). A análise radiográfica da área do defeito ósseo também foi empregada em diversos trabalhos (CLOKIE et al., 2002; AALAMI et al., 2004; PRYOR et al., 2005b; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006; MARZOUK et al., 2007). No entanto, Pryor, Susin e Wikesjo (2006) demonstraram que tal análise pode revelar discordância com a observação histológica, esta considerada o padrão-ouro, não recomendando a avaliação exclusiva dos resultados com base em achados radiográficos. Os resultados obtidos com a utilização de estímulos ao reparo ósseo podem ainda ser avaliados por meio da imunistoquímica, método que baseia-se na reação imunológica antígeno-anticorpo, permitindo uma avaliação histológica específica através da utilização de anticorpos como marcadores celulares (MATSUBARA et al., 2008; JIANG et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar, em diferentes tempos experimentais, a influência ou não da estimulação de campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo em calvária de ratos após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar histomorfometricamente o reparo ósseo, sob a influência de campo magnético sepultado, gerado pela implantação de dois ímãs permanentes adjacentes ao defeito ósseo cirurgicamente criado em calvária de ratos e reconstruído com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem, e compará-lo com o reparo sem estímulo magnético;

b) avaliação imunoistoquímica, no tempo pós-operatório de 60 dias, da expressão da proteína osteopontina durante o reparo ósseo, sob a influência de campo magnético sepultado, gerado pela implantação de dois ímãs permanentes adjacentes ao defeito ósseo cirurgicamente criado em calvária de ratos e reconstruído com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem, e compará-la com a expressão da mesma proteína durante o reparo sem estímulo magnético;

c) realizar mensuração bioquímica das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida após o reparo ósseo, sob a influência ou não de campo magnético sepultado, gerado pela implantação de dois ímãs permanentes adjacentes ao defeito ósseo cirurgicamente criado em calvária de ratos e reconstruído com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo e modelo de estudo

O presente trabalho é um estudo experimental em animais, cego, controlado e randomizado e foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional quantitativo.

4.2 Considerações éticas

Este estudo observou as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme Código Estadual de Proteção aos Animais (Anexo A) e Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA (Anexo B) e foi submetido a parecer do Comitê de Ética em Pesquisa sendo aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA (Projeto nº 10-0307).

4.3 Locais de realização

A etapa cirúrgica do presente trabalho foi realizada na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os procedimentos histológicos para confecção das lâminas foram realizadas nos Laboratórios de Histopatologia “Prof. Dr. J.J. Barbachan” da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Patologia Experimental do HCPA-UFRGS. As análises bioquímicas foram realizadas na Unidade de Análises Moleculares e de proteínas (UAMP) do HCPA-UFRGS. Os cálculos da intensidade do campo magnético foram realizados no Laboratório de Magnetismo do Instituto de Física da UFRGS. As tomadas radiográficas do estudo foram realizadas no Laboratório de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

4.4 Hipótese

A presença de campo magnético sepultado adjacente a área de defeito ósseo estimula e favorece o processo de reparo ósseo, após reconstrução com enxerto

ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita sintética e enxerto alógeno de cartilagem.

4.5 Cálculo amostral

O tamanho da amostra foi estimado utilizando o comando de cálculo para duas médias de grupos independentes do programa estatístico G*Power 3, atribuindo-se valores de 5% e 80% para nível de significância e poder da amostra, respectivamente. O desfecho primário considerado para a estimativa do número de animais necessário para a realização do estudo foi o percentual de preenchimento ósseo. Considerando os dados de Schwengber (2009), preenchimentos de 46% e 20% nos grupos enxerto autógeno com imã e somente enxerto, respectivamente, foram utilizadas para o cálculo amostral, com desvios-padrão de 12,0 e 5,0. Foi estimada a necessidade de 4 animais por grupo para cada tempo experimental. Considerando possível perda de animais, foram incluídos 5 animais por grupo.

4.6 Grupos de estudo e delineamento experimental

Foram utilizados 95 ratos linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) do sexo masculino com 7 a 8 semanas de idade e apresentando em média 300 g de massa corporal. Todos os grupos foram compostos por 5 ratos cada. Os tempos de morte estabelecidos foram de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Foram implantados dois ímãs permanentes ou dispositivos metálicos adjacentes ao defeito ósseo criado cirurgicamente na calvária dos ratos, submetidos a procedimentos de reconstrução com distintos enxertos/materiais:

- a) reconstrução com enxerto ósseo autógeno;
- b) reconstrução com implante de hidroxiapatita granulada sintética;
- c) reconstrução com enxerto alógeno de cartilagem.

Os grupos envolvidos no presente estudo e suas composições estão explicitados na Tabela 1, os animais foram sorteados visando distribuição aleatória nos grupos experimentais.

Tabela 1 – Distribuição dos animais nos diferentes grupos de estudo.

Intervenção Morte	OA	OA+ Í	HA	HA + Í	CT	CT + Í	Naive
	15 dias	5	5	5	5	5	5
30 dias	5	5	5	5	5	5	5
60 dias	5	5	5	5	5	5	

Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

OA. Enxerto ósseo autógeno sem influência de campo magnético; **OA + Í.** Enxerto ósseo autógeno sob influência de campo magnético; **HA.** Implante de hidroxiapatita granulada sintética sem influência de campo magnético; **HA + Í.** Implante de hidroxiapatita granulada sintética sob influência de campo magnético; **CT.** Enxerto alógeno de cartilagem sem influência de campo magnético; **CT + Í.** Enxerto alógeno de cartilagem sob influência de campo magnético; **Naive.** Grupo controle fisiológico da atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida.

Nos grupos que receberam enxerto ósseo autógeno, este consistiu do próprio osso da calota craniana resultante da criação do defeito ósseo de 5 mm de diâmetro com broca trefina. Após a criação do defeito, o enxerto ósseo coletado foi reposicionado em bloco na área a ser reconstruída.

A hidroxiapatita granulada sintética utilizada (HAP 91®) é apresentada como absorvível, porosa e com grânulos obtidos em peneira com malha de 2 mm (Figura 1). Segundo as recomendações do fabricante, o produto pode ser usado diretamente no local desejado.

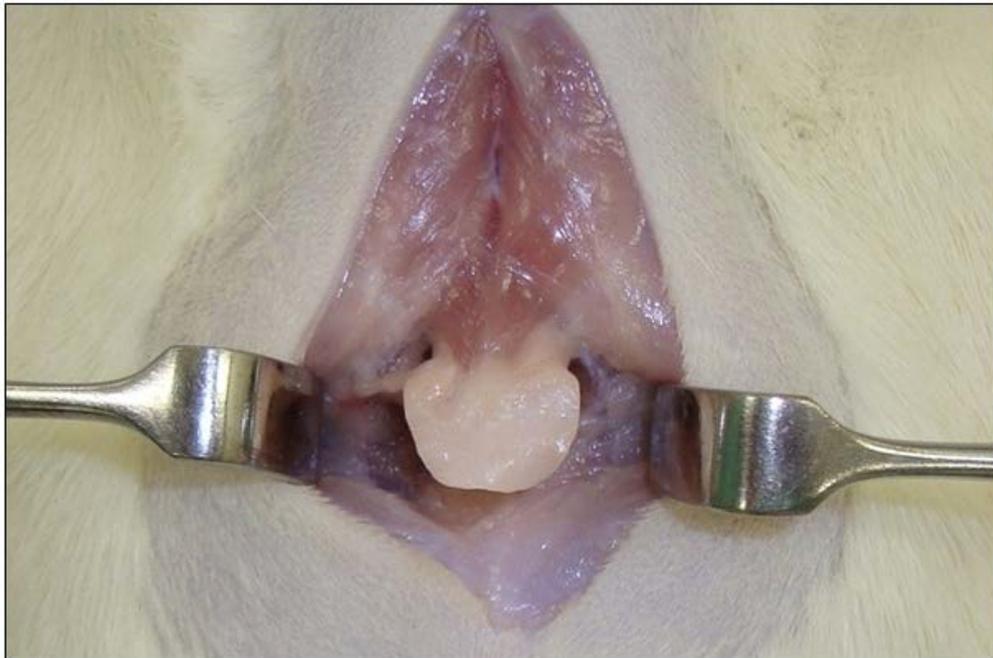
Figura 1 – Apresentação comercial da HAP®, hidroxiapatita granulada sintética utilizada no estudo.



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

O enxerto alógeno de cartilagem foi utilizado segundo protocolo proposto por Vieira e colaboradores (1993), o qual consiste em remoção da cartilagem sem pericôndrio, lavagem com solução fisiológica estéril por 15 minutos e conservação em solução de etanol a 70%, sob refrigeração (2° a 8°C), durante 20 dias. Foi implantado na área do defeito ósseo de forma particulada conforme protocolo utilizado por Puricelli e Bercini (1992). Os animais doadores foram oriundos do grupo Naive, que não sofreu intervenção prévia. Após coleta sanguínea para mensuração da atividade fisiológica das enzimas fosfatase alcalina e ácida, foi realizada remoção de enxerto de cartilagem da região do osso esterno, ilustrado na Figura 2.

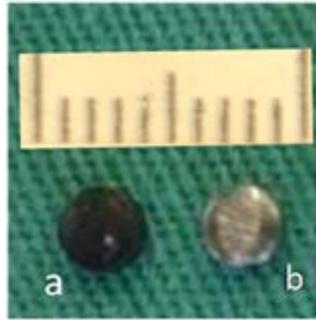
Figura 2 – Grupo Naive. Acesso cirúrgico para remoção da cartilagem do osso esterno.



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

O campo magnético, quando presente, foi gerado por dois ímãs de neodímio-ferro-boro sepultados adjacentes ao defeito ósseo criado. Nas calvárias dos animais dos grupos controle foram utilizados discos de titânio comercialmente puro, para simular a presença dos ímãs, a Figura 3 ilustra os ímãs e dispositivos utilizados no estudo.

Figura 3 – Dispositivos metálicos utilizados no estudo.



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.
a. ímã; b. disco de titânio.

Para assegurar o sepultamento dos ímãs com campo magnético atrativo, e não repulsivo, o pólo norte de todos os magnetos foi demarcado com esmalte branco atóxico e, previamente à inserção, foi realizado teste de atração entre os ímãs. A intensidade de campo magnético no interior do defeito ósseo foi anteriormente mensurada no Laboratório de Magnetismo do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por meio da utilização de um Gaussímetro (Magnet-Physik FH 35, Magnet-Physik Dr. Steingroever GmbH, Alemanha), conforme ilustrado na Figura 4. Todos os magnetos utilizados no estudos foram mensurados e obteve-se o valor de 84,3 G para a média da intensidade de campo magnético presente na região central do defeito ósseo.

Figura 4 – Gaussímetro.



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

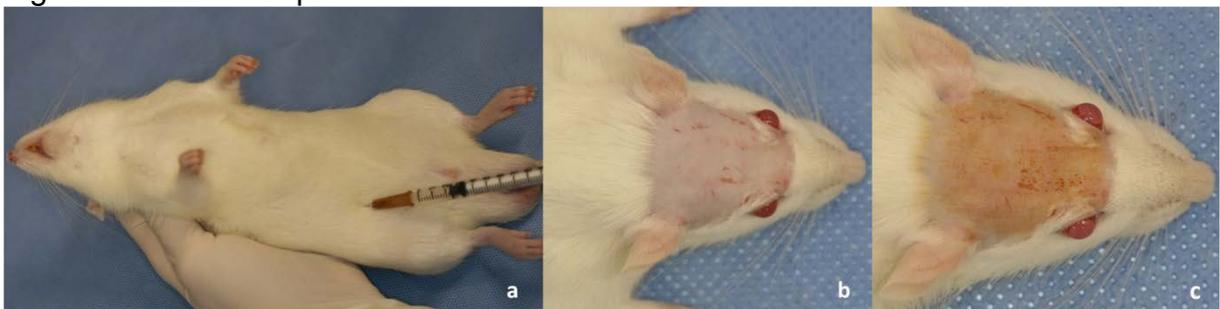
a. Gaussímetro utilizado para mensuração da intensidade do campo magnético; b. e c. Posicionamento do sensor do gaussímetro na região central do defeito ósseo crítico em crânio seco de rato.

4.7 Técnica operatória

Os procedimentos foram realizados seguindo rigoroso padrão de assepsia. Inicialmente, a anestesia dos animais foi supervisionada por médico veterinário

devidamente registrado no Conselho Profissional. Foi realizada a infiltração intraperitoneal de cloridrato de ketamina (Dopalen® injetável) e cloridrato de xilazina (Anasedan® injetável) na dosagem respectiva de 100 mg/kg e 10mg/kg de peso corporal. O animal foi posicionado em decúbito ventral sobre uma superfície rígida e fixa possibilitando a realização de tricotomia na região da calota craniana. A seguir, foi realizada antissepsia com Polivinil Pirrolidona (PVPI) tópico e colocação de campo operatório estéril fenestrado possibilitando acesso à calota craniana, sequência ilustrada na Figura 5.

Figura 5 – Técnica operatória.



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Infiltração intraperitoneal; b. Tricotomia; c. Antissepsia (PVPI).

Foi realizada infiltração local com bupivacaína (Marcaína® 5mg injetável) na dosagem de 2 mg/Kg. O acesso à cortical da calota craniana foi realizado por incisão linear, na linha média, com aproximadamente 1,5 cm, na pele da região, seguida de divulsão tecidual, incisão e descolamento do periósteo. Após exposição do tecido ósseo, foi localizada a sutura óssea fronto-parietal, limite anterior do osso frontal. Neste, foi realizado um defeito ósseo bicortical de 5 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, com broca trefina. Nas direções anterior e posterior do defeito ósseo foram realizadas duas ostectomias transversais de 2 mm de comprimento para sepultamento dos ímãs e fendas de 1 mm na barreira óssea resultante, permitindo maior intensidade de campo magnético no interior do defeito, estas foram confeccionadas com brocas cilíndricas de 2 mm e 1 mm respectivamente, Figura 6.

Figura 6 – Crânio seco de rato.

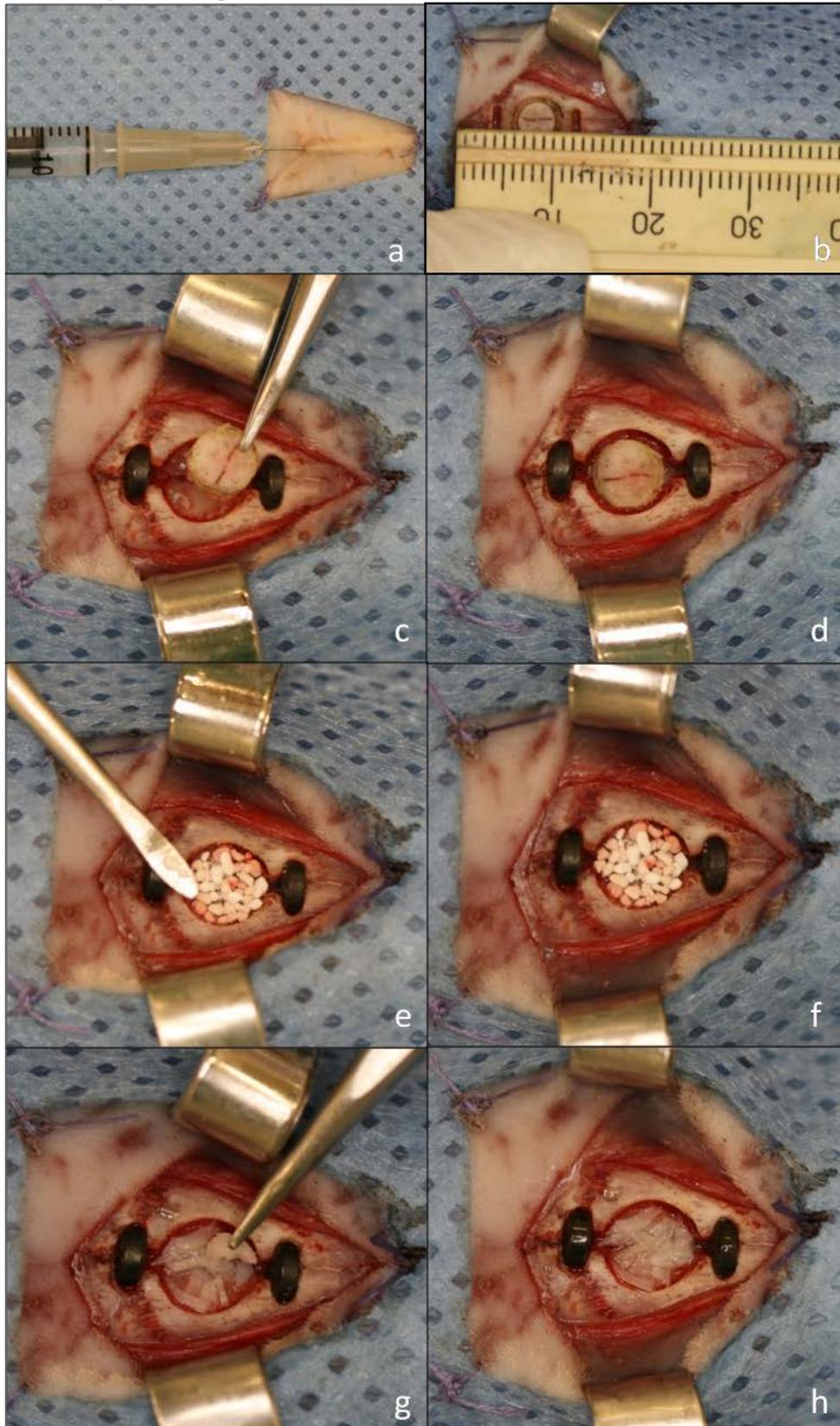


Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Defeito ósseo crítico realizado, note-se as aberturas nas paredes óssea internas para livre passagem do campo magnético; **b.** Posicionamento dos dispositivos utilizados no estudo; **c.** Dimensões do defeito ósseo.

As ostectomias foram realizadas com motor elétrico e sob irrigação constante de água destilada. As lojas para sepultamento dos magnetos sofreram uma solução de continuidade, diferenciando este modelo do utilizado por Calcagnotto (2009) e Schwengber (2009). No interior do defeito ósseo criado foi realizada reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem, evento que diferencia os grupos experimentais, sequência ilustrada pela Figura 7. Após os cuidados com a ferida operatória, foi realizada a sutura a pontos isolados com fio mononylon 5-0. Durante a recuperação anestésica os animais foram colocados em encubadora e receberam ração e água *ad libitum*. A analgesia pós-operatória consistiu na administração de Tramadol (Tramal® injetável) 5mg/Kg no pós-operatório imediato, conforme orientação do médico veterinário. Não foi realizada remoção de sutura. Os animais permaneceram na UEA-HCPA durante os períodos pós-operatórios pré-estabelecidos de 15, 30 e 60 dias. Após esses períodos foi realizada a morte dos animais por decapitação em guilhotina e coleta sangüínea cervical para análise da atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida. Nesta fase, foi realizado novo acesso cirúrgico à calvária já operada, sendo esta removida para realização do preparo histológico da peça.

Figura 7 – Tempos cirúrgicos



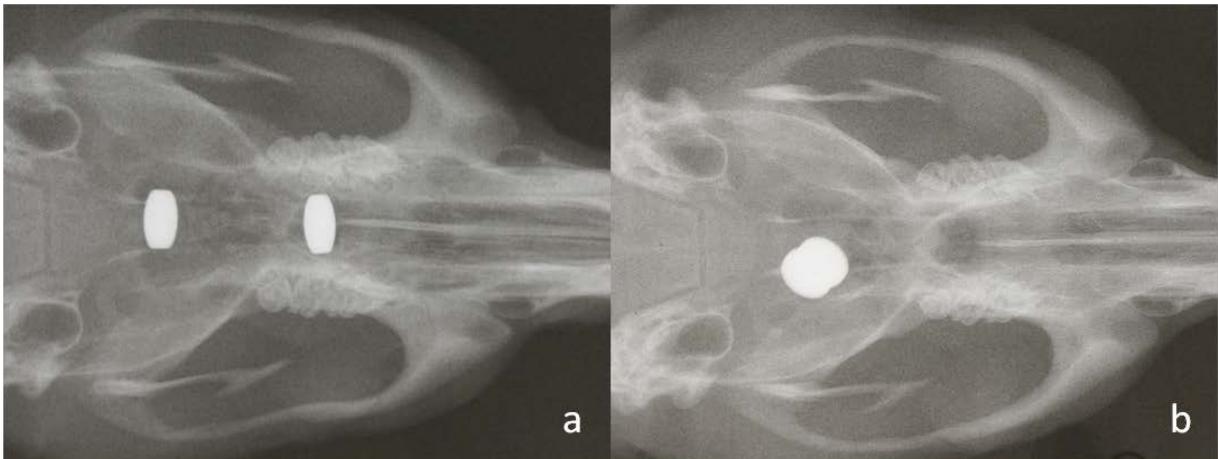
Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Infiltração local com bupivacaína; **b.** Acesso cirúrgico à calvária; **c.** e **d.** Reconstrução com enxerto ósseo autógeno; **e.** e **f.** Reconstrução com implante de hidroxiapatita granulada sintética; **g.** e **h.** Reconstrução com enxerto alógeno de cartilagem.

4.8 Tomadas radiográficas

Radiografias do crânio foram realizadas em todas as amostras coletadas, a fim de verificar a estabilidade dos ímãs e dispositivos metálicos implantados na calvária dos animais. Para a realização das tomadas radiográficas foi utilizado aparelho de raios X odontológico Dabi Atlante Spectro 70X Seletronic®, com regime elétrico de 70 kVp (quilovoltagem) e 8 mA (miliampère) e filme radiográfico periapical Kodak Insight IP-21®. As radiografias obtidas foram reveladas em processadora automática odontológica Revell®. A distância entre foco do aparelho e filme radiográfico foi padronizada em 30,0 cm (CORSETTI, 2005) e o tempo de exposição em 0,1 segundo (PRYOR et al., 2005b; PRYOR; SUSIN; WIKESJO, 2006). O feixe central de raios X foi posicionado superiormente à área de defeito ósseo, perpendicularmente ao centro do mesmo. Nas imagens obtidas foi observada a estabilidade ou não dos dispositivos metálicos implantados (Figura 8).

