

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

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO REPARO ÓSSEO EM**  
**CRÂNIO DE RATOS APÓS IMPLANTES DE CIMENTO DE FOSFATO DE**  
**CÁLCIO (MIMIX™) SOB CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE**

**LINHA DE PESQUISA: BIOMATERIAIS E TÉCNICAS TERAPEUTICAS**

**THIAGO CALCAGNOTTO**

Autor

**Profa. Dra. Edela Puricelli**

Orientadora

**Porto Alegre, 2009**

**À Juliana Zanettini,**

A quem eu tanto amo e com quem brevemente espero me casar, dedico esta dissertação e agradeço pelo companheirismo, pela força na elaboração deste trabalho e, principalmente, por todo amor e carinho que iluminaram minha vida.

À meus pais, **Luiz e Inéz**, e à minha irmã, **Larissa**,

Agradeço pelo incentivo a realização do mestrado, pelo companheirismo, por todo amor, por todo tempo investido em minha educação e, acima de tudo, pelo exemplo positivo que vocês foram e continuam sendo em minha vida.

À Profa. Dra. Edela Puricelli,

Agradeço pelo tempo dedicado em minha orientação durante a elaboração desta dissertação, pelo modelo singular de profissional e por todo crescimento profissional e maturidade que me fez adquirir durante as fases de graduação e pós-graduação.

À Profa. Dra. Ângela T. S. Wyse,

Por todo o conhecimento técnico-científico a mim ensinado durante o período de iniciação científica, pela confiança, amizade e pelo prazer que tens em ensinar. Fostes e será sempre um exemplo a ser seguida como pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Luís Gustavo Pereira,

Pela disponibilidade de tempo e laboratório, atenção especial, ajuda na realização dos estudos realizados no Laboratório de Magnetismo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao colega de mestrado e grande amigo Marcos M. B.Schwengber,

Cujo companheirismo e amizade ajudaram a tornar mais fácil a elaboração deste trabalho.

Ao colega de mestrado Luciano Henrique de Jesus,

Pela troca de experiências, pelo apoio e incentivo durante a realização do mestrado.

Ao Prof. Dr. João Batista Burzalaff,

Pelo incentivo à realização do mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, pelas idéias que contribuíram à realização deste trabalho, pela amizade e confiança em mim depositadas durante a graduação, pós-graduação, pelo tempo disponibilizado para discussões e orientações em casos cirúrgicos.

À Dra. Cristiane Matté,

Pela dedicação e grande contribuição a realização deste trabalho, pelo tempo dedicado e pela ajuda na realização da etapa bioquímica desta dissertação, pelo carinho e amizade que se iniciaram ainda no período de iniciação científica.

Ao setor de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, em especial ao Prof. Dr. Reni Dalla Bona, pela atenção e pela disponibilidade de espaço para realização de etapas deste estudo no laboratório de Radiologia.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho,

Pela orientação e pelas idéias que foram fundamentais para a elaboração da metodologia empregada neste trabalho, pela confiança em dispor o laboratório de Histopatologia para que a idealização de um trabalho fosse concretizada.

À Bióloga Isabel Lauxen,

Por ter possibilitado que as idéias de um projeto se tornassem realidade através da confecção das lâminas histológicas, por toda atenção e pela confiança em ceder espaço e tempo de sua vida para que o trabalho se tornasse diferenciado.

À Profa. Dra. Deise Ponzoni,

Por toda ajuda e orientação durante a elaboração deste trabalho e por todo tempo disponibilizado durante o convívio na graduação e pós-graduação.

Aos Profs. Dr. João Júlio da Cunha Filho e Marcel Fasolo de Paris,  
Pelo incentivo à realização do mestrado em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e por todo aprendizado durante a vida acadêmica.

À todos os pós-graduandos, Fábio, Adriana, Fernanda, Maíra, Lênio, Felipe, Renan, Eliane, Prof. Dr. Vinícius e graduandos, Rodrigo, Tales, Luisa, Orion, Marcelo que auxiliaram anãs diversas etapas deste trabalho.

Aos funcionários do setor de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia – UFRGS: Dona Marli, Dona Vera, Eliane, Scheila, Seu Lopes, Eduardo e Dona Vera, pelo carinho, amizade, atenção e ajuda durante o mestrado.

Aos funcionários do HCPA, em especial ao pessoal do Bloco Cirúrgico e Zona 18, por toda ajuda, amizade e inúmeros momentos de alegria.

À todos os funcionários do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, em especial a Dona Geni, Márcio, Paula e Ângela, pela imensa generosidade, carinho e ajuda para a realização deste estudo.

Aos sócios, colegas e, acima de tudo, amigos do Centro de Reabilitação em Odontologia, pelo carinho, atenção, apoio e entendimento durante o mestrado.

À todos os meus familiares e amigos que sempre apoiaram e incentivaram a realização do mestrado.

**Muito obrigado...**

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar histológica e bioquimicamente o reparo ósseo em crânios de ratos sob campo magnético, permanente e estático, após enxerto ósseo autógeno ou implante de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™). **Materiais e Métodos:** 65 animais, divididos em grupos com cinco animais cada, nos quais foram confeccionados defeitos ósseos com tamanho de 5,0 mm, realizados no crânio de ratos Wistar. Os animais foram submetidos a quatro diferentes intervenções: enxerto ósseo autógeno, implante de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™), ambos com e sem campo magnético sepultado, permanente e estático, com intensidade variável entre 43,72 G, 66,20 G e 73,40 G, nos três diferentes pontos mensurados no interior do defeito ósseo. Foi realizada análise histológica histométrica (transversal e longitudinal) da quantidade de tecido ósseo neoformado no interior do defeito ósseo e análise histológica descritiva dos defeitos ósseos em 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Realizou-se análise da atividade sistêmica da enzima fosfatase alcalina nos mesmos tempos operatórios, sendo o grupo Naive (sem intervenção cirúrgica) o controle fisiológico da atividade desta enzima. **Resultados:** O reparo ósseo não apresentou diferenças estatísticas entre enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio. Não foi observada diferença histológica no reparo ósseo entre os grupos com e sem a presença de campo magnético estático em relação a quantidade de tecido ósseo neoformado na análise histométrica transversal. Longitudinalmente, a histometria evidenciou diferenças na quantidade de tecido ósseo neoformado entre os grupos de 15 e 60 dias pós-operatórios com enxerto ósseo autógeno sob estimulação

magnética. A enzima fosfatase alcalina apresentou atividade mais elevada no tempo de 30 dias pós-operatórios. Neste mesmo tempo pós-operatório, os grupos com aplicação de campo magnético apresentaram atividade enzimática inferior aos grupos sem influência magnética. **Conclusão:** o implante de cimento de fosfato de cálcio não apresentou diferenças em relação ao enxerto ósseo autógeno em termos de quantidade de osso neoformado. O campo magnético permanente e estático acelerou o reparo ósseo nos grupos de enxerto ósseo autógeno sob estimulação magnética. A enzima fosfatase alcalina teve sua atividade diminuída em 30 dias pós-operatórios nos grupos sob influência do campo magnético estático.

**Palavras-chave:** Enxerto ósseo, cimento de fosfato de cálcio, defeito ósseo, magnetismo.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate histologically and biochemically the bone repair in the rat skull under magnetic field, permanent and static, after autogenous bone graft or calcium phosphate cement implant (Mimix<sup>TM</sup>). **Materials and Methods:** 65 animals divided into groups of five animals each, which were made bone defects with 5.0 mm diameter, made in the skull of Wistar rats. The animals were subjected to four different interventions: autogenous bone graft, calcium phosphate cement implant (Mimix<sup>TM</sup>), both with and without magnetic field buried, permanent and static, with intensity ranging from 43.72 G, 66.20 G and 73.40 G, in the three different points measured into the bone defect. Histometric histological, longitudinal and transversal, analyses were performed the amount of newly formed bone tissue into the bone defect and descriptive histological analysis of bone defects in 15, 30 and 60 days postoperatively. Analysis of the systemic activity of alkaline phosphatase enzyme was performed in the same operative times, and the Naive group (without surgery) was physiological control of this enzyme activity. **Results:** The bone repair did not show statistical differences between autogenous bone graft and calcium phosphate cement implants. No histologically difference was observed in bone healing between the groups with and without the presence of static magnetic field for the amount of newly formed bone tissue in histometric transversal analysis. Longitudinal, the histometric analysis shown significant differences in newly bone formation between 15 and 60 autogenous bone under magnetic field. The enzyme alkaline phosphatase showed higher activity in the time of 30 days after surgery. In this same post-operative time, the groups with magnetic field application shown lower enzymatic activity than the groups without magnetic

influence. **Conclusion:** The implant of calcium phosphate cement did not differ in relation to autogenous bone graft in terms of quantity of newly bone formation in histomteric analysis. The permanent and static magnetic field had accelerate the bone healing in the autogenous bone grafts under magnetic field. The alkaline phosphatase enzyme had its activity decreased at 30 days postoperatively in the groups under static magnetic field influence.

**Keywords:** bone graft, calcium phosphate, critical size defects, magnetism, alkaline phosphatase.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BMP – Bone morphogenetic protein

cm – Centímetro

Fapergs – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FDA – Food and Drug Administration

G – Gauss

g – Grama

GPPG/HCPA – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas  
de Porto Alegre

Kg – Kilograma

ml – Mililitro

mm – Milímetro

mmol – Milimol

nm – Nanômetro

Pronex – Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

Propesq – Pró-Reitoria de Pesquisa

rpm – Rotações por minuto

T – Tesla

U – Unidade

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  – Beta

$\mu$ l – Micro litro

$\mu$ m – Micrometro

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1. Distribuição do número de animais por grupo experimental. Porto Alegre, 2009..... 60
- Tabela 2. Análise histométrica longitudinal e transversal do percentual de neoformação óssea nos grupos com enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio, com e sem estimulação magnética, em 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (média + desvio-padrão). (\*) Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo experimental. Teste Bonferroni,  $p < 0,05$ . (\*\*) Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos experimentais dentro de cada grupo. Teste Bonferroni,  $p < 0,05$ . Porto Alegre, 2009..... 75

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. (A) Apresentação comercial do cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) em embalagens pré-mensuradas; (B) Consistência pastosa do cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) após manipulação. Porto Alegre, 2009..... 56
- Figura 2. Imagens de microscopia eletrônica do material utilizado no estudo evidenciando porosidades do cimento de fosfato de cálcio (Mimix™). (A) Porosidade presente na superfície externa, aumento de 250X; (B) Porosidade presente na superfície interna, aumento de 250X; (Mp) Macro-poro na superfície interna do cimento de fosfato de cálcio, aumento de 1.200X; (C) Macro-poro sinalizado na figura “B” evidenciando micro-poros em sua parede. Imagens obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, UFRGS. Porto Alegre, 2009..... 56
- Figura 3. (A) Imagem evidenciando o diâmetro dos ímãs e peças metálicas; (B) Imagem evidenciando a espessura dos ímãs e peças metálicas. (a) Ímãs de neodímio, ferro e boro; (b) Discos de titânio. Porto Alegre, 2009. .... 57
- Figura 4. Gaussímetro utilizado para mensuração da intensidade de campo magnético no defeito ósseo. A) Vista do aparelho; B) Vista do sensor de mensuração. Porto Alegre, 2009..... 58

- Figura 5. Crânio seco do rato. (A) Orifícios para inserção dos ímãs de neodímio, ferro e boro ou dispositivos metálicos; (B) Defeito ósseo de 5 mm de diâmetro. Porto Alegre, 2009..... 58
- Figura 6. Mensuração da intensidade de campo magnético em três pontos dentro do defeito ósseo. (A) Mensuração na extremidade anterior; (B) Mensuração no centro do defeito; (C) Mensuração na extremidade posterior do defeito. Porto Alegre, 2009..... 59
- Figura 7. Ilustração evidenciando dispositivos metálicos (área pontilhada amarela) e Ímãs de neodímio, ferro e boro (área pontilhada branca) marcados com esmalte branco atóxico no pólo norte. N - Pólo norte; S - Pólo sul. Porto Alegre, 2009. .... 59
- Figura 8. Imagem trans-operatória do preparo cirúrgico evidenciando a tricotomia realizada de forma manual em região de calota craniana. Porto Alegre, 2009. .... 63
- Figura 9. Imagem trans-operatória evidenciando área da incisão longitudinal em calota craniana do rato. (a) Afastadores de Senn Müller. Porto Alegre, 2009..... 63
- Figura 10. Aspecto trans-operatório após exposição do leito ósseo. (A) Setas amarelas evidenciando sutura fronto-parietal. (B) Posicionamento da broca trefina para confecção do defeito ósseo crítico na calota craniana do rato. Setas amarelas delimitando a sutura fronto-parietal. Porto Alegre, 2009. .... 65

Figura 11. (A) Imagem trans-operatória dos dispositivos metálicos fixados e evidenciando tamanho destes dispositivos metálicos e enxerto autógeno. (B) IFC - Implante de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™). (C) Sutura em pele a pontos isolados com fio de nylon 5-0. Porto Alegre, 2009. .... 65

Figura 12. Esquema da obtenção da peça para confecção das lâminas histológicas. Área pontilhada preta indica a peça removida para posterior descalcificação. Linha pontilhada vermelha aponta a secção longitudinal mediana da peça após a descalcificação. Porto Alegre, 2009. .... 69

Figura 13. Imagem de corte histológico demarcado no programa Axion Vision evidenciando mensurações em Pixel<sup>2</sup> da área total (delimitado pela linha amarela) e das áreas de neoformação óssea no interior do defeito ósseo (áreas achuradas em verde). Limites do defeito ósseo (LDO); Enxerto ósseo autógeno (EOA). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 71

Figura 14. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009. .... 76

Figura 15. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 76

Figura 16. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 77

Figura 17. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 77

Figura 18. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) sem aplicação de campo

magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 78

Figura 19. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 78

Figura 20. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 79

Figura 21. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes

delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito.  
Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 79

Figura 22. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito.  
Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 80

Figura 23. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito.  
Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 80

Figura 24. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito.  
Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 81

Figura 25. Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009..... 81

Figura 26. Gráfico comparativo da atividade da enzima fosfatase alcalina entre os grupos Naive, enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo autógeno com magnetismo nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Significância estatística “a” # “b” # “c”; Anova,  $p < 0,05$ . Enxerto ósseo autógeno (EX). Porto Alegre, 2009. .... 82

Figura 27. Gráfico comparativo da atividade da enzima fosfatase alcalina entre os grupos Naive, implante de cimento de fosfato de cálcio e implante de cimento de fosfato de cálcio com magnetismo nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Significância estatística “a” # “b”; Anova,  $p < 0,05$  . Implante de cimento de fosfato de cálcio (MIM). Porto Alegre, 2009. .... 83

Figura 28. Gráfico comparativo da atividade da enzima fosfatase alcalina entre os grupos enxerto ósseo autógeno com e sem estimulação magnética e implante de cimento de fosfato de cálcio com e sem estimulação magnética nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Sem significância estatística “a” = “a”; Anova,  $p > 0,05$  .

Enxerto ósseo autógeno (EX); Implante de cimento de fosfato de cálcio (MIM) Porto Alegre, 2009. .... 84

Figura 29. Radiografias das peças removidas dos crânios dos ratos. A) Radiografia evidenciando estabilidade dos imãs; B) Radiografia evidenciando deslocamento dos imãs. Porto Alegre, 2009. .... 85

Figura 30. Imagem ilustrando loja óssea do dispositivo metálico. Grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. ... 86

Figura 31. Imagem ilustrando limites do enxerto ósseo autógeno e limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Matriz osteóide (Mo); Neoformação vascular (Nfv); Enxerto ósseo (Ex); Limite do defeito ósseo (LDO); Área com infiltrado linfoplasmocitático (Ilp); Setas evidenciando osteoblastos alinhados secretando matriz osteóide. Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 87

Figura 32. Imagem ilustrando formação óssea sobre a cortical externa do crânio rato na área do limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Cortical externa (Ce); Neoformação vascular (Nfv); Limite do defeito ósseo (LDO); Setas pretas evidenciando osteoblastos alinhados e secretando matriz osteóide. Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009. .... 87

- Figura 33. Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã. Grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do imã (Loi). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 88
- Figura 34. Imagem ilustrando espaço entre o enxerto ósseo autógeno e limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Matriz osteóide (Mo); Neoformação vascular (Nfv); Áreas com infiltrado linfoplasmocitário (Ilp); Enxerto ósseo (Ex); Limite do defeito ósseo (LDO). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 89
- Figura 35. Imagem ilustrando formação óssea ectópica (Toe) à cortical externa do crânio rato na área do limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Cortical externa (Ce); Neoformação vascular (Nfv); Limite do defeito ósseo (LDO); Setas pretas evidenciando osteoblastos alinhados e secretando matriz osteóide (Mo). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009. .... 89
- Figura 36. Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com 15 dias pós-operatórios sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 90

Figura 37. Imagem ilustrando espaço entre o implante de cimento de fosfato de cálcio (lcp) e limite do defeito ósseo no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Matriz osteóide (Mo); Limite do defeito ósseo (LDO); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009..... 91

Figura 38. Imagem ilustrando área central do implante de cimento de fosfato de cálcio no grupo de 15 dias sem estimulação magnética. Implante de cimento de fosfato de cálcio (lcp); Tecido de granulação (Tg); Neoformação vascular (Nfv). Áreas brancas da figura evidenciam material implantado. Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009. .... 91

Figura 39. Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com 15 dias pós-operatório sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do imã (Loi); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 92

Figura 40. Imagem ilustrando limites do implante de cimento de fosfato de cálcio e limite do defeito ósseo no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Matriz osteóide (Mo); neoformação vascular (Nfv); Enxerto ósseo (Ex); Áreas com extravasamento do material implantado (Et); Limite do defeito ósseo (LDO). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009..... 93

- Figura 41. Imagem ilustrando área central do implante de cimento de fosfato de cálcio no grupo de 15 dias com estimulação magnética. Implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp); Tecido de granulação (Tg); Tecido conjuntivo (Tc). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009..... 93
- Figura 42. Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 94
- Figura 43. Imagem ilustrando espaço entre o enxerto ósseo autógeno e o limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo(Tc); Neoformação vascular (Nfv); Enxerto ósseo (Ex); Limite do defeito ósseo (LDO); Área com infiltrado linfoplasmocitário (Ilp); Setas evidenciando osteoblastos alinhados e secretando matriz óssea. Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009..... 95
- Figura 44. Imagem ilustrando loja óssea do imã grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Loja óssea que continha o imã (Loi); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. 95
- Figura 45. Imagem ilustrando espaço entre o limite do defeito ósseo (LDO) e enxerto ósseo autógeno (Ex) no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias sob estimulação magnética. Osso neoformado (On);

Neoformação vascular (Nfv); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Tecido conjuntivo denso (Tcd). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009. .... 96

Figura 46. Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico de titânio no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estímulo magnético em 30 dias. Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm); Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 97

Figura 47. Imagem ilustrando espaço entre o limite do defeito ósseo (LDO) e implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp) no grupo de implantes de cimento de fosfato de cálcio sem estímulo magnético em 30 dias pós-operatórios. Tecido de granulação (Tg); Matriz osteóide (Mo); Tecido conjuntivo (Tc); Infiltrado linfoplasmocitário (Ilp); Neoformação vascular (Nfv); Osso neoformado (On); Áreas com extravasamento do material implantado para fora do defeito ósseo criado (Et). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 97

Figura 48. Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã no grupo de animais que recebeu implante de cimento de fosfato cálcio com estimulação magnética no período pós-operatório de 30 dias. Loja óssea do imã (Loi); Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo. (Tc) Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 98

Figura 49. Imagem ilustrando zona central do implante de cimento de fosfato de cálcio no grupo que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética no período de 30 dias pós-operatórios. Área do implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp); Tecido ósseo

neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Formação vascular (Nfv).  
Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 99

Figura 50. Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno sem imã com 60 dias pós-operatórios. Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm); Neoformação óssea (On); Tecido conjuntivo com infiltrado linfoplasmocitário (TLp); Tecido conjuntivo (Tc). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 99

Figura 51. Imagem ilustrando espaço entre limite do defeito ósseo (LDO) e enxerto ósseo autógeno (Ex) no grupo de enxerto ósseo autógeno com 60 dias pós-operatórios sem estimulação magnética. Tecido conjuntivo com infiltrado linfoplasmocitário (TLp); Osso neoformado (On); Tecido de granulção (Tg); Setas sinalizando osteoblastos alinhados e secretando matriz óssea. Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 100

Figura 52. Imagem ilustrando cavidade que continha imã no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias pós-operatórios com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Neoformação vascular (Nfv); Loja óssea do imã (Loi). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 101

Figura 53. Imagem ilustrando espaço entre o enxerto ósseo autógeno (Ex) de 60 dias pós-operatórios e o limite do defeito ósseo (LDO) no grupo de enxerto ósseo autógeno com 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Setas pretas

evidenciando limites do defeito ósseo; setas vermelhas evidenciando limites do enxerto ósseo autógeno; Neoformação vascular (Nfv); Tecido de granulação (Tg); Tecido conjuntivo com infiltrado linfoplasmocitário (Tlp). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009. .... 101

Figura 54. Imagem ilustrando loja óssea que continua o dispositivo metálico (Ldm) no grupo de 60 dias pós-operatórios que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética. Tecido conjuntivo fibroso (Tcf); Neoformação óssea (On). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 102

Figura 55. Imagem ilustrando porção central do defeito ósseo preenchido com implante de cimento de fosfato (lcp) de cálcio no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética em 60 dias pós-operatórios. Osso neoformado (On); Neoformação vascular (Nfv); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 103

Figura 56. Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã no grupo que recebeu implante de cimento de fosfato cálcio com estimulação magnética de 60 dias pós-operatórios. Loja óssea do imã (Loi); Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 103

Figura 57. Imagem ilustrando porção central do defeito ósseo preenchido com implante de cimento de fosfato de cálcio (lcp) no grupo que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética em 60 dias pós-operatórios. Osso neoformado (On); Neoformação

vascular (Nfv); Tecido conjuntivo (Tc); Tecido de granulação (Tg).  
Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009. .... 104

Figura 58. Imagem ilustrando limite entre implante de cimento de fosfato de 60 dias pós-operatórios e limite do defeito ósseo (LDO) no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Setas pretas evidenciando limites do defeito ósseo; setas vermelhas evidenciando limites do biomaterial implantado (Icp); Neoformação vascular (Nfv).  
Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009. .... 104

## SUMÁRIO

1	Introdução .....	31
2	Revisão da Literatura .....	35
2.1	Defeito Ósseo em Calvária .....	35
2.2	Substitutos Ósseos .....	38
2.3	Cimento de Fosfato de Cálcio.....	40
2.4	Campo Magnético e Reparo Ósseo.....	45
2.5	Fosfatase Alcalina.....	50
3	Objetivos .....	53
3.1	Objetivo Geral .....	53
3.2	Objetivos Específicos.....	53
4	Materiais e métodos .....	54
4.1	Tipo e Modelo de Estudo .....	54
4.2	Locais do Estudo .....	54
4.3	Hipótese.....	55
4.4	Descrição do Cimento de Fosfato de Cálcio.....	55
4.5	Dispositivos Metálicos e Imãs.....	57
4.6	Cálculo da Intensidade do Campo Magnético .....	57
4.7	Cálculo e Seleção da Amostra.....	59
4.8	Delineamento Experimental.....	61
4.8.1	Assepsia.....	61
4.8.2	Anestesia .....	61
4.8.3	Infiltração Local Anestésica.....	62
4.8.4	Tricotomia, Colocação de Campos Operatórios e Incisão .....	62
4.8.5	Divulsão e Descolamento dos Tecidos .....	63
4.8.6	Afastamento dos Tecidos.....	64
4.8.7	Ostectomias na Calota Craniana .....	64
4.8.8	Cuidados Pós-Operatórios .....	65
4.8.9	Morte dos Animais.....	66
4.8.10	Coleta das Amostras .....	66
4.8.11	Aprovação do Projeto de Pesquisa .....	67
4.9	Análise Radiográfica .....	67
4.10	Estudo Histológico .....	68

4.11 Análise Bioquímica .....	71
4.12 Análise Estatística.....	73
4.13 Considerações Éticas .....	73
5. Resultados .....	74
5.1 Análise Histométrica .....	74
5.2 Análise Bioquímica .....	81
5.3 Análise Radiográfica .....	84
5.4 Análise Histológica Descritiva.....	85
5.4.1 Grupos de 15 dias pós-operatório .....	86
5.4.2 Grupos de 30 dias pós-operatório.....	94
5.4.3 Grupos de 60 dias pós-operatório .....	99
6. Discussão.....	106
7. Conclusões.....	121
Referências Bibliográficas .....	122
Anexos .....	141
Anexo I – Lei de Proteção aos Animais .....	141
Anexo II – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Resolução Normativa 04/97 .....	144
Anexo III – Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa .....	146
Anexo IV – Aprovação do Projeto por Banca Examinadora.....	147

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da grande quantidade mineral, responsável pela resistência do tecido ósseo, esse permanece sujeito a estímulos (químicos, físicos ou patológicos) que podem provocar sua fratura (Peterson, Ellis *et al.*, 2005) ou induzir modificações em sua estrutura (Katchburian e Aranha, 2004). Assim, diversos materiais e metodologias, buscando acelerar o reparo e restabelecer a forma e a função do tecido ósseo, têm sido estudados (Zhang, Lin *et al.*, 2004; Greenberg e Schneider, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Saunders, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Defeitos ósseos, cirurgicamente criados, são utilizados com o intuito de avaliar o processo de reparo ósseo (Schmitz e Hollinger, 1986; Ferreira, Cestari *et al.*, 2004; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006), avaliar materiais que possam substituir da melhor forma o tecido lesado (Del Carlo, Kawata *et al.*, 2003; Pou, 2003; Gisepp, Kugler *et al.*, 2004; Tanag, Yano *et al.*, 2004; Carey, Xu *et al.*, 2005; Sinikovic, Kramer *et al.*, 2007) e avaliar mecanismos capazes de acelerar o reparo ósseo e a consolidação de fraturas (Barker e Lunt, 1983; Giordano, Knacfuss *et al.*, 2001; Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Contudo, para que estas avaliações sejam possíveis, é freqüente a utilização de modelos experimentais em animais visando testar/pesquisar novas técnicas, a eficácia terapêutica ou conseqüências fisiopatológicas de procedimentos (Fagundes e Taha, 2004). Estudos em calotas cranianas de ratos (Schmitz e Hollinger, 1986; Haddad, Peel *et al.*, 2006; Da Silva, Bertran *et al.*, 2007; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007) são

exemplos de defeitos ósseos induzidos que permitem análises histológicas decritivas(Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Mai, Reinstorf *et al.*, 2008), histométricas(Brandao, Brentegani *et al.*, 2002; Calixto, Teofilo *et al.*, 2007; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), radiográficas(Marins, Cestari *et al.*, 2004; Pryor, Yang *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006) e bioquímicas(Vieira, 1999a; Saraiva e Castro, 2002; Molina, 2003b; Vieira, 2007).

A grande variedade de modelos animais e da predileção pelo rato, todos os modelos de estudo têm sido realizados em íntima relação com o conceito de defeito ósseo crítico. Este define que uma adequada análise do reparo ósseo ou estímulo reparador somente poderá ser feita se este defeito possuir um tamanho mínimo necessário para que não ocorra cicatrização óssea completa e espontânea durante toda a vida do animal ou durante a vigência do estudo(Schmitz e Hollinger, 1986; Ferreira, Cestari *et al.*, 2004; Haddad, Peel *et al.*, 2006; Rijnen, Gardeniers *et al.*, 2007). A partir deste conceito pode-se fazer uma análise do potencial osteogênico do material enxertado/implantado ou estímulo reparador(Schmitz e Hollinger, 1986; Bosch, Melsen *et al.*, 1998).

Uma destas análises é através da mensuração da atividade fosfatase alcalina, uma enzima relacionada ao início do processo de mineralização(Ten Cate, 1998; Vieira, 1999a; Katchburian e Aranha, 2004; Zambuzzi, Neves *et al.*, 2005). A atividade dessa enzima é uma ferramenta que auxilia no entendimento e compreensão dos fenômenos envolvidos na resposta celular associada a enxertos ósseos e implantes de materiais aloplásticos (Zambuzzi, Neves *et al.*, 2005).