Figura 8 – Tomadas radiográficas



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

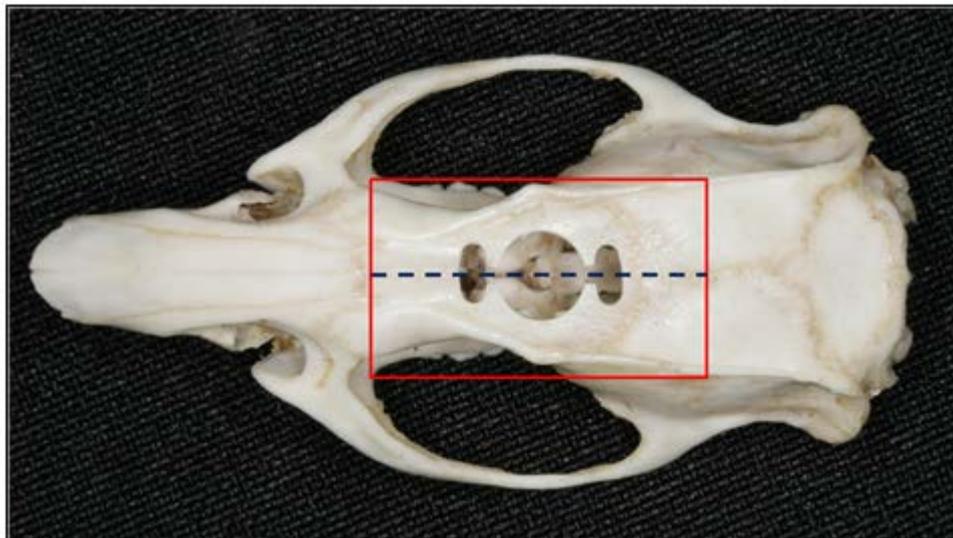
a. Estabilidade dos ímãs; **b.** Deslocamento dos ímãs.

4.9 Preparo histológico e imunoistoquímico

O material de calvária removido foi fixado em formalina neutra tamponada 10%, por 24 horas. Após fixação, as peças foram descalcificadas em uma solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20%, (1:1). Foi realizada cuidadosa remoção dos dispositivos metálicos durante o período de descalcificação sem

danificação da peça. Após a completa descalcificação, foi realizada secção longitudinal mediana da calvária com uso de uma navalha descartável para micrótomos, (Figura 9). Em seguida, as peças foram submetidas ao procedimento usual para inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 4 μm que contemplaram a área central de estimulação magnética, correspondente à área central do defeito ósseo. Uma lâmina histológica foi submetida a coloração de hematoxilina e eosina (HE). Cortes seqüenciais foram capturados em lâminas silanizadas para marcação imunoistoquímica com o anticorpo anti-osteopontina (Anti-Osteopontin antibody, ab8448, Abcam®). Foi realizada recuperação antigênica com a enzima pepsina (Solução de Pepsina, cod 00-3009, Invitrogen Corporation®). Após a titulação do anticorpo anti-osteopontina, optou-se pela diluição de 1:100.

Figura 9 – Obtenção da peça para processamento histológico



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.
A linha pontilhada indica secção longitudinal mediana da calvária.

4.10 Calibração

A calibração intra-examinador foi realizada separadamente para as variáveis histomorfométrica e imunoistoquímica. Após o treinamento do examinador nos dois métodos de análise o mesmo realizou duas mensurações de dez lâminas de cada método, sendo as mensurações separadas por um intervalo de sete dias.

Os valores obtidos para as duas mensurações do período de calibração foram analisados com auxílio do software R, versão 2.9.0, (R Development Core Team,

2010). Para calcular o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) e o intervalo de confiança (IC) foram utilizadas as bibliotecas psy e boot respectivamente.

Os valores de calibração obtidos foram:

- a) para a histomorfometria: ICC de 0,98 e IC de 0,61 a 0,99;
- b) para a imunoistoquímica: ICC de 0,945 e IC de 0,58 a 0,98.

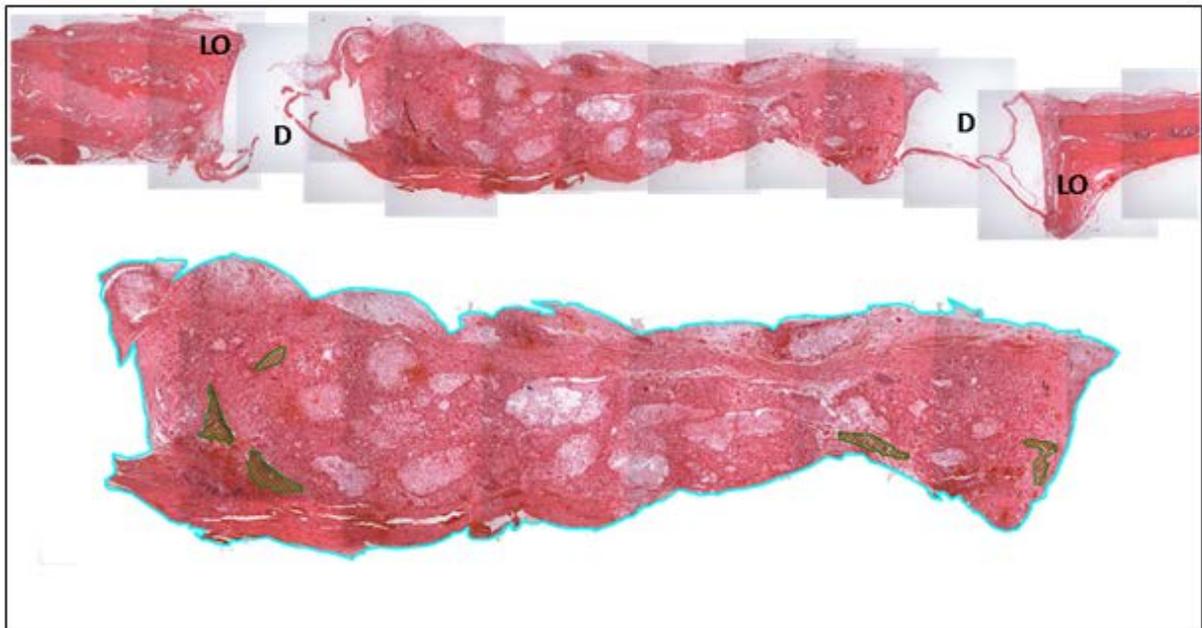
4.11 Análise histomorfométrica

Foram realizados três cortes histológicos por peça, coletados em uma única lâmina. As lâminas foram codificadas para permitir o cegamento do observador quanto à distribuição dos grupos do estudo. O campo histológico analisado envolveu toda a extensão do defeito ósseo, sendo seu limite extremo as bordas do defeito ósseo.

As imagens microscópicas das lâminas histológicas foram capturadas no aumento de 100x (cem vezes), através de uma câmera de vídeo Olympus® (modelo Qcolor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF e a um computador Dell_ (modelo Dimension 5150), utilizando o software Qcapture® (versão 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005). (Equipamento presente no Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J.J.D. Barbacham no setor de Patologia Bucal de FO-UFRGS adquirido com apoio financeiro da FAPERGS, PROAP04/2005 nº do Processo 0410882). As fotomicrografias obtidas foram agrupadas lado a lado utilizando a técnica de mosaico, possibilitando a visualização e mensuração da área total do defeito ósseo. Posteriormente, foram excluídas as imagens externas ao defeito ósseo, permanecendo para análise apenas a porção central do defeito ósseo, Figura 10.

A análise histomorfométrica consistiu na demarcação da área total do defeito ósseo e demarcação das áreas de neoformação óssea no interior do mesmo, obtendo-se o percentual de osso neoformado no interior do defeito ósseo criado. Essas mensurações foram obtidas em Pixel², utilizando o software Axiovision®, versão 4.6.3, (Carl Zeiss Imaging) e transformadas em porcentagem, permitindo a obtenção de valores do percentual de osso neoformado em relação ao defeito original.

Figura 10 – Técnica do mosaico utilizada para agrupar as fotomicrografias



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

LO. Indica limite do defeito ósseo; **D.** Indica posição do dispositivo metálico utilizado (ímã ou disco de titânio); no plano inferior observa-se a imagem obtida para análise histomorfométrica após exclusão das áreas externas ao defeito ósseo crítico criado; a linha azul delimita a área total do defeito ósseo; somatório das áreas hachuradas em verde representam área de neoformação óssea no interior do defeito crítico.

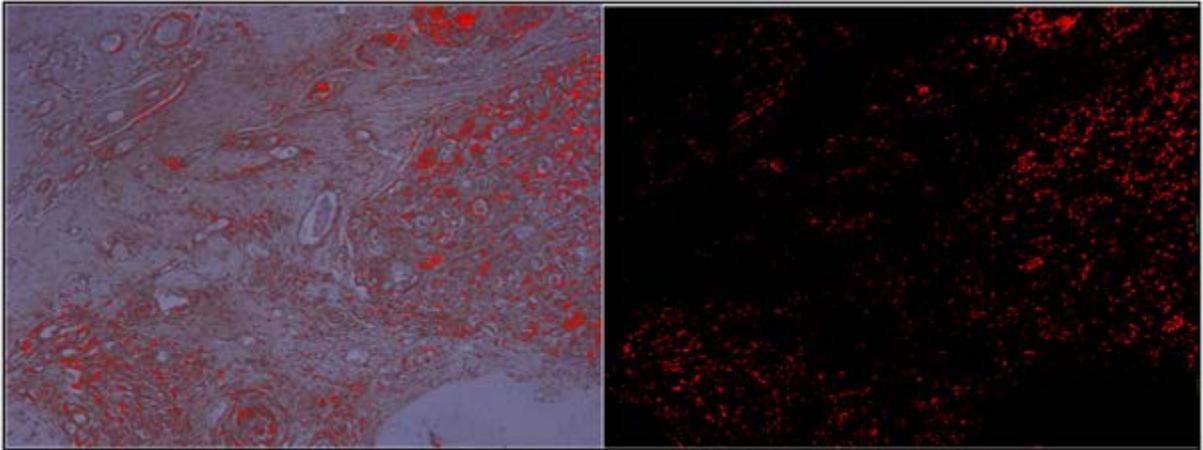
4.12 Análise imunoistoquímica

As lâminas marcadas por imunoistoquímica foram da mesma forma codificadas para manutenção do cegamento do examinador. As imagens microscópicas das lâminas marcadas por imunoistoquímica foram obtidas da mesma maneira já descrita anteriormente para a avaliação histomorfométrica, porém o aumento utilizado para este material foi de 400x (quatrocentas vezes). A análise imunoistoquímica foi realizada em todos os grupos experimentais no tempo pós-operatório de 60 dias. Foram selecionadas duas áreas do defeito ósseo para análise, uma correspondente à região central do defeito ósseo e outra correspondente à extremidade do defeito ósseo adjacente à implantação do ímã/dispositivo não magnético.

A quantificação das lâminas marcadas por imunoistoquímica foi realizada com auxílio do software Image Pro-Plus®, versão 6.0, (Media Cybernetics). Consistiu na seleção, por diferença de coloração, das áreas consideradas marcação positiva,

sendo o resultado obtido o somatório das áreas selecionadas para cada imagem analisada, Figura 11.

Figura 11 – Análise imunohistoquímica: quantificação das lâminas marcadas por imunohistoquímica



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

vermelho: áreas de marcação positiva pelo anticorpo anti-osteopontina antes e após exclusão do fundo da imagem para somatório das mesmas.

4.13 Atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida

A mensuração da atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida foi realizada em todos os animais do estudo. Para estas análises bioquímicas, foram coletados 500 µl de sangue em tubo de ensaio apropriado, por meio de coleta sanguínea cervical, após a decaptação do animal em guilhotina. Após a coleta sanguínea, foi realizada centrifugação do material obtido para obtenção de 50 µl de soro para dosagem da atividade da enzima fosfatase alcalina e a 50 µl de soro para dosagem da atividade da enzima fosfatase ácida. Cada amostra foi codificada para promover o cegamento do laboratorista.

Para a dosagem da atividade da enzima fosfatase alcalina foi utilizado o kit Laboratorial Labtest Catálogo 40 (Labtest Diagnóstica S.A., MG, Brasil), tendo como substrato a timolftaleína monofosfato. A hidrólise desse substrato de éster de ácido fosfórico é realizada pela enzima fosfatase alcalina. Esta reação será cessada pela adição de carbonato de sódio (94 mmol/l) e hidróxido de sódio (250 mmol/l) fazendo com que o produto da hidrólise da timolftaleína monofosfato seja corada de azul, permitindo a mensuração em espectrofotômetro a 590 nm de acordo com o método proposto por Roy (1970).

As amostras destinadas à dosagem da enzima fosfatase ácida foram acidificadas imediatamente após a obtenção do soro como preconizado pelo teste utilizado. Para a dosagem da enzima fosfatase ácida foi utilizado o kit Laboratorial Labtest Catálogo 39 (Labtest Diagnóstica S.A., MG, Brasil). A fosfatase ácida do soro atua sobre o substrato de timolftaleína monofosfato. A adição de álcali inibe a ação enzimática e converte a timolftaleína liberada na sua forma azul, que é medida colorimetricamente. O produto final da reação se constitui de uma mistura de cor azul e a cor própria do substrato, que pode ser mensurado em espectrofotômetro a absorvância em 590 nm de acordo com o método Roy (1970) modificado.

4.14 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS. A unidade analítica considerada foi o rato e o nível de significância estabelecido em 5%. A normalidade dos dados obtidos foi testada através do teste Kolmogorov-Smirnov, apresentando distribuição simétrica.

Para a análise das variáveis fosfatase alcalina, fosfatase ácida e percentual de preenchimento ósseo foi utilizado o teste de Modelos Mistos, com a estrutura de covariância escolhida pelo menor critério de informação de Akaike e teste de post-hoc de Bonferroni.

Para a variável imunistoquímica foi realizado o teste ANOVA de uma via e teste de Tukey como post-hoc.

5 RESULTADOS

Os animais envolvidos no estudo não apresentaram complicações infecciosas pós-operatórias. Dois animais foram excluídos da amostra sendo um por deslocamento do ímã e um por obtenção de material de qualidade insuficiente para a avaliação histológica, os mesmos pertenciam respectivamente aos grupos enxerto alógeno de cartilagem com magnetismo aos 30 dias pós-operatórios e enxerto ósseo autógeno sem magnetismo aos 15 dias pós-operatórios.

5.1 Histomorfometria

Para avaliação histomorfométrica foi utilizada a variável percentual de preenchimento ósseo, calculada após a mensuração da área total do defeito ósseo e das áreas de osso neoformado em seu interior. A variável percentual de preenchimento ósseo apresentou dados com distribuição normal. Para a análise estatística desta variável foi utilizado o teste de Modelos Mistos com a estrutura de covariância escolhida pelo menor critério de informação de Akaike que, neste caso, foi a Diagonal. O teste de post-hoc utilizado foi Bonferroni. O modelo evidenciou interação significativa entre as variáveis grupo e tempo, $p=0,008$. A avaliação dos dados foi feita via intervalo de confiança e os valores são apresentados na Tabela 2. A Figura 12 apresenta a representação dos intervalos de confiança.

A avaliação transversal, ou seja, entre os grupos no mesmo tempo experimental do percentual de preenchimento ósseo evidenciou, aos 15 dias, que o grupo OA+Í (IC 5,59-11,69) apresentou percentual de preenchimento ósseo estatisticamente superior ao grupo CT (IC 0-5,03). Aos 30 dias, o grupo OA+Í (IC 21,99-36,08) permaneceu com percentual de preenchimento ósseo estatisticamente superior ao grupo CT (IC 1,29-15,38) e foi ainda estatisticamente superior ao grupo HA+Í (IC 6,57-20,66). Aos 60 dias, o grupo HA+Í (IC 23,01-39,38) apresentou percentual de preenchimento ósseo estatisticamente superior ao grupo CT (IC 5,87-22,23). Ainda aos 60 dias, o grupo OA+Í (IC 26,56-42,92) apresentou percentual de preenchimento ósseo estatisticamente superior ao grupo CT (IC 5,87-22,23) e ao grupo OA (IC 7,36-23,72). Esse resultado demonstrou que, aos 60 dias, nos animais que receberam reconstrução com osso autógeno o grupo que recebeu influência do

campo magnético apresentou percentual de preenchimento ósseo estatisticamente superior ao grupo sem influência do estímulo magnético.

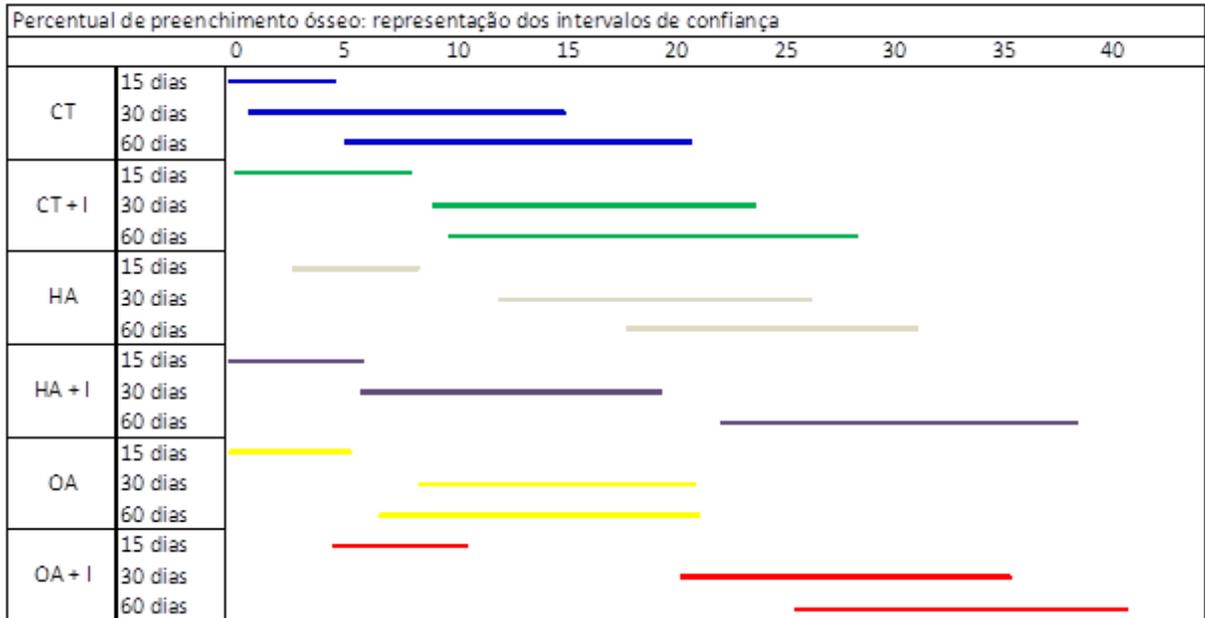
A análise longitudinal dos resultados obtidos permite realizar comparações ao longo do tempo no mesmo grupo experimental. Os valores do percentual de preenchimento ósseo para a análise longitudinal encontram-se expressos na Tabela 2. Esta análise evidenciou nos grupos CT+Í, HA, OA e OA+Í que o percentual de preenchimento ósseo aos 15 dias foi inferior ao encontrado aos 30 e aos 60 dias. No grupo HA+Í esta diferença no percentual de preenchimento ósseo ocorreu apenas aos 60 dias com valores superiores aos verificados nos tempos 15 e 30 dias. No grupo CT houve diferença entre o percentual de preenchimento ósseo entre os 15 e os 60 dias, os valores encontrados aos 30 dias não apresentaram diferença dos valores encontrados nos tempos 15 e 60 dias. No gráfico da Figura 13 observamos a representação gráfica do percentual de neoformação óssea em função do tempo para todos os grupos experimentais.

Tabela 2 – Percentual de preenchimento ósseo em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios

Percentual de Preenchimento Ósseo					
Grupo	Tempo	Média	Erro Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
CT	15 dias	1,631	1,643	-1,776	5,039
	30 dias	8,335	3,413	1,29	15,38
	60 dias	14,055	3,964	5,875	22,236
CT + I	15 dias	3,989	1,47	0,941	7,037
	30 dias	17,018	3,413	9,973	24,063
	60 dias	19,12	3,964	10,940	27,300
HA	15 dias	6,258	1,47	3,21	9,306
	30 dias	19,372	3,413	12,327	26,417
	60 dias	25,5	3,964	17,320	33,680
HA + I	15 dias	3,811	1,47	0,764	6,859
	30 dias	13,617	3,413	6,572	20,661
	60 dias	31,199	3,964	23,019	39,380
OA	15 dias	3,069	1,643	-0,339	6,476
	30 dias	16,384	3,413	9,339	23,429
	60 dias	15,544	3,964	7,364	23,724
OA + I	15 dias	8,644	1,47	5,596	11,692
	30 dias	29,041	3,413	21,996	36,086
	60 dias	34,749	3,964	26,568	42,929

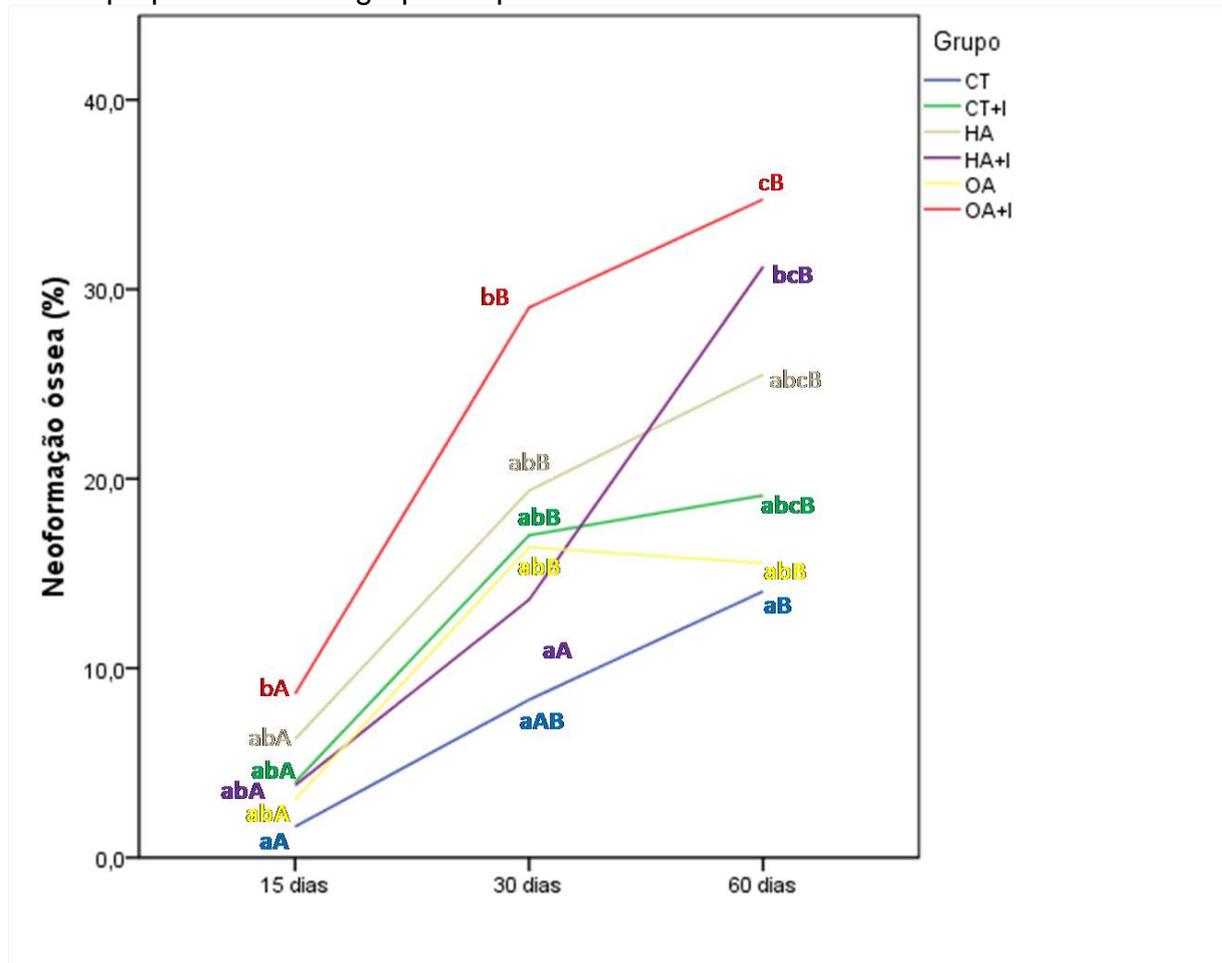
Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Figura 12 – Representação dos intervalos de confiança do percentual de preenchimento ósseo



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.
Traços sem sobreposição indicam diferença significativa.