Todo processo de reparo ósseo possui fases e estas possuem tempos cronológicos médios que as determinam(Junqueira e Carneiro, 1995; Ten Cate, 1998; Katchburian e Aranha, 2004). Porém, diversas formas de estimular esse reparo têm sido estudadas com o intuito de acelerar e melhorar a qualidade do reparo ósseo(Bruce, Howlett *et al.*, 1987; Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

No contexto da atividade celular envolvida na reparação óssea, diversos agentes podem influenciar este processo(Giordano, Knacfuss *et al.*, 2001; Saldanha, Pimentel *et al.*, 2004; Da Cunha, Sarmiento *et al.*, 2007). Contudo, o uso do campo magnético tem mostrado resultados significativos(Barker e Lunt, 1983; Yan, Tomita *et al.*, 1998).

Relatos do uso do eletromagnetismo, como coadjuvante no processo de remodelação óssea, surgiram já no século XIX e se intensificaram por volta dos anos de 1970(Barker e Lunt, 1983). A partir de então, com a necessidade de clarear os conhecimentos sobre a influência do campo magnético na reparação óssea, diversos estudos, utilizando este agente, têm sido realizados(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Matsumoto, Ochi *et al.*, 2000; Midura, Ibiwoye *et al.*, 2005), empregando até mesmo o sepultamento de ímãs para melhor estudar efeitos deste sobre a remodelação óssea(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

O interesse em acelerar o processo de reparo não remonta somente em direção às pesquisas com estimulação magnética, mas avalia também o potencial reabilitador de substitutos ósseos. Estes trabalhos têm mostrado que biomateriais como a hidróxiapatita(Wiese e Merten, 1993; Spivak e Hasharoni, 2001) e o cimento de fosfato de cálcio(Hotz e Herr, 1994; Bohner,

2001; Carey, Xu *et al.*, 2005; Corsetti, 2005) apresentam biocompatibilidade e capacidade de substituir o tecido ósseo perdido, acelerando processos de reparação e permitindo reconstruções ósseas(Heini e Berlemann, 2001; Goebel e Jacob, 2005).

Dentro dos cimentos ósseos à base de Fosfato de Cálcio, o Mimix<sup>TM</sup>, tem sido bastante utilizado em humanos(Piesold, Merwald *et al.*, 2004; Tadic e Epple, 2004; Goebel e Jacob, 2005; Greenberg e Schneider, 2005).

Entretanto, há escassez de trabalhos avaliando a utilização do cimento Mimix<sup>TM</sup> em estudos *in vivo* e não há avaliações histológicas e bioquímicas dos implantes com Mimix<sup>TM</sup> sob estimulação magnética permanente e estática.

Assim, as implicações clínicas da interferência no processo de integração dos implantes através da estimulação do leito receptor, da osteoindução do material de substituição óssea através do emprego de campos magnéticos podem representar um grande avanço na área da saúde, especialmente na Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Defeito Ósseo em Calvária

Defeitos ósseos representam desafios para diversas áreas da Odontologia, principalmente para a especialidade de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial(Prado, Anbinder *et al.*, 2006). A análise do reparo destes defeitos, quando cirurgicamente criados em modelos animais, é uma boa alternativa para o estudo da reparação de fraturas ósseas(Drosse, Volkmer *et al.*, 2008), para o teste de biomateriais(Bosch, Melsen *et al.*, 1998; Pou, 2003; Carey, Xu *et al.*, 2005) e para avaliar metodologias que possam acelerar o processo de reparação óssea(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Concomitante ao desenvolvimento de estudos sobre a reparação óssea surgiu a necessidade de se estabelecerem critérios metodológicos que permitissem avaliações adequadas da reparação óssea em estudo, surgindo assim o conceito de “defeito de tamanho mínimo”, ou “defeito crítico mínimo”. Este conceito estabelece que, nos estudos sobre reparação óssea, sejam criadas ostectomias com tamanho mínimo e que estas, durante toda a vida do animal, não sofram reparação óssea completa e espontânea, mas possam preencher-se apenas com tecido conjuntivo fibroso(Schmitz e Hollinger, 1986). Somente nesta situação o real efeito osteogênico de um substituto ósseo ou estímulo reparador poderá ser avaliado.

O padrão e o tempo de reparo variam de acordo com a espécie do animal utilizado e de acordo com a localização anatômica deste defeito em uma mesma espécie animal(Schmitz e Hollinger, 1986), podendo existir,

portanto, diferentes tamanhos e diferentes localizações anatômicas para o defeito ser considerado crítico(Gosain, Song *et al.*, 2000; Prado, Anbinder *et al.*, 2006; Mokbel, Bou Serhal *et al.*, 2008). Como exemplo desta variedade de modelos animais citam-se estudos em calvária(Da Silva, Bertran *et al.*, 2007; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), mandíbula(Soccol, Bettega *et al.*, 2006), fêmures(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Vogelín, Jones *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) e tibia de ratos, calvária de porcos (Gosain, Song *et al.*, 2000), crânio de coelhos(Haddad, Peel *et al.*, 2006; Ascherman, Foo *et al.*, 2008) e crânio de ovelhas(Gosain, Riordan *et al.*, 2004).

Outro fato importante que deve ser considerado é de que a maioria dos estudos não se estende ao longo de toda a vida do animal, fazendo com que o conceito clássico de defeito crítico fosse reavaliado, considerando-se então 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, permanecendo preenchido apenas por tecido conjuntivo fibroso(Gosain, Song *et al.*, 2000).

Esta modificação na definição de defeito crítico fez com que defeitos de 8,0mm de diâmetro considerados críticos para períodos experimentais de 12 semanas em ratos(Schmitz e Hollinger, 1986; Messora, Nagata *et al.*, 2008) fossem preteridos a defeitos de 5,0mm, considerados críticos para períodos experimentais que variam de 4 a 12 semanas(Bosch, Melsen *et al.*, 1998; Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007). Isto, também permite a realização de modelos de estudos em animais com períodos de tempos experimentais pós-operatórios reduzidos, fato que diminui custos e reduz o

número de animais utilizados, uma vez que permite a criação de mais de um defeito na mesma calota craniana(Gosain, Song *et al.*, 2000).

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, a manutenção de margens de segurança do defeito em relação a estruturas vitais, como vasos e nervos, permitiu ainda a realização de grupo teste e grupo controle no mesmo animal, fato que diminui o número de animais necessários para o estudo e, conseqüentemente, diminui custos(Bosch, Melsen *et al.*, 1998).

Na literatura científica é notável a predileção por modelos animais envolvendo defeitos em calota craniana de ratos. Contudo, deve ser tomada extrema cautela, uma vez que logo abaixo da cortical óssea encontra-se a dura-máter, uma membrana extremamente vulnerável a traumas ocasionados por instrumentais rotatórios, como, por exemplo, a broca trefina. Esta meninge é a principal responsável pela irrigação sanguínea do crânio e a não preservação de sua integridade pode afetar severamente os resultados obtidos no estudo, causando maior morbidade e aumento do risco de morte do animal(Schmitz e Hollinger, 1986; Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Messora, Nagata *et al.*, 2008).

Outro cuidado na criação de um defeito ósseo para estudo é a utilização de animais adultos, uma vez que o potencial osteogênico de animais jovens é superior. Assim, a desconsideração deste preceito pode mascarar ou causar erro na interpretação dos resultados de estudos sobre reparação óssea

e sobre o real potencial osteogênico de um biomaterial ou estímulo reparador(Bosch, Melsen *et al.*, 1998).

## **2.2 Substitutos Ósseos**

Deformidades do complexo bucomaxilofacial podem ser causadas por diversos fatores etiológicos, entre esses, traumas(Erdmann, Follmar *et al.*, 2008) e seqüelas de ressecções tumorais(Peterson, Ellis I I I *et al.*, 2005). Porém, devido à necessidades funcionais, estéticas e o impacto social destas deformidades sobre a expectativa e qualidade de vida, aumentou também a demanda pelas cirurgias reabilitadoras, propiciando assim um cenário ideal para a inserção dos substitutos ósseos em cirurgias reconstrutivas(Pou, 2003; Habibovic e De Groot, 2007).

Os substitutos ósseos são biomateriais que, como o próprio nome refere, possuem o intuito de substituir o tecido ósseo lesado ou perdido. No entanto, esses biomateriais devem apresentar algumas características para que seu uso clínico possa ser considerado seguro e eficaz: biocompatibilidade, integração com o tecido a ser substituído ou reparado, ser quimicamente inerte, ser capaz de manter a forma e ter um comportamento preditivo ao longo do tempo(Pou, 2003; Greenberg e Schneider, 2005). Além disso, estes biomateriais devem ser, quando absorvíveis, obrigatoriamente metabolizados e excretados por vias fisiológicas do organismo, sem a permanência de resíduos no hospedeiro(Valerio, Pereira *et al.*, 2004).

O comportamento de biomateriais, de acordo com a interface com o tecido hospedeiro, pode ser classificado como inerte, não havendo interação química ou biológica com o hospedeiro; poroso, no qual ocorre o

crescimento do tecido fisiológico para o interior do material implantado; bioativo, ocorrendo forte ligação químico-física entre tecido ósseo e implante e bioabsorvível, que é o caso dos cimentos à base de fosfato de cálcio, nos quais o material é degradado e, concomitantemente, substituído por tecido ósseo(Hench, 1998).

Apesar do uso dos biomateriais de substituição óssea ser cada vez mais freqüente, o uso clínico do tecido ósseo autógeno continua sendo o “padrão ouro”(Le Guehenec, Layrolle *et al.*, 2004) em cirurgias reconstrutivas. Contudo, os leitos doadores intra-bucais desse tecido, em alguns casos, são limitados(Nasr, Aichelmann-Reidy *et al.*, 1999), necessitando de intervenção em um segundo sítio cirúrgico doador, fato que aumenta a morbidade do paciente favorecendo o aumento dos custos hospitalares(Erdmann, Price *et al.*, 2008). Todos estes fatores estimulam o uso clínico dos biomateriais em estudos envolvendo a reparação de tecidos duros tanto em animais(Hotz e Herr, 1994; Habibovic, Sees *et al.*, 2006) quanto em humanos(Heini e Berlemann, 2001; Greenberg e Schneider, 2005).

Alguns aspectos biológicos, encontrados nos enxertos autógenos, são enfaticamente pesquisados e perseguidos nos biomateriais de substituição óssea. A capacidade de osteointegração(capacidade do material se incorporar ao tecido ósseo), osteoindução (capacidade do biomaterial de transformar células mesenquimais em células osteoprogenitoras) e osteocondução (capacidade que o biomaterial possui de conduzir a formação do tecido ósseo neoformado)(Albrektsson e Johansson, 2001). Estas são características que ainda mantêm os enxertos de tecido ósseo autógeno como o “padrão ouro” em enxertia(Nasr, Aichelmann-Reidy *et al.*, 1999).

Estudos envolvendo biomateriais como hidroxiapatita(Gosain, Riordan *et al.*, 2004), cimentos ósseos à base de fosfato de cálcio(Corsetti, 2005; Da Silva, Bertran *et al.*, 2007) e também a associação destes biomateriais com fatores de crescimento, como as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), mostram resultados promissores em análises de formação óssea osteoinduzidas nas cirurgias reconstrutivas do complexo crânio-maxilofacial(Brandao, Brentegani *et al.*, 2002).

Estes biomateriais de substituição, apesar de um custo relativamente elevado, possuem vantagens como disponibilidade irrestrita, não necessitando intervenção em sítios secundários para obtenção de maior quantidade de material. Além disso, favorecem a diminuição do tempo cirúrgico e podem ser moldados e adaptados de acordo com a necessidade de cada caso, fazendo com que a análise de custos finais acabe justificando seu uso(Nicolosi e Moraes, 2005).

### **2.3 Cimento de Fosfato de Cálcio**

A busca por biomateriais que possam de alguma forma reparar defeitos ósseos ou substituir o tecido ósseo lesado(Goebel e Jacob, 2005; Oda, Nakamura *et al.*, 2006; Da Silva, Bertran *et al.*, 2007) tem sido, nos últimos anos, o objetivo de muitos estudos envolvendo os cimentos ósseos à base de fosfato de cálcio(Del Real, Ooms *et al.*, 2003; Corsetti, 2005; Da Silva, Bertran *et al.*, 2007; Rijnen, Gardeniers *et al.*, 2007; Ascherman, Foo *et al.*, 2008). Contudo, pesquisas envolvendo estes cimentos são realizadas desde o início do século XX, quando por volta de 1920, o cimento ósseo de fosfato de cálcio

já foi utilizado como forma de estimular a osteogênese, acelerando o crescimento ósseo durante a reparação de fraturas(Albee, 1920).

Os cimentos ósseos à base de fosfato de cálcio consistem em pós, ou misturas de pós, envolvendo sais à base de fosfato de cálcio, como o fosfato tetracálcio, dicálcio fosfato, monocálcio fosfato, octacálcio fosfato,  $\alpha$ -tricálcio fosfato e  $\beta$ -tricálcio fosfato(Calafiori, Di Marco *et al.*, 2007). São constituídos pelos mesmos íons cálcio e fósforo que constituem o tecido ósseo normal(Kenny e Buggy, 2003), fato que explica a interação positiva deste material com o tecido ósseo hospedeiro(Kawachi, Bertran *et al.*, 2000).

Sua manipulação consiste na agregação de uma solução (aquosa ou ácida) ao pó, formando uma pasta que, em temperatura ambiente ou corporal, sofrerá o fenômeno de cristalização e deposição de íons cálcio e fósforo no tecido ósseo hospedeiro(Bermudez, Boltong *et al.*, 1994).

A produção dos cimentos ósseos de fosfato de cálcio é realizada por meio de sinterização em altas temperaturas, fenômeno este que remove os vapores de água permitindo a obtenção do pó(Kenny e Buggy, 2003). Esse processo de sinterização, de acordo com a temperatura, também é o responsável pelo tamanho dos poros encontrados nos cimentos à base de fosfato de cálcio. Isto é, em altas temperaturas são obtidos os macroporos, enquanto que em temperaturas menores forma-se um cimento mais denso, constituído por microporos(Le Guehenec, Layrolle *et al.*, 2004).

Por se tratar de um biomaterial, cuja finalidade, na maioria dos casos, é substituir o tecido ósseo ou mesmo favorecer seu processo de reparação, o tamanho dos poros que constituem este cimento tem grande importância no processo de colonização e proliferação celular. Macroporos

(poros > 10  $\mu\text{m}$ ) possuem relação direta com a adesão celular, fato que permite a colonização de células no interior do implante constituído por fosfato de cálcio. Já os microporos (poros < 10  $\mu\text{m}$ ) funcionam mais como canalículos que permitem a passagem de fluidos corporais, o que promoverá a nutrição para o processo de proliferação celular (Daculsi, Passuti *et al.*, 1990; Bodde, Cammaert *et al.*, 2007; Oprita, Moldovan *et al.*, 2008).

O tamanho ideal dos poros de implantes de fosfato de cálcio é aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ . Esta dimensão facilita a adesão e colonização celular. Além disso, oferece um suprimento sanguíneo adequado, capaz de fornecer nutrição às células que emigraram do tecido ósseo hospedeiro(Kawachi, Bertran *et al.*, 2000).

Além da relação com adesão e proliferação celular, o tamanho dos poros que constituem o implante de cimento de fosfato de cálcio, também está relacionado ao processo de absorção e resistência deste biomaterial. Assim, macroporos favorecem a absorção quando comparado à microporosidades, porém, sua resistência à fratura e sua densidade são menores que a dos cimentos de fosfato de cálcio constituídos por microporos(Corsetti, 2005; Xu, Burguera *et al.*, 2007).

O processo de absorção dos implantes constituídos por cimento ósseo de fosfato de cálcio está relacionado a diversos aspectos, como fatores físico-químicos e ações celulares(Heymann, Pradal *et al.*, 1999).

De acordo com a constituição química, os cimentos de  $\alpha$ -tricálcio fosfato apresentam taxas de absorção intermediárias, sendo parcialmente absorvidos entre seis e quinze semanas após sua implantação. Este aspecto tem grande importância no processo de osteocondução do tecido

neoformado, uma vez que o biomaterial deve possuir uma taxa de absorção compatível com a velocidade de neoformação osteogênica. (Kawachi, Bertran *et al.*, 2000).

A absorção dos implantes de fosfato de cálcio pode ocorrer de duas formas: passiva e ativa. Na forma passiva, há a ação dos fluidos corporais causando a dissolução do material. A partir disso, quanto maior a superfície de contato com o material maior será a sua taxa de absorção, fato que justifica o porquê de formulações com macroporos serem absorvidas mais facilmente(Kawachi, Bertran *et al.*, 2000; Habibovic, Gbureck *et al.*, 2008). Na forma ativa, por sua vez, há a ação direta de células, como monócitos, macrófagos e osteoclastos, promovendo a degradação do material(Legeros, 1993; Heymann, Pradal *et al.*, 1999; Kawachi, Bertran *et al.*, 2000; Corsetti, 2005).

Um dos pré-requisitos para que um biomaterial possa ser utilizado como substituto ósseo é sua capacidade de manter a forma, resistir a fraturas e, principalmente, servir de meio para proliferação celular e indução de células com fenótipo osteoprojenitor(Pou, 2003; Greenberg e Schneider, 2005). Contudo, ao mesmo tempo em que a macroporosidade favorece a adesão celular, também ocorre a fragilização deste biomaterial devido a diminuição de sua densidade(Kawachi, Bertran *et al.*, 2000; Xu, Burguera *et al.*, 2007).

Com o entendimento de que um biomaterial deve possuir resistência, ser absorvido, mantendo macroporos que favorecem a adesão e colonização celular, outros biomateriais como fibras de carbono(Dos Santos, Carrodegua, Boschi e Fonseca De Arruda, 2003), metilmetacrilato(Fini, Giavaresi *et al.*, 2002) e poliacrilatos(Dos Santos, Carrodegua, Boschi e De

Arruda, 2003), malha de titânio(Vehof, Spauwen *et al.*, 2000) e carboximetilcelulose(Alves, Dos Santos *et al.*, 2008), começaram a ser usados como aditivos nas formulações dos cimentos de fosfato de cálcio com o intuito de aumentar a sua resistência e melhorar suas propriedades físicas.

Os fenômenos de osteointegração, osteoindução e osteocondução promovidos por um biomaterial não são dependentes somente da resistência, composição química e tamanho dos poros que constituem este biomaterial. Estes fenômenos são complexos, envolvendo também o tipo de modelo animal, idade do animal e até mesmo diferentes sítios de um mesmo animal(Yang, Yuan *et al.*, 1996).

No entanto, apesar desta complexidade de fatores envolvidos no processo de osteogênese e da necessidade de mais estudos para clarear os conhecimentos da inter-relação osso/cimento de fosfato de cálcio, estes biomateriais têm mostrado resultados clínicos positivos e promissores em reconstruções da região craniobucamaxilofacial(Comuzzi, Ooms *et al.*, 2002; Piesold, Merwald *et al.*, 2004; Saunders, 2006; Sinikovic, Kramer *et al.*, 2007; Ascherman, Foo *et al.*, 2008),cirurgias de coluna(Bohner, 2001; Spivak e Hasharoni, 2001) e até mesmo como carreadores de substâncias químicas como fatores de crescimento(Liang, Yang *et al.*, 2005).

A absoluta compreensão das inter-relações que determinam biocompatibilidade, osteocondutividade, osteointegração e osteoindutividade entre biomateriais, como o cimento de fosfato de cálcio, e o tecido ósseo pode contribuir significativamente para o entendimento de mecanismos físico-químicos, pertinentes aos biomateriais, e entendimento de reações celulares, caracterizadas pela resposta do hospedeiro aos biomateriais implantados. Esse

cenário propiciará o desenvolvimento e o aumento da vida útil dos biomateriais, criando bases de escolha de materiais adequados para cada caso clínico segundo sua necessidade reabilitadora(Habibovic e De Groot, 2007; Habibovic, Gbureck *et al.*, 2008).

#### **2.4 Campo Magnético e Reparo Ósseo**

A busca pela aceleração dos processos de reparação tecidual, principalmente em casos de cirurgias de reconstrução óssea envolvendo o complexo bucomaxilofacial, tem feito com que diversas formas alternativas de estimular o reparo ósseo fossem propostas e estudadas ao longo do tempo(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Giordano, Knacfuss *et al.*, 2001; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Com o entendimento da atividade celular envolvida no processo de reparação óssea, metodologias envolvendo o laser de baixa intensidade(Giordano, Knacfuss *et al.*, 2001) e campos eletromagnéticos e magnéticos (Yan, Tomita *et al.*, 1998; Fredericks, Nepola *et al.*, 2000; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) têm sido empregadas com o propósito de influenciar este processo, aumentando a velocidade e qualidade do reparo.

O uso específico do eletromagnetismo e do magnetismo, como forma terapêutica coadjuvante no processo de remodelação óssea encontra referência já no século XIX(Barker e Lunt, 1983). A partir de então, estudos mais aprofundados se iniciaram tendo um foco principal: acelerar o processo de reparo ósseo(Barker e Lunt, 1983; Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006).

Estes estudos mostraram que a estimulação com eletromagnetismo e magnetismo possui efeitos positivos sobre os tecidos, células e moléculas que compõem o organismo, mas suas formas de ação são diferentes. Enquanto o eletromagnetismo é gerado por uma corrente elétrica, o magnetismo é responsável apenas pela gênese de um campo magnético que passará a influenciar a atividade celular (Bruce, Howlett *et al.*, 1987).

Entre os campos eletromagnéticos que possuem efeitos terapêuticos, e são amplamente investigados nos estudos científicos, destacam-se os gerados por corrente elétrica ou campos eletromagnéticos pulsáteis (Sharrard, 1990; Fredericks, Nepola *et al.*, 2000; Aaron, Boyan *et al.*, 2004). Já os campos magnéticos são aqueles gerados por magnetos (ímãs), cuja constituição pode ser formada por diferentes materiais, com intensidade de campo diretamente relacionada às propriedades das ligas metálicas que os constituem. Estes podem ser aplicados externamente (Bruce, Howlett *et al.*, 1987) e até mesmo internamente (sepultados) no organismo, principalmente na forma estática, ou seja, com intensidade constante (Yan, Tomita *et al.*, 1998) ou com fluxo magnético variável (Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

No meio natural, os magnetos podem ser classificados como naturais e estáveis. Estes são capazes de gerar campos magnéticos espontaneamente, sendo popularmente mais conhecidos os constituídos por ligas de samário e cobalto e os compostos por neodímio, ferro e boro. No campo envolvendo a medicina alternativa estes mesmos ímãs são utilizados com frequência em diversas terapias, havendo, no entanto, pouco respaldo científico sobre sua real e efetiva ação. Além disso, estes magnetos têm sido

empregados pelo contato direto com a parte do corpo a ser tratada, supondo-se que sua ação magnética possa ocorrer entre dois e cinco centímetros através da pele, estimulando principalmente o ferro, encontrado na hemoglobina, e o oxigênio(Bruce, Howlett *et al.*, 1987).

Evidências científicas a cerca do uso do magnetismo como forma de estimulação tecidual tem mostrado resultados diversos. Na regeneração tecidual ocorre ativação de fibroblastos e estimulação à angiogênese(Bruce, Howlett *et al.*, 1987). No tecido ósseo, por sua vez, o campo magnético induz à osteogênese através da ativação de osteoblastos e aumenta o aporte sangüíneo á área estimulada(Bruce, Howlett *et al.*, 1987; Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 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, Boyan *et al.*, 2004).

Metodologias buscando estudar a aplicação do magnetismo na ortodontia utilizaram porcos para avaliar a movimentação dentária de incisivos superiores. A partir da aplicação de campo magnético, campo eletromagnético pulsátil mais artefato ortodôntico ou unicamente artefato ortodôntico, no caso do grupo controle, observaram-se maiores movimentações dentárias e, concomitantemente, um processo de reorganização óssea mais intensa nos dois primeiros grupos envolvendo estimulação magnética e eletromagnética(Fredericks, Nepola *et al.*, 2000).

Com o objetivo de se estudar a formação óssea, mineral e também a atividade bioquímica envolvida no reparo ósseo influenciado pela estimulação magnética, estudos mais ousados realizaram o sepultamento de

magnetos em fêmures de ratos. Os resultados destes experimentos evidenciaram que a quantidade de cálcio e a densidade mineral nos fêmures dos animais sob efeito de campo magnético foram maiores em relação ao grupo controle, sugerindo assim que a estimulação magnética é capaz de influenciar positivamente o metabolismo do tecido ósseo(Yan, Tomita *et al.*, 1998) Ainda, a avaliação da estimulação magnética, sobre defeitos ósseos cirurgicamente criados em fêmures de ratos com campos magnéticos sepultados também mostrou acelerar a reparação óssea e, paralelamente a isso, observou-se aumento da angiogênese na área de reparação óssea(Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

A utilização de campos magnéticos de alta intensidade (aproximadamente 8 T) permitiu o estudo da orientação celular e formação óssea em culturas de osteoblastos. A análise destes dados, por meio de fotomicroscopia, histologia e avaliação radiográfica evidenciou que as culturas de osteoblastos orientaram-se paralelamente ao campo magnético, o que não foi observado nos grupos não expostos à estimulação magnética. Além disso, a utilização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) nestas culturas estimuladas com magnetismo levou a formação de um tecido ósseo com orientação paralela às linhas de campo magnético(Kotani, Kawaguchi *et al.*, 2002). Tal fato, segundo estudos, pode ser fator de extrema relevância como forma de tratamento de fraturas ósseas guiadas por meio das linhas do campo magnético(Sharrard, 1990).

Clinicamente, a utilização de magnetos compostos por neodímio, ferro e boro se mostrou eficaz no tratamento coadjuvante de fraturas envolvendo mão e punho. A aplicação extra-corpórea de campo magnético

com intensidade de 12.000 Gauss (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(Bruce, Howlett *et al.*, 1987).

As pesquisas experimentais sobre cicatrização não estão voltadas apenas para terapias coadjuvantes envolvendo tecido ósseo, mas tem envolvido também pesquisas sobre cicatrização de feridas experimentais de pele em modelos animais. Para isso, a análise do estudo envolvendo o recobrimento destas feridas com magnetos comerciais de 23 G de intensidade de campo, quando comparado aos grupos recobertos com couro e sem recobrimento da ferida experimental, evidenciou cicatrização total em aproximadamente 15 dias, sendo que nos demais grupos o período de cicatrização foi de aproximadamente 20 dias(Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007).

A idéia de terapias coadjuvantes envolvendo o campo magnético como forma de estimular a reparação tecidual, como comentado anteriormente, encontra referência já no século XIX(Barker e Lunt, 1983). A partir de então, estes estudos se intensificaram e desenvolveram inúmeras formas metodológicas para estimular os tecidos com campos magnéticos, o que, no entanto, dificulta comparação de resultados entre estudos(Bruce, Howlett *et al.*, 1987; Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009). Além disso, muitos destes estudos carecem de metodologias mais adequadas que permitam avaliar o real efeito do campo magnético sobre os processos de reparação tecidual que ocorrem no organismo.

## 2.5 Fosfatase Alcalina

O tecido ósseo apresenta características como a grande extensão/distribuição corporal e uma formação mineral que permite sua análise por meio de exames de imagem que utilizam os Raios "X". Contudo, os fenômenos fisiológicos, metabólicos e patológicos que podem afetá-lo futuramente ou que estão em estágios iniciais só serão manifestados, em exames de imagem, depois de decorrido um tempo considerável(Vieira, 1999b).

Com a necessidade de diagnósticos precoces das patologias ósseas surge a necessidade de utilização de exames laboratoriais coadjuvantes que, através da análise de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, podem antecipar os resultados diagnósticos diminuindo possíveis seqüelas patológicas(Christenson, 1997; Saraiva e Castro, 2002).

Os marcadores do metabolismo ósseo podem ser classificados em marcadores de formação e de absorção. Esses marcadores são expressos, na verdade, pelo resultado da análise de atividades de enzimas como a fosfatase alcalina, envolvida no processo de osteogênese, e a fosfatase ácida, responsável pela atividade absorptiva do tecido ósseo(Christenson, 1997; Saraiva e Castro, 2002; Vieira, 2007).