Figura 13 - Representação gráfica do percentual de neoformação óssea em função do tempo para todos os grupos experimentais

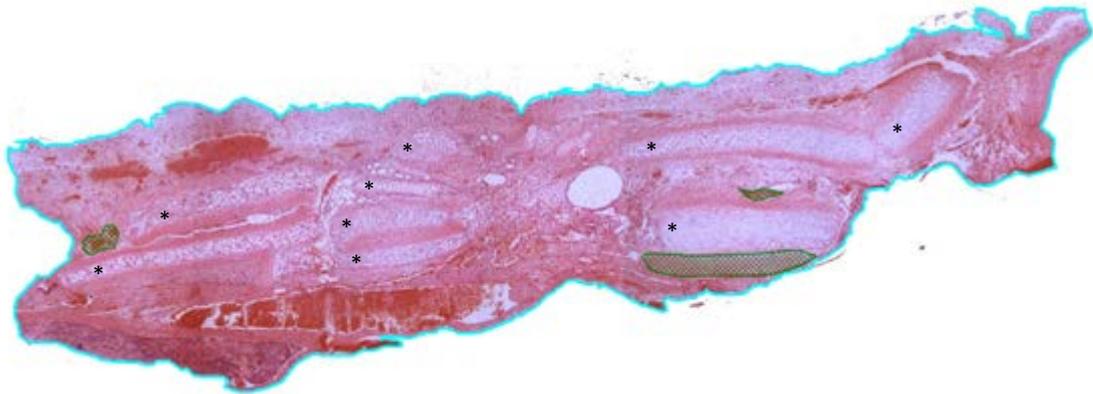


Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Letras diferentes indicam diferença significativa sendo que as letras minúsculas indicam comparações transversais e as letras maiúsculas indicam comparações longitudinais.

As Figuras 14 a 31 ilustram a análise histomorfométrica realizada no programa AxioVision® após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem, sob influência ou não de campo magnético sepultado, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós operatórios.

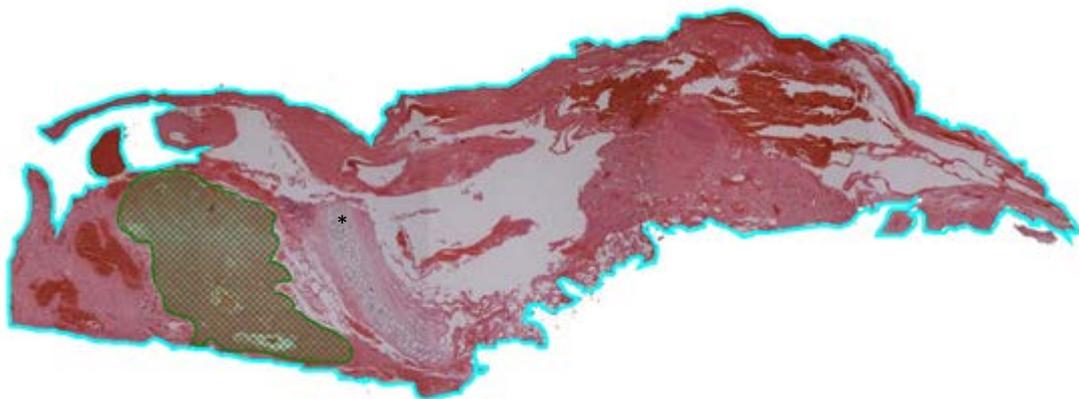
Figura 14 – Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; * enxerto alógeno de cartilagem.

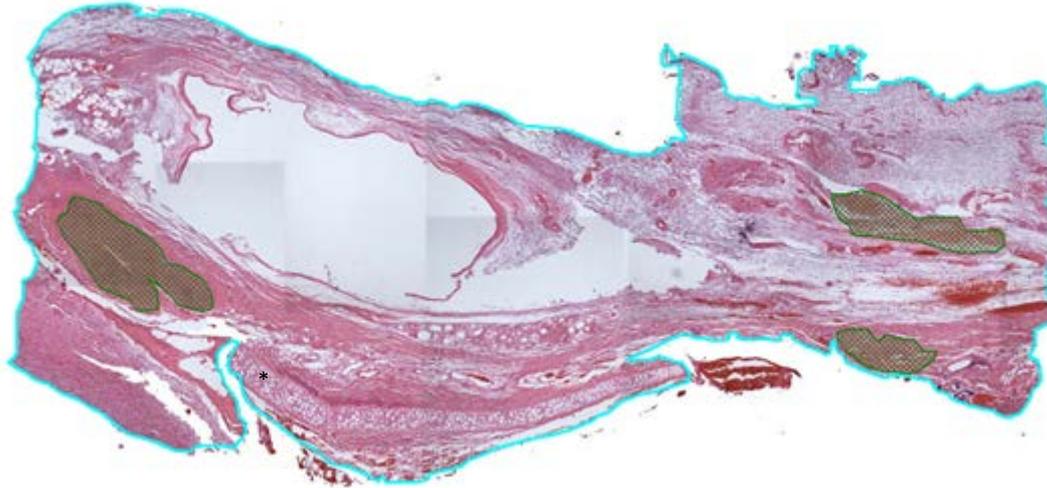
Figura 15 – Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; * enxerto alógeno de cartilagem.

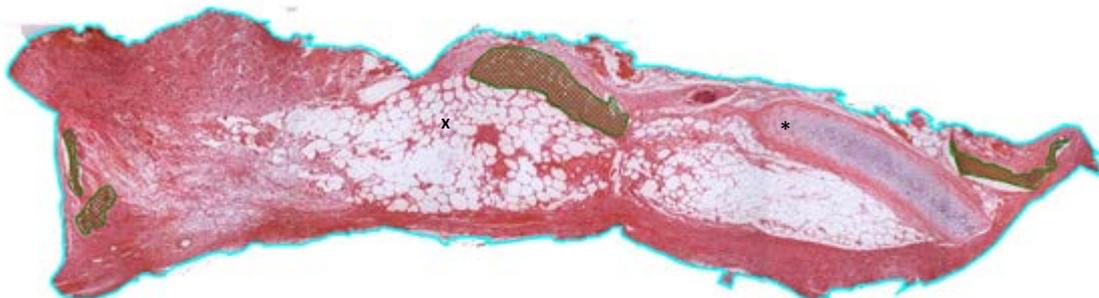
Figura 16 – Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; * enxerto alógeno de cartilagem.

Figura 17 – Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; * enxerto alógeno de cartilagem; x residual de pericôndrio.

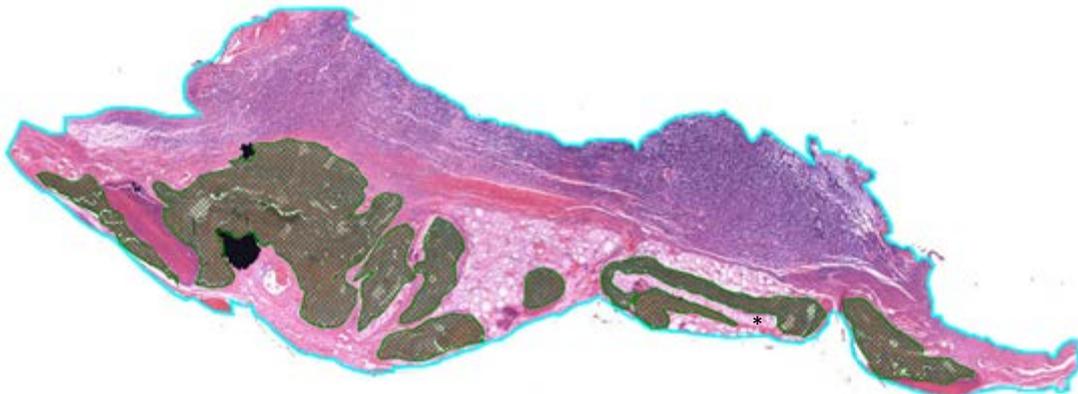
Figura 18 – Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; * enxerto alógeno de cartilagem; ^x residual de pericôndrio.

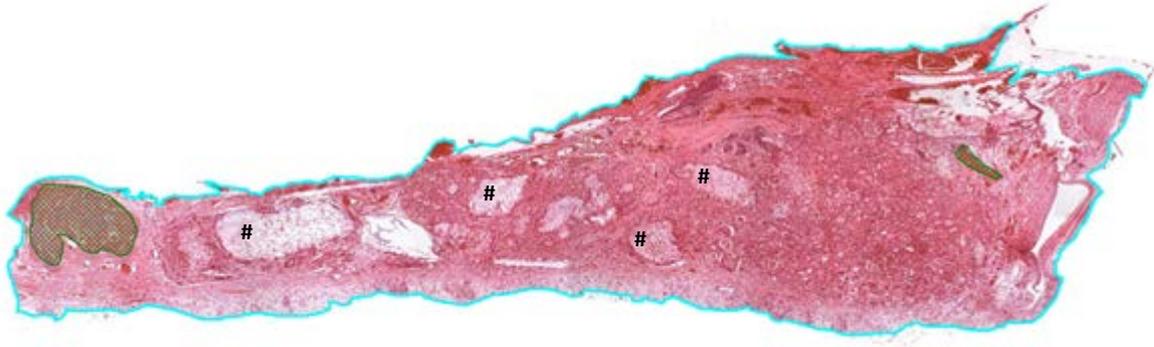
Figura 19 – Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; * enxerto alógeno de cartilagem.

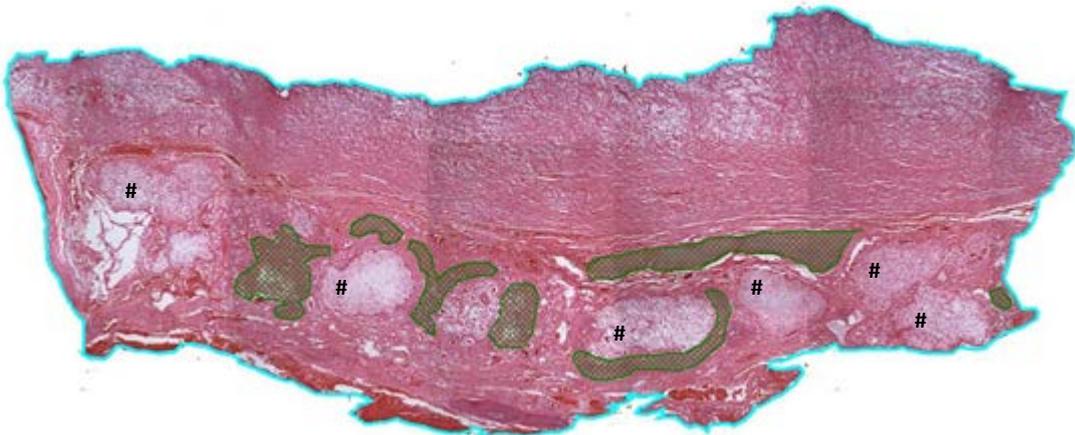
Figura 20 – Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; # implante de hidroxiapatita granulada sintética.

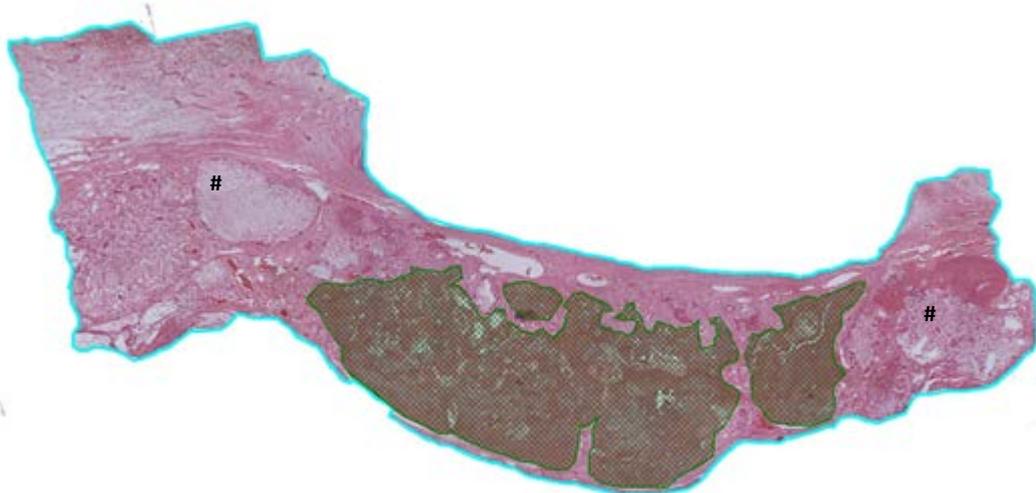
Figura 21 – Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; # implante de hidroxiapatita granulada sintética.

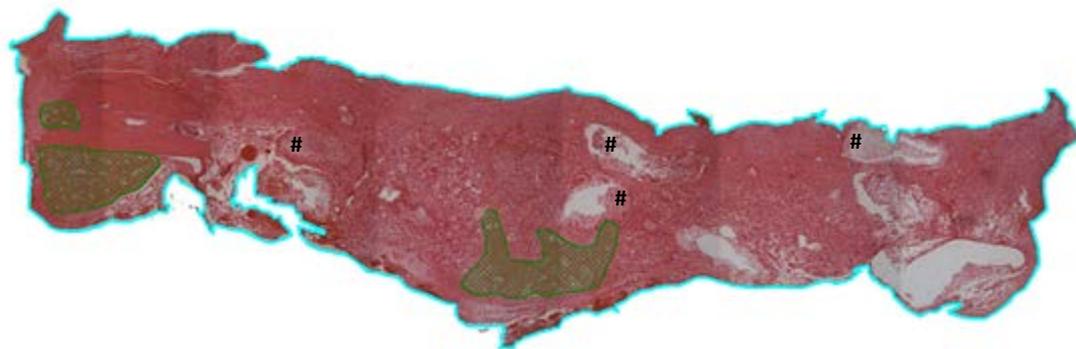
Figura 22 – Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; # implante de hidroxiapatita granulada sintética.

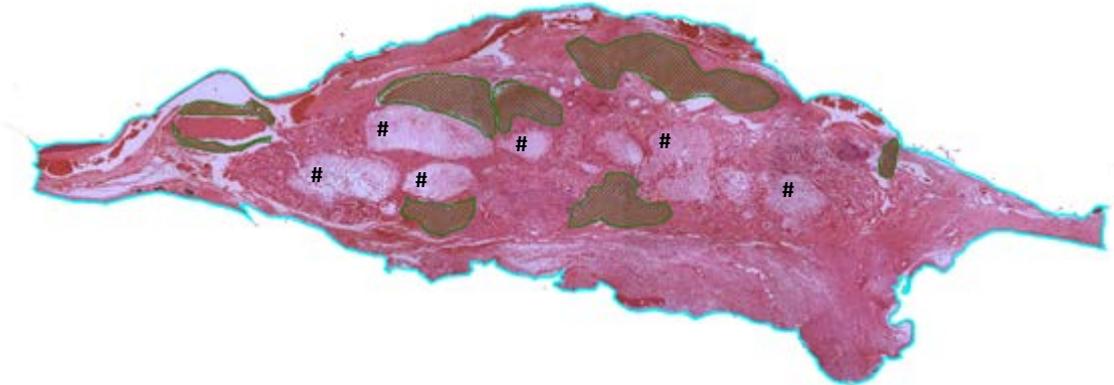
Figura 23 – Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; # implante de hidroxiapatita granulada sintética.

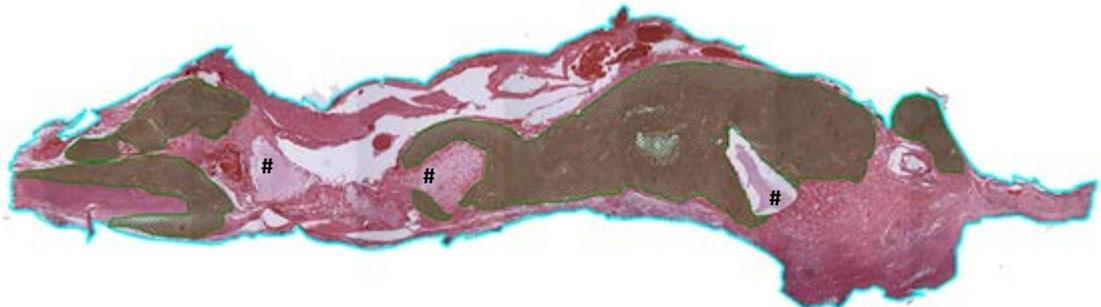
Figura 24 – Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; # implante de hidroxiapatita granulada sintética.

Figura 25 – Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; # implante de hidroxiapatita granulada sintética.

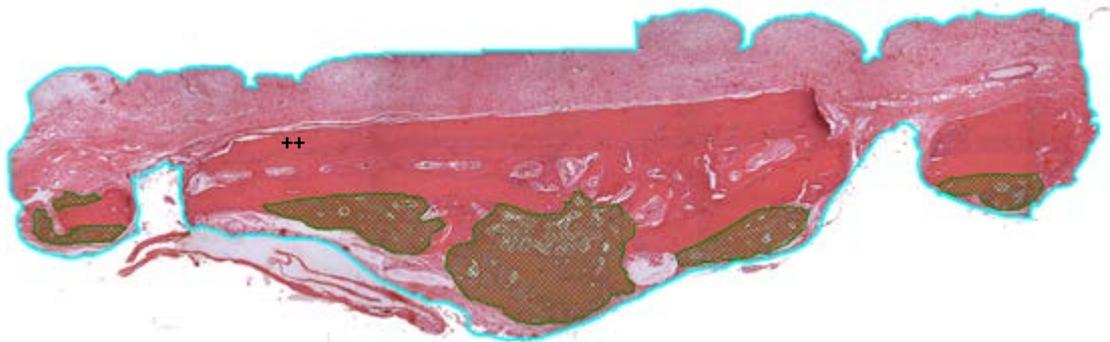
Figura 26 – Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; **++** enxerto ósseo autógeno.

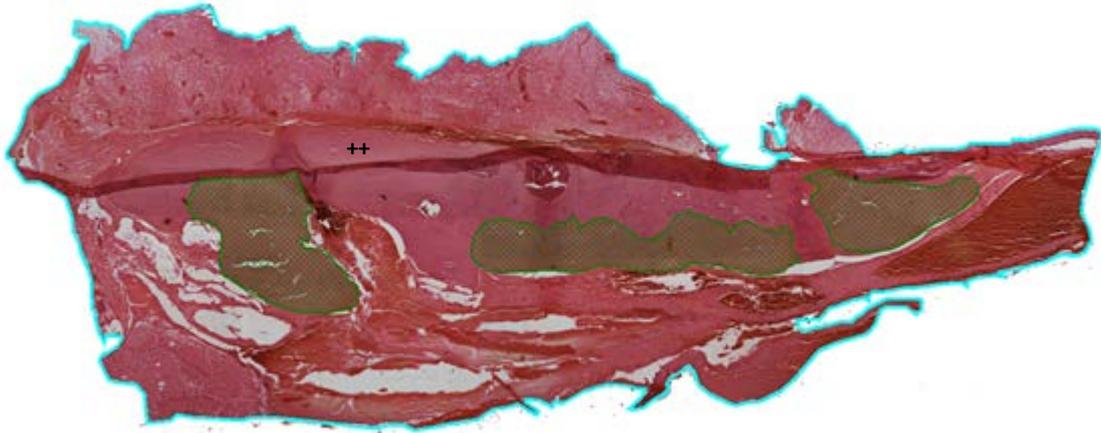
Figura 27 – Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; **++** enxerto ósseo autógeno.