Em situações de normalidade, a fosfatase alcalina e fosfatase ácida matem um equilíbrio de atividade que é caracterizado pela homeostase óssea(Junqueira e Carneiro, 1995; Christenson, 1997; Ten Cate, 1998; Katchburian e Aranha, 2004). Porém, em situações de anormalidade, como a que ocorre em doenças osteometabólicas como osteoporose(Saraiva e Castro, 2002; Campos, 2003; Molina, 2003a; Seibel, 2006), osteomalácia(Saraiva e

Castro, 2002), síndromes como a de Marfan(Araújo, Simplício *et al.*, 2003) e durante a reparação de fraturas(Yue, Lu *et al.*, 2005), estas atividades enzimáticas se encontram alteradas, caracterizando assim uma alteração no metabolismo ósseo.

A fosfatase alcalina é uma enzima localizada na superfície da célula e está intimamente relacionada ao início do processo de mineralização do tecido ósseo(Leung, Fung *et al.*, 1993; Junqueira e Carneiro, 1995; Ten Cate, 1998; Katchburian e Aranha, 2004).

Os osteoblastos quando estão secretando matriz óssea ativam muitas enzimas, sendo que certa quantidade dessas se difundem pela corrente sanguínea(Guyton, 1989). Estas características, clinicamente, permitem que a atividade da fosfatase alcalina seja facilmente dosada no sangue ou plasma sanguíneo(Roy, 1970; Leung, Fung *et al.*, 1993), sendo, portanto, um bom indicador do índice de formação óssea e, conseqüentemente, podendo ser empregada como marcador periférico do metabolismo do tecido ósseo(Guyton, 1989; Seibel, 2006).

Apesar da facilidade de dosagem da fosfatase alcalina, em pacientes e modelos animais jovens, devido ao metabolismo ósseo ser mais acelerado, é difícil estabelecer padrões de normalidade, o que torna os resultados menos seguros. Contudo, em modelos animais adultos e pacientes adultos jovens, o metabolismo ósseo se estabiliza mantendo uma homeostase, aumentando assim, a confiabilidade das provas de diagnóstico(Vieira, 1999b; Yue, Lu *et al.*, 2005).

A mensuração da atividade da fosfatase alcalina é uma importante ferramenta que pode auxiliar o entendimento e compreensão de

fenômenos envolvidos na resposta celular associada a implantes de materiais aloplásticos(Mah, Hung *et al.*, 2004), enxertos ósseos(Oliveira, Sicca *et al.*, 2003; Zambuzzi, Neves *et al.*, 2005) ou mesmo fenômenos que possam estimular e acelerar o processo de reparação óssea(Yan, Tomita *et al.*, 1998). Além disso, sua atividade pode refletir variações da atividade celular que ocorrem em diferentes etapas do processo de reparação óssea, propiciando assim melhor entendimento sobre este(Yue, Lu *et al.*, 2005).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar histológica e bioquimicamente o reparo ósseo em crânio de ratos após enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) sob campo magnético permanente e estático.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar o comportamento do reparo ósseo com e sem estímulo de um campo magnético permanente através da análise histológica descritiva e histométrica;

- Avaliar o comportamento do reparo ósseo frente ao implante de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) quando comparado ao enxerto ósseo autógeno, ambos com e sem estimulação magnética, através da análise histológica descritiva e histométrica;

- Avaliar a concentração da enzima fosfatase alcalina frente ao enxerto ósseo autógeno e o implante com cimento de fosfato de cálcio, ambos com e sem estimulação magnética.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo e Modelo de Estudo**

O presente trabalho foi desenvolvido dentro do paradigma tradicional quantitativo, utilizando o método descritivo e analítico, realizando um estudo experimental *in vivo* em animais, cego, com amostragem selecionada de forma aleatória ou probabilística simples – randomizada, com grupo controle e grupos testes.

### **4.2 Locais do Estudo**

A etapa cirúrgica do estudo foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Traumatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A análise bioquímica foi realizada no Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os cálculos da intensidade do campo magnético foram realizados no Laboratório de Magnetismo do Instituto de Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A confecção das lâminas e a análise histomorfométrica foram realizadas no Laboratório de Histopatologia “Prof. Dr. J.J. Barbachan” do setor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e as imagens de microscopia eletrônica, para uma visão da porosidade do material, foram obtidas no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

### 4.3 Hipótese

O cimento de fosfato de cálcio Mimix™ é osteoindutor, osteocondutor, absorvível e biocompatível e o campo magnético estimula o processo de reparo ósseo. Portanto, ambos favorecem a reparação óssea.

### 4.4 Descrição do Cimento de Fosfato de Cálcio

O material inorgânico, Cimento de Fosfato de Cálcio (Mimix™) é produzido pela empresa Walter Lorenz Surgical (Jacksonville, FL, USA) e foi fornecido, por meio de doação, pela empresa Intermedic Technology Ltda. (São Paulo, Brasil).

O Mimix™ apresenta-se comercialmente sob a forma de um pó e um líquido em embalagens pré-mensuradas (figura 1 – A). O pó é um material a base de Fosfato de Cálcio com adição de Cimento Tetra-Fosfato de Cálcio e  $\alpha$ -Tricálcio Fosfato e Nitrato de Sódio desidratado, expresso pela fórmula  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . O líquido é uma solução composta por Ácido Cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) e Água Destilada ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

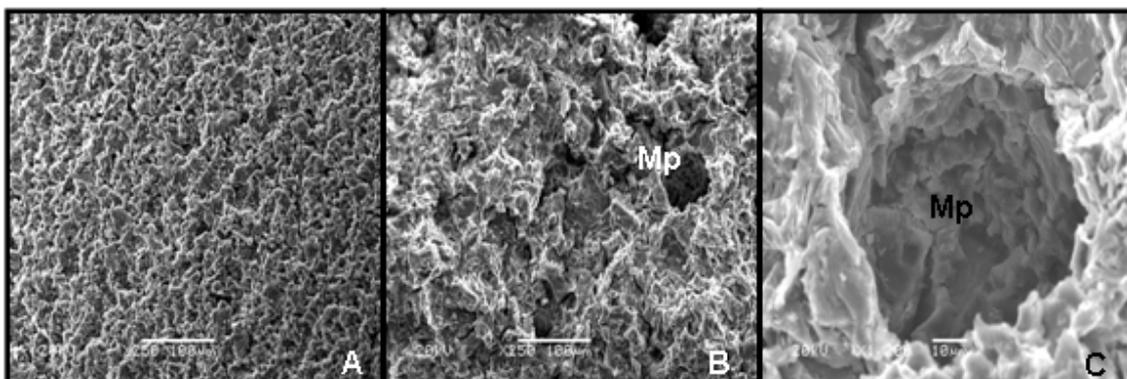
Quando o pó e o líquido são misturados (seguindo orientação do fabricante), formam um material de consistência pastosa (figura 1 – B), biocompatível, que pode ser aplicado sobre defeitos ósseos no trans-operatório. Pode ser manipulado de 30 a 45 segundos. Permanece maleável por 3 a 4 minutos requerendo 4 a 6 minutos para completa reação de presa, formando então uma estrutura cristalizada constituída por micro e macro-poros (figurara 2).

É um cimento largamente utilizado em neurocirurgia como alternativa para reconstrução de calotas cranianas e fechamento de suturas ósseas cranianas.

Foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2002, sendo regulamentado com o número 882.5300, com denominação comercial Mimix™ Bone Void Filler e possuindo registro na ANVISA número 80044680026.



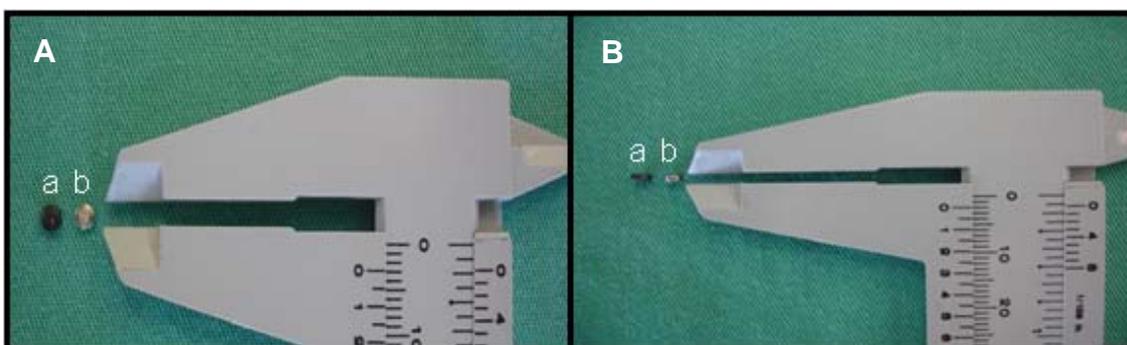
**Figura 1.** (A) Apresentação comercial do cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) em embalagens pré-mensuradas; (B) Consistência pastosa do cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) após manipulação. Porto Alegre, 2009.



**Figura 2.** Imagens de microscopia eletrônica do material utilizado no estudo evidenciando porosidades do cimento de fosfato de cálcio (Mimix™). (A) Porosidade presente na superfície externa, aumento de 250X; (B) Porosidade presente na superfície interna, aumento de 250X; (Mp) Macro-poro na superfície interna do cimento de fosfato de cálcio, aumento de 1.200X; (C) Macro-poro sinalizado na figura "B" evidenciando micro-poros em sua parede. Imagens obtidas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura, UFRGS. Porto Alegre, 2009.

#### 4.5 Dispositivos Metálicos e Imãs

Os dispositivos metálicos e imãs utilizados neste trabalho apresentaram forma de discos com bordos arredondados e com dimensões de 3,0 mm de diâmetro (figura 3 – A) e 1,0 mm de espessura (figura 3 – B). Os imãs são constituídos por neodímio, ferro e boro e os dispositivos metálicos são compostos por uma liga de titânio comercialmente puro.



**Figura 3.** (A) Imagem evidenciando o diâmetro dos ímãs e peças metálicas; (B) Imagem evidenciando a espessura dos ímãs e peças metálicas. (a) Imãs de neodímio, ferro e boro; (b) Discos de titânio. Porto Alegre, 2009.

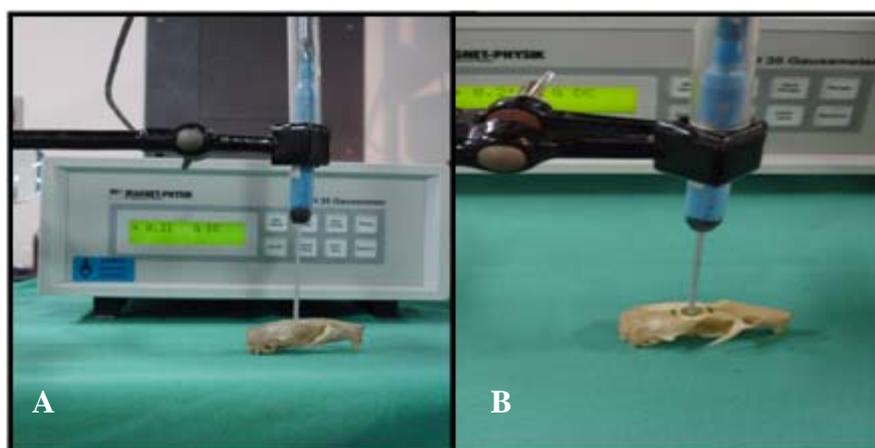
#### 4.6 Cálculo da Intensidade do Campo Magnético

O cálculo da intensidade do campo magnético foi realizado 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) (figura 4) e da utilização de um crânio seco de rato (figura 5).

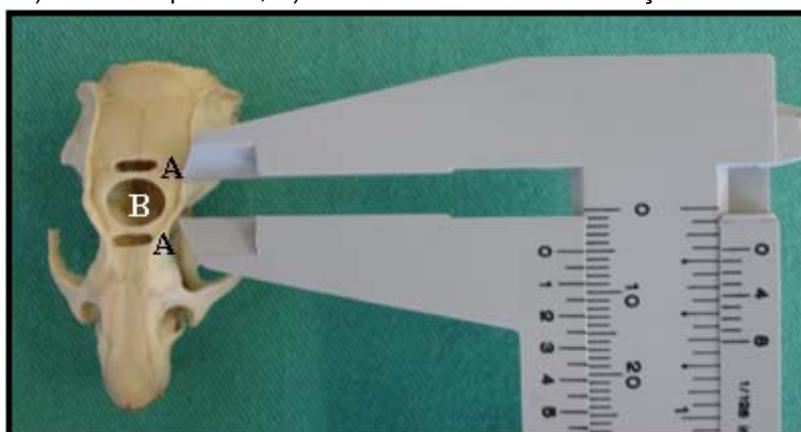
O campo magnético, quando presente, foi gerado por dois ímãs sepultados tangenciado a periferia do defeito ósseo no crânio do rato e a mensuração de sua intensidade foi realizada em três pontos do defeito ósseo: extremidade anterior, centro e extremidade posterior (figura 6). Os trinta pares de ímã utilizados neste estudo foram mensurados e a média da intensidade de

campo magnético em cada ponto dentro do defeito foi de 73,40 G, 66,20 G e 43,72 G, respectivamente na extremidade anterior, posterior e centro do defeito.

Este cálculo teve a função de evitar o sepultamento de pares de ímãs com intensidade magnética discrepante à média e assim causar vieses na interpretação dos dados obtidos. Além disso, para assegurar que os ímãs sempre fossem sepultados com intensidade de campo magnético atrativo, e não repulsivo, o pólo norte de todos os ímãs foi demarcado com esmalte branco atóxico e, previamente a inserção, foi realizado o teste de atração entre os ímãs(figura 7).



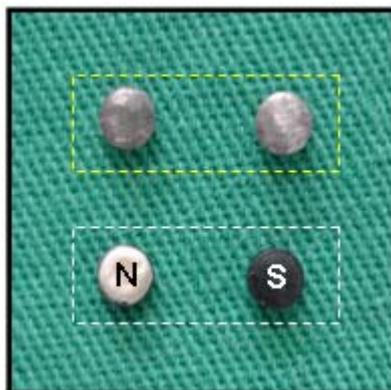
**Figura 4.** Gaussímetro utilizado para mensuração da intensidade de campo magnético no defeito ósseo. A) Vista do aparelho; B) Vista do sensor de mensuração. Porto Alegre, 2009.



**Figura 5.** Crânio seco do rato. (A) Orifícios para inserção dos ímãs de neodímio, ferro e boro ou dispositivos metálicos; (B) Defeito ósseo de 5 mm de diâmetro. Porto Alegre, 2009.



**Figura 6.** Mensuração da intensidade de campo magnético em três pontos dentro do defeito ósseo. (A) Mensuração na extremidade anterior; (B) Mensuração no centro do defeito; (C) Mensuração na extremidade posterior do defeito. Porto Alegre, 2009.



**Figura 7.** Ilustração evidenciando dispositivos metálicos (área pontilhada amarela) e Imãs de neodímio, ferro e boro (área pontilhada branca) marcados com esmalte branco atóxico no pólo norte. N - Pólo norte; S - Pólo sul. Porto Alegre, 2009.

#### 4.7 Cálculo e Seleção da Amostra

A amostra foi selecionada a partir de um cálculo realizado através do software Winpepi<sup>®</sup>, módulo Compare 2, versão 1.62, atribuindo-se valores de 5% e 80% para nível de significância e poder da amostra, respectivamente.

Com base nos valores de desvio-padrão apresentados por Marzouk(Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), que também estudou o reparo ósseo de ostectomias em calvária de ratos, e considerando uma diferença de 20% no preenchimento do defeito ósseo, chegou-se ao valor de cinco animais para cada grupo experimental. Para tanto, foram utilizados 65 ratos, machos, adultos, albinos, com idade entre 8 e 10 meses de vida, peso médio de 500g, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*, cepa *Wistar*. Os

animais foram obtidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais permaneceram durante todo o período do estudo em gaiolas de polietileno com tampas de aço inoxidável, regularmente higienizadas, mantidas em ambiente climatizado com temperatura de 23 °C (+/- 1°C), sendo alimentados com ração comercial padrão e água *ad libidum*.

Para a formação de cada grupo experimental os animais foram sorteados de forma aleatória e ao final do sorteio os grupos ficaram distribuídos da seguinte forma (tabela 1):

**Tabela 1.** Distribuição do número de animais por grupo experimental. Porto Alegre, 2009.

<b>Tempos / Grupos</b>	<b>OASC</b>	<b>OACC</b>	<b>IFSC</b>	<b>IFCC</b>	<b>NAIVE</b>
<b>15 dias</b>	5	5	5	5	
<b>30 dias</b>	5	5	5	5	5
<b>60 dias</b>	5	5	5	5	
<b>Total de animais</b>	15	15	15	15	5

OASC: Enxerto ósseo Autógeno / Sem Campo Magnético;

OACC: Enxerto ósseo Autógeno / Com Campo Magnético;

IFSC: Implante de Cimento de Fosfato de Cálcio / Sem Campo Magnético;

IFCC: Implante de Cimento de Fosfato de Cálcio / Com Campo Magnético;

NAIVE: Grupo Controle Fisiológico da Atividade da Fosfatase Alcalina.

A morte dos animais foi realizada nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Estes intervalos de tempo foram estabelecidos a partir da metodologia proposta por Puricelli(Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) e a partir dos diferentes resultados em estudos pós-operatórios da análise do reparo ósseo(Schmitz e Hollinger, 1986; Albrektsson e Johansson, 2001; Haddad, Peel *et al.*, 2006). Para cada tempo, 05 (cinco) animais de cada grupo experimental foram mortos à exceção do grupo NAIVE, no qual apenas 5 animais foram mortos durante todo o estudo para servirem de controle fisiológico da atividade da enzima fosfatase alcalina dos demais grupos.

#### **4.8 Delineamento Experimental**

No período de oito a dez meses de idade e com peso médio de 500g, os ratos foram submetidos à cirurgia experimental conforme protocolo que segue:

##### **4.8.1 Assepsia**

Durante a realização da fase cirúrgica o cirurgião manteve todos os critérios de assepsia, mantendo-se paramentado com avental cirúrgico, luvas cirúrgicas estéreis, propés, máscara, gorro e óculos de proteção. O instrumental cirúrgico foi individualizado para cada animal operado, sendo previamente esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

##### **4.8.2 Anestesia**

Sob orientação de um Médico Veterinário, devidamente registrado no Conselho Regional de Veterinária, o animal foi submetido à

anestesia intraperitoneal conforme protocolos clínicos veterinários utilizando-se Cloridrato de Xylazina e Cloridrato de Cetamina a 10% respectivamente na dosagem de 0,1 ml/Kg e 1,0 ml/Kg de peso corporal do animal.

#### **4.8.3 Infiltração Local Anestésica**

A área operada recebeu infiltração local de mepivacaína a 2 % com adrenalina, na proporção de 1:100.000, não excedendo 0,9 ml/Kg de peso corporal do animal. A aplicação foi realizada de forma subcutânea e teve o objetivo de promover hemostasia local e também analgesia pós-operatória.

#### **4.8.4 Tricotomia, Colocação de Campos Operatórios e**

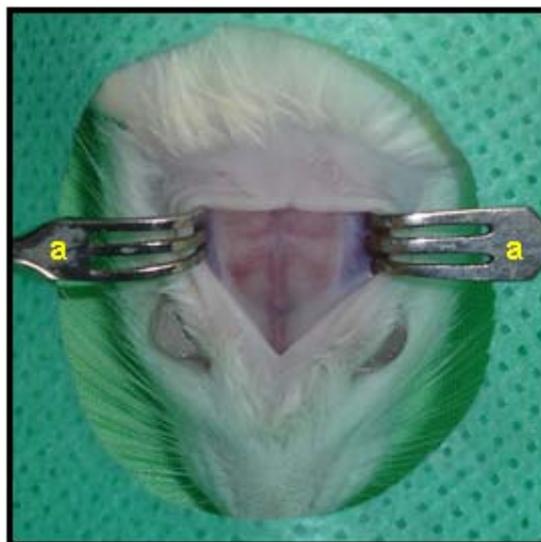
##### **Incisão**

Após a realização da anestesia no animal, este foi colocado em decúbito ventral sobre uma superfície rígida e fixa para que fosse realizada a tricotomia manual (figura 8) da região da calota craniana. Seguiram-se a assepsia do campo operatório por meio de solução aquosa de digluconato de clorexidina a 2,0 % e a colocação do campo cirúrgico estéril com fenestração na área de calota craniana.

Na pele, sobre a calota craniana, uma incisão de aproximadamente 1,5 centímetros foi realizada no sentido ântero-posterior, seguindo uma linha imaginária longitudinal ao corpo do animal (figura 9). A incisão foi realizada por meio de bisturi cabo número três, montado com uma lâmina número quinze.



**Figura 8.** Imagem trans-operatória do preparo cirúrgico evidenciando a tricotomia realizada de forma manual em região de calota craniana. Porto Alegre, 2009.



**Figura 9.** Imagem trans-operatória evidenciando área da incisão longitudinal em calota craniana do rato. (a) Afastadores de Senn Müller. Porto Alegre, 2009.

#### **4.8.5 Divulsão e Descolamento dos Tecidos**

Após a incisão em pele e divulsão desta com sindesmótono delicado (espátula esculpadora 3S) fez-se a incisão do periósteo com lâmina número quinze seguindo-se o descolamento do mesmo também com a espátula esculpadora 3S, permitindo assim o acesso à cortical óssea da calota craniana. Esse procedimento foi realizado em todos os grupos experimentais a exceção dos animais pertencentes ao grupo controle fisiológico da atividade da enzima fosfatase alcalina (grupo Naive). No grupo NAIVE, os animais não

foram submetidos a intervenção cirúrgica e foram mortos para permitir a coleta sanguínea para posterior análise fisiológica da atividade da enzima fosfatase alcalina, servindo assim de amostra para controle fisiológico da atividade desta enzima.

#### **4.8.6 Afastamento dos Tecidos**

O afastamento dos tecidos no campo operatório foi realizado por um auxiliar com afastadores do tipo Senn Müller (figura 9), permitindo assim a visualização adequada do campo operatório.

#### **4.8.7 Ostectomias na Calota Craniana**

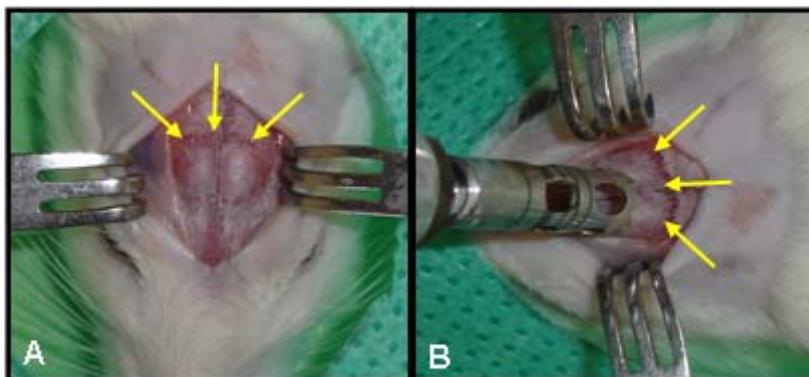
Após a incisão dos tecidos, a sutura fronto-parietal foi localizada (figura 10 – A) e 2,0 mm a frente desta realizou-se a ostectomia que criou o defeito ósseo crítico para posterior análise do reparo ósseo em calota craniana do rato (figura 10 – B). A ostectomia do orifício central foi realizada de forma bicortical por meio de uma broca trefina<sup>1</sup> com diâmetro de 5,0 mm (figura 10 – B). Após a confecção do defeito ósseo, foram realizadas duas ostectomias que tangenciaram 1,0 mm o defeito ósseo nos extremos do seu maior diâmetro. Nestas ostectomias, com dimensões de 1,0 mm de espessura e 3,0 mm de comprimento, foram implantados, sob pressão, os imãs e os dispositivos metálicos (figura 11 – A).

As ostectomias foram realizadas com brocas multilaminadas, esféricas número um com auxílio de motor elétrico de baixa rotação e sob irrigação constante com solução fisiológica.

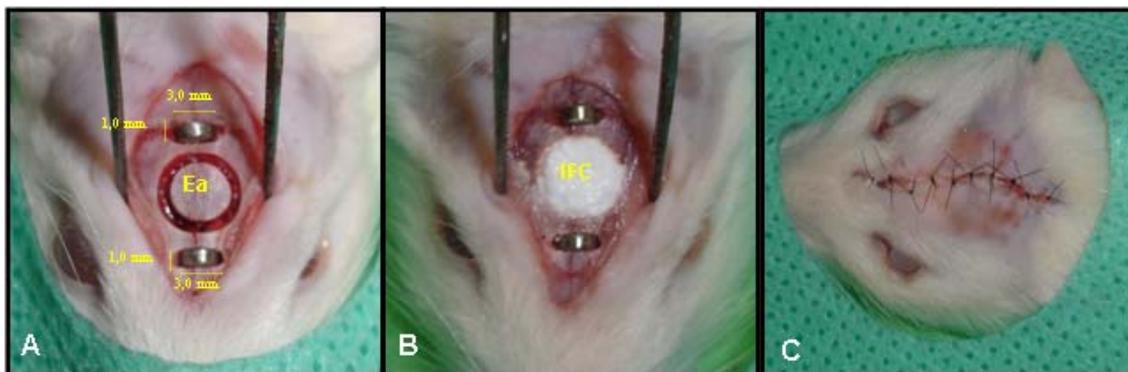
---

<sup>1</sup> SIN – Sistema de Implantes LTDA. Porto Alegre, RS, Brasil.

O evento que diferiu entre os grupos foi a fixação de imãs no grupo teste e a implantação de dispositivos metálicos de titânio não-ímantados no grupo controle, a presença de material substituto ósseo (cimento de fosfato de cálcio) no grupo teste e a colocação de enxerto ósseo autógeno no grupo controle (Figura 11 – B).



**Figura 10.** Aspecto trans-operatório após exposição do leito ósseo. (A) Setas amarelas evidenciando sutura fronto-parietal. (B) Posicionamento da broca trefina para confecção do defeito ósseo crítico na calota craniana do rato. Setas amarelas delimitando a sutura fronto-parietal. Porto Alegre, 2009.



**Figura 11.** (A) Imagem trans-operatória dos dispositivos metálicos fixados e evidenciando tamanho destes dispositivos metálicos e enxerto autógeno. (B) IFC - Implante de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™). (C) Sutura em pele a pontos isolados com fio de nylon 5-0. Porto Alegre, 2009.

#### 4.8.8 Cuidados Pós-Operatórios

Os cuidados pós-operatórios envolveram irrigação abundante da ferida operatória com solução fisiológica e sutura a pontos isolados com fio de nylon 4-0 (figura 11 – C).

A analgesia (Paracetamol, 20mg/Kg de peso corporal, Tylenol solução oral, Jassen-Cilag Farmcêutica LTDA., São José dos Campos, São Paulo) e antibióticoterapia (Oxitetraciclina, 0,1ml/Kg de peso corporal, Cyamicina® solução injetável, Fort Dodge Saúde Animal, Campinas, São Paulo) pós-operatórias foram realizadas conforme indicação e orientação do médico veterinário.

Para manutenção da temperatura corporal durante a recuperação pós-operatória, os animais foram envolvidos com campos cirúrgicos e bolsas de água morna.

#### **4.8.9 Morte dos Animais**

A morte dos animais foi realizada por decapitação em guilhotina, respeitando a lei estadual de proteção aos animais nº 11.915, de 23 de maio de 2003 (Anexo I) e de acordo com a Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde GPPG/HCPA (Anexo II).

#### **4.8.10 Coleta das Amostras**

A coleta de sangue para dosagem da atividade da enzima fosfatase alcalina foi realizada por meio da morte por decapitação em guilhotina e imediata coleta sanguínea cervical em funil heparinizado.

Após a morte, as cabeças dos animais foram colocadas sobre uma superfície plana e rígida, sendo realizado o acesso ao crânio, conforme

descrito anteriormente no procedimento cirúrgico. Os tecidos moles foram dissecados e um segmento do crânio, que continha o defeito ósseo cirurgicamente criado, foi removido em bloco por meio de secções realizadas através de instrumental rotatório (disco de corte) sob irrigação contínua com solução fisiológica. As peças coletadas foram imediatamente colocadas em recipiente plástico com solução de formalina neutra tamponada a 10%, durante 24 horas.