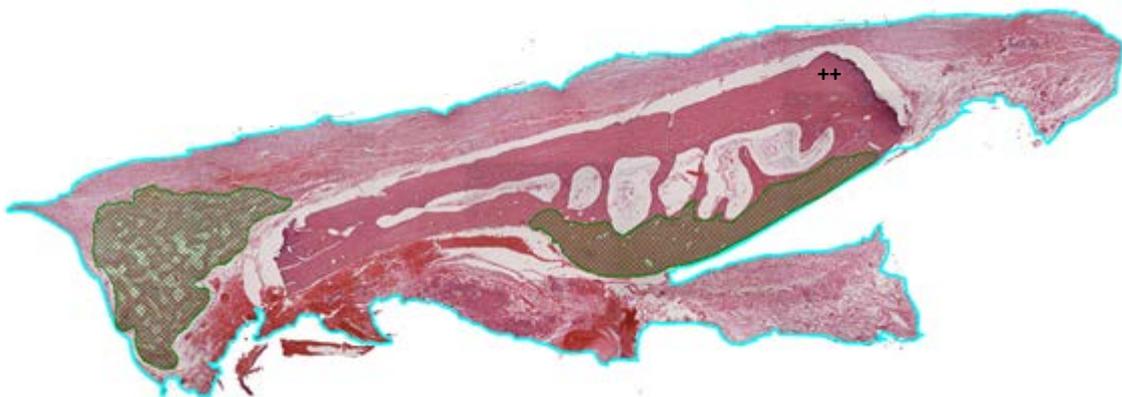
Figura 28 – Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; **++** enxerto ósseo autógeno.

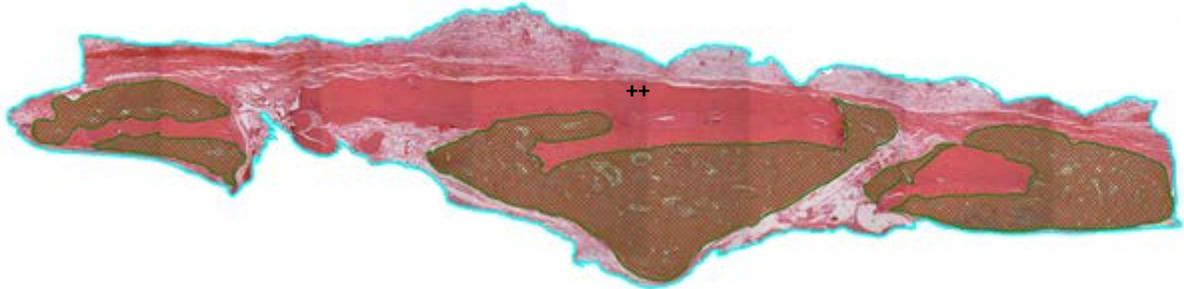
Figura 29 – Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; **++** enxerto ósseo autógeno.

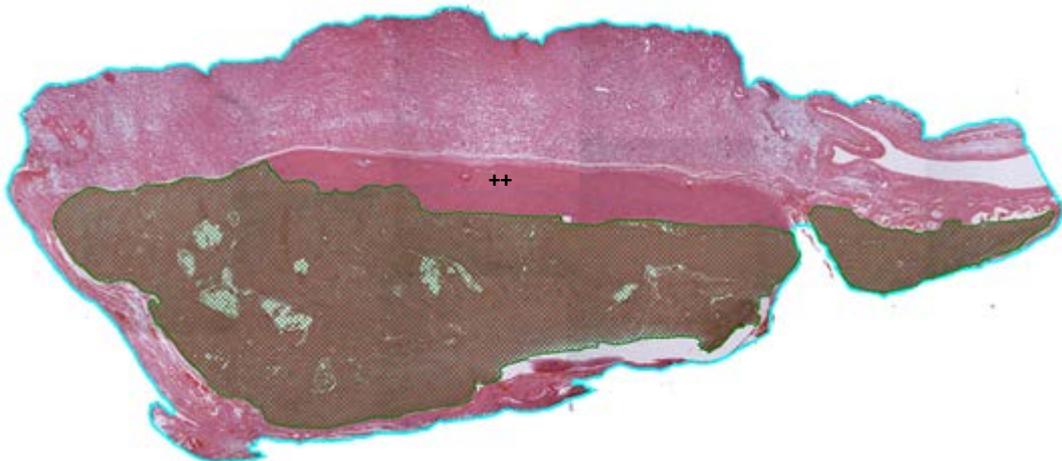
Figura 30 – Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; ++ enxerto ósseo autógeno.

Figura 31 – Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. Análise histomorfométrica de corte histológico do defeito ósseo crítico, com 5mm de diâmetro, realizado na calvária do rato

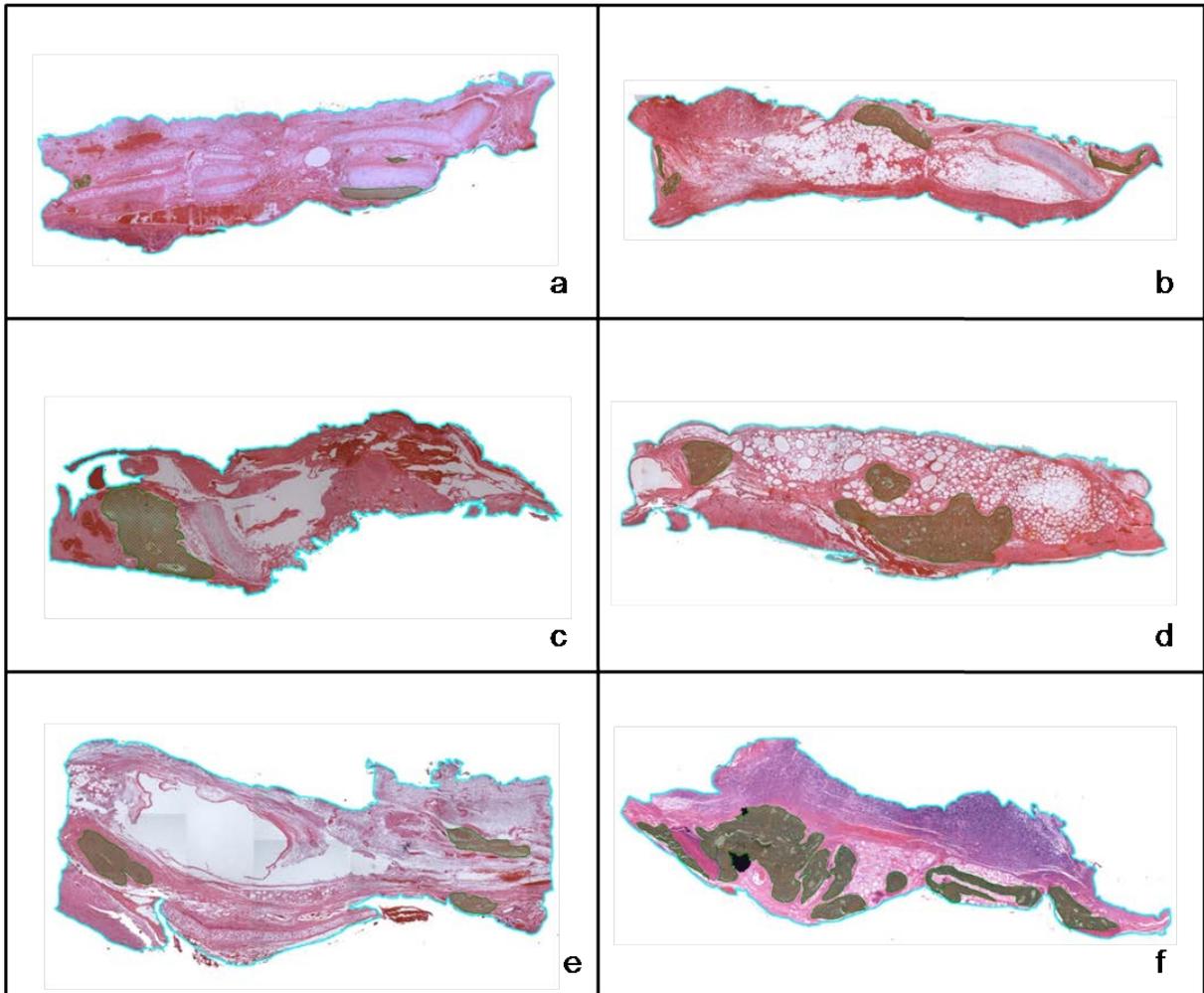


Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Linha azul. delimita a área total do defeito ósseo; **áreas hachuradas em verde.** delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico; ++ enxerto ósseo autógeno.

As Figuras 32 a 34 apresentam as imagens anteriores agrupadas lado a lado ilustrando comparações entre os grupos do estudo.

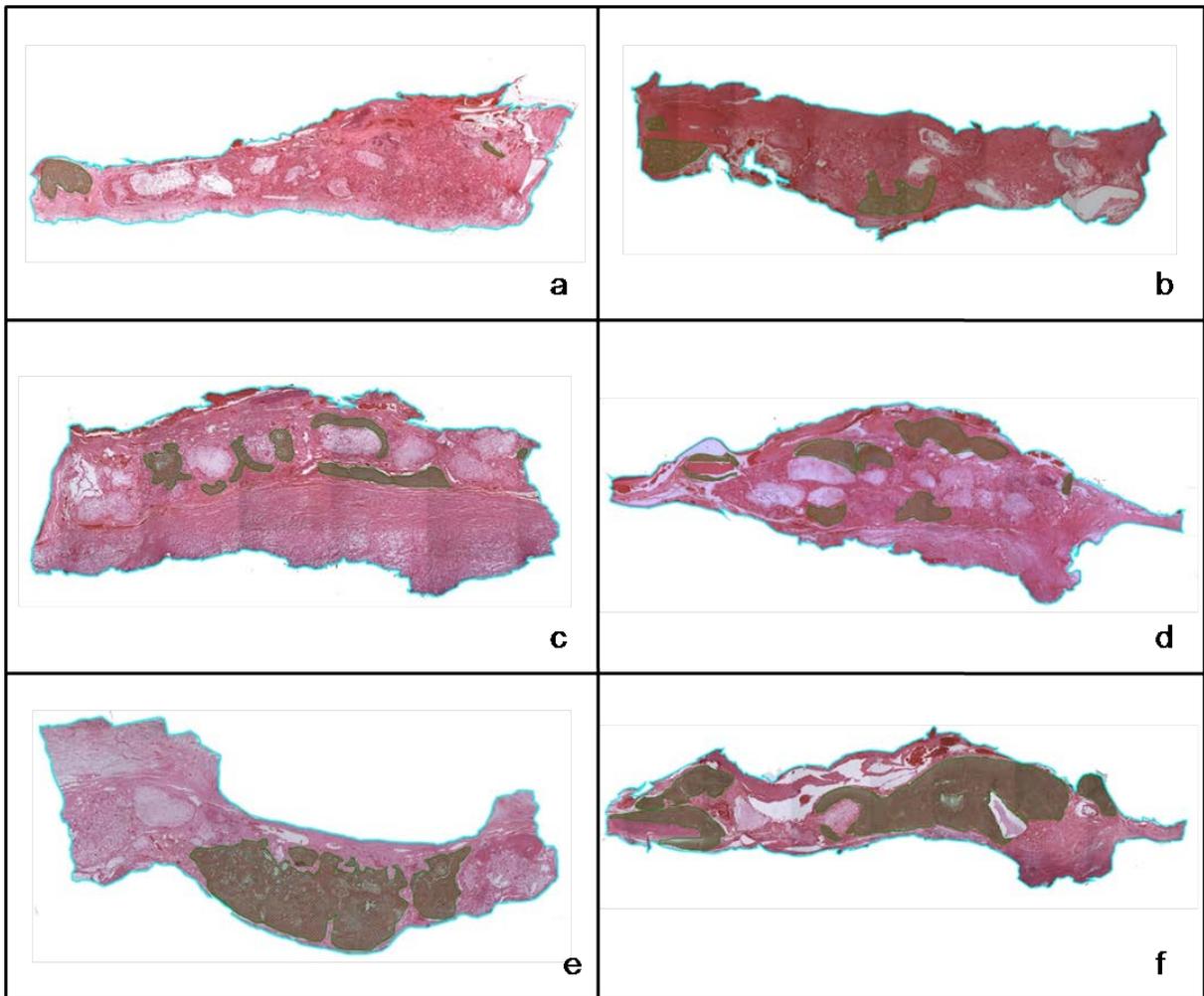
Figura 32 – Comparação entre os grupos que receberam enxerto alógeno de cartilagem



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios; **b.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios; **c.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios; **d.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios; **e.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios; **f.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios.

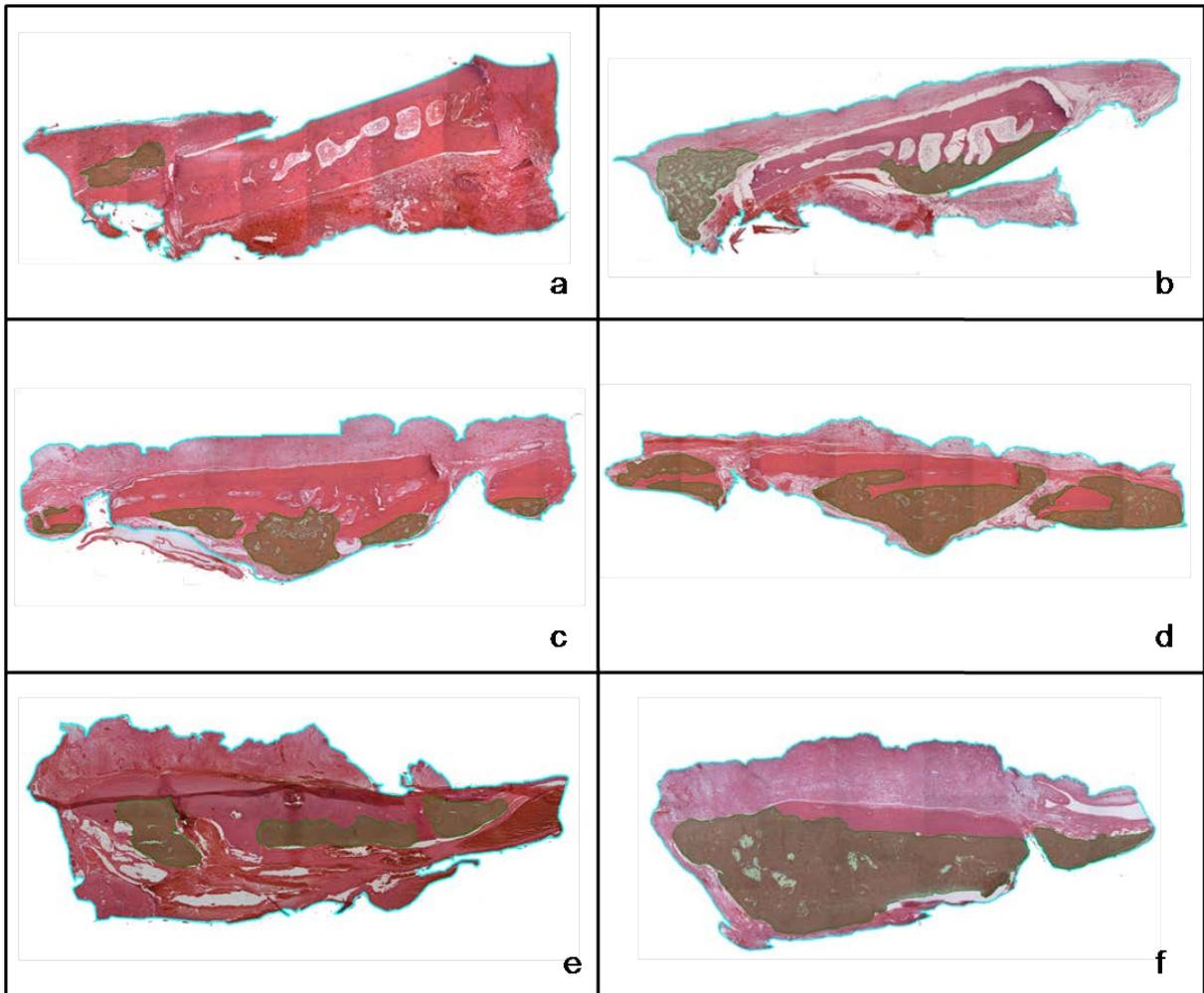
Figura 33 – Comparação entre os grupos que receberam implante de hidroxiapatita granulada sintética



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios; **b.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios; **c.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios; **d.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios; **e.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios; **f.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios.

Figura 34 – Comparação entre os grupos que receberam enxerto ósseo autógeno



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios; **b.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 15 dias pós-operatórios; **c.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios; **d.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 30 dias pós-operatórios; **e.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios; **f.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios.

5.2 Marcadores bioquímicos

5.2.1 Fosfatase Alcalina

A variável fosfatase alcalina apresentou dados com distribuição normal. Para a análise estatística desta variável utilizamos Modelos Mistos com a estrutura de covariância escolhida pelo menor critério de informação de Akaike que, neste caso, foi o Autoregressivo de Primeira Ordem. O teste de post-hoc utilizado foi Bonferroni.

O modelo evidenciou interação significativa entre as variáveis grupo e tempo, $p=0,02$. Os valores são apresentados na Tabela 3. A avaliação dos dados é feita via intervalo de confiança, a Figura 35 apresenta a representação dos intervalos de confiança.

O grupo Naive, que representa a atividade fisiológica da enzima fosfatase alcalina e não sofreu intervenção cirúrgica, apresentou resultados estatisticamente superiores em relação aos grupos que sofreram intervenção cirúrgica. Aos 15 dias, essa diferença foi significativa entre o grupo Naive (IC 48,94-59,64) e os grupos CT (IC 34,2-46,24), HA (IC 42,34-53,04), OA (IC 31,9-43,85) e OA+Í (IC 36,99-47,68). Aos 30 dias, o grupo HA+Í (IC 44,28-54,97) seguiu apresentando valores de fosfatase alcalina iguais aos do grupo Naive (IC 48,94-59,64), enquanto o grupo CT+Í (IC 33,57-44,27) passou a apresentar, à semelhança dos demais grupos valores significativamente inferiores aos do grupo Naive (IC 48,94-59,64). Aos 60 dias, todos os grupos apresentaram valores de fosfatase alcalina estatisticamente inferiores ao grupo Naive (IC 48,94-59,64).

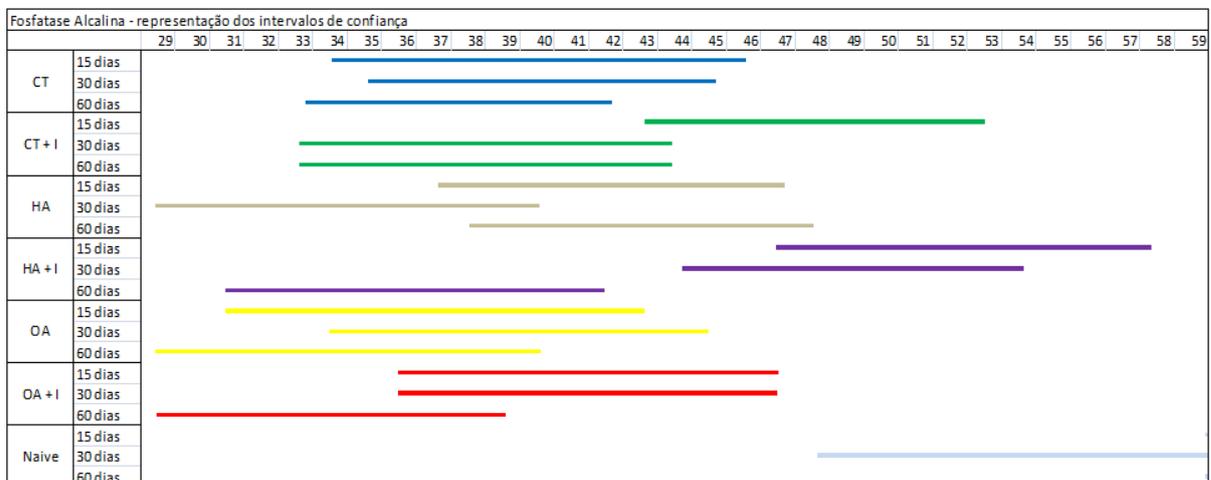
Uma análise longitudinal dos resultados obtidos para esta variável evidenciou que o grupo HA+Í apresentou valores de fosfatase alcalina significativamente inferiores aos 60 dias (IC 31,86-42,55) se comparados aos 15 (IC 47,42-58,11) e 30 (IC 44,28-54,97) dias. Os demais grupos não apresentaram variação longitudinal dos valores de fosfatase alcalina.