Os corpos e as cabeças dos animais, após a coleta das amostras, foram encaminhados até o Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para serem descartados por meio de incineração.

#### **4.8.11 Aprovação do Projeto de Pesquisa**

Esta dissertação teve seu projeto aprovado pelo Comitê de Ética e Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número de processo 259/08 (Anexo III), tendo sido previamente aprovada por banca examinadora em defesa de projeto de pesquisa (Anexo VI).

#### **4.9 Análise Radiográfica**

Radiografias do crânio foram realizadas em todas as amostras coletadas. Estas tomadas radiográficas foram realizadas com filme periapical odontológico número 2 (Kodak Ultra-speed, Kodak do Brasil, Comércio e Indústria Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil) tendo o intuito de verificar a

estabilidade do enxerto ósseo, estabilidade do implante de cimento de fosfato de cálcio e estabilidade dos ímãs e dispositivos metálicos implantados na calvária dos animais. As tomadas radiográficas foram realizadas a uma distância padrão de 30,0 cm entre a película e o foco do aparelho (Corsetti, 2005) e com uma incidência de 0,1 segundo de tempo de exposição (Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006). Esta incidência radiográfica foi realizada superiormente à área de defeito ósseo, perpendicularmente a este defeito por meio de aparelho de RX odontológico (Procion ION 70X, 70 KVA, 8 mA).

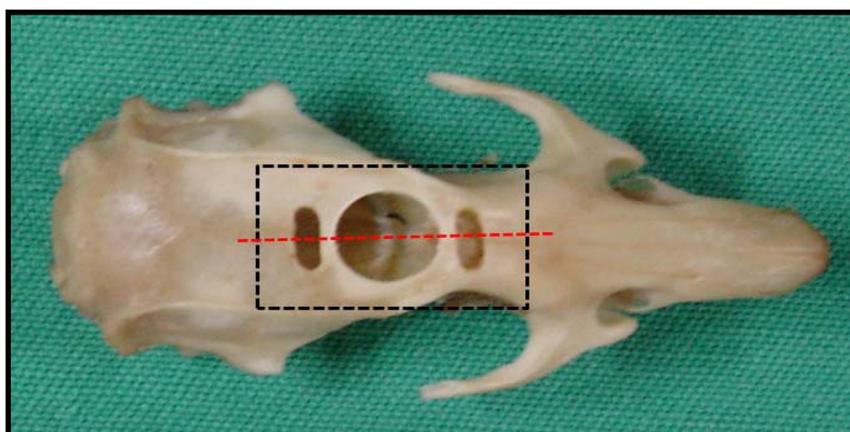
Após as tomadas, os filmes radiográficos foram processados no mesmo dia e de forma automatizada no Serviço de Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

#### **4.10 Estudo Histológico**

O preparo das peças avaliadas histomorfometricamente foi realizado no Laboratório de Histopatologia “Prof. Dr. J.J.D. Barbachan” do setor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com apoio financeiro do CNPq, Propesq, Pronex, FAPERGS e PROAP04/2005, número do Processo 0410882.

Após fixação das peças em solução de formalina neutra tamponada a 10% por 24 horas, as peças foram submersas em uma solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20% por aproximadamente sete dias para realizar a sua descalcificação. A etapa seguinte foi a remoção dos artificios metálicos e dos ímãs. A peça descalcificada foi seccionada longitudinalmente na linha média da calvária com uso de uma navalha descartável para

micrótomos, sendo que o traço longitudinal da secção incluiu a parte central das duas ostectomias criadas para sepultamento dos ímãs/dispositivos metálicos, conforme a figura 12, dividindo assim o defeito ósseo em duas metades iguais. A seguir, cada metade da peça foi processada conforme protocolo de inclusão em parafina e coloração por meio de Hematoxilina e Eosina (HE). Uma das metades da peça coletada foi então utilizada para realização de três cortes histológicos sagitais contíguos com espessura de 4 $\mu$ m dispostos seqüencialmente em uma mesma lâmina de vidro. A outra metade foi utilizada somente nos casos em que a primeira lâmina apresentasse problemas técnicos que dificultavam sua análise.



**Figura 12.** Esquema da obtenção da peça para confecção das lâminas histológicas. Área pontilhada preta indica a peça removida para posterior descalcificação. Linha pontilhada vermelha aponta a secção longitudinal mediana da peça após a descalcificação. Porto Alegre, 2009.

As lâminas foram codificadas para que o observador se mantivesse cego quanto à distribuição dos grupos do estudo.

O campo histológico, analisado de forma histométrica, foi toda a extensão do defeito ósseo, sendo seu limite extremo os bordos do defeito ósseo.

A análise histológica descritiva englobou toda a área do defeito ósseo bem como as lojas ósseas que continham os imãs ou discos metálicos, sendo seu limite de análise os bordos externos destas. Os aspectos observados foram a presença de neoformação óssea, presença de tecido de granulação e reações inflamatórias do tipo reações a corpo estranho. A observação e análise descritiva das lâminas foi realizada nos aumentos de 40x, 100x, 200x e 400x. A correlação entre as análises histológicas descritivas foi calculada através do índice de Kappa obtendo-se os valores de 0,8, 1,0 e 1,0, respectivamente para neoformação óssea, tecido de granulação e reações inflamatórias.

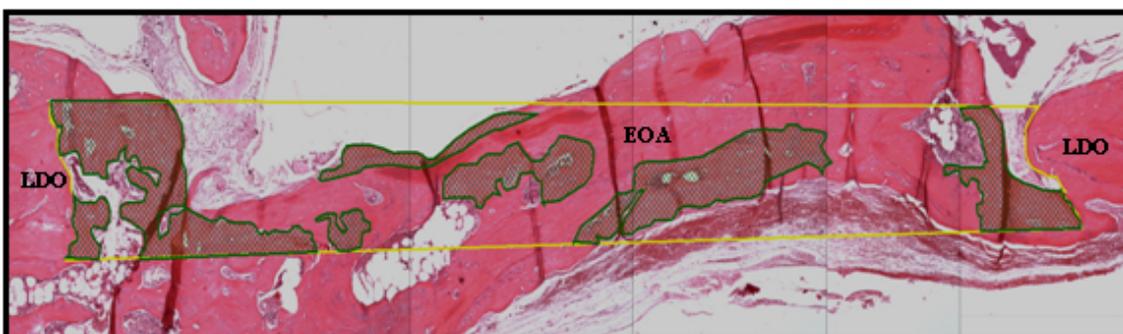
As imagens microscópicas das lâminas histológicas foram capturadas no aumento de 40x, através de uma câmera de vídeo Olympus® (modelo Qcolor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF e a um computador Dell® (modelo Dimension 5150), utilizando o software Qcapture® (versão 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005)<sup>2</sup>.

Para análise da quantificação do osso neoformado na área do reparo ósseo, foi mensurada a área total do defeito ósseo e, posteriormente, todas as áreas de neoformação óssea dentro deste. Essas mensurações, obtidas em Pixel<sup>2</sup> e transformadas em porcentagens, foram realizadas nos três cortes de cada lâmina utilizando-se o software Axiovision®, versão 4.6.3 (Carl Zeiss Imaging). Isto permitiu que as áreas de neoformação óssea fossem expressas como porcentagem de neoformação em relação á área total do defeito original (figura 13).

---

<sup>2</sup> 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 n° do Processo 0410882.

A manipulação do programa de imagem foi realizada por examinador cego e calibrado. Primeiramente foi realizado o treinamento do examinador em conjunto com um professor doutor na área de Patologia Bucal. Após o treinamento, foi realizada a calibração intra-examinador: a partir de duas mensurações de dez lâminas, cada mensuração separada por um intervalo de sete dias, o examinador realizou análises histométricas destas dez lâminas selecionadas de forma aleatória. Com os valores das mensurações obtidos no período de calibração, foi calculada correlação entre as duas análises histométricas por meio do coeficiente de correlação intraclassa, obtendo-se o valor de 0,93, considerado excelente (Susin e Rösing, 1999).



**Figura 13.** Imagem de corte histológico demarcado no programa Axion Vision evidenciando mensurações em Pixel<sup>2</sup> da área total (delimitado pela linha amarela) e das áreas de neoformação óssea no interior do defeito ósseo (áreas achuradas em verde). Limites do defeito ósseo (LDO); Enxerto ósseo autógeno (EOA). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

Com os valores de porcentagens obtidos dos três diferentes cortes de cada calvária obtiveram-se médias que, após a descodificação das lâminas e reagrupamento dos grupos de estudo, foram utilizadas para fins estatísticos na análise dos resultados.

#### 4.11 Análise Bioquímica

A análise bioquímica foi realizada no Laboratório de Neuroproteção e Doença Metabólica, Laboratório 34, no Grupo de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A coleta sanguínea para mensuração da atividade enzimática foi realizada nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, seguindo os mesmos tempos de morte para a análise histométrica.

Para a análise bioquímica da atividade da fosfatase alcalina plasmática, foram coletados 1000 µl de sangue por meio de coleta sanguínea cervical em funil heparinizado após a decapitação do animal.

O sangue coletado foi centrifugado a 3.000 rpms por dez minutos obtendo-se a partir disso o plasma sanguíneo. Através de 50 µl desse foi realizada a dosagem da atividade da fosfatase alcalina. Cada amostra foi codificada para promover o cegamento do laboratorista.

Para a dosagem da atividade enzimática foram utilizados os reagentes do kit Laboratorial Labtest (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 foi 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 se corasse de azul, permitindo a mensuração em espectrofotômetro a 590 nm de acordo com o método proposto por Roy (Roy, 1970). A atividade enzimática foi expressa em U/L.

Após a obtenção dos valores numéricos para a atividade da enzima fosfatase alcalina, as amostras foram reagrupadas para que pudessem ser feitas as análises estatísticas.

#### **4.12 Análise Estatística**

A análise dos dados foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS (SPSS versão 13.0 for Microsoft Windows). A unidade analítica considerada foi o rato e o nível de significância foi estabelecido em 5%. Os dados de preenchimento ósseo apresentaram distribuição assimétrica, sendo transformados utilizando a raiz quadrada. Comparações entre grupos e entre tempos experimentais foram realizadas através da análise de variância de uma via com teste de Bonferroni como post-hoc. Os resultados foram apresentados através de médias e desvios-padrão do percentual de neoformação óssea após transformação inversa. Para a atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica foi utilizado análise variância de uma via seguida pelo post-hoc teste de escores múltiplos de Duncan.

A escolha de tais testes estatísticos foi baseada em consultoria técnica junto ao setor de Epidemiologia e Bioestatística do GPPG/HCPA.

#### **4.13 Considerações Éticas**

Este estudo seguiu as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme Código Estadual de Proteção aos Animais (Anexo I) e Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA (Anexo II).

## **5. RESULTADOS**

Dos sessenta e cinco animais utilizados neste trabalho, três foram excluídos por motivos relacionados a infecção pós-operatória (dois animais) e deslocamento dos imãs (um animal). Os dois animais excluídos devido à infecção pertenciam, respectivamente, aos grupos de enxerto ósseo autógeno sem imã de 30 dias e implante de cimento de fosfato de cálcio sem imã de 30 dias. O único animal excluído devido ao deslocamento dos imãs pertencia ao grupo de enxerto ósseo autógeno com imã de 15 dias. A exclusão destes animais foi realizada também na análise bioquímica deste trabalho. Assim, estes grupos permaneceram com quatro animais para serem analisados.

### **5.1 Análise Histométrica**

A análise histométrica foi realizada em duas etapas: primeiramente de forma transversal (avaliação entre os diferentes grupos em um mesmo tempo experimental) e, após, avaliada de forma longitudinal (avaliação entre os diferentes tempos de um mesmo grupo).

Os resultados da análise histométrica transversal, nos grupos envolvendo enxerto ósseo autógeno com e sem estimulação magnética, podem ser vistos na tabela 2. A comparação entre os grupos que receberam enxerto ósseo autógeno com e sem estimulação magnética não evidenciou diferenças estatísticas significativas no percentual de neoformação óssea nos diferentes tempos analisados a partir da análise histométrica transversal, em termos de quantidade de tecido ósseo neoformado.

A análise dos grupos em que o defeito ósseo foi preenchido com implante de cimento de fosfato de cálcio, a partir da histometria transversal,

não observou diferenças estatísticas significativas no percentual de neoformação óssea entre os grupos com e sem estimulação magnética permanente, estática e sepultada (tabela 2).

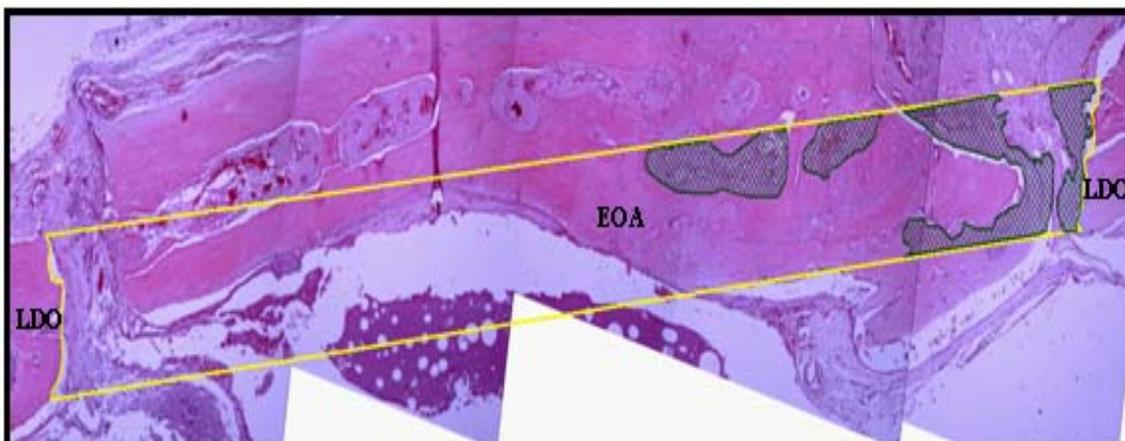
A comparação da quantidade de tecido ósseo neoformado, entre os grupos que receberam enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio, ambos com e sem estimulação magnética, não evidenciou diferenças estatísticas no percentual de neoformação óssea nos diferentes tempos analisados, conforme os dados da tabela 2.

A avaliação entre os diferentes tempos experimentais em um mesmo grupo experimental (análise histométrica longitudinal) evidenciou diferenças significativas na velocidade de neoformação e quantidade a mais de tecido ósseo neoformado entre os tempos de 15 e 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética (tabela 2). Nos demais grupos, a histometria longitudinal não evidenciou diferenças significativas.

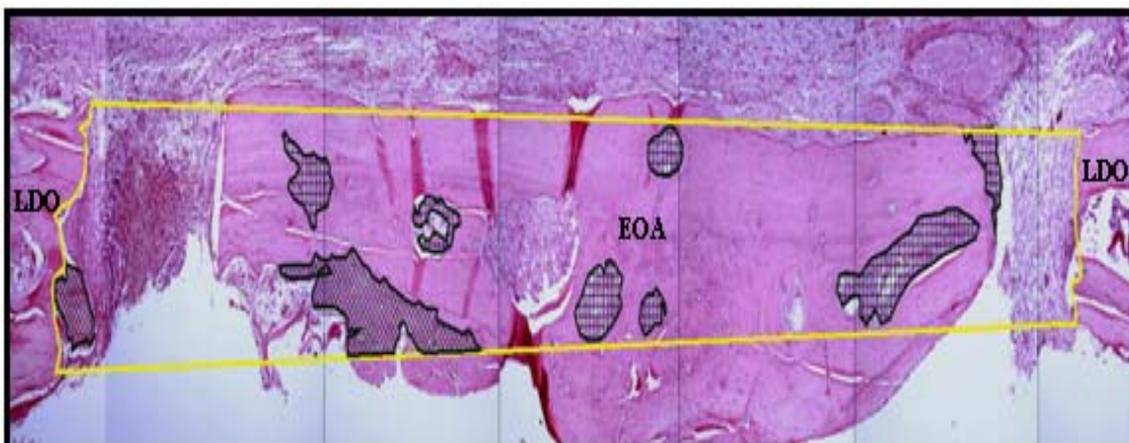
**Tabela 2.** Análise histométrica longitudinal e transversal do percentual de neoformação óssea nos grupos com enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio, com e sem estimulação magnética, em 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (média  $\pm$  desvio-padrão). (\*) Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo experimental. Teste Bonferroni,  $p < 0,05$ . (\*\*) Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos experimentais dentro de cada grupo. Teste Bonferroni,  $p < 0,05$ . Porto Alegre, 2009.

	15 dias		30 dias		60 dias	
	% Média $\pm$ DP	*				
<b>Enxerto + Imã</b>	8,15 $\pm$ 2,32	A	14,84 $\pm$ 4,10	A	19,95 $\pm$ 7,00	A
**	a		ab		b	
<b>Enxerto</b>	11,23 $\pm$ 3,92	A	12,09 $\pm$ 1,76	A	14,64 $\pm$ 6,36	A
**	a		a		a	
<b>Mimix<sup>TM</sup> + Imã</b>	9,94 $\pm$ 3,85	A	10,91 $\pm$ 1,56	A	16,50 $\pm$ 15,38	A
**	a		a		a	
<b>Mimix<sup>TM</sup></b>	7,23 $\pm$ 2,53	A	8,28 $\pm$ 4,30	A	10,73 $\pm$ 3,12	A
**	a		a		a	

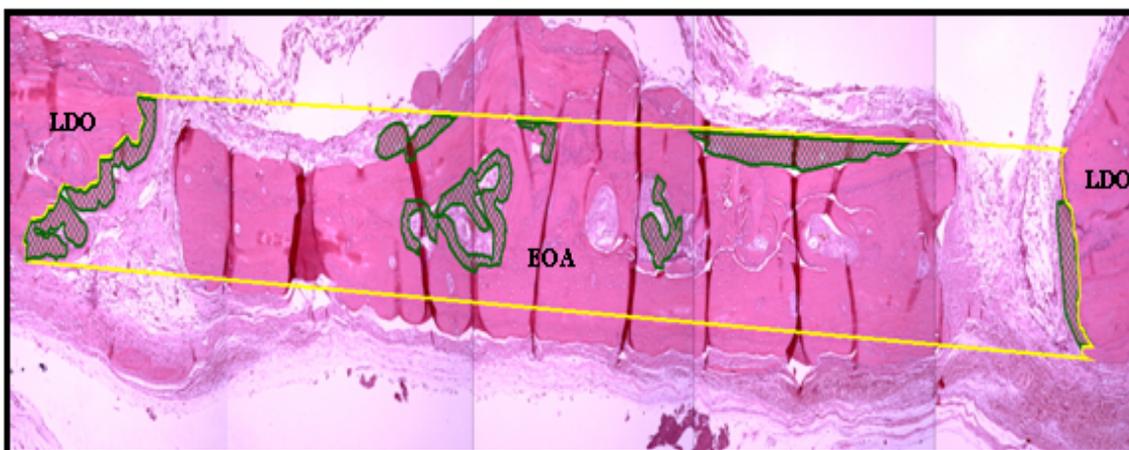
As figuras 14 a 19 ilustram a análise histométrica realizada no programa AxionVision® nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios nos grupos de enxerto ósseo autólogo com e sem estimulação magnética permanente e constante.



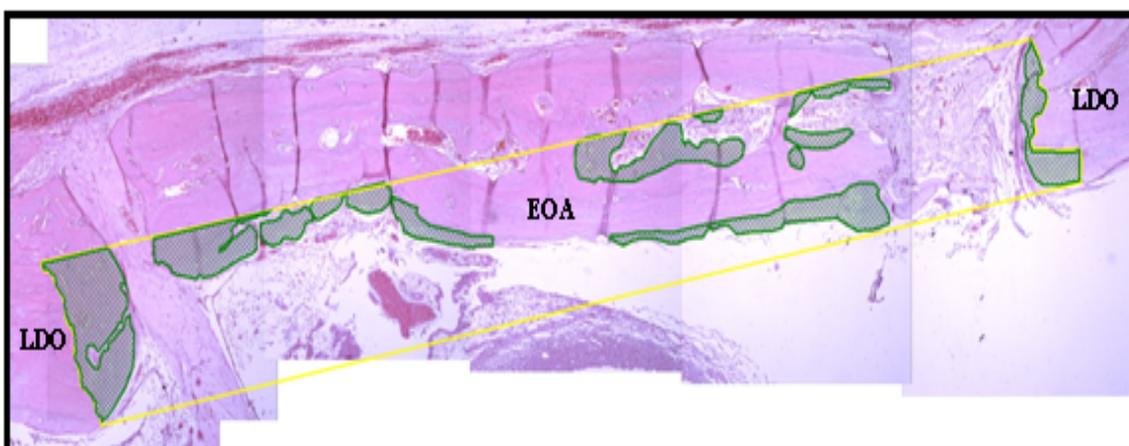
**Figura 14.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Enxerto autólogo (EOA) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



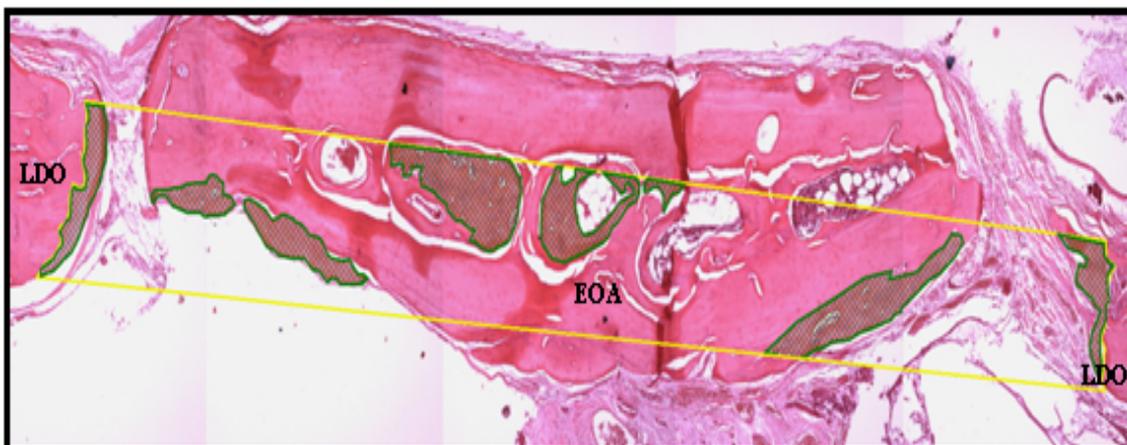
**Figura 15.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Enxerto autólogo (EOA) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



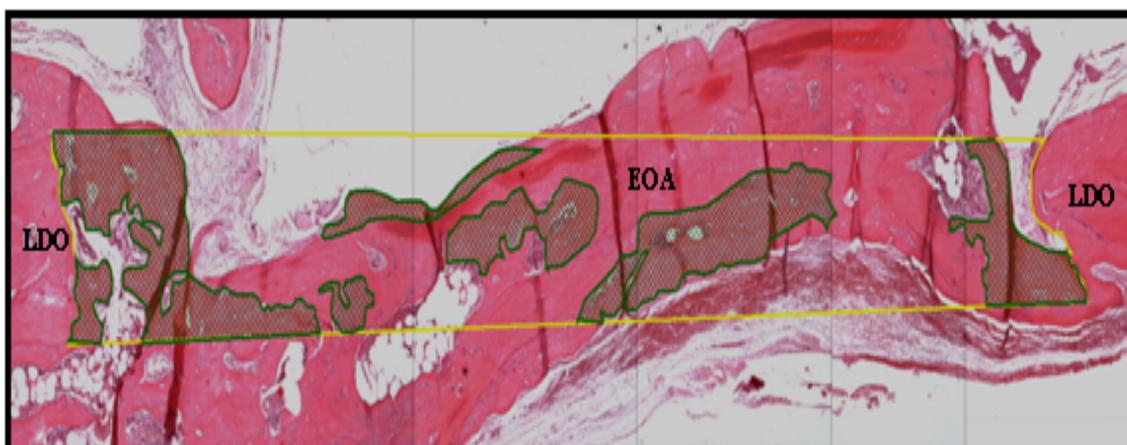
**Figura 16.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



**Figura 17.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Enxerto autógeno (EOA) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.

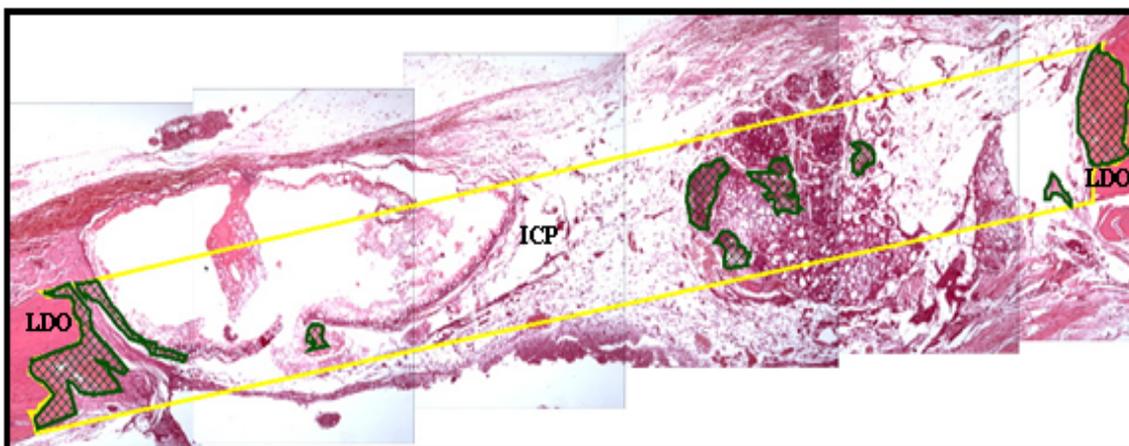


**Figura 18.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Enxerto autólogo (EOA) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.

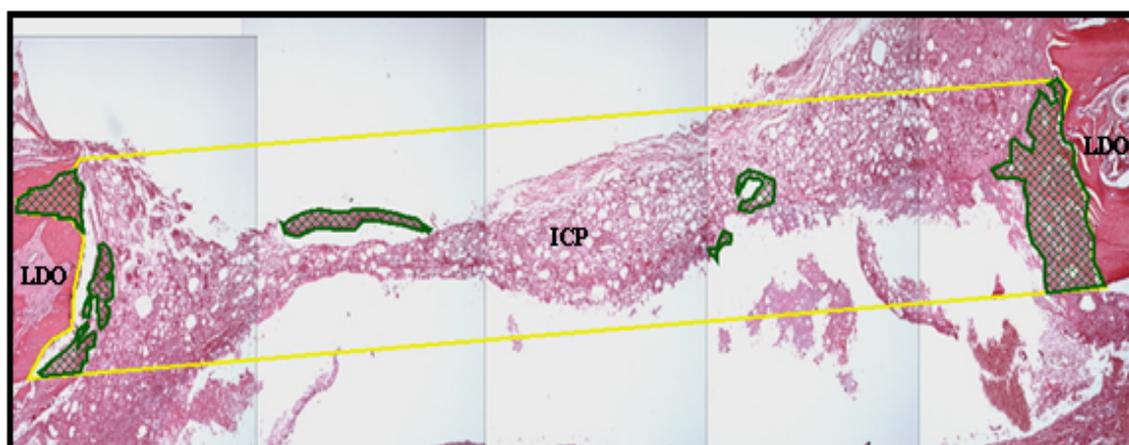


**Figura 19.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Enxerto autólogo (EOA) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.