Tabela 3 – Atividade da enzima fosfatase alcalina em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios

Fosfatase Alcalina					
Grupo	Tempo	Média	Erro Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
CT	15 dias	40,269	3,005	34,291	46,247
	30 dias	40,351	2,688	35,004	45,698
	60 dias	38,449	2,688	33,102	43,795
CT + I	15 dias	47,695	2,688	42,348	53,042
	30 dias	38,924	2,688	33,577	44,271
	60 dias	39,24	2,688	33,894	44,587
HA	15 dias	42,371	2,688	37,024	47,718
	30 dias	35,075	2,688	29,728	40,422
	60 dias	43,467	2,688	38,12	48,814
HA + I	15 dias	52,769	2,688	47,423	58,116
	30 dias	49,629	2,688	44,282	54,976
	60 dias	37,207	2,688	31,86	42,553
OA	15 dias	37,878	3,005	31,9	43,856
	30 dias	40,002	2,688	34,655	45,349
	60 dias	34,726	2,688	29,379	40,072
OA + I	15 dias	42,342	2,688	36,995	47,689
	30 dias	42,01	2,688	36,663	47,357
	60 dias	34,642	2,688	29,295	39,989
Naive	30 dias	54,295	2,688	48,948	59,642

Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

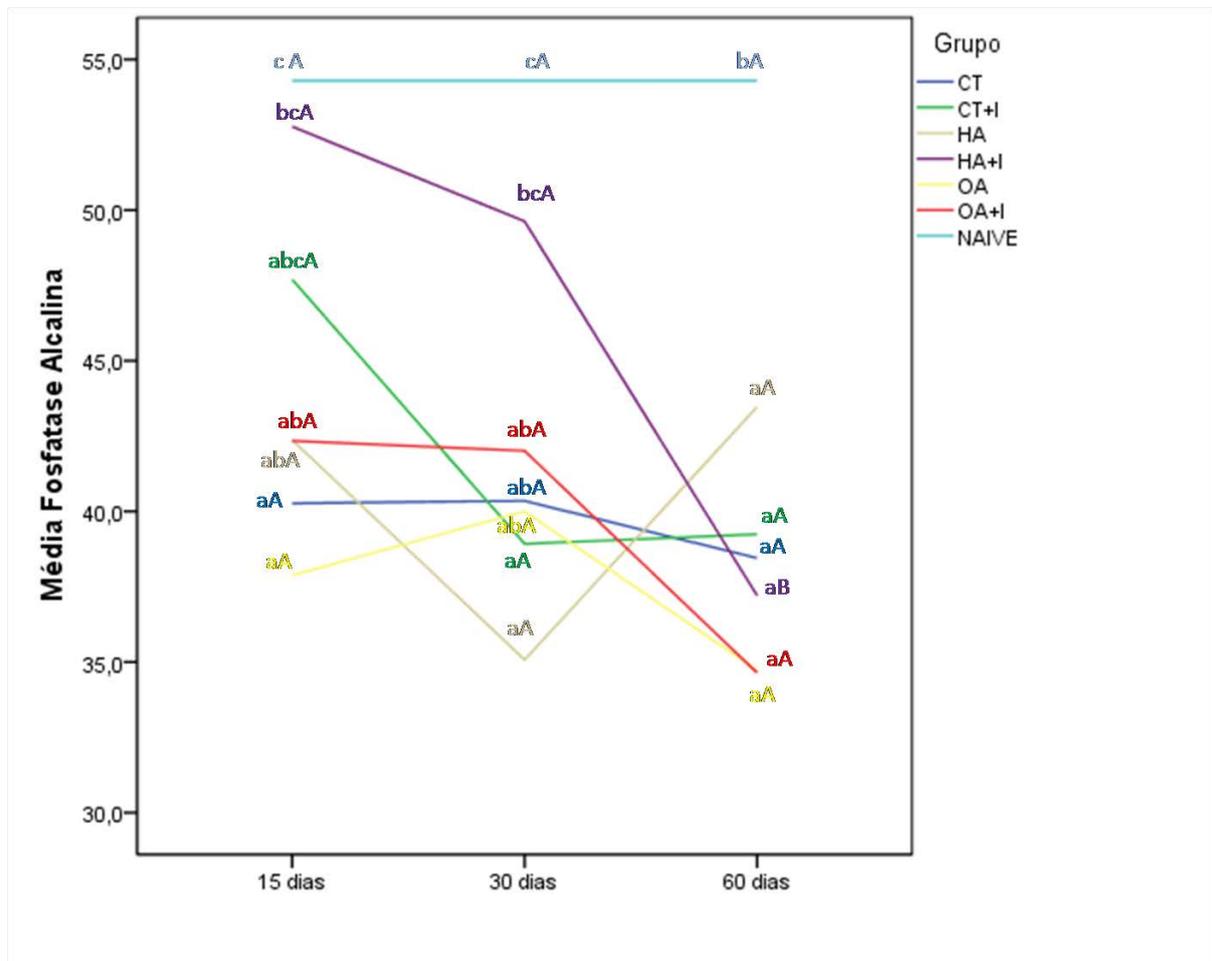
Figura 35 – Representação dos intervalos de confiança da atividade da enzima fosfatase alcalina



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.
Traços sem sobreposição indicam diferença significativa.

No gráfico, as letras minúsculas representam comparações transversais: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo. As letras maiúsculas representam comparações longitudinais: letras diferentes indicam diferenças significativas em tempos diferentes dentro de um mesmo grupo Figura 36.

Figura 36 – Representação gráfica da atividade da enzima fosfatase alcalina em função do tempo para todos os grupos experimentais



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Letras diferentes indicam diferença significativa sendo que as letras minúsculas indicam comparações transversais e as letras maiúsculas indicam comparações longitudinais.

5.2.2 Fosfatase Ácida

A variável fosfatase ácida apresentou dados com distribuição normal. Para a análise estatística desta variável foi utilizado o teste de Modelos Mistos com a estrutura de covariância escolhida pelo menor critério de informação de Akaike que,

neste caso, foi a Diagonal. O teste de post-hoc utilizado foi Bonferroni. O modelo evidenciou interação significativa entre as variáveis grupo e tempo, $p=0,005$. Os valores são apresentados na Tabela 4. A avaliação dos dados é feita via intervalo de confiança, a Figura 37 apresenta a representação gráfica dos intervalos de confiança.

O grupo Naive (IC 1,18-1,62), que representa a atividade fisiológica da enzima fosfatase ácida e não sofreu intervenção cirúrgica, apresentou resultados elevados em relação aos grupos que sofreram intervenção cirúrgica, esta diferença foi significativa em todos os tempos experimentais apenas nos grupos CT (IC 15 dias 0,58-1,07; IC 30 dias 0,66-1,10; IC 60 dias 0,69-0,98) e HA (IC 15 dias 0,49-0,94; IC 30 dias 0,61-1,06; IC 60 dias 0,51-0,81). Os demais grupos apresentaram atividade estatisticamente igual ao grupo Naive em pelo menos um dos tempos experimentais.

Aos 60 dias, todos os grupos apresentaram atividade da enzima fosfatase ácida estatisticamente inferior ao grupo Naive (IC 1,18-1,62).

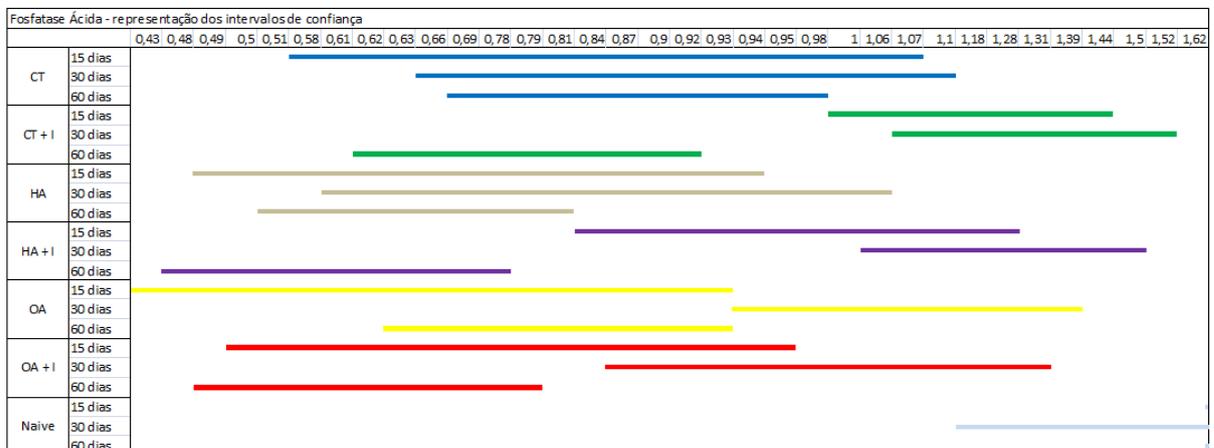
Todos os grupos apresentaram, ao longo do tempo, o mesmo padrão de atividade da enzima fosfatase ácida, com pico aos 30 dias. Os grupos com influência do campo magnético apresentaram atividade igual aos 15 e 30 dias e significativamente diferente aos 60 dias, isso não se repetiu nos grupos sem influência do campo magnético.

Tabela 4 – Atividade da enzima fosfatase ácida em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios

Fosfatase Ácida					
Grupo	Tempo	Média	Desvio Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
CT	15 dias	0,830	26	0,583	1,077
	30 dias	0,883	28	0,662	1,104
	60 dias	0,839	28	0,69	0,988
CT + I	15 dias	1,227	26	1,006	1,449
	30 dias	1,299	28	1,078	1,52
	60 dias	0,774	28	0,625	0,923
HA	15 dias	0,72	26	0,499	0,942
	30 dias	0,84	28	0,618	1,061
	60 dias	0,666	28	0,517	0,815
HA + I	15 dias	1,066	26	0,845	1,287
	30 dias	1,282	28	1,061	1,503
	60 dias	0,638	28	0,489	0,787
OA	15 dias	0,686	26	0,438	0,933
	30 dias	1,17	28	0,949	1,391
	60 dias	0,782	28	0,633	0,931
OA + I	15 dias	0,73	26	0,508	0,951
	30 dias	1,094	28	0,873	1,315
	60 dias	0,641	28	0,492	0,79
Naive	30 dias	1,403	28	1,182	1,624

Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Figura 37 – Representação dos intervalos de confiança da atividade da enzima fosfatase ácida

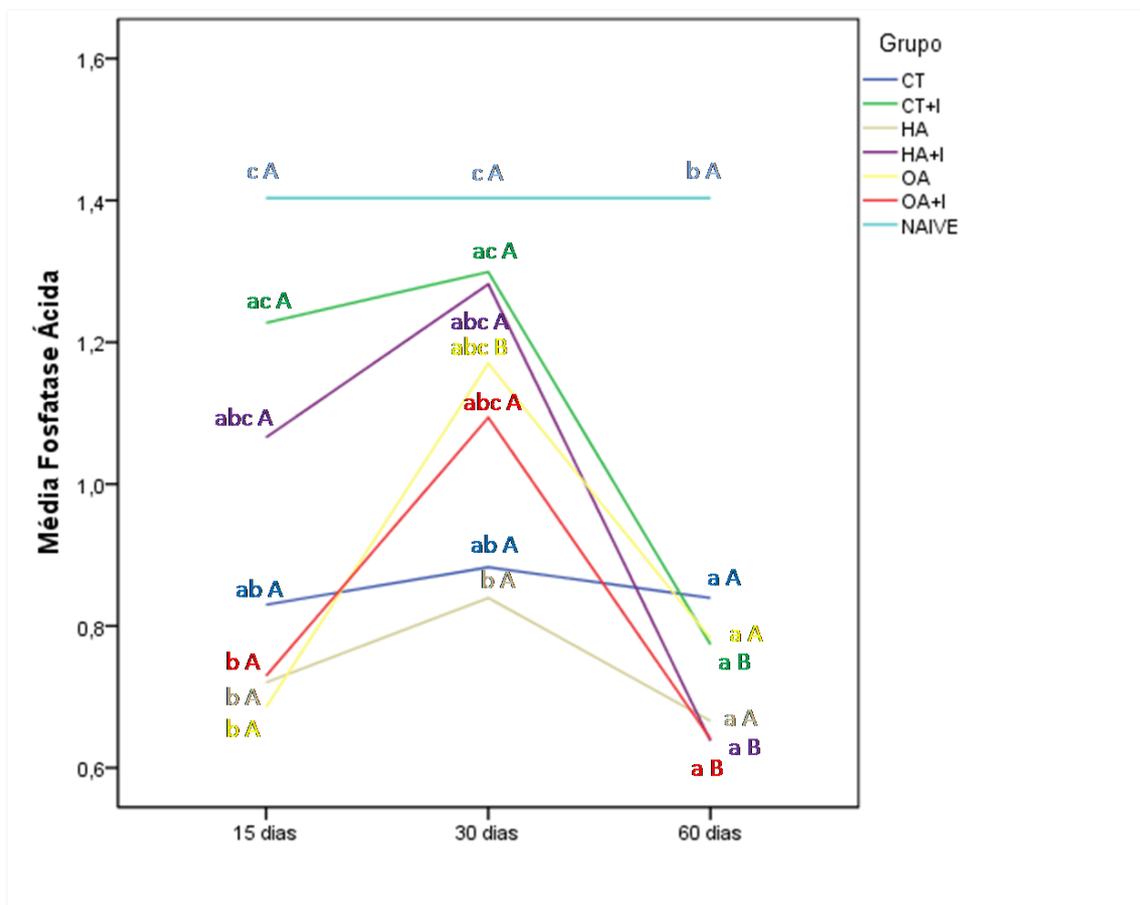


Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

Traços sem sobreposição indicam diferença significativa.

No gráfico, as letras minúsculas representam comparações transversais: letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos no mesmo tempo. E as letras maiúsculas representam comparações longitudinais: letras diferentes indicam diferenças significativas em tempos diferentes dentro de um mesmo grupo, Figura 38.

Figura 38 – Representação gráfica da atividade da enzima fosfatase ácida em função do tempo para todos os grupos experimentais



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

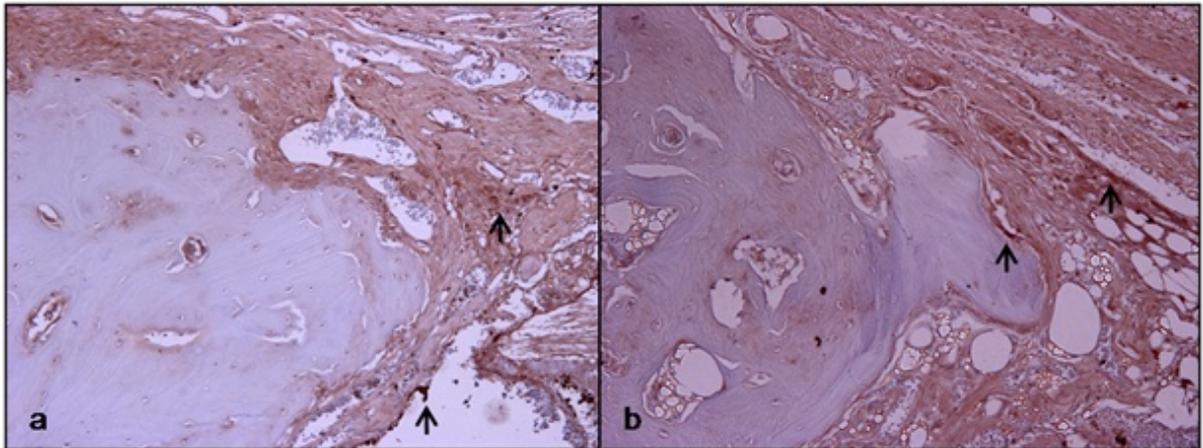
Letras diferentes indicam diferença significativa sendo que as letras minúsculas indicam comparações transversais e as letras maiúsculas indicam comparações longitudinais.

5.3 Análise imunoistoquímica

Para a análise estatística da intensidade de marcação da proteína osteopontina, que apresentou dados com distribuição normal, foi utilizado o teste ANOVA de uma Via que não evidenciou diferença significativa entre os grupos analisados.

Na Figura 39, a seguir, fotomicrografias ilustrando marcação imunohistoquímica utilizando anticorpo anti-osteopontina (Anti-Osteopontin antibody, ab8448, Abcam®).

Figura 39 – Fotomicrografias ilustrando as regiões selecionadas para análise imunohistoquímica



Fonte: Dissertação de Mestrado – CTBMF – FO/UFRGS.

a. Região correspondente ao limite do defeito ósseo; **b.** Região central do defeito ósseo; as setas indicam coloração correspondente à marcação positiva pelo anticorpo anti-osteopontina.

6 DISCUSSÃO

O tecido ósseo é um vasto assunto para estudo e objeto de inúmeras investigações. Segundo Shapiro (2008) o osso pode ser entendido como um tecido quando analisadas suas estruturas celulares e matriz extracelular e, ainda, pode ser entendido como um órgão quando estudado juntamente com os demais tecidos relacionados a ele como vasos sanguíneos, cartilagem, estruturas nervosas e sua relação com os demais órgãos que compõe o organismo.

Abordando o osso como tecido, sob os mais diversos aspectos, este trabalho buscou respaldo no entendimento da fisiologia envolvida na formação óssea e no conhecimento sobre as estruturas que o compõem para entender os mecanismos envolvidos no reparo do mesmo. Lesões ao tecido ósseo podem ser de etiologia traumática, patológica e infecciosa (JIANG et al., 2009). É característica do tecido ósseo seu reparo como resposta a agressões sofridas. O reparo ósseo pode ser influenciado por características inerentes ao indivíduo como idade, patologias presentes ou medicamentos sistêmicos que possam interferir no metabolismo ósseo. Também aspectos relacionados ao tipo de dano causado no tecido ósseo como tamanho da lesão e viabilidade de aporte sanguíneo para a região lesada devem ser considerados (SHAPIRO, 2008; NAGATA et al., 2009).

Modelos animais são amplamente utilizados para avaliar o potencial osteogênico e osteocondutor de determinado enxerto ou implante, principalmente por meio da utilização de defeitos ósseos artificialmente criados (PURICELLI et al., 2006; FURLANETO et al., 2007; MARZOUK et al., 2007; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009). Este estudo utilizou defeitos ósseos na calvária de ratos. Tal sítio cirúrgico permitiu a criação de defeitos amplos, capazes de avaliar a neoformação óssea dentro do princípio de “defeito de tamanho crítico”, idealizado por Schmitz e Hollinger (1986) e modificado por Gosain e colaboradores (2000).

Neste estudo, as lojas para sepultamento dos magnetos sofreram uma solução de continuidade, diferenciando este modelo do utilizado por Calcagnotto (2009) e Schwengber (2009). Esta modificação no preparo das lojas ósseas para sepultamento dos magnetos influenciou a presença do campo magnético no interior do defeito ósseo, estimulando uma revisão dos resultados histomorfométricos comparativos dos trabalhos anteriores cujos magnetos mantiveram-se isolados por presença de barreira óssea.

Sabe-se que quando um sistema biológico é exposto a um estímulo físico este é capaz de detectar sua presença e de modificar sua atividade biológica, dependendo das características do estímulo, seja ele mecânico, elétrico ou magnético (VARANI et al., 2002). O presente estudo buscou avaliar formas de estímulo ao reparo ósseo. Os estímulos utilizados foram o magnetismo, presente sob a forma de campo magnético sepultado, e os estímulos gerados pela reconstrução do tecido lesado com substitutos ósseos. Os meios utilizados para reconstrução óssea avaliados foram osso autógeno, hidroxiapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem.

Nos estudos sobre a utilização de estímulos magnéticos no reparo tecidual os resultados ainda permanecem controversos. Os principais campos magnéticos estudados são os eletromagnéticos e os magnéticos. A utilização de campos eletromagnéticos na área da ortopedia parece promissora, Griffin, Warner e Costa (2008) em uma revisão sistemática da literatura concluíram que existem evidências para suportar o uso de estimulação eletromagnética no tratamento de falhas de união em fraturas de tíbia. Os autores revisaram 49 artigos, dos quais 3 foram ensaios clínicos controlados e randomizados sendo os demais ensaios clínicos não randomizados e séries de casos. A utilização de campos eletromagnéticos no reparo de fraturas recentes (HANNEMANN et al., 2011) e também em recuperação pós-operatória (VAN BERGEN et al., 2009) vem sendo avaliada por meio de ensaios clínicos controlados e randomizados a fim de gerar evidências científicas consistentes para sua aplicação.

A utilização de campos magnéticos estáticos, gerados por ímãs permanentes ou por materiais imantados, também apresenta uma gama variada de estudos e evidências. Tratamentos com a utilização de magnetos são amplamente utilizados na medicina chinesa para alívio da dor, promoção do fluxo sanguíneo e fortalecimento da arquitetura óssea (PAN et al., 2009).

Muitos estudos apontaram que campos magnéticos estáticos podem acelerar o processo de neoformação óssea ou cicatrização tecidual (DARENDELILER; DARENDELILER; SINCLAIR, 1997; PURICELLI et al., 2006; COSTANTINO et al., 2007; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009). Para a compreensão da influência do campo magnético sobre o reparo ósseo a literatura busca evidências em parâmetros histológicos (PURICELLI et al., 2006; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009), na avaliação da concentração de fatores de crescimento (AARON et al., 2004;

CORNAGLIA et al., 2006), no estudo da deposição de íons cálcio durante a ossificação (YAN; TOMITA; IKADA, 1998) e ainda na influência do magnetismo sobre a membrana plasmática celular (CORNAGLIA et al., 2006).

O presente trabalho avaliou a aplicação de campo magnético sepultado adjacente a defeito ósseo cirurgicamente criado, conforme conceito proposto por Puricelli e colaboradores (2006). Por meio da metodologia aqui utilizada foi possível demonstrar, nos animais que receberam reconstrução com osso autógeno, que o grupo sob influência do campo magnético apresentou percentual de preenchimento ósseo significativamente superior ao grupo sem influência do estímulo magnético, no tempo pós-operatório de 60 dias. Nos tempos mais precoces, apesar da média do percentual de preenchimento ósseo ser superior nos grupos sob estimulação magnética essa diferença não foi estatisticamente significativa.

O osso autógeno é considerado o padrão ouro entre os substitutos ósseos. Neste trabalho o grupo OA+Í obteve os maiores valores de percentual de preenchimento ósseo, sendo estatisticamente superior ao grupo CT aos 15 dias, aos grupos CT e HA+Í aos 30 dias e aos grupos CT e OA aos 60 dias. O osso autógeno apresenta as propriedades de osteoindução, osteocondução e osteogênese que influenciam positivamente o reparo ósseo. Esse resultado também sinaliza para o efeito positivo do magnetismo no reparo ósseo, mantido em uma fase mais tardia do processo.

O estímulo gerado pela aplicação de campos magnéticos sobre o reparo ósseo parece promissor, no entanto, a melhor metodologia para avaliação deste estímulo ainda necessita ser elucidada, assim como os mecanismos biológicos que resultam em tal efeito.

Além do potencial efeito positivo gerado pelo campo magnético no reparo ósseo após enxerto é importante considerar que outros fatores podem influenciar diretamente a incorporação de enxertos ósseos. Um deles é o tipo de enxerto, no presente estudo foi utilizado enxerto em bloco de osso cortical oriundo da calota craniana. Esse tipo de enxerto revasculariza mais lentamente se comparado ao enxerto de osso medular, conseqüentemente a incorporação de enxertos de osso cortical será mais lenta do que aquela que ocorre em sítios com enxertos medulares (NAGATA et al., 2009). O enxerto cortical permanece como uma mescla de osso necrótico com osso viável por longos períodos de tempo enquanto o enxerto medular é completamente substituído. Outro fator que influencia diretamente a

incorporação dos enxertos é o tamanho das partículas utilizadas. Em um estudo conduzido em coelhos, os estágios precoces do reparo ósseo foram influenciados pelo tamanho das partículas de osso autógeno utilizadas (PALLESEN et al., 2002). No presente trabalho a utilização do enxerto em bloco provavelmente influenciou negativamente o reparo ósseo nos tempos de 15 e 30 dias pós-operatórios. Segundo Shapoff e colaboradores (1980), nos mesmos tempos pós-operatórios, o volume total de osso neoformado em defeitos preenchidos com partículas pequenas foi maior se comparado a defeitos preenchidos com partículas maiores. Já para Nagata e colaboradores (2009) deve-se respeitar um limite para a redução das partículas de enxerto, o tamanho das partículas ósseas deve ultrapassar 125 µm para evitar sua remoção por macrófagos.