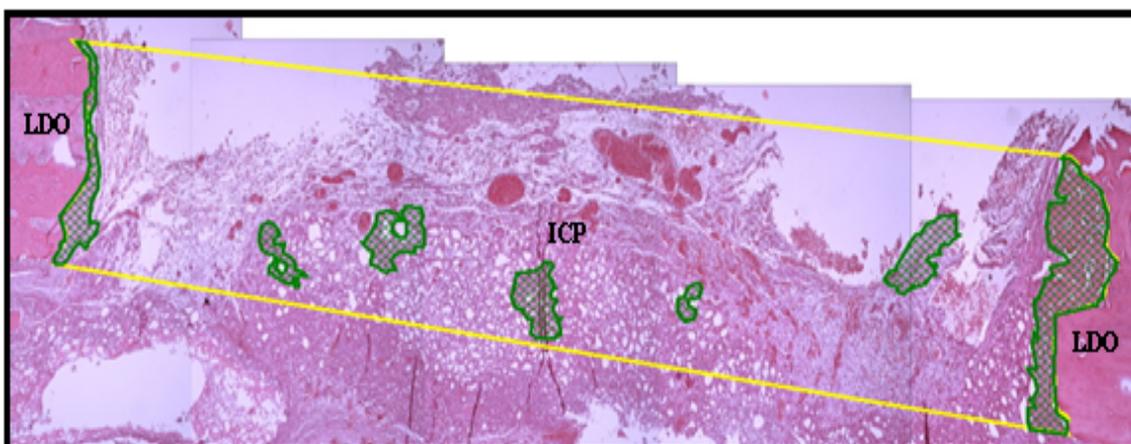
As figuras 20 a 25 ilustram a análise histométrica realizada no programa AxionVision® nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios nos grupos com implantes de cimento de fosfato de cálcio com e sem estimulação magnética permanente e constante.



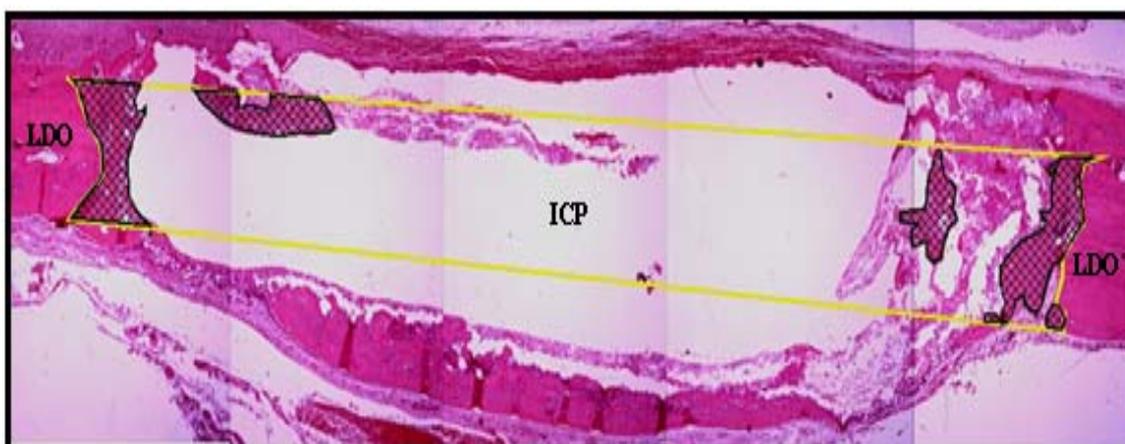
**Figura 20.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



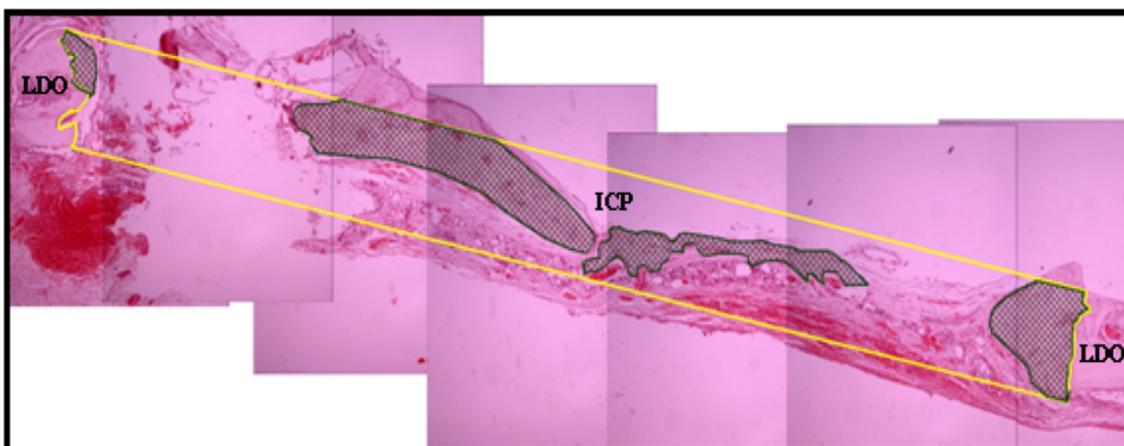
**Figura 21.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 15 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



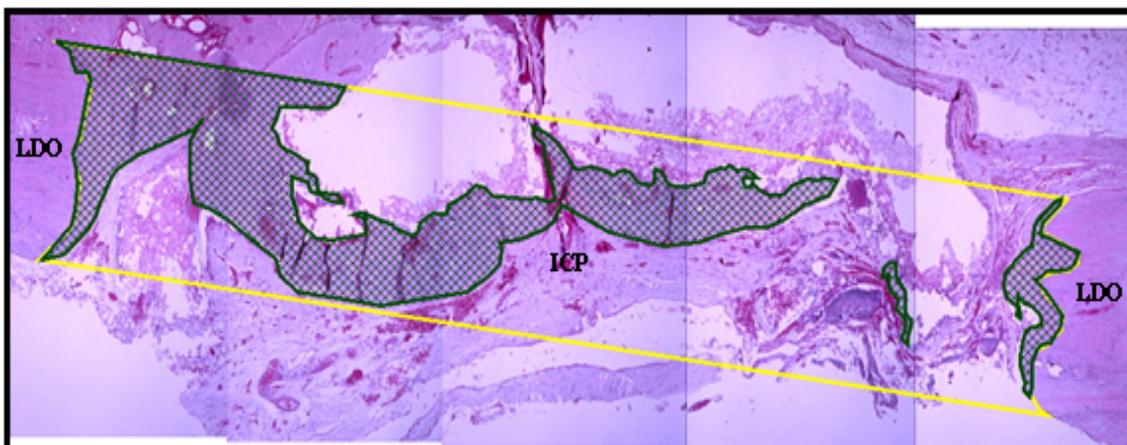
**Figura 22.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



**Figura 23.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 30 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.



**Figura 24.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) sem aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.

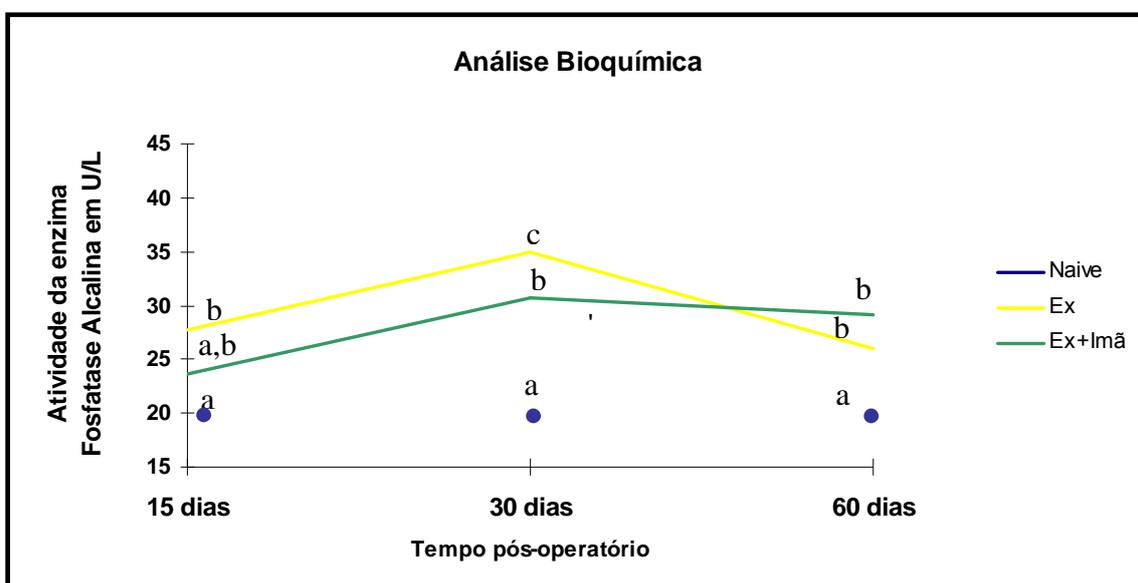


**Figura 25.** Corte histológico ilustrando análise histométrica do defeito crítico com 5,0 mm realizado no crânio de rato. Período de 60 dias pós-operatórios. Implante de cimento de fosfato de cálcio (ICP) com aplicação de campo magnético. Limite do defeito ósseo (LDO); Linha amarela delimitando área do defeito ósseo analisado; áreas verdes delimitando locais de neoformação óssea no interior do defeito. Aumento de 40X. Porto Alegre, 2009.

## 5.2 Análise Bioquímica

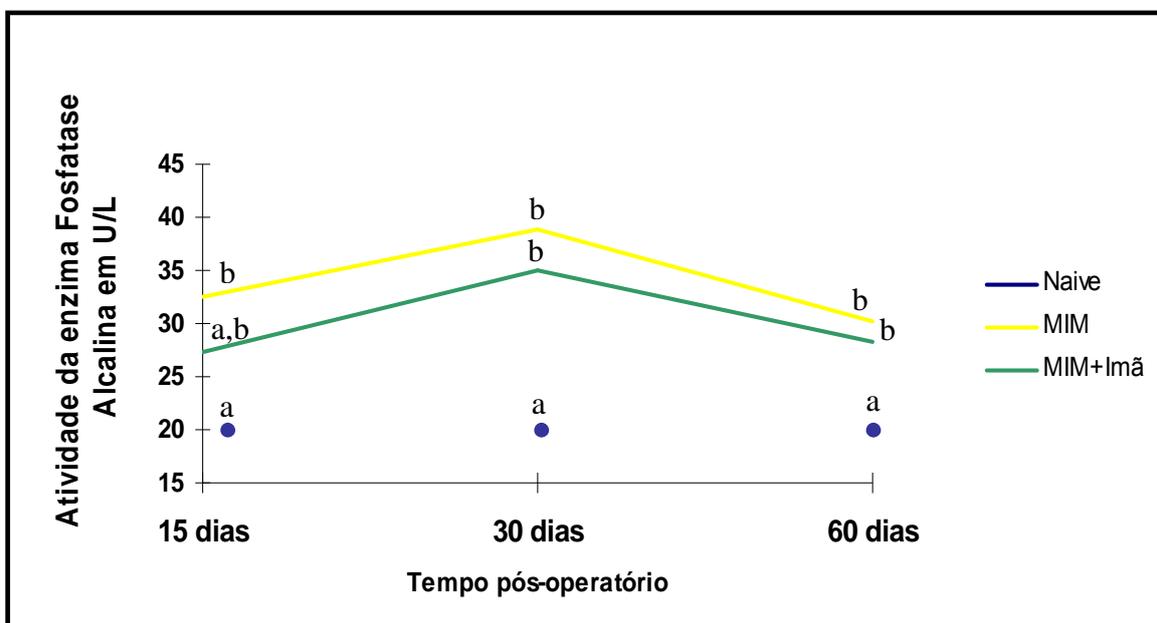
A análise bioquímica evidenciou diferença estatística significativa do grupo Naive ( $20,02 \pm 1,87$ ) em relação aos grupos de 30 dias com enxerto ósseo autólogo ( $35,01 \pm 1,44$ ;  $p < 0,05$ ), enxerto ósseo autólogo com

magnetismo ( $30,66 \pm 4,17$ ;  $p < 0,05$ ) e 60 dias pós-operatórios nos grupos com enxerto ósseo autógeno ( $25,99 \pm 3,92$ ;  $p < 0,05$ ) e enxerto ósseo autógeno com magnetismo ( $29,09 \pm 5,03$ ;  $p < 0,05$ ). Em 15 dias, apenas o grupo de enxerto ósseo autógeno sem magnetismo ( $27,65 \pm 4,22$ ;  $p < 0,05$ ) apresentou diferenças estatísticas significantes, enquanto que o grupo de enxerto ósseo autógeno com magnetismo de 15 dias ( $23,67 \pm 2,63$ ;  $p > 0,05$ ) apresentou atividade enzimática estatisticamente igual ao grupo Naive e também igual ao grupo de enxerto ósseo autógeno com magnetismo de 15 dias. Ainda, em 30 dias pós-operatórios, houve diferenças estatísticas significativas entre o grupo de enxerto ósseo autógeno com e sem imãs, sendo que o grupo que estava sob influência do campo magnético apresentou atividade enzimática estatisticamente menor que o enxerto ósseo autógeno sem imã, conforme ilustrado na figura 26.



**Figura 26.** Gráfico comparativo da atividade da enzima fosfatase alcalina entre os grupos Naive, enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo autógeno com magnetismo nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Significância estatística “a” # “b” # “c”; Anova,  $p < 0,05$ . Enxerto ósseo autógeno (EX). Porto Alegre, 2009.

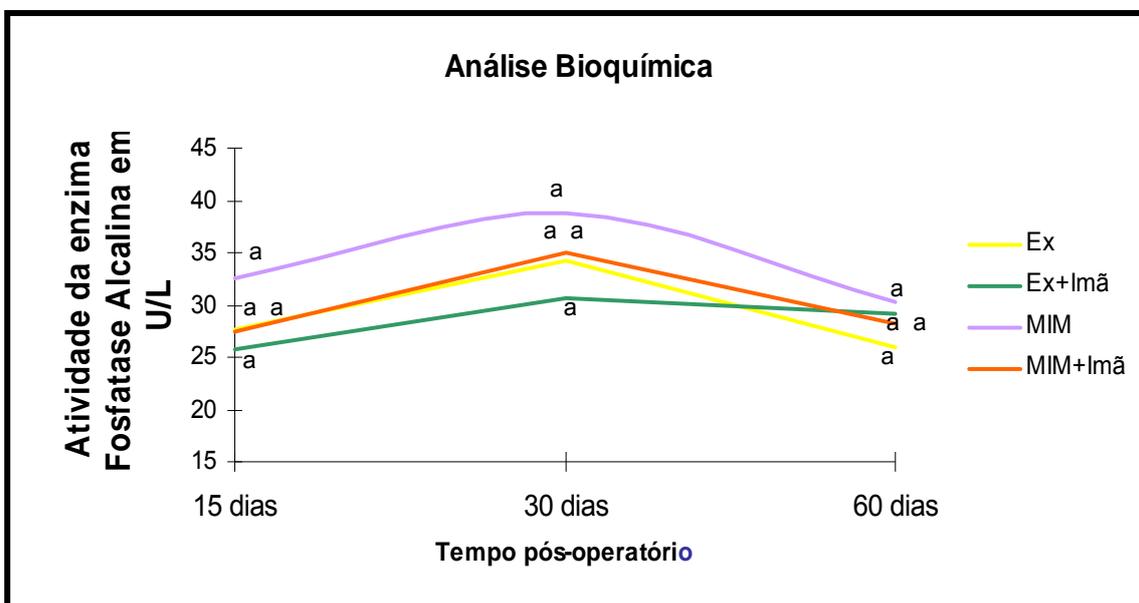
A comparação entre a atividade da fosfatase alcalina do grupo Naive ( $20,02 \pm 1,87$ ) com o grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética não apresentou diferença estatisticamente significativa no tempo de 15 dias pós-operatórios ( $27,36 \pm 5,2$ ,  $p > 0,05$ ). No tempo de 15 dias sem estimulação magnética ( $32,56 \pm 9,07$ ;  $p < 0,05$ ), 30 dias com imã ( $35,06 \pm 4,7$ ;  $p < 0,05$ ), 30 dias sem imã ( $38,77 \pm 10,65$ ), 60 dias sem magnetismo ( $30,28 \pm 5,66$ ,  $p < 0,05$ ) e 60 dias com imã ( $28,19 \pm 7,08$ ;  $p < 0,05$ ), houve diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo Naive, conforme figura 27.



**Figura 27.** Gráfico comparativo da atividade da enzima fosfatase alcalina entre os grupos Naive, implante de cimento de fosfato de cálcio e implante de cimento de fosfato de cálcio com magnetismo nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Significância estatística "a" # "b"; Anova,  $p < 0,05$ . Implante de cimento de fosfato de cálcio (MIM). Porto Alegre, 2009.

A comparação entre a atividade enzimática dos grupos com enxerto ósseo autógeno, com e sem estimulação magnética, e implantes de cimento de fosfato de cálcio, com e sem estimulação magnética, não apresentaram diferenças estatísticas nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatório entre o

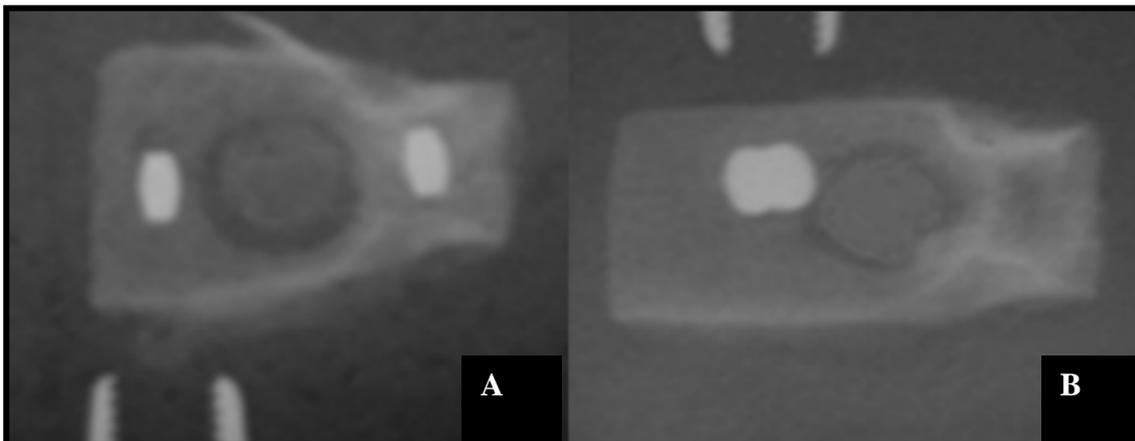
biomaterial e enxerto ósseo, tanto nos grupos com imã quanto nos grupos sem estimulação magnética (figura 28).



**Figura 28.** Gráfico comparativo da atividade da enzima fosfatase alcalina entre os grupos enxerto ósseo autólogo com e sem estimulação magnética e implante de cimento de fosfato de cálcio com e sem estimulação magnética nos tempos de 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Sem significância estatística "a" = "a"; Anova,  $p > 0,05$ . Enxerto ósseo autólogo (EX); Implante de cimento de fosfato de cálcio (MIM) Porto Alegre, 2009.

### 5.3 Análise Radiográfica

Por meio de tomadas radiográficas das peças obtidas após a morte dos animais, observou-se estabilidade do enxerto ósseo em todos os animais dos grupos estudados. Observou-se, também, o deslocamento dos ímãs em um animal do grupo de enxerto ósseo com magnetismo de 15 dias pós-operatórios (figura 26), sendo este excluído do estudo. Os demais ímãs encontravam-se estáveis conforme a figura 26.



**Figura 29.** Radiografias das peças removidas dos crânios dos ratos. A) Radiografia evidenciando estabilidade dos imãs; B) Radiografia evidenciando deslocamento dos imãs. Porto Alegre, 2009.

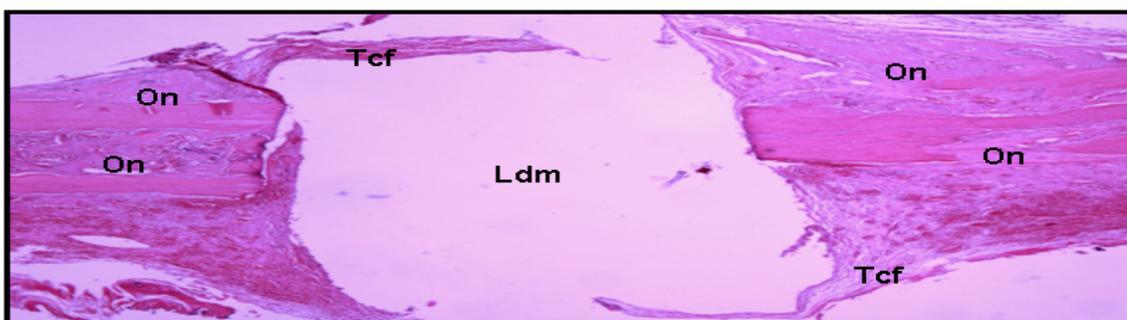
#### 5.4 Análise Histológica Descritiva

Os resultados encontrados na análise histológica descritiva seguem uma sequência que inicia pelas lojas ósseas dos imãs ou dispositivos metálicos, limite do defeito ósseo criado e enxerto ósseo autógeno ou implante de cimento de fosfato de cálcio, segue em direção a zona central do implante de cimento de fosfato de cálcio, avalia a presença de tecido ósseo neoformado, tecido de granulção e reações inflamatórias do tipo reação a corpo estranho. A descrição foi realizada em cada grupo experimental, seguindo a mesma lógica dos tempos experimentais: 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Em cada tempo, primeiramente há a descrição dos grupos de enxerto ósseo autógeno sem influência do campo magnético e sob estimulação magnética. Após há a descrição do grupo que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética e, por fim, os sob estimulação magnética.

#### 5.4.1 Grupos de 15 dias pós-operatório

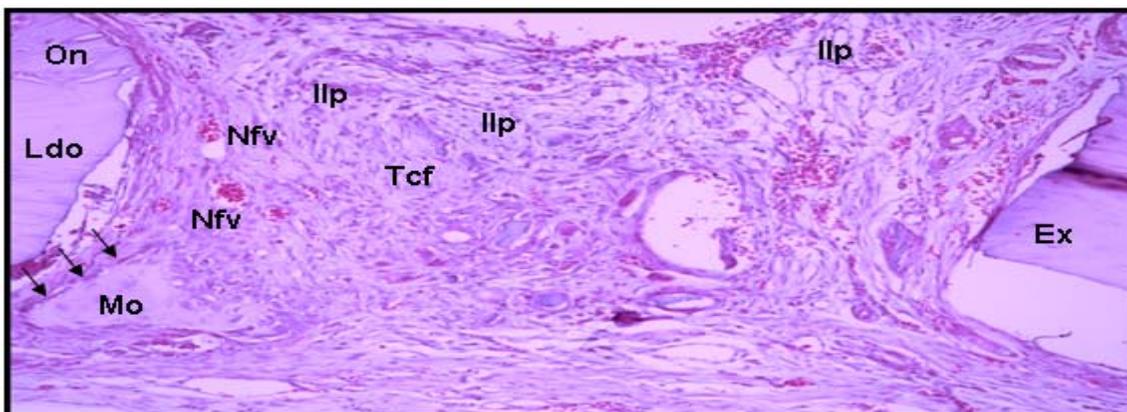
##### Grupo de enxerto osseo autógeno sem estimulação magnética:

A loja óssea do dispositivo metálico apresenta-se circundada por fina camada de tecido conjuntivo frouxo. Não se observam áreas com infiltrado linfoplasmocitário associado a essa região. Presença de tecido ósseo neorformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do dispositivo metálico e pequena quantidade de tecido ósseo formado de forma aposicional sobre a cortical externa da calota craniana do rato (figura 30).



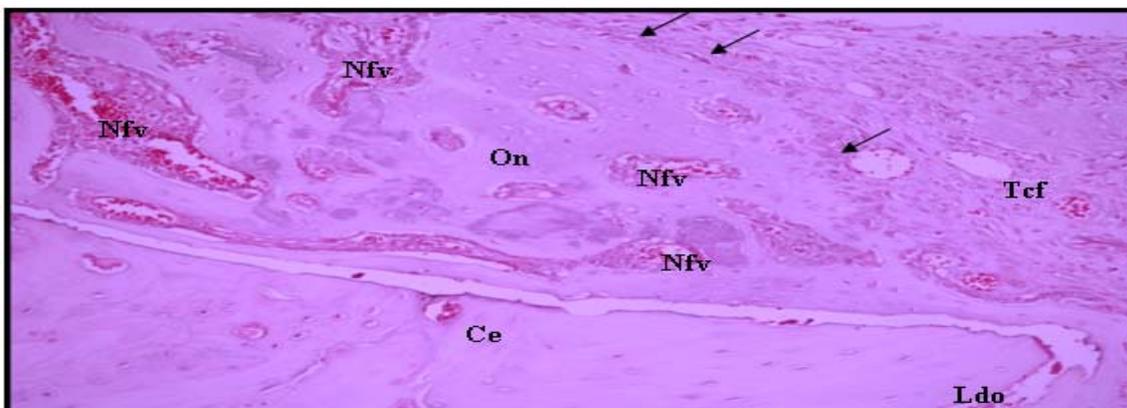
**Figura 30.** Imagem ilustrando loja óssea do dispositivo metálico. Grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neorformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

O espaço entre o limite do defeito ósseo e enxerto ósseo evidencia grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo, com intensa neformação vascular e infiltrado linfoplasmocitário no interior deste tecido. Presença de matriz osteóide com osteoblastos alinhados na sua extremidade provavelmente secretando essa matriz osteóide. Ausência de tecido ósseo neorformado a partir dos bordos do defeito e dos bordos do enxerto ósseo. Tecido ósseo neformado aposicionalmente junto a cortical externa crânio do rato na região dos bordos do defeito (figura 31).



**Figura 31.** Imagem ilustrando limites do enxerto ósseo autógeno e limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Matriz osteóide (Mo); Neoformação vascular (Nfv); Enxerto ósseo (Ex); Limite do defeito ósseo (LDO); Área com infiltrado linfoplasmocitário (Ilp); Setas evidenciando osteoblastos alinhados secretando matriz osteóide. Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

Tecido ósseo neoformado com intensa neoformação vascular formado aposicionalmente sobre a cortical externa do crânio do rato e com osteoblastos possivelmente secretando matriz osteóide (figura 32).



**Figura 32.** Imagem ilustrando formação óssea sobre a cortical externa do crânio rato na área do limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Cortical externa (Ce); Neoformação vascular (Nfv); Limite do defeito ósseo (LDO); Setas pretas evidenciando osteoblastos alinhados e secretando matriz osteóide. Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

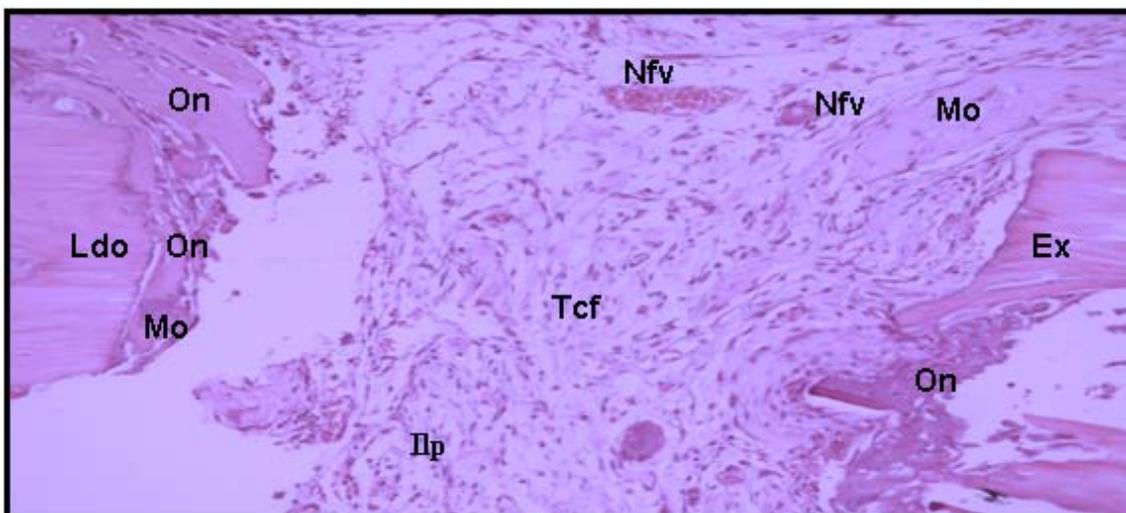
Grupo de enxerto osseo autógeno com estimulação magnética:

A loja óssea que continha o imã apresenta-se circundada por fina camada de tecido conjuntivo. Não se observam áreas com infiltrado linfoplasmocitário associado a essa região. Há tecido ósseo neoformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do imã e pequena quantidade de tecido ósseo formado de forma aposicional sobre a cortical externa da calota craniana do rato (figura 33).



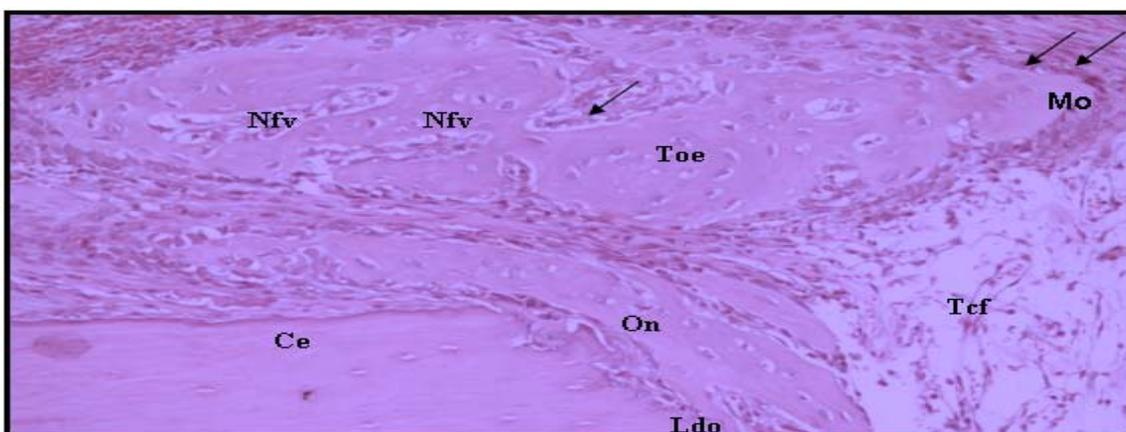
**Figura 33.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã. Grupo de enxerto ósseo autógeno de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do imã (Loi). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

O espaço entre o defeito ósseo e o enxerto ósseo evidenciam grande quantidade de tecido conjuntivo frouxo, com áreas de neformação vascular e infiltrado linfoplasmocitário no interior deste tecido. Presença de matriz osteóide na área do tecido conjuntivo, pequena quantidade de osso neoformado a partir dos bordos do defeito e bordos do enxerto ósseo autógeno. Tecido ósseo neoformado junto a cortical externa crânio do rato na região do limite do defeito ósseo e matriz osteóide formando-se sobre o enxerto ósseo (figura 34).



**Figura 34.** Imagem ilustrando espaço entre o enxerto ósseo autólogo e limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autólogo de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Matriz osteóide (Mo); Neoformação vascular (Nfv); Áreas com infiltrado linfoplasmocitário (Ilp); Enxerto ósseo (Ex); Limite do defeito ósseo (LDO). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

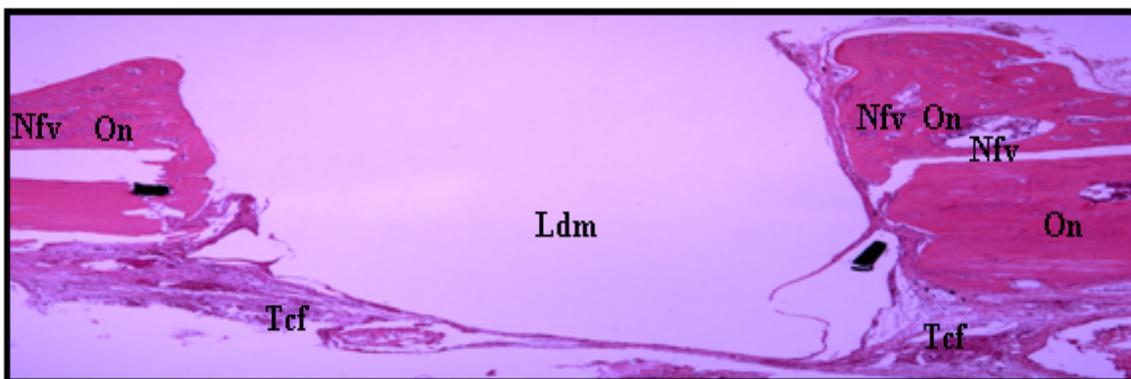
Tecido ósseo neoformado adjacente a cortical do crânio do rato com intensa neoformação vascular e grande quantidade de osteoblastos alinhados em sua periferia talvez secretando matriz óssea (figura 35).



**Figura 35.** Imagem ilustrando formação óssea ectópica (Toe) à cortical externa do crânio rato na área do limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autólogo de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Cortical externa (Ce); Neoformação vascular (Nfv); Limite do defeito ósseo (LDO); Setas pretas evidenciando osteoblastos alinhados e secretando matriz osteóide (Mo). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

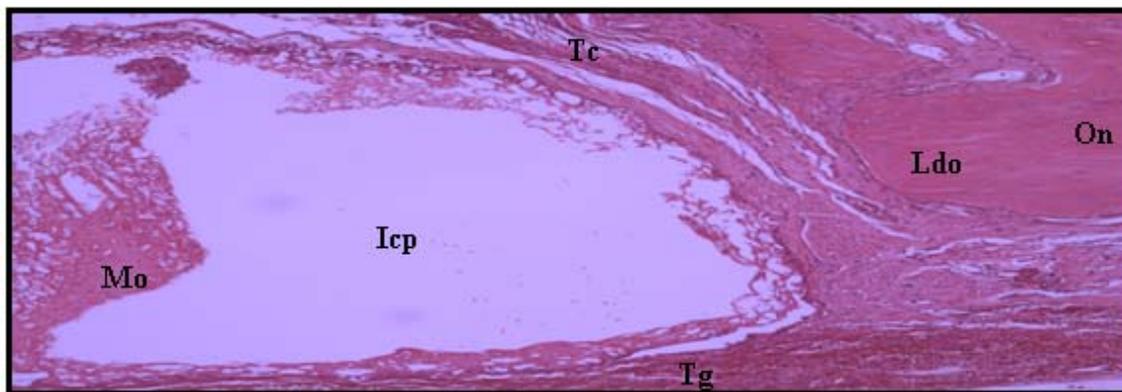
Grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética:

Observa-se a loja óssea do dispositivo metálico circundada por fina camada de tecido conjuntivo. Não se observa infiltrado linfoplasmocitário associado a essa região. Presença de pouco tecido ósseo neoformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do dispositivo metálico e grande quantidade de tecido ósseo neoformado aposicionalmente sobre a cortical externa da calota craniana do rato nos segmentos ósseos que limitam a loja do dispositivo metálico (figura 36).



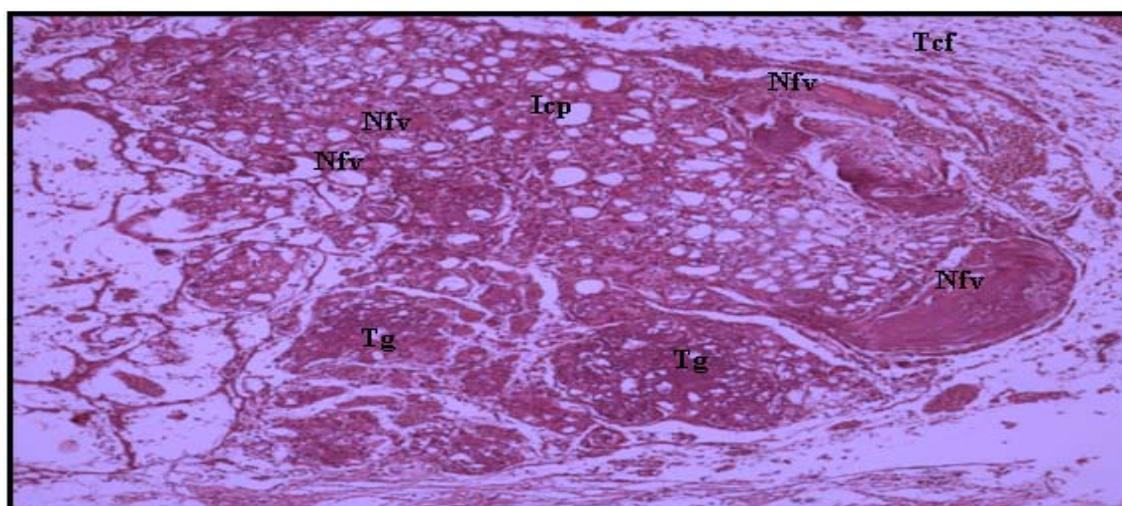
**Figura 36.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com 15 dias pós-operatórios sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

A área do limite entre tecido ósseo e implante de cimento de fosfato de cálcio evidencia áreas com tecido conjuntivo e áreas com tecido de granulção circundando o cimento de fosfato de cálcio implantado. Há pouca formação óssea estendendo-se em direção a região medular do tecido ósseo do limite do defeito ósseo. Há pequena formação de matriz osteóide em área que continha o biomaterial implantado, provavelmente formando-se por meio de osteocondução (figura 37).



**Figura 37.** Imagem ilustrando espaço entre o implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp) e limite do defeito ósseo no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio de 15 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Matriz osteóide (Mo); Limite do defeito ósseo (LDO); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

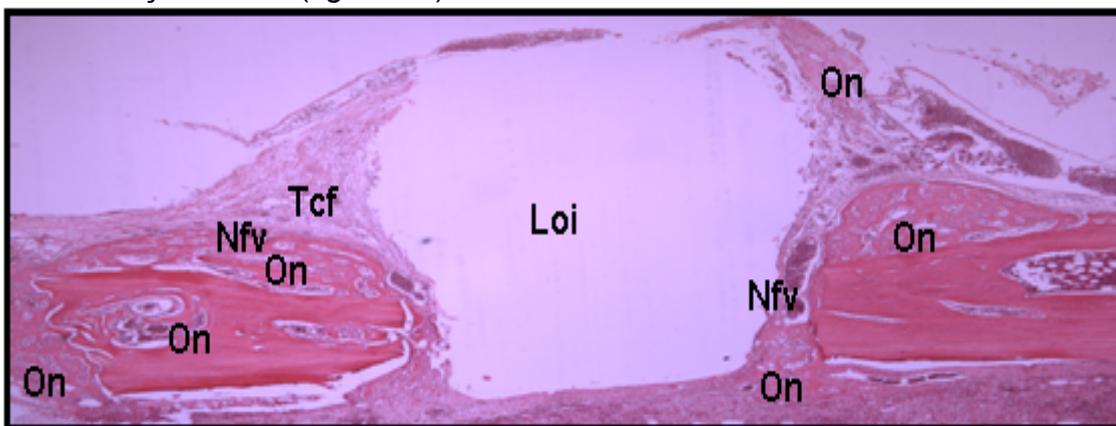
A área central do defeito ósseo preenchido com implante de cimento de fosfato de cálcio evidencia grande quantidade de tecido de granulação com neoformação vascular circundando os cristais do material. Não são observadas áreas de neoformação óssea (figura 38).



**Figura 38.** Imagem ilustrando área central do implante de cimento de fosfato de cálcio no grupo de 15 dias sem estimulação magnética. Implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp); Tecido de granulação (Tg); Neoformação vascular (Nfv). Áreas brancas da figura evidenciam material implantado. Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

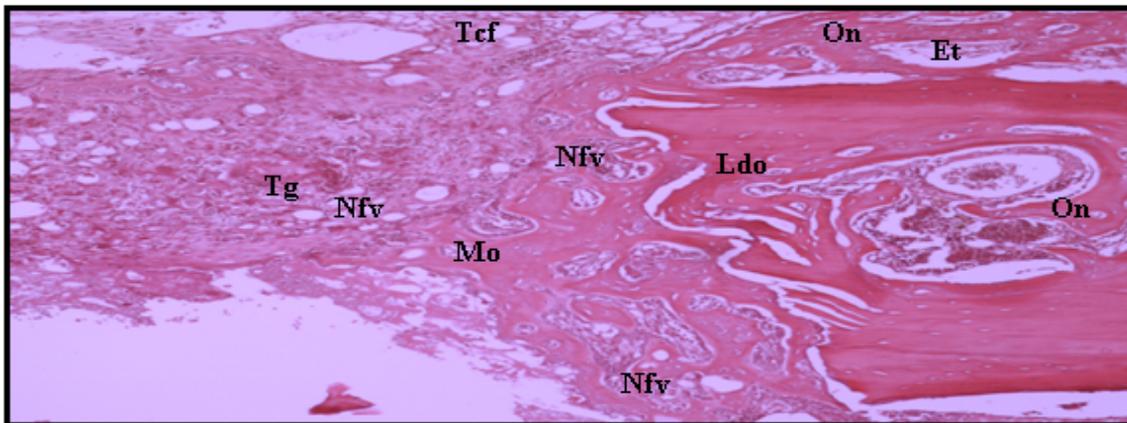
Grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética:

A loja óssea do imã apresenta-se circundada por fina camada de tecido conjuntivo. Não se observam áreas com infiltrado linfoplasmocutário nessa região. Presença de tecido ósseo neoformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do imã e grande quantidade de tecido ósseo neoformado sobre a cortical externa da calota craniana, formado aposicionalmente. Intensa neoformação vascular nas áreas de neoformação óssea (figura 39).



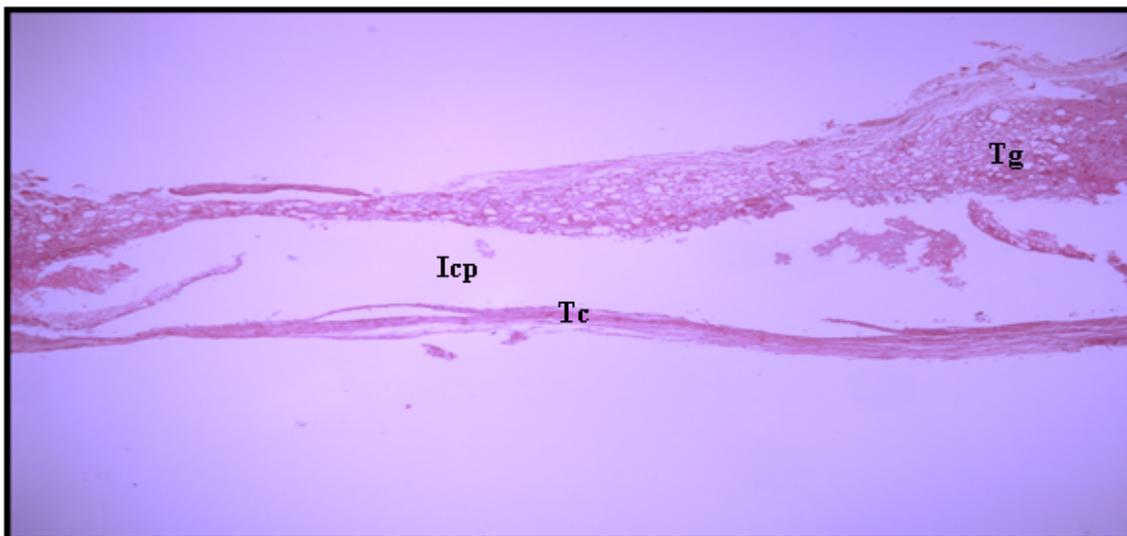
**Figura 39.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com 15 dias pós-operatório sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Loja óssea do imã (Loi); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

O espaço entre o limite do defeito ósseo e implante de cimento de fosfato de cálcio evidencia áreas com tecido conjuntivo, áreas com neoformação óssea e matriz osteóide caracterizando a osteocondução; todas ricamente vascularizadas. Observa-se ainda grande quantidade de tecido de granulação envolvendo o material implantando. Observa-se o extravasamento do material implantado para fora da área do defeito, estando esta área também envolvida por tecido ósseo neoformado (figura 40).



**Figura 40.** Imagem ilustrando limites do implante de cimento de fosfato de cálcio e limite do defeito ósseo no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio de 15 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Matriz osteóide (Mo); neoformação vascular (Nfv); Enxerto ósseo (Ex); Áreas com extravasamento do material implantado (Et); Limite do defeito ósseo (LDO). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

A área central do defeito ósseo preenchido com implante de cimento de fosfato de cálcio circunscrito por tecido conjuntivo e pequena quantidade de tecido de granulação (figura 41).



**Figura 41.** Imagem ilustrando área central do implante de cimento de fosfato de cálcio no grupo de 15 dias com estimulação magnética. Implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp); Tecido de granulação (Tg); Tecido conjuntivo (Tc). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

#### 5.4.2 Grupos de 30 dias pós-operatório

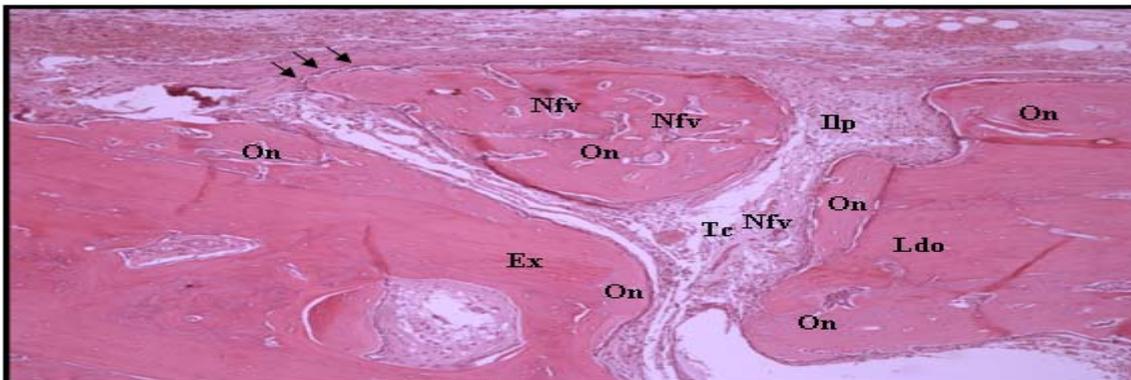
##### Grupo de enxerto osseo autógeno sem estimulação magnética:

A loja óssea que continha o dispositivo metálico está circundada por camada de tecido conjuntivo. Não se observam áreas com infiltrado linfoplasmocitário associado a essa região. Presença de tecido ósseo neoformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do dispositivo metálico e pequena quantidade de tecido ósseo formado de forma aposicional sobre a cortical externa da calota craniana do rato (figura 42).



**Figura 42.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

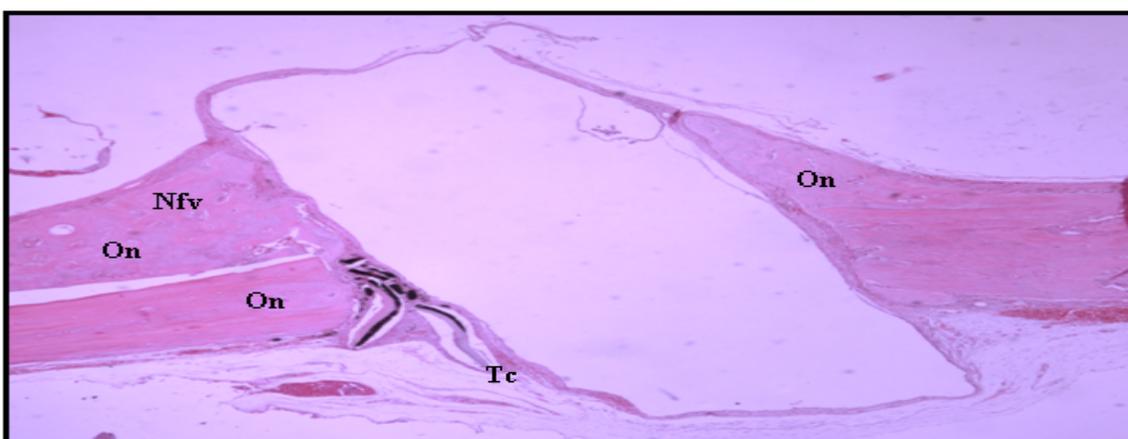
O espaço entre o limite do defeito ósseo e o enxerto ósseo evidencia tecido conjuntivo frouxo, neoformação vascular no interior deste tecido e no interior do tecido ósseo neoformado a partir dos bordos do defeito e enxerto ósseo. Há formação óssea aposicional a partir da cortical externa do crânio do rato e áreas com infiltrado linfoplasmocitário (figura 43).



**Figura 43.** Imagem ilustrando espaço entre o enxerto ósseo autógeno e o limite do defeito ósseo no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias sem estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo(Tc); Neoformação vascular (Nfv); Enxerto ósseo (Ex); Limite do defeito ósseo (LDO); Área com infiltrado linfoplasmocitário (Iip); Setas evidenciando osteoblastos alinhados e secretando matriz óssea. Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

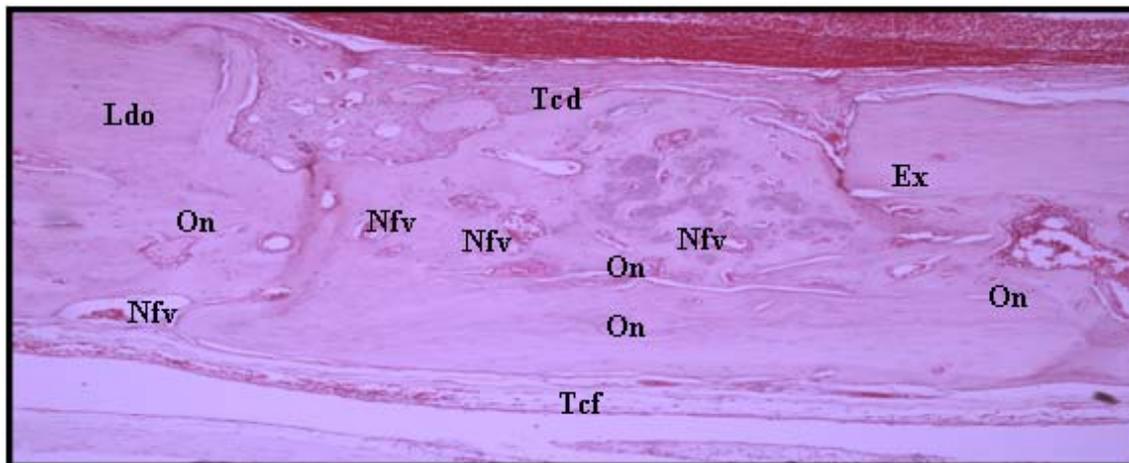
*Grupo de enxerto osseo autógeno com estimulação magnética:*

Observa-se loja óssea que continha o imã circundada por camada de tecido conjuntivo. Não se observam áreas com infiltrado linfoplasmocitário nessa região. Presença de tecido ósseo neoformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do imã e tecido ósseo novo formado aposicionalmente sobre a cortical externa da calota craniana (figura 44).



**Figura 44.** Imagem ilustrando loja óssea do imã grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Loja óssea que continha o imã (Loi); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

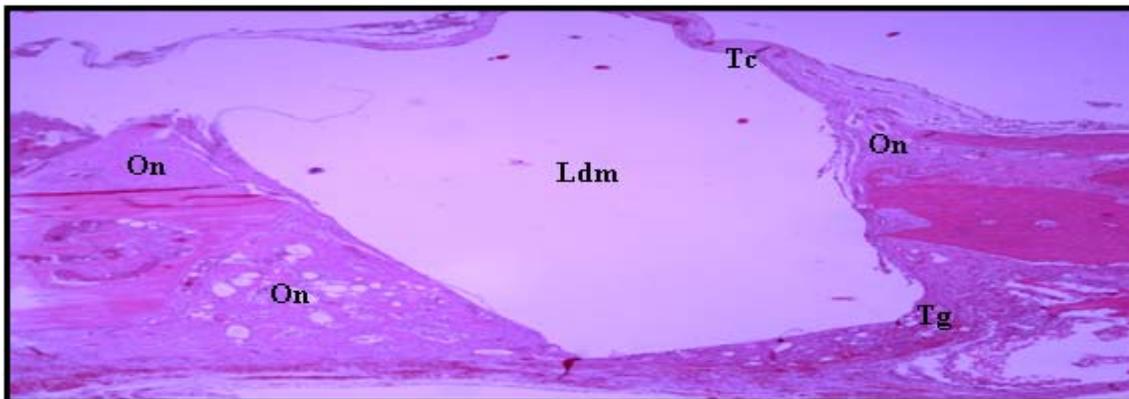
O espaço entre o limite do defeito ósseo e enxerto ósseo autógeno apresenta extensa formação de osso novo em direção ao enxerto ósseo e do enxerto em direção ao limite do defeito ósseo, promovendo a união destes segmentos e o fechamento do defeito ósseo cirurgicamente criado. O tecido ósseo neoformado nessa área apresenta rica neoformação vascular (figura 45).



**Figura 45.** Imagem ilustrando espaço entre o limite do defeito ósseo (LDO) e enxerto ósseo autógeno (Ex) no grupo de enxerto ósseo autógeno de 30 dias sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Neoformação vascular (Nfv); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Tecido conjuntivo denso (Tcd). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

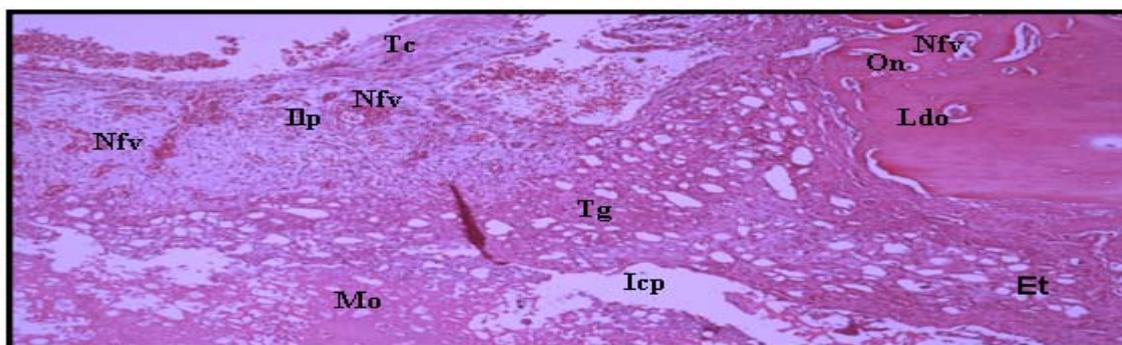
Grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética:

Observa-se loja óssea do dispositivo metálico circundada por camada de tecido conjuntivo. Não se observam áreas com infiltrado linfoplasmocitário associado a essa região. Há presença de tecido ósseo neoformado em direção a região medular dos segmentos ósseos que limitam a loja do dispositivo metálico e tecido ósseo novo formado lateralmente ao dispositivo metálico. Presença de tecido de granulação sobre a superfície do dispositivo metálico (figura 46).



**Figura 46.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico de titânio no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estímulo magnético em 30 dias. Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm); Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

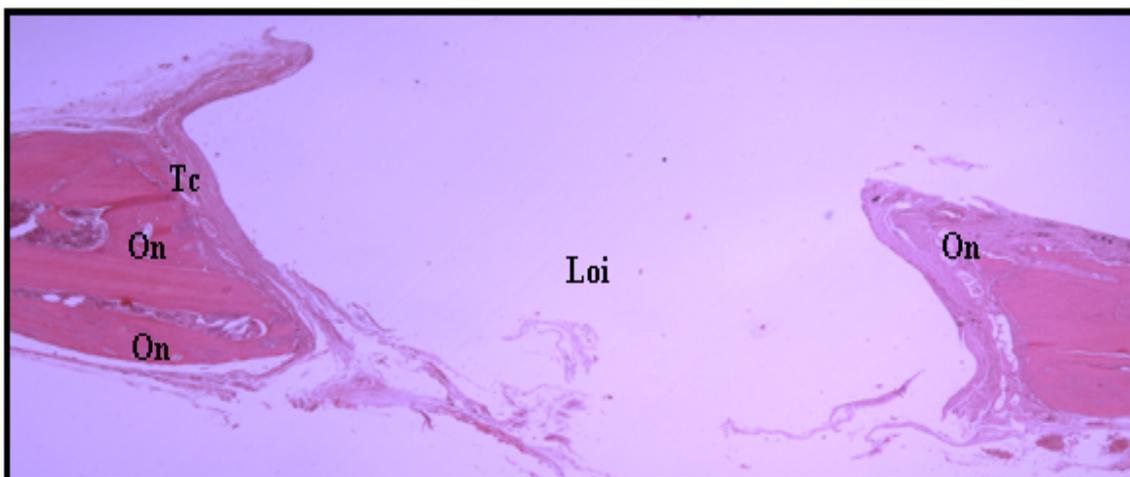
O espaço entre o limite do defeito ósseo e o implante de cimento de fosfato de cálcio apresentam formação óssea aposicional sobre a cortical externa do limite do defeito ósseo. Presença de grande quantidade de tecido de granulação envolvendo o material implantado e presença de matriz osteóide envolvendo o material implantado e áreas com tecido conjuntivo e infiltrado linfoplasmocitário. Observa-se também o extravasamento do material para o exterior do defeito ósseo (figura 47).