Apesar de ser considerado o padrão ouro para reconstruções ósseas o osso autógeno apresenta conhecidas limitações para seu uso, sendo as principais a morbidade cirúrgica pela necessidade de um sítio doador, a limitação de quantidade de enxerto e a reabsorção irregular no leito receptor (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). Por essa razão, o presente trabalho buscou avaliar materiais alternativos ao uso do enxerto ósseo autógeno. Biocompatibilidade, bioatividade e propriedades mecânicas adequadas são os principais requisitos esperados em substitutos ósseos. A hidroxiapatita é um substituto ósseo muito estudado e utilizado no tratamento de defeitos ósseos. Sua fórmula química é semelhante à fase inorgânica do tecido ósseo, o que pode explicar a intensa afinidade da hidroxiapatita com o leito ósseo receptor (DINARVAND et al., 2011).

Foi possível, através do presente estudo, a avaliação da utilização de um implante de hidroxiapatita granulada sintética com grânulos obtidos em peneira com malha de 2 mm (HAP 91®) para o tratamento de defeitos ósseos de 5 mm, considerados extensos. O material em questão foi manipulado seguindo as recomendações do fabricante e aplicado diretamente no defeito ósseo crítico criado. Segundo Kuemmerle (2005 apud NOTODIHARDJO et al., 2011) a qualidade da hidroxiapatita pode variar entre os fabricantes sem trazer diferença significativa para os estudos realizados. O tamanho dos poros do material influencia seu preenchimento por osteoblastos sendo poros de 150 a 500 µm considerados ideais (NOTODIHARDJO et al., 2011).

A avaliação histológica realizada permitiu evidenciar a adequada biocompatibilidade do material utilizado, uma vez que não foi observado o

desencadeamento de reação do tipo corpo estranho ao material implantado em nenhum dos animais do estudo. Na grande maioria dos casos, os grânulos de HA encontravam-se circundados por tecido de granulação, sugerindo uma possível neoformação óssea futura. Outra propriedade do material evidenciada neste estudo foi a osteocondução, corroborando resultados encontrados por outros autores (PARIS, 2002; LE GUEHENNEC; LAYROLLE; DACULSI, 2004; ASCHERMAN et al., 2008; SCHWENGBER, 2009; DINARVAND et al., 2011). Observou-se, em todos os tempos operatórios, que o implante de hidroxiapatita foi capaz de conduzir a formação óssea através da superfície de seus grânulos.

O material empregado neste estudo apresenta como limitação para o emprego em cavidades pouco profundas a dificuldade de manutenção de forma no defeito ósseo. Essa relativa instabilidade do material pode levar a variação na quantidade de osso neoformado dentro de um mesmo grupo experimental (SCHWENGBER, 2009; DINARVAND et al., 2011). Alguns autores utilizaram substitutos ósseos suportados por membranas ou barreiras (HADDAD et al., 2006; FURLANETO et al., 2007; MARZOUK et al., 2007), favorecendo a manutenção do material empregado no leito receptor. Outro recurso é a utilização de *scaffolds* para melhorar as propriedades biológicas dos substitutos ósseos. Esse recurso pode ser empregado juntamente com fatores de crescimento e substâncias osteoindutoras apresentando resultados promissores (WOODRUFF et al., 2007; NEOVIUS; ENGSTRAND, 2010; DINARVAND et al., 2011).

O desenvolvimento do esqueleto craniofacial pode ser considerado diferente do que ocorre nos demais ossos do organismo. Primeiramente porque a maior parte dos ossos craniofaciais apresenta seu desenvolvimento pela ossificação intramembranosa. Isso ocorre por deposição da matriz osteóide pela camada interna do perióstio sem mediação de uma fase cartilaginosa. Por sua vez, os ossos longos do esqueleto desenvolvem-se pela ossificação endocondral, através da matriz cartilaginosa. Além disso, a origem embrionária dos ossos craniofaciais é derivada de células da crista neural enquanto a maioria dos outros ossos é de origem mesodérmica (JHEON; SCHNEIDER, 2009). Segundo Shapiro (2008), esses mecanismos são também utilizados no reparo ósseo. Neste caso o ambiente no qual o reparo está ocorrendo é que determinará o tipo de mecanismo utilizado durante o mesmo. No reparo ósseo intramembranoso (quando há contato direto entre os cotos ósseos) células mesenquimais se diferenciam em preosteoblastos e posteriormente

em osteoblastos alinhados. O reparo ósseo endocondral (quando ocorre formação de calo ósseo) é caracterizado pela síntese inicial de uma matriz cartilaginosa seguida pela sequência de ossificação endocondral.

A presença de uma fase cartilaginosa pode ser observada tanto na formação óssea quanto em seu reparo. Neste estudo, foi possível observar o comportamento de enxerto alógeno de cartilagem frente a uma situação de reparo ósseo. Vários autores apresentam a cartilagem como alternativa na área bucomaxilofacial para reconstrução em áreas onde é necessária sua permanência no sítio receptor por um longo período antes da sua reabsorção (KARIMI-YAZDI et al., 2007; LUK; RUAN, 2008; SOUZA et al., 2008; CAVALIERE et al., 2009; MCNICKLE et al., 2009; SHI et al., 2009). No presente trabalho os grupos que receberam enxerto alógeno de cartilagem apresentaram menor percentual de preenchimento ósseo, o que pode ter ocorrido pela permanência do tecido enxertado por um período maior se comparado aos outros materiais utilizados. Vieira e colaboradores (1993) em um estudo em ratos, comparou diferentes meios de preservação de enxertos de cartilagem e verificou o início de sua substituição por tecido ósseo somente após 120 dias pós operatórios.

Os resultados obtidos neste estudo para o percentual de osso neoformado no interior do defeito ósseo crítico diferem dos encontrados por Calcagnotto (2009) e Schwengber (2009). O presente trabalho propõe uma alteração importante no desenho da cavidade experimental, com a remoção da barreira óssea entre os magnetos e a região central do defeito ósseo. Esta alteração permitiu ação direta do campo magnético na cavidade óssea repercutindo positivamente no reparo ósseo.

Além da análise histomorfométrica este trabalho realizou uma avaliação da expressão da proteína osteopontina durante o reparo ósseo, sob a influência ou não de campo magnético sepultado, após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem. A partir dos resultados histomorfométricos que evidenciaram diferenças significativas favoráveis à estimulação magnética no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno no tempo de 60 dias, optou-se por realizar a marcação imunoistoquímica em todos os grupos no tempo de 60 dias.

O anticorpo anti-osteopontina utilizado confere marcação ao material secretado pelas células. A marcação positiva pode ser observada de forma mais presente nas bordas do defeito ósseo, corroborando achados de Woodruff e

colaboradores (2007), que observaram a mesma distribuição de marcação. Não observou-se diferença significativa na intensidade de marcação entre os grupos estudados. Uma possível explicação para esse resultado pode estar relacionada ao período de observação (60 dias pós-operatórios) uma vez que a osteopontina é um marcador precoce da formação óssea (KHOJASTEH; ESLAMINEJAD; NAZARIAN, 2008; NAGATA et al., 2009). Uma limitação na metodologia empregada está relacionada ao fato de que a marcação imunistoquímica indica a presença ou a ausência da proteína na matriz óssea, não possibilitando identificar se sua expressão ocorreu antes ou depois da criação do defeito ósseo (NAGATA et al., 2009).

Outra forma de analisar o metabolismo ósseo é por meio de marcadores bioquímicos como as fosfatases alcalina e ácida. Segundo Bonucci e colaboradores (2001), a fosfatase alcalina é um marcador não específico para osteoblastos e a isoforma tartarato-resistente da enzima fosfatase ácida é um marcador não específico para osteoclastos. Ambas enzimas podem ser usadas para identificar os precursores dessas células e podem ser encontradas em osteócitos jovens, osteoblastos e macrófagos. Os autores realizaram uma revisão de vários estudos sobre a atividade das referidas enzimas e sua relação com o metabolismo ósseo (BONUCCI et al., 2001).

Tradicionalmente os níveis séricos totais das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida são utilizados como marcadores bioquímicos de formação óssea e de reabsorção óssea, respectivamente. No entanto ambas enzimas apresentam isoformas atuantes em outros órgãos. Para uma informação mais precisa sobre o metabolismo ósseo idealmente deve-se isolar as isoformas óssea-específica da enzima fosfatase alcalina e tartarato-resistente da enzima fosfatase ácida. Quando essa separação entre as isoformas não é possível deve-se considerar na análise dos resultados a interferência de outros fatores (TOBIUME et al., 1997). A enzima fosfatase alcalina possui isoformas que atuam na placenta, no fígado, no rim e no intestino. A enzima fosfatase ácida possui isoformas que atuam na próstata, nas plaquetas, nos eritrócitos e no baço (VIEIRA, 1999; SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

No presente estudo a metodologia empregada permitiu obter informações sobre os níveis séricos totais das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida, o que deve ser considerado como uma limitação do estudo. Dessa forma, consideramos

que os resultados encontrados não possam ser considerados isoladamente na formação e na reabsorção óssea. A fração óssea da fosfatase alcalina, quando aumentada, deve ser interpretada como aumento da atividade osteoblástica (TOBIUME et al., 1997). A isoforma óssea da enzima fosfatase ácida, quando aumentada, é um indicativo de aumento da atividade osteoclástica (WU et al., 2010).

Os resultados obtidos neste estudo para a atividade da enzima fosfatase alcalina diferem dos encontrados por Calcagnotto (2009) e Schwengber (2009), estes autores encontraram níveis de fosfatase alcalina inferiores no grupo Naive se comparados aos grupos que sofreram intervenção cirúrgicas. Os trabalhos citados utilizaram kit para mensuração da atividade da enzima fosfatase alcalina do mesmo fabricante, porém as análises foram realizadas em laboratórios distintos. Além disso, Calcagnotto e Schwengber realizaram a mensuração no plasma sanguíneo enquanto neste estudo a mensuração foi realizada no soro sanguíneo.

7 CONCLUSÃO

Após a realização do presente estudo com a metodologia empregada foi possível concluir que:

a) a avaliação histomorfométrica, após quantificação do percentual de preenchimento ósseo, evidenciou superioridade do reparo no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno sob influência de campo magnético se comparado ao grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno sem influência de campo magnético, aos 60 dias pós-operatórios;

b) a avaliação histomorfométrica, comparando os diferentes grupos, apontou a superioridade do reparo no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno, seguido pelos grupos que receberam implante de hidroxiapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem.

c) a avaliação imunohistoquímica, após quantificação da expressão da proteína osteopontina, aos 60 dias pós-operatórios não evidenciou diferença significativa entre os grupos com a metodologia empregada;

d) a atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida apresentou valores inferiores entre os grupos que sofreram intervenção e o grupo que não sofreu intervenção cirúrgica, sendo que aos 60 dias pós-operatórios esta diferença foi significativa para todos os grupos do estudo;

e) o presente trabalho contribuiu para o entendimento da influência do campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo. A partir dos resultados encontrados, novas metodologias podem ser propostas para complementar os resultados obtidos e fortalecer a presente linha de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- AALAMI, O. O. et al. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 3, p. 713-720, 2004.
- AARON, R. K. et al. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. **Clin Orthop Relat Res**, n. 419, p. 30-37, 2004.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, v. 10, p. S96-101, 2001. Supplement 2.
- ANBINDER, A. L. et al. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. **Braz Dent J**, v. 17, n. 4, p. 267-273, 2006.
- AOKI, H. **Science and medical applications of hydroxyapatite**. Tokyo: Takayama, 1991.
- ASCHERMAN, J. A. et al. Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 4, p. 1131-1135, 2008.
- BERCINI, F. **Enxertos autógenos intra-ósseos e sub periostais de cartilagem, com remoção do pericôndrio: estudo histológico em ratos**. 1991. 102 p. Dissertação (Mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.
- BONUCCI, E. et al. The osteoblastic phenotype in calcium-depleted and calcium-repleted rats: a structural and histomorphometric study. **J Electron Microsc (Tokyo)**, v. 50, n. 4, p. 333-347, 2001.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.
- BRUCE, G. K.; HOWLETT, C. R.; HUCKSTEP, R. L. Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius. Preliminary results. **Clin Orthop Relat Res**, n. 222, p. 300-306, 1987.
- BRUNSKI, J. B.; PULEO, D. A.; NANJI, A. Biomaterials and biomechanics of oral and maxillofacial implants: current status and future developments. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 1, p. 15-46, 2000.
- BURG, K. J.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.
- CALCAGNOTTO, T. **Avaliação histológica e bioquímica do reparo óseo em crânio de ratos após implantes de cimento de fosfato de cálcio (MimixTM) sob**

campo magnético permanente. 2009. 171 p. Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CAMILLERI, S.; MCDONALD, F. Static magnetic field effects on the sagittal suture in *Rattus norvegicus*. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 103, n. 3, p. 240-246, 1993.

CAVALIERE, M. et al. Tragal cartilage in tympanoplasty: anatomic and functional results in 306 cases. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v. 29, n. 1, p. 27-32, 2009.

CHOI, B. H.; IM, C. J.; HUH, J. Y.; SUH, J. J.; LEE, S. H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, p. 56-59, 2004.

CLOKIE, C. M. et al. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. **J Craniofac Surg**, v. 13, n. 1, p. 111-123, 2002.

COHEN JR, M. M. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 104, p. 2646-2706, 2006.

CORNAGLIA, A. I. et al. Stimulation of osteoblast growth by an electromagnetic field in a model of bone-like construct. **Eur J Histochem**, v. 50, n. 3, p. 199-204, 2006.

CORSETTI, A. **Avaliação do reparo ósseo em fêmures de ratos após implantes de blocos de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno**. 2005. 122 p. Dissertação (Mestrado)–Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CORSETTI, A.; LEITE, M. E. A. Avaliação da presença de microrganismos aeróbios em blocos de cimento fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização. **RFO - UPF**, v. 13, n. 2, p. 27-32, 2008.

COSTANTINO, C. et al. Treatment of wrist and hand fractures with natural magnets: preliminary report. **Acta Biomed**, v. 78, n. 3, p. 198-203, 2007.

DARENDELILER, M. A.; DARENDELILER, A.; SINCLAIR, P. M. Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. **Int J Adult Orthodon Orthognath Surg**, v. 12, n. 1, p. 43-53, 1997.

DINARVAND, P. et al. New approach to bone tissue engineering: simultaneous application of hydroxyapatite and bioactive glass coated on a poly(L-lactic acid) scaffold. **ACS Appl Mater Interfaces**, 2011.

DUTRA, N. B. **Avaliação histológica da aplicação de um campo magnético em enxertos ósseos autógenos em ratos**. 2005. 82 p. Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FINI, M. et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. **J Orthop Res**, v. 20, n. 4, p. 756-763, 2002.

FREDERICKS, D. C. et al. Effects of pulsed electromagnetic field stimulation on distraction osteogenesis in the rabbit tibial leg lengthening model. **J Pediatr Orthop**, v. 23, n. 4, p. 478-483, 2003.

FURLANETO, F. A. et al. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 3, p. 311-318, 2007.

GAUTHIER, O. et al. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. **J Biomed Mater Res**, v. 47, n. 1, p. 28-35, 1999.

GOSAIN, A. K. et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. **Plast Reconstr Surg**, v. 114, n. 5, p. 1155-1165, 2004.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v. 106, n. 2, p. 360-372, 2000.

GRIFFIN, X. L.; WARNER, F.; COSTA, M. The role of electromagnetic stimulation in the management of established non-union of long bone fractures: what is the evidence? **Injury**, v. 39, n. 4, p. 419-429, 2008.

GUYTON, A. C. Hormônio paratireóide, calcitonina, metabolismo do cálcio e do fósforo, vitamina D, osso e dentes. In: GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989. p. 743-755.

HADDAD, A. J. et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. **J Craniofac Surg**, v. 17, n. 5, p. 926-934, 2006.

HALLIDAY, D. **Fundamentos de física: eletromagnetismo**. 3. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1994. v. 3.

HANNEMANN, P. et al. Pulsed electromagnetic fields in the treatment of fresh scaphoid fractures: a multicenter, prospective, double blind, placebo controlled, randomized trial. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 12, p. 90, 2011.

INODA, H.; YAMAMOTO, G.; HATTORI, T. rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 1, p. 39-44, 2007.

JÄGER, A. et al. Cellular and extracellular factors in early root resorption repair in the rat. **Eur J Orthod**, v. 30, n. 4, p. 336-345, 2008.

JHEON, A. H.; SCHNEIDER, R. A. The cells that fill the bill: neural crest and the evolution of craniofacial development. **J Dent Res**, v. 88, n. 1, p. 12-21, 2009.

JIANG, X. et al. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4522-4532, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.

KARIMI-YAZDI, A. et al. Comparison of microtia reconstructive surgery with autograft versus homograft. **Arch Iran Med**, v. 10, n. 1, p. 43-47, 2007.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral: texto - atlas - correlações clínicas**. 2. ed. Buenos Aires: Panamericana, 2004.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN, C. A. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KHOJASTEH, A.; ESLAMINEJAD, M. B.; NAZARIAN, H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 3, p. 356-363, 2008.

KOTANI, H. et al. Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res**, v. 17, n. 10, p. 1814-1821, 2002.

KUEMMERLE, J. M. et al. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty e an experimental study in sheep. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 33, p. 37-44, 2005.

LE GUEHENNEC, L.; LAYROLLE, P.; DACULSI, G. A review of bioceramics and fibrin sealant. **Eur Cell Mater**, v. 8, p. 1-11, 2004.

LEE, M. B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction: a review. **J Clin Periodontol**, v. 24, n. 6, p. 355-365, 1997.

LEUNG, K. S. et al. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. **J Bone Joint Surg Br**, v. 75, n. 2, p. 288-292, 1993.

LUK, K. D.; RUAN, D. K. Intervertebral disc transplantation: a biological approach to motion preservation. **Eur Spine J**, v. 17, p. 504-510, 2008. Supplement 4.

MARZOUK, K. M. et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 8, p. 1508-1516, 2007.

MATSUBARA, H. et al. Percutaneous nonviral delivery of hepatocyte growth factor in an osteotomy gap promotes bone repair in rabbits: a preliminary study. **Clin Orthop Relat Res**, v. 466, n. 12, p. 2962-2972, 2008.

MCNICKLE, A. G. et al. Performance of a sterile meniscal allograft in an ovine model. **Clin Orthop Relat Res**, v. 467, n. 7, p. 1868-1876, 2009.

MENDONÇA, J. C. G. et al. Reconstrução de assoalho de órbita com enxerto autógeno de cartilagem auricular: relato de caso. **Rev Bras Cir Craniomaxilofac**, v. 12, n. 4, p. 188-191, 2009.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 6, p. 723-729, 2008a.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2008b.

MOKAL, N. J.; KALE, C. Composite correction of a unilateral cleft lip nose deformity and alveolar bone grafting. **Indian J Plast Surg**, v. 42, p. S71-S78, 2009. Supplement.

NAGATA, M. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 339-345, 2009.

NEOVIUS, E.; ENGSTRAND, T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 63, n. 10, p. 1615-1623, 2010.

NOTODIHARDJO, F. Z. et al. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, 2011.

OLIVEIRA, R. C. de. et al. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 8, p. 749-754, 2008.

PALLESEN, L. et al. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 4, p. 498-506, 2002.

PAN, X. et al. Study of rotating permanent magnetic field to treat steroid-induced osteonecrosis of femoral head. **Int Orthop**, v. 33, n. 3, p. 617-623, 2009.

PARIS, M. F. D. **Reconstrução de osso alveolar, em área dentada, com o uso de hidroxiapatita**. 2002. 124 p. Dissertação (Mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 9, p. 966-972, 2005a.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. **J Periodontol**, v. 76, n. 8, p. 1287-1292, 2005b.

PRYOR, M. E.; SUSIN, C.; WIKESJO, U. M. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 6, p. 455-460, 2006.

PURICELLI, E.; BERCINI, F. Enxertos autógenos e subperiosteais de cartilagem, com remoção do pericôndrio: estudo histológico em ratos. **R Fac de Odontol**, v. 7, n. 14, p. 9-24, 1992.

PURICELLI, E. Avaliação histológica de implantes de hidroxiapatita em defeito ósseo alveolar dentado em humano: relato de caso. **R Fac Odontol**, v. 43, n. 1, p. 34-36, 2002.

PURICELLI, E. et al. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs. **Head Face Med**, v. 2, p. 43, 2006.

PURICELLI, E.; DUTRA, N. B.; PONZONI, D. Histological evaluation of the influence of magnetic field application in autogenous bone grafts in rats. **Head Face Med**, v. 5, p. 1, 2009.

RABIE, A. B.; LIE KEN JIE, R. K. Integration of endochondral bone grafts in the presence of demineralized bone matrix. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 25, n. 4, p. 311-318, 1996.

ROY, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. **Clin Chem**, v. 16, n. 5, p. 431-436, 1970.

RUPPRECHT, S. et al. Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects: an experimental study. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 31, n. 3, p. 149-153, 2003.

SARAIVA, G. L.; CASTRO, M. L. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.

SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 1, p. 72-78, 2002.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n. 204, p. 299-308, 1986.

SCHWENGBER, M. M. B. **Reparo ósseo após enxerto ósseo autógeno e implante de hidroxiapatita absorvível granulada sob influência de campo magnético estático**: estudo experimental em calvária de ratos. 2009. 115 p. Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SEIBEL, M. J. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 50, n. 4, p. 603-620, 2006.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair: the role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **Eur Cell Mater**, v. 15, p. 53-76, 2008.

SHAPOFF, C. A. et al. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. **J Periodontol**, v. 51, n. 11, p. 625-630, 1980.

SHARRARD, W. J. A double-blind trial of pulsed electromagnetic fields for delayed union of tibial fractures. **J Bone Joint Surg Br**, v. 72, n. 3, p. 347-355, 1990.