**Figura 47.** Imagem ilustrando espaço entre o limite do defeito ósseo (LDO) e implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp) no grupo de implantes de cimento de fosfato de cálcio sem estímulo magnético em 30 dias pós-operatórios. Tecido de granulação (Tg); Matriz osteóide (Mo); Tecido conjuntivo (Tc); Infiltrado linfoplasmocitário (Ilp); Neoformação vascular (Nfv); Osso neoformado (On); Áreas com extravasamento do material implantado para fora do defeito ósseo criado (Et). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

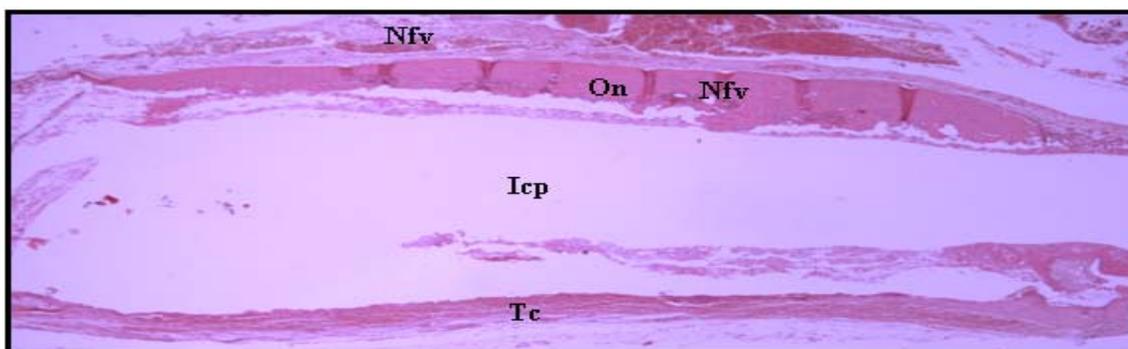
Grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética:

Observa-se a loja óssea do imã circundada por camada de tecido conjuntivo. Pouca formação de tecido ósseo novo sendo que este se encontra em direção à região medular e aposicionalmente à cortical externa dos limites da loja óssea do imã (figura 48).



**Figura 48.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã no grupo de animais que recebeu implante de cimento de fosfato cálcio com estimulação magnética no período pós-operatório de 30 dias. Loja óssea do imã (Loi); Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo. (Tc) Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

A área central do implante de cimento de fosfato de cálcio evidencia extensa formação oteoconduzida sobre o biomaterial implantado. Além disso, observa-se camada de tecido conjuntivo circunscrevendo o biomaterial (figura 49).

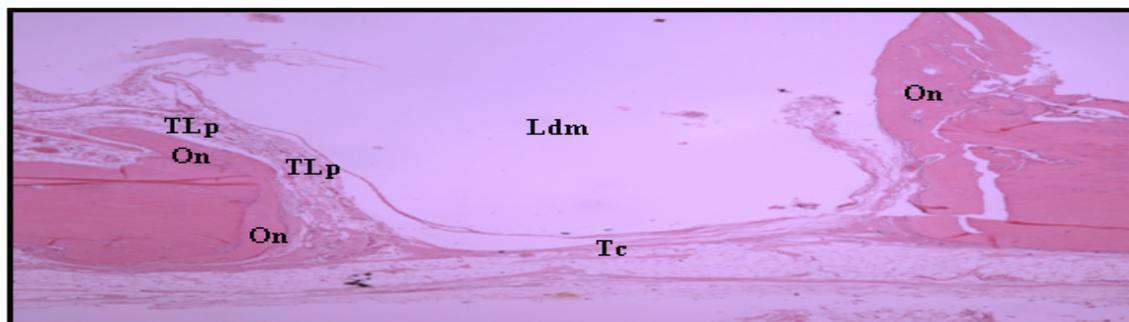


**Figura 49.** Imagem ilustrando zona central do implante de cimento de fosfato de cálcio no grupo que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética no período de 30 dias pós-operatórios. Área do implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp); Tecido ósseo neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Formação vascular (Nfv). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

### 5.4.3 Grupos de 60 dias pós-operatório

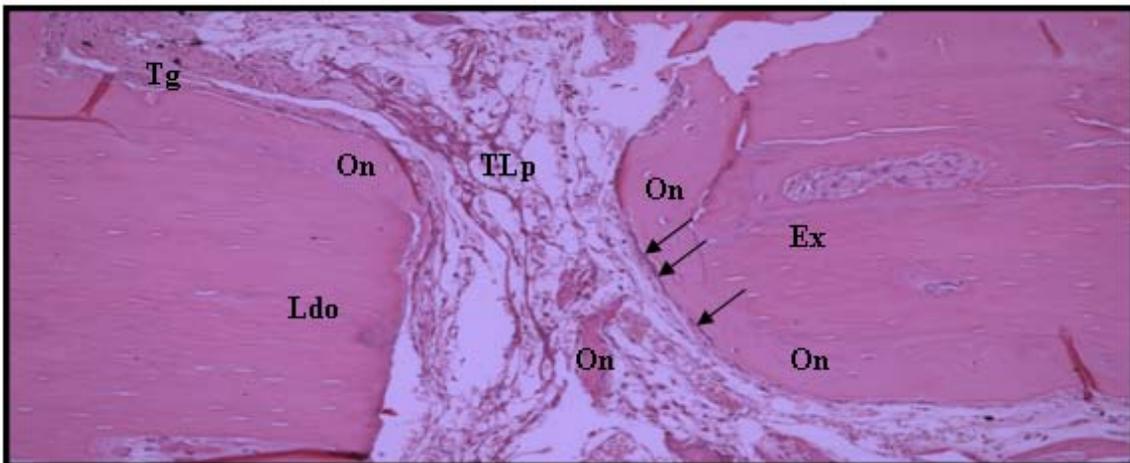
#### Grupo de enxerto ósseo autógeno sem estimulação magnética:

Tecido conjuntivo fibroso com infiltrado linfoplasmocitário circundando a loja óssea que continha o dispositivo metálico de titânio. Neoformação óssea nas paredes da loja do dispositivo metálico e presença de tecido ósseo formado na porção externa da cortical do crânio do rato (figura 50).



**Figura 50.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o dispositivo metálico no grupo que recebeu enxerto ósseo autógeno sem imã com 60 dias pós-operatórios. Loja óssea do dispositivo metálico (Ldm); Neoformação óssea (On); Tecido conjuntivo com infiltrado linfoplasmocitário (TLp); Tecido conjuntivo (Tc). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

Espaço entre o limite do defeito ósseo e o enxerto ósseo autógeno evidencia tecido conjuntivo frouxo com infiltrado linfoplasmocitário. Presença de áreas com neoformação vascular. Há, ainda, áreas de neoformação óssea a partir do bordo do enxerto ósseo formado aposicionalmente sobre a porção cortical externa do limite do defeito ósseo e sobre o enxerto ósseo. Observam-se a partir do mesmo enxerto osteoblastos alinhados e secretando matriz óssea (figura 51).



**Figura 51.** Imagem ilustrando espaço entre limite do defeito ósseo (LDO) e enxerto ósseo autógeno (Ex) no grupo de enxerto ósseo autógeno com 60 dias pós-operatórios sem estimulação magnética. Tecido conjuntivo com infiltrado linfoplasmocitário (TLp); Osso neoformado (On); Tecido de granulação (Tg); Setas sinalizando osteoblastos alinhados e secretando matriz óssea. Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

*Grupo de enxerto ósseo autógeno com estimulação magnética:*

Tecido conjuntivo circundando a loja óssea que continha o imã. Neoformação óssea nas paredes da loja do imã e estendendo-se em direção a porção medular destas paredes ósseas. Presença de tecido ósseo formado na porção externa da cortical do crânio do rato. Essas áreas com neoformação óssea apresentam expressiva quantidade de neoformação vascular (figura 52).



**Figura 52.** Imagem ilustrando cavidade que continha imã no grupo de enxerto ósseo autólogo de 30 dias pós-operatórios com estimulação magnética. Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc); Neoformação vascular (Nfv); Loja óssea do imã (Loi). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

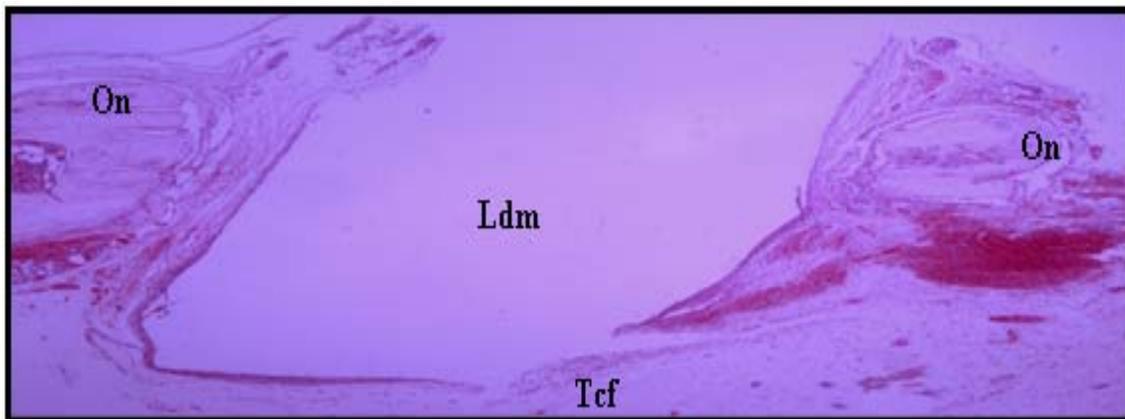
O espaço entre enxerto ósseo autólogo e o limite do defeito ósseo apresentou intensa neoformação óssea sendo esta ricamente vascularizada. Esta neoformação promoveu o fechamento do defeito ósseo como pode ser visto na figura 53. Observa-se também exuberante neoformação óssea estendendo-se para o interior da porção medular, tanto do enxerto ósseo quanto na porção óssea do limite do defeito ósseo (figura 53).



**Figura 53.** Imagem ilustrando espaço entre o enxerto ósseo autólogo (Ex) de 60 dias pós-operatórios e o limite do defeito ósseo (LDO) no grupo de enxerto ósseo autólogo com 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Setas pretas evidenciando limites do defeito ósseo; setas vermelhas evidenciando limites do enxerto ósseo autólogo; Neoformação vascular (Nfv); Tecido de granulação (Tg); Tecido conjuntivo com infiltrado linfoplasmocitário (Tlp). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

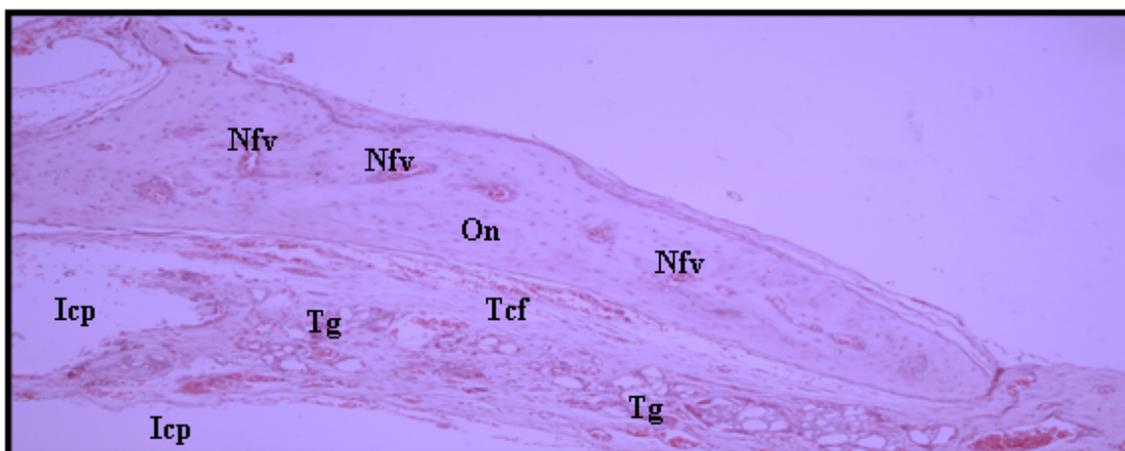
Grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética:

Tecido conjuntivo circundando a loja óssea que continha o dispositivo metálico. Neoformação óssea na porção externa da cortical do crânio do rato e em direção à porção medular das paredes ósseas que constituem a loja do dispositivo metálico de titânio (figura 54).



**Figura 54.** Imagem ilustrando loja óssea que continua o dispositivo metálico (Ldm) no grupo de 60 dias pós-operatórios que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética. Tecido conjuntivo fibroso (Tcf); Neoformação óssea (On). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

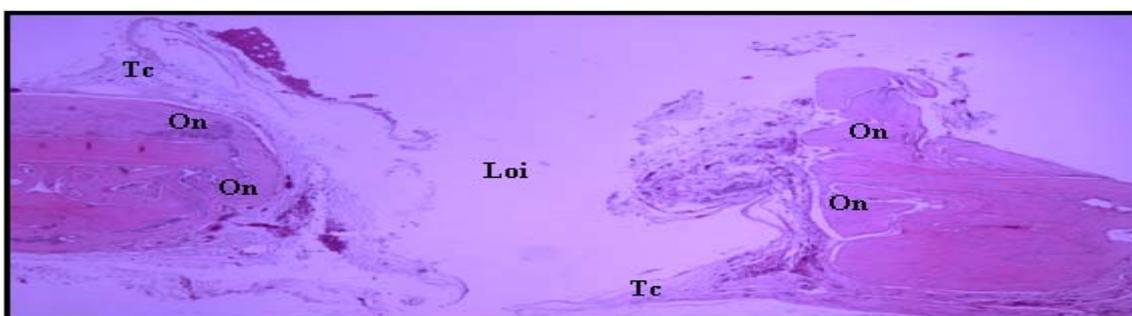
Área central do defeito ósseo que continha o implante cimento de fosfato de cálcio evidenciando exuberante neoformação óssea rica em neoformação vascular. Esta formação óssea se dá por meio de osteocondução a partir do material implantado (figura 55). Ainda na figura 55 se observam os cristais do biomaterial circundados por tecido conjuntivo frouxo ricamente vascularizado e ilhas de tecido de granulação.



**Figura 55.** Imagem ilustrando porção central do defeito ósseo preenchido com implante de cimento de fosfato (Icp) de cálcio no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio sem estimulação magnética em 60 dias pós-operatórios. Osso neoformado (On); Neoformação vascular (Nfv); Tecido conjuntivo frouxo (Tcf); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

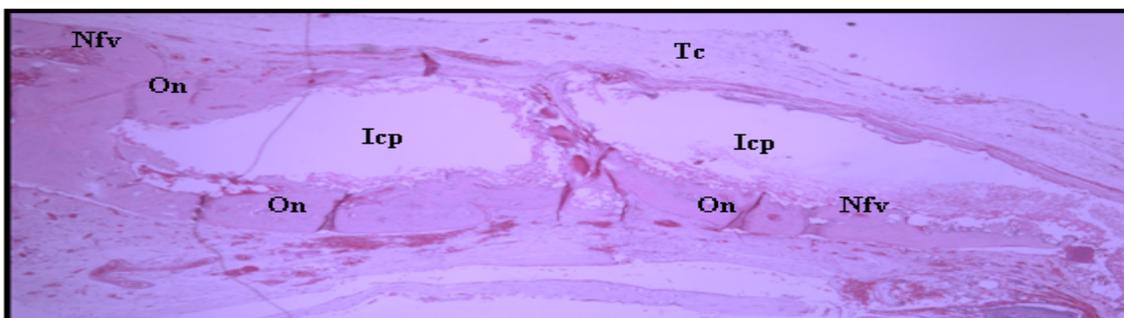
Grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética:

Tecido conjuntivo circundando a loja óssea que continha o imã. Neoformação óssea nas paredes desta loja óssea e na porção externa da cortical do crânio do rato e também em direção à porção medular das paredes ósseas que constituem a loja do imã, conforme pode ser visto na figura 56.



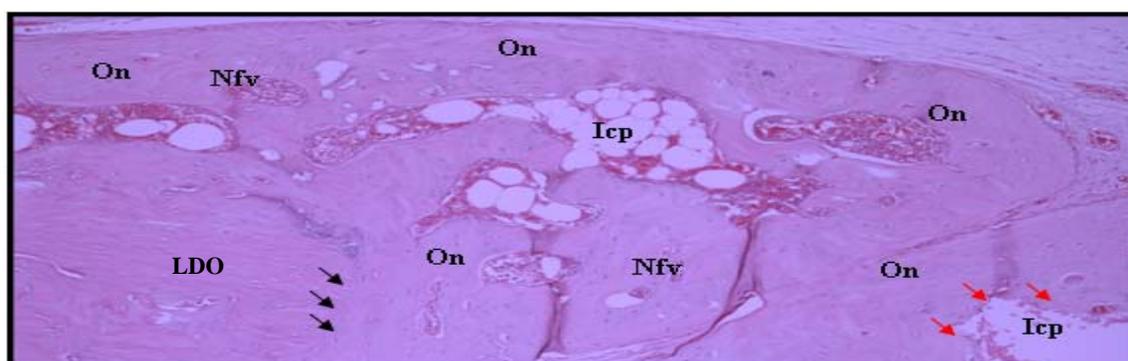
**Figura 56.** Imagem ilustrando loja óssea que continha o imã no grupo que recebeu implante de cimento de fosfato cálcio com estimulação magnética de 60 dias pós-operatórios. Loja óssea do imã (Loi); Osso neoformado (On); Tecido conjuntivo (Tc). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

A porção central do defeito ósseo (figura 57) evidencia grande formação de osso novo osteoconduzindo-se sobre o material implantado. Presença de tecido conjuntivo circundando o material implantado.



**Figura 57.** Imagem ilustrando porção central do defeito ósseo preenchido com implante de cimento de fosfato de cálcio (Icp) no grupo que recebeu implante de cimento de fosfato de cálcio com estimulação magnética em 60 dias pós-operatórios. Osso neoformado (On); Neoformação vascular (Nfv); Tecido conjuntivo (Tc); Tecido de granulação (Tg). Aumento de 40x. Porto Alegre, 2009.

O espaço entre o material implantado e o limite do defeito ósseo evidencia exuberante neoformação óssea que se estende do tecido ósseo do bordo do defeito e osteoconduz-se sobre o material implantado (figura 58)



**Figura 58.** Imagem ilustrando limite entre implante de cimento de fosfato de 60 dias pós-operatórios e limite do defeito ósseo (LDO) no grupo de implante de cimento de fosfato de cálcio com 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética. Osso neoformado (On); Setas pretas evidenciando limites do defeito ósseo; setas vermelhas evidenciando limites do biomaterial implantado (Icp); Neoformação vascular (Nfv). Aumento de 100x. Porto Alegre, 2009.

A análise descritiva evidenciou o fechamento total de dois defeitos ósseos no crânio dos ratos, sendo estes em animais pertencentes aos grupos de enxerto ósseo autógeno de 30 e 60 dias pós-operatórios sob influência de campo magnético. Não ocorreu fechamento completo de defeitos ósseos nos grupos de enxerto ósseo autógeno sem estimulação magnética e também não foi observado o fechamento de defeitos ósseos nos grupos que receberam implantes de cimento de fosfato de cálcio, tanto nos grupos com e sem estimulação magnética.

Em nenhum dos cortes histológicos analisados observou-se sinal de rejeição ao enxerto ósseo ou reações inflamatórias do tipo reação a corpo estranho ao cimento implantado.

A neoformação óssea foi mais evidente quanto maior o tempo pós-operatório de análise e, embora não se observaram diferenças no padrão ósseo entre os grupos com e sem estimulação magnética na análise histométrica transversal, a análise histométrica longitudinal evidenciou diferenças significativas na quantidade de tecido ósseo neoformado entre os tempos de 15 e 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética. Além disso, os cortes histológicos sugerem formação óssea mais exuberante e maior concentração de núcleos de angiogênese nos grupos sob estimulação magnética.

## 6. DISCUSSÃO

A Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, uma especialidade odontológica, dentro de sua área de atuação que é o complexo bucomaxilofacial, tem cada vez mais estudado biomateriais(Comuzzi, Ooms *et al.*, 2002; Del Real, Ooms *et al.*, 2003; Dos Santos, Carrodegua, Boschi e De Arruda, 2003; Zhang, Lin *et al.*, 2004; Corsetti, 2005; Greenberg e Schneider, 2005) e desenvolvido alternativas(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Aaron, Boyan *et al.*, 2004; Yue, Lu *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) que possam acelerar a reparação ou substituir o tecido ósseo quando lesado ou perdido.

Todos estes estudos têm sido realizados a fim de fornecer alternativas viáveis para a utilização não apenas do enxerto ósseo autógeno, que apesar de ser considerado o padrão ouro dentro das reconstruções ósseas bucomaxilofaciais possui algumas limitações, como maior morbidade pós-operatória e limitada quantidade óssea disponível(Nasr, Aichelmann-Reidy *et al.*, 1999).

Assim, a melhor forma de se estudar a interação entre os biomateriais e metodologias propostas para a estimulação de processos reparativos é *in vivo*, através da utilização de modelos animais. Estudos em coelhos(Haddad, Peel *et al.*, 2006; Ascherman, Foo *et al.*, 2008), ovelhas(Gosain, Riordan *et al.*, 2004; Sinikovic, Kramer *et al.*, 2007), porcos(Gosain, Song *et al.*, 2000), cabras(Comuzzi, Ooms *et al.*, 2002; Bodde, Cammaert *et al.*, 2007; Habibovic e De Groot, 2007) e ratos(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Yang *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) têm sido

realizados, com predileção por este último animal devido ao seu fácil manuseio, necessidade de reduzido espaço para acomodação, o que o torna um animal de experimentação com baixo custo e de primeira escolha(Fagundes e Taha, 2004).

Especificamente nos modelos experimentais que utilizam ratos, diversos são os sítios possíveis para realização de defeitos ósseos cirurgicamente criados com o intuito de permitir análises adequadas do reparo ósseo e da influência dos biomateriais e agentes estimulantes sobre o leito ósseo receptor. Defeitos ósseos em fêmures(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Corsetti, 2005; Vogelín, Jones *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009), em mandíbulas(Soccol, Bettega *et al.*, 2006), tíbias(Sharrard, 1990; Fredericks, Nepola *et al.*, 2000) e em calota craniana(Schmitz e Hollinger, 1986; Bosch, Melsen *et al.*, 1998; Ferreira, Cestari *et al.*, 2004; Marins, Cestari *et al.*, 2004; Da Silva, Bertran *et al.*, 2007; Ascherman, Foo *et al.*, 2008; Drosse, Volkmer *et al.*, 2008) são os mais usados. Neste trabalho, optou-se pela criação de defeito ósseo realizado no crânio do rato pela fácil acessibilidade. Entre o tecido ósseo e a pele há somente uma fina camada muscular e o perióstio. Em modelos que utilizam tíbia, fêmur e mandíbula, a camada muscular mais espessa exige maior divulsão tecidual, podendo aumentar a morbidade pós-operatória. Contudo, o principal motivo pela escolha da criação do defeito ósseo no crânio é a sua imobilidade que, ao contrário da mandíbula, fêmur e tíbia, torna-se menos suscetível a influência das atividades largamente realizadas pelos roedores: locomoção e mastigação. Isso diminuiu a possibilidade de deslocamento do material enxertado ou implantado,

minimizando também a probabilidade de fraturas no sítio operado e a exclusão do animal do estudo.

Estudos clássicos em calota craniana de ratos realizaram defeitos com dimensão de 8,0 mm de diâmetro nos ossos parietais, uma vez que este tamanho está intimamente relacionado ao conceito de “defeito ósseo de tamanho crítico”. Para que um defeito possa ser considerado crítico, com validade para posterior análise, durante toda a vida do animal este não deve sofrer reparação completa e espontânea, permitindo assim avaliar o real efeito de um biomaterial ou de um estímulo reparador sobre o leito ósseo receptor (Schmitz e Hollinger, 1986; Ferreira, Cestari *et al.*, 2004; Marins, Cestari *et al.*, 2004; De Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008). No entanto, os defeitos ósseos realizados neste trabalho experimental com diâmetro de 5,0 mm, relacionam-se a um conceito inovador de “defeito ósseo crítico”, a partir do qual, para que uma análise possa ser feita de forma adequada este não deve sofrer reparação completa e espontânea durante o período do estudo (Bosch, Melsen *et al.*, 1998; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), e não durante toda a vida do animal como o conceito clássico.

O conceito inovador de “defeito ósseo crítico” reduziu não apenas o tamanho do defeito ósseo, mas também permitiu que o acompanhamento longitudinal do estudo pudesse ser reduzido permitindo a obtenção de resultados a curto prazo. Outro aspecto positivo, é a redução do número de animais e diminuição da variação inter-animais, uma vez que devido a redução do tamanho do defeito ósseo, locais que antes comportavam apenas um defeito ósseo podem agora alojar dois (Bosch, Melsen *et al.*, 1998; Pryor,

Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006), permitindo que cada animal seja seu grupo teste e seu grupo controle.

Apesar do defeito ósseo desta dissertação ser de 5,0mm de diâmetro, o que permitiria a criação de defeitos ósseos teste e controle no mesmo animal, realizou-se apenas um em cada animal. Tal fato se deve pela utilização de campos magnéticos, os quais não se restringem somente a um defeito ósseo específico, mas atuam também nas adjacências, podendo interferir no defeito ósseo que seria usado como controle. Outro fato é que a escolha do sítio ósseo no crânio do rato para a realização da ostectomia, ao contrário dos estudos clássicos que preconizam ostectomias nos ossos parietais, foi realizada no centro do osso frontal. Evitam-se assim as suturas ósseas, ricas em células conjuntivas, que podem influenciar o processo de reparação óssea causando vieses e levando a uma interpretação equivocada dos resultados. Além disso, sua localização mediana ao complexo crânio-maxilar do rato permite a realização de ostectomias com menor probabilidade de lesionar estruturas vitais, como nervos e vasos, encontrados facilmente logo abaixo dos ossos parietais. Outro aspecto a ser considerado em relação à ostectomia no osso frontal é que este, por ser mais espesso que os ossos parietais diminui o risco de danos a dura-máter, amplamente vascularizada e intimamente relacionada ao processo de osteogênese(Bosch, Melsen *et al.*, 1998).

A utilização de ostectomias em modelos animais, mais especificamente na calota craniana de ratos, representam modelos adequados para o estudo sobre reparação óssea(Schmitz e Hollinger, 1986; Bosch, Melsen *et al.*, 1998; Gosain, Song *et al.*, 2000), permitindo que diversos

biomateriais e formas de estimulação possam ser testados com o propósito de se restabelecer estruturas perdidas e acelerar os processos reparativos do tecido ósseo. Dentre estas alternativas estão os cimentos à base de fosfato de cálcio(Albee, 1920; Piesold, Merwald *et al.*, 2004; Tadic e Epple, 2004; Carey, Xu *et al.*, 2005) e o uso de campos magnéticos(Yan, Tomita *et al.*, 1998; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Os estudos envolvendo biomateriais à base de cimento de fosfato de cálcio mostram uma diversidade muito grande em relação a estes materiais. Estas diferenças estão principalmente relacionadas à sua estrutura química, física e apresentação comercial(Dos Santos, De Oliveria *et al.*, 1999; Comuzzi, Ooms *et al.*, 2002; Dos Santos, Carrodegua, Boschi e De Arruda, 2003; Dos Santos, Carrodegua, Boschi e Fonseca De Arruda, 2003; Carey, Xu *et al.*, 2005). Apesar da diversidade, todos buscam o mesmo propósito: tornar as características dos materiais a base de cimento de fosfato cálcio mais próximas à do tecido ósseo autógeno no que tange às cirurgias reconstrutivas e reparativas.