SHI, H. et al. Animal models of tracheal allotransplantation using vitrified cryopreservation. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 138, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.11, n. 3, p. 279-303, 2000.

SOCCOL, A. T. et al. Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 72, n. 2, p. 195-199, 2006.

SOUZA, M. M. A. de. et al. Study of rabbit septal cartilage grafts placed on the nasal dorsum. **Arch Facial Plast Surg**, v. 10, n. 4, p. 250-254, 2008.

SYKARAS, N. et al. Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration: a literature review. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 15, n. 5, p. 675-690, 2000.

TOBIUME, H. et al. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in

normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 7, p. 2056-2061, 1997.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

VAN BERGEN, C. J. A. et al. Pulsed electromagnetic fields after arthroscopic treatment for osteochondral defects of the talus: double-blind randomized controlled multicenter trial. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 10, p. 83, 2009.

VARANI, K. et al. Effect of low frequency electromagnetic fields on A2A adenosine receptors in human neutrophils. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 1, p. 57-66, 2002.

VIEIRA, E. H. et al. Allogeneic transplants of rib cartilage preserved in 98% glycerol or 70% alcohol into the malar process of rats: a comparative histological study. **J Nihon Univ Sch Dent**, v. 35, n. 2, p. 96-103, 1993.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 43, n. 6, p. 415-422, 1999.

WOODRUFF, M. A. et al. Sustained release and osteogenic potential of heparan sulfate-doped fibrin glue scaffolds within a rat cranial model. **J Mol Hist**, v. 38, p. 425-433, 2007.

WU, Y. Y. et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity as a prognostic marker of survival in breast cancer with bone metastasis. **BMC Cancer**, v. 10, p. 158, 2010.

YAN, Q. C.; TOMITA, N.; IKADA, Y. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. **Med Eng Phys**, v. 20, n. 6, p. 397-402, 1998.

YUE, B. et al. BMP2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats. **Calcif Tissue Int**, v. 77, n. 6, p. 395-403, 2005.

ANEXO A – Código Estadual de Proteção aos Animais

Lei Estadual Nº 11.915
21 de maio de 2003
Rio Grande do Sul

TÍTULO II CAPÍTULO I Dos Animais de Laboratório

Seção I Da Vivissecção

Art.18 - Considera-se vivissecção os experimentos realizados com animais vivos em centros de pesquisas.

Art.19 - Os centros de pesquisas deverão ser devidamente registrados no órgão competente e supervisionados por profissionais de nível superior, nas áreas afins.

Art.20 - É proibida a prática de vivissecção sem uso de anestésico, bem como a sua realização em estabelecimentos escolares de ensino fundamental e médio.

Parágrafo único - Os relaxantes musculares parciais ou totais não serão considerados anestésicos.

Art.21 - Com relação ao experimento de vivissecção é proibido:

I - realizar experiências com fins comerciais, de propaganda armamentista e outros que não sejam de cunho científico humanitário;

II - utilizar animal já submetido a outro experimento ou realizar experiência prolongada com o mesmo animal.

Art.22 - Nos locais onde está autorizada a vivissecção, deverá constituir-se uma comissão de ética, composta por, no mínimo, 03 (três) membros, sendo:

I - um (01) representante da entidade autorizada;

II - um (01) veterinário ou responsável;

III - um (01) representante da sociedade protetora de animais.

Art.23 - Compete à comissão de ética fiscalizar:

I - a habilitação e a capacidade do pessoal encarregado de prestar assistência aos animais;

II - verificar se estão sendo adotados os procedimentos para prevenir dor e o sofrimento do animal, tais como aplicação de anestésico ou analgésico;

III - denunciar ao órgão competente qualquer desobediência a esta Lei.

Art.24 - Todos os centros de pesquisas deverão possuir os recursos humanos e materiais necessários a fim de zelar pela saúde e bem-estar dos animais.

Seção II Das Disposições Finais

Art.25 - As penalidades e multas referentes às infrações definidas nesta Lei serão estabelecidas pelo Poder Executivo, em espécie.

Art.26 - O Poder Executivo definirá o órgão estadual encarregado de fiscalizar o cumprimento das disposições desta Lei.

Art.27 - O Poder Executivo regulamentará esta Lei no prazo de 30 (trinta) dias da data de sua publicação.

Art.28 - Esta Lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art.29 - Revogam-se as disposições em contrário.

PALÁCIO PIRATINI, em Porto Alegre, 21 de maio de 2003.

ANEXO B – Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA

A) A Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde credenciada, junto a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde, como Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), vinculada ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com o objetivo de estabelecer normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa submetidos à apreciação desta Comissão, com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas, dispõe que:

a) a utilização de animais em pesquisas científicas deve ocorrer somente após ser provada a sua relevância para o avanço do conhecimento científico, considerando-se a impossibilidade de utilização de métodos alternativos como: modelos matemáticos, simulações computadorizadas; sistemas biológicos "in vitro" ou outro método adequado;

b) a espécie utilizada e o cálculo do tamanho da amostra devem ser adequados para a obtenção de resultados válidos;

c) deve ser oferecido alojamento, transporte, alimentação e cuidados adequados à espécie através de assistência qualificada;

d) procedimentos que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia, salvo quando forem os mesmos o objetivo da pesquisa. Devem ser, igualmente, observados cuidados com assepsia e prevenção de infecções, assim como cuidados para minimizar o desconforto e estresse dos animais em estudo;

e) necessitando de imobilização física e/ou de privação alimentar ou hídrica, os pesquisadores devem procurar manter estas condições pelo menor período de tempo possível, evitando prolongar a angústia, desconforto e dor;

f) quando for necessário ao estudo, ou após o mesmo, se indicado, que os animais devam ser sacrificados, este procedimento deve ser realizado de forma rápida indolor e irreversível;

g) as técnicas aceitas para o sacrifício de animais são as seguintes: hipoxia por barbitúricos, anestésicos inalatórios, dióxido de carbono e monóxido de carbono (engarrafado), metanesulfonato de triclaína, benzocaína e irradiação por microondas;

h) as técnicas aceitas, de forma condicional, são as seguintes: hipóxia por deslocamento cervical, por medular; por nitrogênio ou argônio, decapitação, concussão cerebral e dano medular;

i) não serão aceitas, salvo exceções extremamente justificadas, as seguintes técnicas de sacrifício de animais: sangramento, descompressão, congelamento rápido, embolismo gasoso, afogamento, atordoamento, uso isolado de estriquinina, nicotina, sulfato de magnésio, cloreto de potássio, agentes curariformes, clorofórmio e cianeto.

Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA. Resolução Normativa 04/97 - Utilização de Recursos Financeiros em Projetos de Pesquisa. Aprovada na reunião conjunta das Comissões Científica e de Pesquisa e Ética em Saúde de 08 de maio de 1997.

APÊNDICE A – Artigo elaborado a partir da dissertação

Efeito sobre o reparo ósseo de campo magnético sepultado em crânio de ratos após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, hidroxiapatita sintética e enxerto alógeno de cartilagem

Edela Puricelli*

Maíra Cavallet de Abreu**

* Estudante de pós-graduação, nível Mestrado, Unidade de Cirurgia Bucomaxilofacial, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

** Professora e Chefe da Unidade de Cirurgia Bucomaxilofacial, HCPA e Faculdade de Odontologia, UFRGS.

ABSTRACT

Objective: the comprehension of the phenomenon of bone repair represents a fundamental part of odontology and of oral and maxillofacial surgery. The present work has as its objective, to evaluate the influence of a stimulated magnetic field implanted over the calvarial bone of rats after its reconstruction with autogeneous bone graft, synthetic hydroxyapatite crystals or with the insertion of allogeneic cartilage, in comparison to no magnetic stimulation. **Materials e methods:** 90 Wistar male rats were used, divided into groups with 5 animals in each. The autogeneous bone graft, the synthetic hydroxyapatite crystals and the insertion of allogeneic cartilage were each used separately in the performed interventions of reconstruction with or without the influence of implanted magnetic fields. Evaluations were performed in 15, 30 and 60 days after surgery. Also, quantification of bone neoformation was obtained through histomorphometry in all experimental time periods. **Results:** the histomorphometry 60-day evaluation, showed evidence of a significant interaction between the groups and the time of $p=0,008$ on the animals that received reconstruction with autogeneous bone. The group that was influenced by the magnetic field presented a percent of bone reconstruction superior to that of the group which did not receive magnetic stimulation. **Conclusion:** this work

contributed to the understanding of the influence that an implanted magnetic field has on bone reconstruction. From the results found, new methodologies can be proposed as a complementary to obtained results and can strengthen the present line of research.

Key-words: Dentistry. Surgery, oral. Facial bones – Surgery. Bone graft. Magnetic field therapy.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é mineralizado e de natureza conjuntiva, quando lesado é capaz de reparação (KATCHBURIAN; ARANA, 2004; TORTORA; GRABOWSKI, 2002). Reconstruções bem sucedidas de defeitos ósseos bucomaxilofaciais são possíveis devido aos avanços no entendimento da fisiologia óssea juntamente com o aprimoramento das técnicas cirúrgicas (PETERSON et al., 2005), estas devem promover o estabelecimento de mecanismos biológicos reparadores, evoluindo para o reestabelecimento da função do tecido lesado (FINI et al., 2002; PETERSON et al., 2005; SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000).

Muitos estímulos biológicos, químicos e físicos vêm sendo testados com o objetivo de influenciar positivamente o crescimento, a remodelação e o reparo ósseo (FINI et al., 2002). Dentre estes, destacam-se os estudos que avaliam a estimulação de campos eletromagnéticos e magnéticos em relação a seus efeitos em níveis tecidual, celular e molecular (AARON et al., 2004; FINI et al., 2002; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009; PURICELLI et al., 2006).

O magnetismo é um fenômeno que existe espontaneamente na natureza, especificamente em estruturas chamadas ferro-magnéticas, que possuem forças de atração e repulsão localizadas em suas extremidades ou pólos (CONSTANTINO et al., 2007). Campos magnéticos podem ser aplicados interna ou externamente ao organismo. Estudos relacionados à aplicação de campos magnéticos estáticos nos tecidos evidenciaram diversos efeitos. A penetração do campo magnético através da pele gera estímulos no ferro presente na hemoglobina, influenciando o transporte de oxigênio (CONSTANTINO et al., 2007). No tecido ósseo, o campo magnético parece provocar estímulo à osteogênese através da ativação de osteoblastos e aumento de aporte sanguíneo (CONSTANTINO et al., 2007; PURICELLI; DUTRA; PONZONI,

2009; PURICELLI et al., 2006). Além disso, resultados sugerem que o campo magnético aumenta a concentração de fatores de crescimento, fato que acelera o processo de reparação óssea (AARON et al., 2004).

A utilização de modelos animais para o estudo de intervenções visando acelerar o reparo ósseo e restabelecer forma e função deste tecido tem se mostrado pertinente (FAGUNDES; TAHA, 2004). Diversos estudos utilizam a calvária de ratos para avaliação do reparo ósseo através de defeitos ósseos críticos, que impossibilitam o reparo espontâneo durante todo o período experimental (FURLANETO et al., 2007; MESSORA et al., 2008a; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Como método de quantificação e comparação dos tecidos presentes nos cortes histológicos, a histomorfometria é amplamente utilizada (FINI et al., 2002; FURLANETO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008; PRYOR et al., 2005a).

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência da estimulação de campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo em calvária de ratos após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, hidroxapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem, comparados aos controles sem estimulação magnética.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo observou as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme Código Estadual de Proteção aos Animais e Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA e foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA (projeto número 10-0307).

O tamanho da amostra foi estimado utilizando o comando de cálculo para duas médias de grupos independentes do programa estatístico G*Power 3, atribuindo-se valores de 5% e 80% para nível de significância e poder da amostra, respectivamente. O desfecho primário considerado para a estimativa do número de animais necessário para a realização do estudo foi o percentual de preenchimento ósseo.

Foram utilizados 90 ratos, linhagem Wistar, sexo masculino, com 7 a 8 semanas de idade e apresentando em média 300 g de massa corporal. Todos os grupos foram compostos por 5 ratos cada, os animais foram sorteados visando distribuição aleatória nos grupos experimentais. Os tempos de avaliação estabelecidos foram de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. O presente trabalho avaliou a influência de campo magnético sepultado gerado pela implantação de dois ímãs permanentes adjacentes ao defeito ósseo criado em calvária de ratos, submetidos isoladamente procedimentos de reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem.

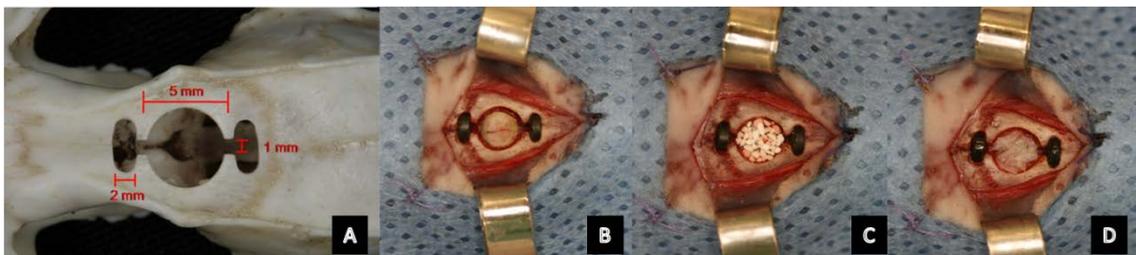
O enxerto alógeno de cartilagem foi utilizado segundo protocolo proposto por Vieira e colaboradores (1993), o qual consiste em remoção da cartilagem sem pericôndrio, lavagem com solução fisiológica estéril por 15 minutos e conservação em solução de etanol a 70%, sob refrigeração (2° a 8°C), durante 20 dias. Foi implantado na área do defeito ósseo de forma particulada conforme protocolo utilizado por Puricelli (1992). Nos grupos que receberam enxerto ósseo autógeno, este consistiu do próprio osso da calota craniana resultante da criação do defeito ósseo de 5 mm de diâmetro com broca trefina. Após a criação do defeito, o enxerto ósseo coletado foi reposicionado em bloco na área a ser reconstruída. A hidroxiapatita granulada sintética utilizada (HAP 91®) é apresentada como absorvível, porosa e com grânulos obtidos em peneira com malha de 2 mm.

O campo magnético, quando presente, foi gerado por dois ímãs de neodímio-ferro-boro sepultados adjacentes ao defeito ósseo criado. Nas calvárias dos animais dos grupos controle foram utilizados discos de titânio comercialmente puro, para simular a presença dos ímãs. Todos os magnetos utilizados no estudos foram mensurados por gaussímetro e obteve-se o valor de 84,3 G para a média da intensidade de campo magnético presente na região central do defeito ósseo.

Os procedimentos foram realizados seguindo rigoroso padrão de assepsia. A anestesia dos animais foi por infiltração intraperitoneal de cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina na dosagem respectiva de 100 mg/kg e 10mg/kg e infiltração local com bupivacaína na dosagem de 2 mg/Kg. Após exposição e localização do osso frontal, foi realizado neste um defeito ósseo bicortical de 5 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, com broca trefina. Nas direções anterior e posterior do defeito ósseo foram realizadas duas ostectomias transversais de 2 mm de comprimento

para sepultamento dos ímãs e fendas de 1 mm na barreira óssea resultante. Esta solução de continuidade favorecendo a presença do campo magnético na área, diferenciou este modelo do utilizado por Calcagnotto (2009) e Schwengber (2009). No interior do defeito ósseo criado foi realizada reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxiapatita granulada sintética ou enxerto alógeno de cartilagem, evento que diferencia os grupos experimentais, figura 1. A analgesia pós-operatória consistiu na administração de Tramadol 5mg/Kg, no pós-operatório os animais receberam ração e água *ad libitum*. Após os períodos de 15, 30 e 60 dias foi realizada a morte dos animais por decapitação em guilhotina.

Figura 1 – Defeito ósseo crítico e reconstruções realizadas



Fonte: Autora.

Legenda: **A.** Dimensões do efeito ósseo crítico criado em calvária de rato; **B.** Reconstrução com enxerto ósseo autógeno; **C.** Reconstrução com hidroxiapatita granulada sintética; **D.** Reconstrução com enxerto alógeno de cartilagem.

Preparo histológico

O material foi fixado em formalina neutra tamponada 10%, por 24 horas. Após fixação, as peças foram descalcificadas em uma solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20%, (1:1). Foi realizada cuidadosa remoção dos dispositivos metálicos durante o período de descalcificação sem danificação da peça. Após a completa descalcificação, foi realizada secção longitudinal mediana da calvária com uso de uma navalha descartável para micrótomos. Em seguida, as peças foram submetidas ao procedimento usual para inclusão em parafina. Foram realizados cortes histológicos de 4 μ que contemplaram a área central de estimulação magnética, correspondente à área central do defeito ósseo e realizada coloração de hematoxilina e eosina (HE).

Para a calibração o examinador realizou duas mensurações de dez lâminas separadas por um intervalo de sete dias. Os valores obtidos para as duas mensurações do período de calibração foram analisados com auxílio do software R,

versão 2.9.0, (R Development Core Team, 2010). Os valores de calibração obtidos foram: coeficiente de correlação intraclasse (ICC) de 0,98 e intervalo de confiança (IC) de 0,61 a 0,99.

As lâminas foram codificadas para permitir o cegamento do observador quanto à distribuição dos grupos do estudo. O campo histológico analisado envolveu toda a extensão do defeito ósseo. As imagens microscópicas das lâminas histológicas foram capturadas no aumento de 100x, através de uma câmera de vídeo Olympus® (modelo Qcolor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF e a um computador Dell_ (modelo Dimension 5150), utilizando o software Qcapture® (versão 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005). (Equipamento presente no Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J.J.D. Barbacham no setor de Patologia Bucal de FO-UFRGS adquirido com apoio financeiro da FAPERGS, PROAP04/2005 nº do Processo 0410882). As fotomicrografias obtidas foram agrupadas lado a lado utilizando a técnica de mosaico, possibilitando a visualização e mensuração da área total do defeito ósseo. Posteriormente, foram excluídas as imagens externas ao defeito ósseo, permanecendo para análise apenas a porção central do defeito ósseo.

A análise histomorfométrica consistiu na demarcação da área total do defeito ósseo e demarcação das áreas de neoformação óssea no interior do mesmo, obtendo-se o percentual de osso neoformado no interior do defeito ósseo criado. Essas mensurações foram obtidas em Pixel², utilizando o software Axiovision®, versão 4.6.3, (Carl Zeiss Imaging) e transformadas em porcentagem, permitindo a obtenção de valores do percentual de osso neoformado em relação ao defeito original.

RESULTADOS

Os animais envolvidos no estudo não apresentaram complicações infecciosas pós-operatórias. Dois animais foram excluídos da amostra sendo um por deslocamento do ímã e um por obtenção de material de qualidade insuficiente para a avaliação histológica.

Histomorfometria

Para avaliação histomorfométrica foi utilizada a variável percentual de preenchimento ósseo, calculada após a mensuração da área total do defeito ósseo e das áreas de osso neoformado em seu interior. A variável percentual de preenchimento ósseo apresentou dados com distribuição normal. Para a análise estatística desta variável foi utilizado o teste de Modelos Mistos com a estrutura de covariância escolhida pelo menor critério de informação de Akaike que, neste caso, foi a Diagonal. O teste de post-hoc utilizado foi Bonferroni. O modelo evidenciou interação significativa entre as variáveis grupo e tempo, $p=0,008$. A avaliação dos dados é feita via intervalo de confiança. Os valores são apresentados na Tabela 1.

A avaliação transversal, ou seja, entre os grupos no mesmo tempo experimental do percentual de preenchimento ósseo evidenciou, aos 15 dias, que o grupo OA+Í (IC 5,59-11,69) apresentou percentual de preenchimento ósseo superior ao grupo CT (IC 0-5,03). Aos 30 dias, o grupo OA+Í (IC 21,99-36,08) permaneceu com percentual de preenchimento ósseo superior ao grupo CT (IC 1,29-15,38) e foi ainda superior ao grupo HA+Í (IC 6,57-20,66). Aos 60 dias, o grupo HA+Í (IC 23,01-39,38) apresentou percentual de preenchimento ósseo superior ao grupo CT (IC 5,87-22,23). Ainda aos 60 dias, o grupo OA+Í (IC 26,56-42,92) apresentou percentual de preenchimento ósseo superior ao grupo CT (IC 5,87-22,23) e ao grupo OA (IC 7,36-23,72). Esse resultado demonstrou que, aos 60 dias, nos animesis que receberam reconstrução com osso autógeno o grupo que recebeu influência do campo magnético apresentou percentual de preenchimento ósseo superior ao grupo sem influência do estímulo magnético.

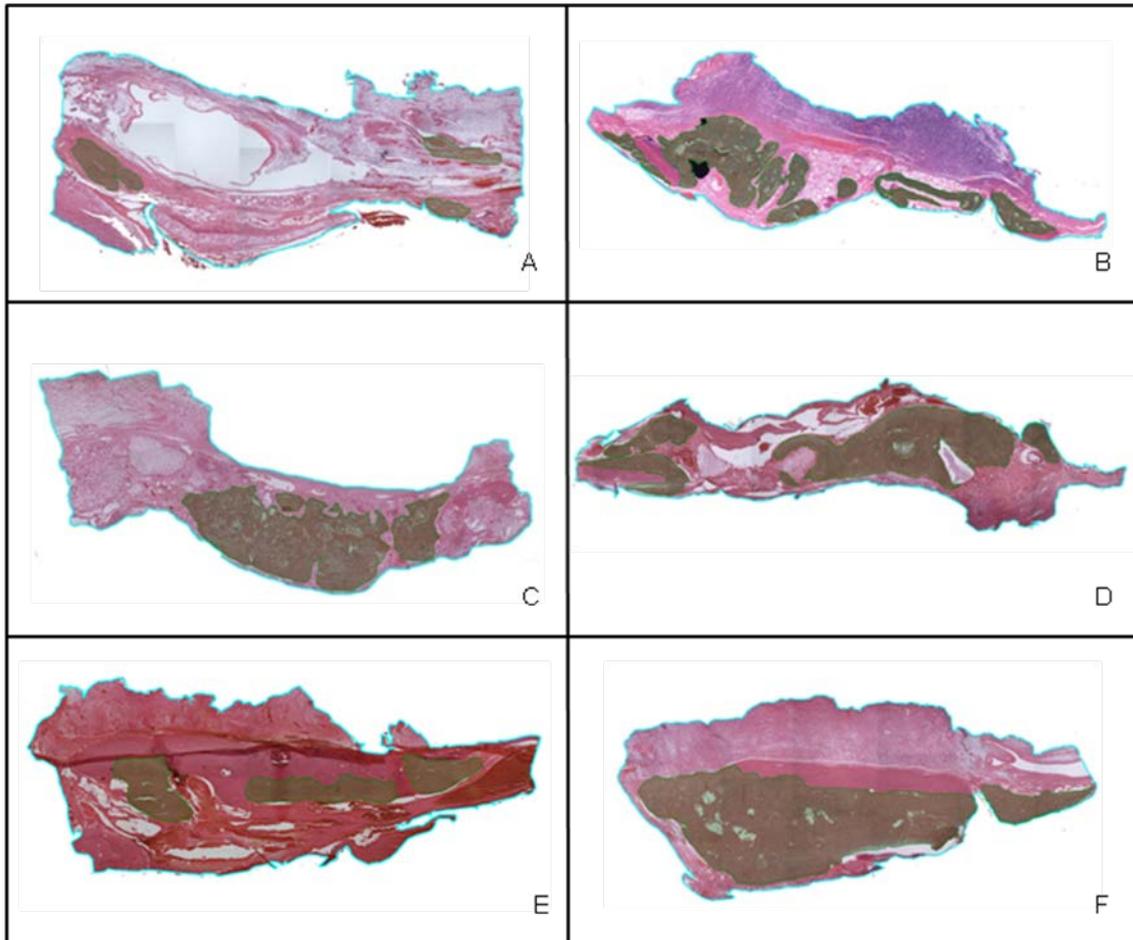
A análise longitudinal dos resultados obtidos permite realizar comparações ao longo do tempo no mesmo grupo experimental. Os valores do percentual de preenchimento ósseo para a análise longitudinal encontram-se expressos na Tabela 1. Esta análise evidenciou nos grupos CT+Í, HA, OA e OA+Í que o percentual de preenchimento ósseo aos 15 dias foi inferior ao encontrado aos 30 e aos 60 dias. No grupo HA+Í esta diferença no percentual de preenchimento ósseo ocorreu apenas aos 60 dias com valores superiores aos verificados nos tempos 15 e 30 dias. No grupo CT houve diferença entre o percentual de preenchimento ósseo entre os 15 e os 60 dias, os valores encontrados aos 30 dias não apresentaram diferença dos valores encontrados nos tempos 15 e 60 dias.

Tabela 1 – Percentual de preenchimento ósseo em todos os grupos experimentais, nos tempos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios

Percentual de Preenchimento Ósseo					
Grupo	Tempo	Média	Erro Padrão	Intervalo de Confiança 95%	
				Limite Inferior	Limite Superior
CT	15 dias	1,631	1,643	-1,776	5,039
	30 dias	8,335	3,413	1,29	15,38
	60 dias	14,055	3,964	5,875	22,236
CT + I	15 dias	3,989	1,47	0,941	7,037
	30 dias	17,018	3,413	9,973	24,063
	60 dias	19,12	3,964	10,940	27,300
HA	15 dias	6,258	1,47	3,21	9,306
	30 dias	19,372	3,413	12,327	26,417
	60 dias	25,5	3,964	17,320	33,680
HA + I	15 dias	3,811	1,47	0,764	6,859
	30 dias	13,617	3,413	6,572	20,661
	60 dias	31,199	3,964	23,019	39,380
OA	15 dias	3,069	1,643	-0,339	6,476
	30 dias	16,384	3,413	9,339	23,429
	60 dias	15,544	3,964	7,364	23,724
OA + I	15 dias	8,644	1,47	5,596	11,692
	30 dias	29,041	3,413	21,996	36,086
	60 dias	34,749	3,964	26,568	42,929

Fonte: Autora.

Figura 2 - Análise histomorfométrica realizada no programa AxioVision® após reconstrução com enxerto ósseo autógeno, implante de hidroxapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem, sob influência ou não de campo magnético sepultado, no tempo de 60 dias pós operatórios.



Fonte: Autora.

Legenda: **A.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sem influência de campo magnético sepultado; **B.** Grupo enxerto alógeno de cartilagem, sob influência de campo magnético sepultado; **C.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sem influência de campo magnético sepultado; **D.** Grupo implante de hidroxiapatita granulada sintética, sob influência de campo magnético sepultado; **E.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sem influência de campo magnético sepultado; **F.** Grupo enxerto ósseo autógeno, sob influência de campo magnético sepultado aos 60 dias pós-operatórios. A linha azul delimita a área total do defeito ósseo, áreas hachuradas em verde delimitam locais de neoformação óssea no interior do defeito crítico.

DISCUSSÃO

Este trabalho buscou respaldo no entendimento da fisiologia envolvida na formação óssea e no conhecimento sobre as estruturas que o compõem para entender os mecanismos envolvidos no reparo do mesmo. Lesões ao tecido ósseo podem ser de etiologia traumática, patológica e infecciosa (JIANG et al., 2009). É característica do tecido ósseo seu reparo como resposta a agressões sofridas. O reparo ósseo pode ser influenciado por características inerentes ao indivíduo como idade, patologias presentes ou medicamentos sistêmicos que possam interferir no

metabolismo ósseo. Também aspectos relacionados ao tipo de dano causado no tecido ósseo como tamanho da lesão e viabilidade de aporte sanguíneo para a região lesada devem ser considerados (SHAPIRO, 2008; NAGATA et al., 2009).

Nos estudos sobre a utilização de estímulos magnéticos no reparo tecidual os resultados ainda permanecem controversos. Os principais campos magnéticos estudados são os eletromagnéticos e os magnéticos. A utilização de campos eletromagnéticos na área da ortopedia parece promissora, Griffin, Warner e Costa (2008) em uma revisão sistemática da literatura concluíram que existem evidências para suportar o uso de estimulação eletromagnética no tratamento de falhas de união em fraturas de tíbia. Os autores revisaram 49 artigos, dos quais 3 foram ensaios clínicos controlados e randomizados sendo os demais ensaios clínicos não randomizados e séries de casos. A utilização de campos eletromagnéticos no reparo de fraturas recentes (HANNEMANN et al., 2011) e também em recuperação pós-operatória (VAN BERGEN et al., 2009) vem sendo avaliado por meio de ensaios clínicos controlados e randomizados a fim de gerar evidências científicas consistentes para sua aplicação.

A utilização de campos magnéticos estáticos, gerados por ímãs permanentes ou por materiais imantados, também apresenta uma gama variada de estudos e evidências. Tratamentos com a utilização de magnetos são amplamente utilizados na medicina chinesa para alívio da dor, promoção do fluxo sanguíneo e fortalecimento da arquitetura óssea (PAN et al., 2009).

Muitos estudos apontaram que campos magnéticos estáticos podem acelerar o processo de neoformação óssea ou cicatrização tecidual (COSTANTINO et al., 2007; DARENDELILER; DARENDELILER; PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009; PURICELLI et al., 2006). Para a compreensão da influência do campo magnético sobre o reparo ósseo a literatura busca evidências em parâmetros histológicos (PURICELLI; DUTRA; PONZONI, 2009; PURICELLI et al., 2006), na avaliação da concentração de fatores de crescimento (AARON et al., 2004; CORNAGLIA et al., 2006), no estudo da deposição de íons cálcio durante a ossificação (YAN; TOMITA; IKADA, 1998) e ainda na influência do magnetismo sobre a membrana plasmática celular (CORNAGLIA et al., 2006).

O presente trabalho avaliou a aplicação de campo magnético sepultado adjacente a defeito ósseo cirurgicamente criado, conforme conceito proposto por de Puricelli e colaboradores (2006). Por meio da metodologia também aqui utilizada foi

possível demonstrar, nos animais que receberam reconstrução com osso autógeno, que o grupo sob influência do campo magnético apresentou percentual de preenchimento ósseo significativamente superior ao grupo sem influência do estímulo magnético, no tempo pós-operatório de 60 dias. Nos tempos mais precoces, apesar da média do percentual de preenchimento ósseo ser superior nos grupos sob estimulação magnética essa diferença não foi estatisticamente significativa.

O osso autógeno é considerado o padrão ouro entre os substitutos ósseos. Neste trabalho o grupo osso autógeno sob estímulo magnético obteve os maiores valores de percentual de preenchimento ósseo, sendo estatisticamente superior ao grupo cartilagem sem magnetismo aos 15 dias, aos grupos cartilagem sem magnetismo e hidroxiapatita com magnetismo aos 30 dias e aos grupos cartilagem sem magnetismo e osso autógeno sem magnetismo aos 60 dias. O osso autógeno apresenta as propriedades de osteoindução, osteocondução e osteogênese que influenciam positivamente o reparo ósseo. Esse resultado também sinaliza para o efeito positivo do magnetismo no reparo ósseo, mantido em uma fase mais tardia do processo.

O estímulo gerado pela aplicação de campos magnéticos sobre o reparo ósseo parece promissor, no entanto, a melhor metodologia para avaliação deste estímulo ainda necessita ser elucidada, assim como os mecanismos biológicos que resultam em tal efeito.

Além do potencial efeito positivo gerado pelo campo magnético no reparo ósseo após enxerto é importante considerar que outros fatores podem influenciar diretamente a incorporação de enxertos ósseos. Um deles é o tipo de enxerto, no presente estudo foi utilizado enxerto em bloco de osso cortical oriundo da calota craniana. Esse tipo de enxerto revasculariza mais lentamente se comparado ao enxerto de osso medular, conseqüentemente a incorporação de enxertos de osso cortical será mais lenta do que aquela que ocorre em sítios com enxertos medulares (NAGATA et al., 2009). O enxerto cortical permanece como uma mescla de osso necrótico com osso viável por longos períodos de tempo enquanto o enxerto medular é completamente substituído. Outro fator que influencia diretamente a incorporação dos enxertos é o tamanho das partículas utilizadas. Em um estudo conduzido em coelhos, os estágios precoces do reparo ósseo foram influenciados pelo tamanho das partículas de osso autógeno utilizadas (PALLESEN et al., 2002).

No presente trabalho a utilização do enxerto em bloco provavelmente influenciou negativamente o reparo ósseo nos tempos de 15 e 30 dias pós-operatórios. Segundo Shapoff e colaboradores (1980), nos mesmos tempos pós-operatórios, o volume total de osso neoformado em defeitos preenchidos com partículas pequenas foi maior se comparado a defeitos preenchidos com partículas maiores. Já para Nagata e colaboradores (2009) deve-se respeitar um limite para a redução das partículas de enxerto, o tamanho das partículas ósseas deve ultrapassar 125 µm para evitar sua remoção por macrófagos.

Apesar de ser considerado o padrão ouro para reconstruções ósseas o osso autógeno apresenta conhecidas limitações para seu uso, sendo as principais a morbidade cirúrgica pela necessidade de um sítio doador, a limitação de quantidade de enxerto e a reabsorção irregular no leito receptor (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001). Por essa razão, o presente trabalho buscou avaliar materiais alternativos ao uso do enxerto ósseo autógeno. Biocompatibilidade, bioatividade e propriedades mecânicas adequadas são os principais requisitos esperados em substitutos ósseos. A hidroxiapatita é um substituto ósseo muito estudado e utilizado no tratamento de defeitos ósseos. Sua fórmula química é semelhante à fase inorgânica do tecido ósseo, o que pode explicar a intensa afinidade da hidroxiapatita com o leito ósseo receptor (DINARVAND et al., 2011).

Foi possível, através do presente estudo, a avaliação da utilização de um implante de hidroxiapatita granulada sintética com grânulos obtidos em peneira com malha de 2 mm (HAP 91®) para o tratamento de defeitos ósseos de 5 mm, considerados extensos. O material em questão foi manipulado seguindo as recomendações do fabricante e aplicado diretamente no defeito ósseo crítico criado. Segundo Kuemmerle (2005 apud NOTODIHARDJO et al., 2011) a qualidade da hidroxiapatita pode variar entre os fabricantes sem trazer diferença significativa para os estudos realizados. O tamanho dos poros do material influencia seu preenchimento por osteoblastos sendo poros de 150 a 500 µm considerados ideais (NOTODIHARDJO et al., 2011).

A avaliação histológica realizada permitiu evidenciar a adequada biocompatibilidade do material utilizado, uma vez que não foi observado o desencadeamento de reação do tipo corpo estranho ao material implantado em nenhum dos animais do estudo. Na grande maioria dos casos, os grânulos de HA encontravam-se circundados por tecido de granulação, sugerindo uma possível

neoformação óssea futura. Outra propriedade do material evidenciada neste estudo foi a osteocondução, corroborando resultados encontrados por outros autores (ASCHERMAN et al., 2008; DINARVAND et al., 2011; PARIS, 2002; SCHWENGBER, 2009). Observou-se, em todos os tempos operatórios, que o implante de hidroxiapatita foi capaz de conduzir a formação óssea através da superfície de seus grânulos.

O material empregado neste estudo apresenta como limitação para o emprego em cavidades pouco profundas a dificuldade de manutenção de forma no defeito ósseo. Essa relativa instabilidade do material pode levar a variação na quantidade de osso neoformado dentro de um mesmo grupo experimental (DINARVAND et al., 2011; SCHWENGBER, 2009). Alguns autores utilizaram substitutos ósseos suportados por membranas ou barreiras (FURLANETO et al., 2007; HADDAD et al., 2006; MARZOUK et al., 2007), favorecendo a manutenção do material empregado no leito receptor. Outro recurso é a utilização de *scaffolds* para melhorar as propriedades biológicas dos substitutos ósseos. Esse recurso pode ser empregado juntamente com fatores de crescimento e substâncias osteoindutoras apresentando resultados promissores (DINARVAND et al., 2011; NEOVIUS; ENGSTRAND, 2010; WOODRUFF et al., 2007).

A presença de uma fase cartilaginosa pode ser observada tanto na formação óssea quanto em seu reparo. Neste estudo, foi possível observar o comportamento de enxerto alógeno de cartilagem frente a uma situação de reparo ósseo. Vários autores apresentam a cartilagem como alternativa na área bucomaxilofacial para reconstrução em áreas onde é necessário um longo período antes da sua reabsorção ou até mesmo sua permanência no sítio receptor (CAVALIERE et al., 2009; KARIMI-YAZDI et al., 2007; MCNICKLE et al., 2009; SHI et al., 2009). No presente trabalho os grupos que receberam enxerto alógeno de cartilagem apresentaram menor percentual de preenchimento ósseo, o que pode ter ocorrido pela permanência do tecido enxertado por um período maior se comparado aos outros materiais utilizados. Vieira e colaboradores (1993) em um estudo em ratos, comparou diferentes meios de preservação de enxertos de cartilagem e verificou o início de sua substituição por tecido ósseo somente após 120 dias pós operatórios.

Os resultados obtidos neste estudo para o percentual de osso neoformado no interior do defeito ósseo crítico diferem dos encontrados por Calcagnotto (2009) e Schwengber (2009). O presente trabalho propõe uma alteração importante no

desenho da cavidade experimental, com a remoção da barreira óssea entre os magnetos e a região central do defeito ósseo. Esta alteração permitiu ação direta do campo magnético na cavidade óssea repercutindo positivamente no reparo ósseo.

CONCLUSÃO

Após a realização do presente estudo com a metodologia empregada foi possível concluir que:

a) a avaliação histomorfométrica, após quantificação do percentual de preenchimento ósseo, evidenciou superioridade do reparo no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno sob influência de campo magnético se comparado ao grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno sem influência de campo magnético, aos 60 dias pós-operatórios;

b) a avaliação histomorfométrica, comparando os diferentes grupos, apontou a superioridade do reparo no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno, seguido pelos grupos que receberam implante de hidroxiapatita granulada sintética e enxerto alógeno de cartilagem.

c) o presente trabalho contribuiu para o entendimento da influência do campo magnético sepultado sobre o reparo ósseo. A partir dos resultados encontrados, novas metodologias podem ser propostas para complementar os resultados obtidos e fortalecer a presente linha de pesquisa.

REFERÊNCIAS

AARON, R. K. et al. Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. **Clin Orthop Relat Res**, n. 419, p. 30-37, 2004.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, v. 10, p. S96-101, 2001. Supplement 2.

ASCHERMAN, J. A. et al. Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. **J Craniofac Surg**, v. 19, n. 4, p. 1131-1135, 2008.

CALCAGNOTTO, T. **Avaliação histológica e bioquímica do reparo ósseo em crânio de ratos após implantes de cimento de fosfato de cálcio (MimixTM) sob campo magnético permanente**. 2009. 171 p. Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CAVALIERE, M. et al. Tragal cartilage in tympanoplasty: anatomic and functional results in 306 cases. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, v. 29, n. 1, p. 27-32, 2009.

CORNAGLIA, A. I. et al. Stimulation of osteoblast growth by an electromagnetic field in a model of bone-like construct. **Eur J Histochem**, v. 50, n. 3, p. 199-204, 2006.

COSTANTINO, C. et al. Treatment of wrist and hand fractures with natural magnets: preliminary report. **Acta Biomed**, v. 78, n. 3, p. 198-203, 2007.

DARENDELILER, M. A.; DARENDELILER, A.; SINCLAIR, P. M. Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. **Int J Adult Orthodon Orthognath Surg**, v. 12, n. 1, p. 43-53, 1997.

DINARVAND, P. et al. New approach to bone tissue engineering: simultaneous application of hydroxyapatite and bioactive glass coated on a poly(l-lactic acid) scaffold. **ACS Appl Mater Interfaces**, 2011.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004.

FINI, M. et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. **J Orthop Res**, v. 20, n. 4, p. 756-763, 2002.

FURLANETO, F. A. et al. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 18, n. 3, p. 311-318, 2007.

GRIFFIN, X. L.; WARNER, F.; COSTA, M. The role of electromagnetic stimulation in the management of established non-union of long bone fractures: what is the evidence? **Injury**, v. 39, n. 4, p. 419-429, 2008.

HADDAD, A. J. et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. **J Craniofac Surg**, v. 17, n. 5, p. 926-934, 2006.

HANNEMANN, P. et al. Pulsed electromagnetic fields in the treatment of fresh scaphoid fractures: a multicenter, prospective, double blind, placebo controlled, randomized trial. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 12, p. 90, 2011.

JIANG, X. et al. Mandibular repair in rats with premineralized silk scaffolds and BMP-2-modified bMSCs. **Biomaterials**, v. 30, n. 27, p. 4522-4532, 2009.

KARIMI-YAZDI, A. et al. Comparison of microtia reconstructive surgery with autograft versus homograft. **Arch Iran Med**, v. 10, n. 1, p. 43-47, 2007.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**: texto - atlas - correlações clínicas. 2. ed. Buenos Aires: Panamericana, 2004.

MARZOUK, K. M. et al. Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 65, n. 8, p. 1508-1516, 2007.

MCNICKLE, A. G. et al. Performance of a sterile meniscal allograft in an ovine model. **Clin Orthop Relat Res**, v. 467, n. 7, p. 1868-1876, 2009.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontal Res**, v. 43, n. 6, p. 723-729, 2008a.

NAGATA, M. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 339-345, 2009.

NEOVIUS, E.; ENGSTRAND, T. Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 63, n. 10, p. 1615-1623, 2010.

NOTODIHARDJO, F. Z. et al. Bone regeneration with BMP-2 and hydroxyapatite in critical-size calvarial defects in rats. **J Craniomaxillofac Surg**, 2011.

OLIVEIRA, R. C. de. et al. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 8, p. 749-754, 2008.

PALLESEN, L. et al. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, n. 4, p. 498-506, 2002.

PAN, X. et al. Study of rotating permanent magnetic field to treat steroid-induced osteonecrosis of femoral head. **Int Orthop**, v. 33, n. 3, p. 617-623, 2009.

PARIS, M. F. D. **Reconstrução de osso alveolar, em área dentada, com o uso de hidroxiapatita**. 2002. 124 p. Dissertação (Mestrado)—Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

PRYOR, M. E. et al. Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 9, p. 966-972, 2005a.

PURICELLI, E.; BERCINI, F. Enxertos autógenos e subperiostais de cartilagem, com remoção do pericôndrio: estudo histológico em ratos. **R Fac de Odontol**, v. 7, n. 14, p. 9-24, 1992.

PURICELLI, E. et al. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs. **Head Face Med**, v. 2, p. 43, 2006.

PURICELLI, E.; DUTRA, N. B.; PONZONI, D. Histological evaluation of the influence of magnetic field application in autogenous bone grafts in rats. **Head Face Med**, v. 5, p. 1, 2009.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res**, n. 204, p. 299-308, 1986.

SCHWENGBER, M. M. B. **Reparo ósseo após enxerto ósseo autógeno e implante de hidroxiapatita absorvível granulada sob influência de campo magnético estático**: estudo experimental em calvária de ratos. 2009. 115 p. Dissertação (Mestrado)–Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair: the role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **Eur Cell Mater**, v. 15, p. 53-76, 2008.

SHAPOFF, C. A. et al. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. **J Periodontol**, v. 51, n. 11, p. 625-630, 1980.

SHI, H. et al. Animal models of tracheal allotransplantation using vitrified cryopreservation. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 138, n. 5, p. 1222-1226, 2009.

SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

VAN BERGEN, C. J. A. et al. Pulsed electromagnetic fields after arthroscopic treatment for osteochondral defects of the talus: double-blind randomized controlled multicenter trial. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 10, p. 83, 2009.

VIEIRA, E. H. et al. Allogeneic transplants of rib cartilage preserved in 98% glycerol or 70% alcohol into the malar process of rats: a comparative histological study. **J Nihon Univ Sch Dent**, v. 35, n. 2, p. 96-103, 1993.

WOODRUFF, M. A. et al. Sustained release and osteogenic potential of heparan sulfate-doped fibrin glue scaffolds within a rat cranial model. **J Mol Hist**, v. 38, p. 425-433, 2007.

YAN, Q. C.; TOMITA, N.; IKADA, Y. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. **Med Eng Phys**, v. 20, n. 6, p. 397-402, 1998.