O objetivo comum às diferentes formas e apresentações dos cimentos à base de fosfato de cálcio, que é torná-lo um substituto ósseo, pôde ser constatado neste trabalho, uma vez que a análise histométrica não evidenciou diferenças estatísticas significativas em relação à quantidade de tecido ósseo neoformado entre os implantes de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) e o enxerto ósseo autógeno.

O tecido ósseo é um tecido com alta resistência à tração e a tensão. Possui células osteoprogenitoras, sendo capaz de induzir a osteogênese e osteointegrar-se ao leito ósseo hospedeiro nos processos de enxertia óssea.

Estas características o tornam padrão ouro nos processos reconstrutivos e reparativos(Le Guehenec, Layrolle *et al.*, 2004).

Os biomateriais, para serem substitutos ósseos devem apresentar como pré-requisitos a manutenção da forma, a resistência a fraturas, adesão e proliferação celular e a capacidade de indução de células com fenótipo osteoprogenitor(Hench, 1998; Pou, 2003; Greenberg e Schneider, 2005). À exceção da resistência e osteoindução, aqui não avaliadas, o cimento de fosfato de cálcio implantado no crânio dos ratos contemplou os demais pré-requisitos mantendo sua forma ao longo do estudo, permitiu a colonização e proliferação celular, através da osteocondução observada na análise histológica descritiva e histométrica deste trabalho.

A análise histológica descritiva não demonstrou reações inflamatórias do tipo reação a corpo estranho a este material em qualquer um dos grupos e tempos pós-operatórios estudados, ressaltando a biocompatibilidade do biomaterial, que também é amplamente evidenciada na literatura científica(Hotz e Herr, 1994; Habibovic, Sees *et al.*, 2006; Habibovic e De Groot, 2007; Habibovic, Gbureck *et al.*, 2008). No tempo pós-operatório de 8 semanas, os implantes de cimento de fosfato de cálcio mantinham a forma, sem sinais de absorção, uma vez que esta se inicia entre 6 e 15 semanas após a implantação(Legeros, 1993). Assim, estudos longitudinais com tempo pós-operatório maior podem ser realizados com o intuito de observar o comportamento deste biomaterial em relação ao processo de absorção, influência sobre o leito receptor e sua relação com o padrão de neoformação óssea.

A igualdade estatística encontrada entre os grupos com implante de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno, na análise histométrica deste trabalho, apenas se refere à quantidade de tecido ósseo neoformado nos defeitos ósseos cirurgicamente criados na calota craniana do rato, não avaliando propriedades relacionadas à sua qualidade, constituição e concentração mineral como realizado em outros estudos(Yan, Tomita *et al.*, 1998).

A análise histológica pela histometria não evidenciou diferenças em relação a quantidade do tecido ósseo neoformado no processo ósseo de reparação entre os grupos submetidos a enxertia óssea autógena e a implantação de cimento de fosfato de cálcio, com e sem estimulação magnética, embora os grupos sob estimulação magnética, a partir da análise histológica descritiva, evidenciem maior neoformação óssea e maior quantidade de núcleos de angiogênese em relação aos grupos sem magnetismo. Isso mostra que, da mesma forma que o tecido ósseo, o cimento de fosfato de cálcio criou condições para que ocorresse a neoformação óssea em quantidades iguais ao padrão ouro. O padrão de formação óssea, no entanto, mostrou diferença em relação à osteogênese. Enquanto o osso neoformado nos grupos com enxerto ósseo projeta-se do bordo do defeito em direção ao enxerto e do enxerto em direção ao bordo do defeito, nos grupos com implantes de fosfato de cálcio a neoformação óssea ocorreu a partir do bordo do defeito em direção ao centro do defeito, por meio do fenômeno da osteocondução.

Os resultados estatisticamente iguais, entre enxerto ósseo autógeno e implantes de fosfato de cálcio, apesar de o tecido ósseo autógeno ser

considerado o padrão ouro, podem ser em função de que os biomateriais à base de cimento de fosfato de cálcio são capazes de induzir a formação de tecido ósseo quando implantados em organismos vivos em áreas ectópicas, isto é, em áreas que não possuem contato com tecidos relacionados à osteogênese (Habibovic, Sees *et al.*, 2006; Bodde, Cammaert *et al.*, 2007; Habibovic e De Groot, 2007). No entanto, a osteoindutividade do cimento de fosfato de cálcio não pôde ser avaliada neste trabalho uma vez que o material implantado estava em contato direto com um leito ósseo, sendo recoberto de um lado pelo periósteo e, de outro, pela dura-máter.

A osteoindução promovida pelos biomateriais à base de cimento de fosfato de cálcio é explicada, em parte, pela estrutura do cimento de fosfato de cálcio ser constituída por íons cálcio e fósforo, os mesmos íons que formam o tecido ósseo. Isto promove uma interação positiva deste biomaterial com o tecido ósseo hospedeiro (Kenny e Buggy, 2003). Ainda, a presença de micro e macro-poros em sua constituição, como pôde ser visto na metodologia deste trabalho, torna este biomaterial um local propício para os processos de colonização e proliferação celular. Enquanto os macro-poros relacionam-se a adesão e proliferação celular, os micro-poros transformam-se em uma rede nutricional que, através de canálculos, permite a passagem de líquidos corporais para nutrir às células que estão colonizando o biomaterial (Daculsi, Legeros *et al.*, 1990; Bodde, Cammaert *et al.*, 2007; Oprita, Moldovan *et al.*, 2008).

O principal motivo que justifica a quantidade de tecido ósseo neoformado no biomaterial Mimix<sup>TM</sup> ser estatisticamente igual à neoformação promovida pelo enxerto ósseo autógeno é que este biomaterial foi implantado

em um defeito ósseo realizado de forma bi-cortical preservando-se a integridade da dura-máter e sua cicatrização ocorreu em primeira intenção. Assim, o implante de cimento de fosfato de cálcio esteve recoberto pelo perióstio de um lado e, em contato direto com a dura-máter no outro lado. Tanto perióstio quanto dura-máter são tecidos relacionados ao processo de osteogênese (Wiese e Merten, 1993; Bosch, Melsen *et al.*, 1998), fato que pode ter permitido a colonização celular com intensa proliferação manifestada pela osteocondução observada neste trabalho. Estes fatores podem explicar a formação óssea neste material, igualando-o estatisticamente ao enxerto ósseo autógeno em termos de quantidade de osso neoformado na análise histométrica.

Apesar dos resultados deste estudo evidenciarem que os implantes de cimento Mimix™ se igualam estatisticamente ao padrão ouro, que é o enxerto ósseo autógeno, sua indicação clínica como substituto ósseo deve ser feita com cautela para a condição humana, uma vez que fatores como a realização do estudo ser em animais, o alto custo e baixa resistência do material limitam seu uso a casos com indicação precisa e adequadamente selecionados.

Com o entendimento da atividade celular envolvida no processo de reparação óssea, já no século XIX o eletromagnetismo foi utilizado como forma terapêutica coadjuvante no processo de remodelação óssea (Barker e Lunt, 1983). A partir de então, a busca por formas de acelerar o processo de reparo ósseo intensificou as pesquisas relacionadas ao uso do magnetismo e eletromagnetismo, desenvolvendo metodologias que avaliaram a estimulação eletromagnética em áreas de fraturas (Barker e Lunt, 1983; Bruce, Howlett *et*

*al.*, 1987; Midura, Ibiwoye *et al.*, 2005), estudaram a influência de campos magnéticos gerados por ímãs permanentes implantados sobre feridas cirúrgicas em tecido mole(Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007; Henry, Concannon *et al.*, 2008) e até mesmo o sepultamento de ímãs(Yan, Tomita *et al.*, 1998) e dispositivos metálicos imantados em fêmures de ratos(Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Os campos eletromagnéticos se constituem em campos magnéticos originados a partir de uma corrente elétrica. Este campo gerado está relacionado a um dispositivo responsável pela emissão de ondas magnéticas enquanto estiver conectado a uma fonte de energia, sendo, por tanto, um campo magnético não permanente e com fluxo magnético variável sobre o seu local de ação (Fredericks, Nepola *et al.*, 2000; Matsumoto, Ochi *et al.*, 2000; Midura, Ibiwoye *et al.*, 2005). A implantação de placas maleáveis de ímãs permanentes em tecido mole faz com que estas fiquem sujeitas a micro-movimentações em decorrência da movimentação do animal e, assim, cause variações no fluxo magnético que incide sobre o leito cirúrgico(Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007; Henry, Concannon *et al.*, 2008). Os dispositivos metálicos, por sua vez, adquirem a imantação por meio do contato direto com um ímã natural por determinado espaço de tempo. Sua imantação não é permanente, decrescendo gradativamente com o tempo até que se extinga. Esse decréscimo faz com que o campo magnético no local seja permanente até a completa extinção, mas o fluxo magnético que incide no defeito ósseo se torne decrescente e variável em intensidade ao longo do estudo(Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Todas estas metodologias descritas, apesar de empregarem diferentes formas de promover a estimulação magnética sobre o leito cirúrgico possuem como ponto comum a utilização de campos magnéticos com fluxo variável incidindo sobre a área de estudo. Esta pesquisa, por sua vez, utilizou ímãs naturais, com fluxo magnético permanente e constante. Estes ímãs, compostos por uma liga de neodímio, ferro e boro foram introduzidos sob pressão em lojas ósseas previamente confeccionadas no crânio dos ratos, mantendo-se estáveis, sem sofrer micro-movimentações durante todo o período estudado, fato que determina a presença de um campo magnético permanente e estático.

Neste estudo, a utilização de campo magnético permanente e estático, a partir da análise histométrica transversal, não evidenciou diferenças estatísticas significativas em relação ao percentual de osso neoformado entre os grupos de enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio, tanto nos grupos sem ímãs quanto nos grupos sob estimulação magnética. Outros trabalhos que também utilizaram campos magnéticos constantes encontraram resultados que, como os deste estudo, não evidenciaram benefícios da estimulação magnética sobre quantidade de osso neoformado (Yan, Tomita *et al.*, 1998). Contudo, a análise histométrica longitudinal evidenciou diferenças significativas na quantidade de tecido ósseo neoformado entre os tempos de 15 e 60 dias pós-operatórios sob estimulação magnética, o que corrobora os achados da histologia descritiva que evidencia neoformação óssea mais exuberante e maior presença de microcentros de angiogênese nos grupos sob estimulação magnética. Contudo, estes resultados devem ser comparados com cautela a outros resultados, uma vez

que as metodologias empregadas diferenciam-se em relação aos sítios ósseos e a forma de estimulação magnética(Matsumoto, Ochi *et al.*, 2000; Midura, Ibiwoye *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009). Os sítios ósseos estudados diferenciam-se por maior e menor concentração de tecido ósseo medular. A cavidade criada no fêmur ao contrário da criada na calota craniana oferece grande extensão de osso medular(Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009), ao contrário da pequena porção medular encontrada no osso frontal do rato.

Alguns estudos tentam clarear o entendimento sobre a forma de ação do campo magnético estudando o componente molecular envolvido no reparo ósseo. O aumento da concentração de fatores de crescimento no local onde o campo magnético está agindo é uma hipótese e, aparentemente, se dá em função do fluxo magnético causar alterações na membrana celular, modulando a sinalização trans-membrana e fazendo com que o tecido ósseo se forme mais rapidamente, justificando assim a formação óssea mais intensa em sítios sob estimulação magnética(Aaron, Boyan *et al.*, 2004; Icaro Cornaglia, Casasco *et al.*, 2006).

A literatura científica evidencia maior formação óssea em áreas sob estimulação magnética, contudo, diferente deste estudo, todos os demais utilizaram campos magnéticos com fluxo variável. Um dos poucos estudos com ímãs sepultados, com fluxo magnético permanente e constante, não encontrou evidências de que o campo magnético influenciasse o processo de neoformação óssea, questionando se o campo magnético estimularia a formação óssea ou inibiria processos de absorção deste tecido(Yan, Tomita *et al.*, 1998). A avaliação da influência do campo magnético sobre a atividade

mitocondrial não estabeleceu relação do campo magnético sobre variações na atividade desta organela(Ishisaka, Kanno *et al.*, 2000) e outros estudos ainda evidenciaram a redução da vascularização e redução da quantidade de íons cálcio no interior da célula quando os animais foram expostos de, forma crônica, a campos magnéticos.(Morris e Skalak, 2007)

De um lado resultados positivos da literatura científica evidenciando a estimulação da formação óssea por campos magnéticos que são variáveis(Barker e Lunt, 1983; Sharrard, 1990; Fredericks, Nepola *et al.*, 2000; Matsumoto, Ochi *et al.*, 2000; Midura, Ibiwoye *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) e, por outro, os resultados deste trabalho que não evidenciaram influência do campo magnético permanente e estático sobre o percentual de osso neoformado quando analisado pela histologia histométrica transversal. Este conflito de resultados leva ao questionamento sobre a diferença de estímulo celular gerado por campos magnéticos estáticos e por campos magnéticos variáveis. Assim, cria-se a hipótese de que as células com linhagem osteoprogenitoras poderiam ser estimuladas a produzir tecido ósseo quando submetidas a fluxos magnéticos variáveis, e, por isso, os resultados deste trabalho não evidenciaram diferenças entre os grupos sem imã e os grupos sob estimulação magnética em relação à análise histológica histométrica transversal. Porém, para que tal hipótese possa ser constatada, sugere-se a realização de outros estudos, utilizando a mesma metodologia para avaliação da neoformação óssea empregada neste trabalho, mas com análise comparativa do reparo ósseo sob estimulação magnética variável e sob estimulação magnética permanente e estática. Sugere-se ainda a realização de cortes histológicos não apenas sagitais como os realizados aqui, mas também

coronais e axiais, o que permitiria uma avaliação tridimensional da área do defeito ósseo.

A total compreensão da influência do campo magnético sobre o reparo ósseo não busca evidências apenas em parâmetros histológicos, mas parece influenciar a concentração de fatores de crescimento(Aaron, Boyan *et al.*, 2004; Icaro Cornaglia, Casasco *et al.*, 2006), a deposição de íons cálcio durante a ossificação(Yan, Tomita *et al.*, 1998) e ainda parece causar influência sobre a membrana plasmática(Icaro Cornaglia, Casasco *et al.*, 2006). Assim, mediadores de membrana, como a enzima fosfatase alcalina, conseqüentemente, poderiam ser influenciadas pelo fluxo magnético tendo sua atividade alterada, fato que justificou a realização de uma análise bioquímica neste trabalho.

Esta enzima está intimamente relacionada ao metabolismo ósseo e ao processo de secreção de matriz realizado pelos osteoblastos(Leung, Fung *et al.*, 1993; Ten Cate, 1998; Katchburian e Aranha, 2004), sendo por isso, considerada um marcador periférico do metabolismo ósseo(Roy, 1970; Saraiva e Castro, 2002; Molina, 2003a). Logo, cria-se a hipótese que alterações no metabolismo ósseo, como a reparação de defeitos ósseos, possam ser estadeadas a partir da mensuração da atividade desta enzima.

Os resultados deste estudo evidenciaram que a realização de um defeito crítico no crânio de ratos causa uma ativação desta enzima quando comparados aos resultados de valores da atividade fisiológica da enzima fosfatase alcalina obtidas no grupo NAIVE. A exceção do período experimental de 15 dias pós-operatórios com enxerto ósseo autógeno sob estimulação magnética que não teve atividade enzimática alterada, os demais grupos

evidenciaram diferenças estatísticas significativas em relação à atividade fisiológica.

Em 30 dias pós-operatórios, a atividade enzimática mostrou tendência a um pico. Contudo, nesse tempo experimental, somente a comparação entre os grupos de enxerto ósseo autógeno com e sem imã mostrou diferenças estatisticamente significativas, evidenciando maior atividade enzimática no grupo de enxerto ósseo autógeno sem estimulação magnética.

Esta enzima possui como cofatores (substâncias que podem ser necessárias para sua função) íons zinco e magnésio, e seu sítio ativo possui um ligante a base de manganês(Jedrzejcas, 2000). A partir da observação de que a atividade desta enzima está intimamente relacionada a três íons metálicos, especula-se, se a atividade da fosfatase alcalina reduzida nos grupos com imã, quando comparadas aos grupos sem estimulação magnética, poderia ser em função da ação do campo magnético sobre estes íons, o que causaria diminuição ou inibição da atividade desta enzima. Contudo, como alguns estudos sugerem, a ação do campo magnético parece estar relacionada a fatores com envolvimento em nível molecular e outras enzimas, como osteocalcina e osteopontina(Aaron, Boyan *et al.*, 2004; Icaro Cornaglia, Casasco *et al.*, 2006), o que limita a especulação sobre estas diferenças, uma vez que a metodologia empregada neste trabalho não permitiu avaliações com complexidade molecular.

Todos os resultados encontrados e discutidos neste estudo encorajam a realização de novas pesquisas envolvendo o magnetismo e os biomateriais.

## 7. CONCLUSÕES

A metodologia empregada na realização deste estudo permite concluir, a partir da análise histométrica, histológica descritiva e bioquímica, que:

- Não houve diferença no comportamento do reparo ósseo entre os grupos de enxerto ósseo autógeno e implantes de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) tanto nos grupos com imã quanto nos grupos sem estimulação magnética, no que se refere à quantidade de osso neoformado avaliado pela histologia histométrica;

- A análise histométrica longitudinal evidenciou diferenças significativas na quantidade de tecido ósseo neoformado entre os tempos de 15 e 60 dias pós-operatórios com enxerto ósseo autógeno sob estimulação magnética;

- A análise histológica descritiva evidencia maior presença de tecido ósseo neoformado e núcleos de angiogênese nos grupos submetidos a estimulação magnética;

- A mensuração da atividade sistêmica da enzima fosfatase alcalina foi mais expressiva no tempo pós-operatório de 30 dias. Nos demais tempos avaliados, não houve diferenças estatísticas entre os grupos com enxerto ósseo e implantes de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) em relação a atividade desta enzima;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>3</sup>

Aalami, O. O., R. P. Nacamuli, *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, Sep 1, p.713-20. 2004.

Aaron, R. K., B. D. Boyan, *et al.* Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. Clin Orthop Relat Res, n.419, Feb, p.30-7. 2004.

Albee, F. H. Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. Ann Surg, v.71, n.1, Jan, p.32-9. 1920.

Albrektsson, T. e C. Johansson. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. Eur Spine J, v.10 Suppl 2, Oct, p.S96-101. 2001.

Alves, H. L., L. A. Dos Santos, *et al.* Injectability evaluation of tricalcium phosphate bone cement. J Mater Sci Mater Med, v.19, n.5, May, p.2241-6. 2008.

Araújo, A. M., C. L. Simplício, *et al.* Estudos dos marcadores do tecido ósseo nos pacientes portadores de síndrome de Marfan. Rev Bras Ortop, v.38, n.8, p.473-479. 2003.

---

<sup>3</sup> ABNT

Ascherman, J. A., R. Foo, *et al.* Reconstruction of cranial bone defects using a quick-setting hydroxyapatite cement and absorbable plates. J Craniofac Surg, v.19, n.4, Jul, p.1131-5. 2008.

Barker, A. T. e M. J. Lunt. The effects of pulsed magnetic fields of the type used in the stimulation of bone fracture healing. Clin Phys Physiol Meas, v.4, n.1, Feb, p.1-27. 1983.

Bermudez, O., M. G. Boltong, *et al.* Chloride- and alkali-containing calcium phosphates as basic materials to prepare calcium phosphate cements. Biomaterials, v.15, n.12, Oct, p.1019-23. 1994.

Bodde, E. W., C. T. Cammaert, *et al.* Investigation as to the osteoinductivity of macroporous calcium phosphate cement in goats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, v.83, n.1, Oct, p.161-8. 2007.

Bohner, M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. Eur Spine J, v.10 Suppl 2, Oct, p.S114-21. 2001.

Bosch, C., B. Melsen, *et al.* Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. J Craniofac Surg, v.9, n.4, Jul, p.310-6. 1998.

Brandao, A. C., L. G. Brentegani, *et al.* Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. Braz Dent J, v.13, n.3, p.147-54. 2002.

Bruce, G. K., C. R. Howlett, *et al.* Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius. Preliminary results. Clin Orthop Relat Res, n.222, Sep, p.300-6. 1987.

Calafiori, A. R., G. Di Marco, *et al.* Preparation and characterization of calcium phosphate biomaterials. J Mater Sci Mater Med, v.18, n.12, Dec, p.2331-8. 2007.

Calixto, R. F., J. M. Teofilo, *et al.* Alveolar wound healing after implantation with a pool of commercially available bovine bone morphogenetic proteins (BMPs): a histometric study in rats. Braz Dent J, v.18, n.1, p.29-33. 2007.

Campos, L. M. A. Osteoporose na infância e na adolescência. J Pediatr, v.79, n.6, p.481-488. 2003.

Carey, L. E., H. H. Xu, *et al.* Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair. Biomaterials, v.26, n.24, Aug, p.5002-14. 2005.

Christenson, R. H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. Clin Biochem, v.30, n.8, Dec, p.573-93. 1997.

Comuzzi, L., E. Ooms, *et al.* Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goats. Clin Oral Implants Res, v.13, n.3, Jun, p.304-11. 2002.

Corsetti, A. Avaliação do reparo ósseo em fêmures de ratos após implantes de blocos de cimento de fosfato de cálcio e enxerto ósseo autógeno.

Departamento de Cirurgia e Ortopedia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005. 122 p.

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

Da Cunha, S. S., V. A. Sarmiento, *et al.* Efeitos da radioterapia no tecido ósseo. Radiol Bras, v.40, n.3, p.189-192. 2007.

Da Silva, R. V., C. A. Bertran, *et al.* Repair of cranial bone defects with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft. J Craniofac Surg, v.18, n.2, Mar, p.281-6. 2007.

Daculsi, G., R. Z. Legeros, *et al.* Scanning and transmission electron microscopy, and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. Osseo-coalescence versus osseo-integration. Scanning Microsc, v.4, n.2, Jun, p.309-14. 1990.

Daculsi, G., N. Passuti, *et al.* Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. J Biomed Mater Res, v.24, n.3, Mar, p.379-96. 1990.

De Oliveira, R. C., F. H. De Oliveira, *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, Aug, p.749-54. 2008.

Del Carlo, R. J., D. Kawata, *et al.* Polímero derivado da mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. Ciência Rural, v.33, n.6, p.1081-1083. 2003.

Del Real, R. P., E. Ooms, *et al.* In vivo bone response to porous calcium phosphate cement. J Biomed Mater Res A, v.65, n.1, Apr 1, p.30-6. 2003.

Dos Santos, L. A., R. G. Carrodeguas, *et al.* Dual-setting calcium phosphate cement modified with ammonium polyacrylate. Artif Organs, v.27, n.5, May, p.412-8. 2003.

\_\_\_\_\_. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone cement. J Biomed Mater Res A, v.65, n.2, May 1, p.244-50. 2003.

Dos Santos, L. A., L. C. De Oliveria, *et al.* Influence of polymeric additives on the mechanical properties of alpha-tricalcium phosphate cement. Bone, v.25, n.2 Suppl, Aug, p.99S-102S. 1999.

Drosse, I., E. Volkmer, *et al.* Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective. Tissue Eng Part C Methods, v.14, n.1, Mar, p.79-88. 2008.

Erdmann, D., K. E. Follmar, *et al.* A retrospective analysis of facial fracture etiologies. Ann Plast Surg, v.60, n.4, Apr, p.398-403. 2008.

Erdmann, D., K. Price, *et al.* A financial analysis of operative facial fracture management. Plast Reconstr Surg, v.121, n.4, Apr, p.1323-7. 2008.

Fagundes, D. J. e M. O. Taha. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. Acta Cir Bras, v.19, n.1, p.59-65. 2004.

Ferreira, G. R., T. M. Cestari, *et al.* Lack of repair of rat skull critical size defect treated with bovine morphometric protein bound to microgranular bioabsorbable hydroxyapatite. Braz Dent J, v.15, n.3, p.175-180. 2004.

Fini, M., G. Giavaresi, *et al.* A bone substitute composed of polymethylmethacrylate and alpha-tricalcium phosphate: results in terms of osteoblast function and bone tissue formation. Biomaterials, v.23, n.23, Dec, p.4523-31. 2002.

Fredericks, D. C., J. V. Nepola, *et al.* Effects of pulsed electromagnetic fields on bone healing in a rabbit tibial osteotomy model. J Orthop Trauma, v.14, n.2, Feb, p.93-100. 2000.

Furlaneto, F. A., M. J. Nagata, *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, Jun, p.311-8. 2007.

Giordano, V., I. G. Knacfuss, *et al.* Influência do laser de baixa energia no processo de consolidação de fratura de tíbia: estudo experimental em ratos. Rev. Bras Ortop, v.36, n.5, p.174-178. 2001.

Gisep, A., S. Kugler, *et al.* Mechanical characterisation of a bone defect model filled with ceramic cements. J Mater Sci Mater Med, v.15, n.10, Oct, p.1065-71. 2004.

Goebel, J. A. e A. Jacob. Use of Mimix hydroxyapatite bone cement for difficult ossicular reconstruction. Otolaryngol Head Neck Surg, v.132, n.5, May, p.727-34. 2005.

Gosain, A. K., P. A. Riordan, *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, Oct, p.1155-63; discussion 1164-5. 2004.

Gosain, A. K., L. Song, *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, Aug, p.360-71; discussion 372. 2000.

Greenberg, B. M. e S. J. Schneider. Alloplastic reconstruction of large cranio-orbital defects: a comparative evaluation. Ann Plast Surg, v.55, n.1, Jul, p.43-51; discussion 51. 2005.

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

Habibovic, P. e K. De Groot. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. J Tissue Eng Regen Med, v.1, n.1, Jan-Feb, p.25-32. 2007.

Habibovic, P., U. Gbureck, *et al.* Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. Biomaterials, v.29, n.7, Mar, p.944-53. 2008.

Habibovic, P., T. M. Sees, *et al.* Osteoinduction by biomaterials--physicochemical and structural influences. J Biomed Mater Res A, v.77, n.4, Jun 15, p.747-62. 2006.

Haddad, A. J., S. A. Peel, *et al.* Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. J Craniofac Surg, v.17, n.5, Sep, p.926-34. 2006.

Heini, P. F. e U. Berlemann. Bone substitutes in vertebroplasty. Eur Spine J, v.10 Suppl 2, Oct, p.S205-13. 2001.

Hench, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. Biomaterials, v.19, n.16, Aug, p.1419-23. 1998.

Henry, S. L., M. J. Concannon, *et al.* The effect of magnetic fields on wound healing: experimental study and review of the literature. Eplasty, v.8, p.e40. 2008.

Heymann, D., G. Pradal, *et al.* Cellular mechanisms of calcium phosphate ceramic degradation. Histol Histopathol, v.14, n.3, Jul, p.871-7. 1999.

Hotz, G. e G. Herr. Bone substitute with osteoinductive biomaterials--current and future clinical applications. Int J Oral Maxillofac Surg, v.23, n.6 Pt 2, Dec, p.413-7. 1994.

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

Ishisaka, R., T. Kanno, *et al.* Effects of a magnetic fields on the various functions of subcellular organelles and cells. Pathophysiology, v.7, n.2, Jul, p.149-152. 2000.

Jedrzejewski, M. J. Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. Prog Biophys Mol Biol, v.73, n.2-4, p.263-87. 2000.

Junqueira, L. C. e J. Carneiro. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1995

Katchburian, E. e V. Aranha. Histologia e Embriologia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004

Kawachi, E. Y., C. A. Bertran, *et al.* BIOCERÂMICAS: TENDÊNCIAS E PERSPECTIVAS DE UMA ÁREA INTERDISCIPLINAR. Química Nova, v.23, n.4, p.518-528. 2000.

Kenny, S. M. e M. Buggy. Bone cements and fillers: a review. J Mater Sci Mater Med, v.14, n.11, Nov, p.923-38. 2003.

Kotani, H., H. Kawaguchi, *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, Oct, p.1814-21. 2002.

Le Guehennec, L., P. Layrolle, *et al.* A review of bioceramics and fibrin sealant. Eur Cell Mater, v.8, p.1-10; discussion 10-1. 2004.

Legeros, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. Clin Mater, v.14, n.1, p.65-88. 1993.

Leung, K. S., K. P. Fung, *et al.* Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. J Bone Joint Surg Br, v.75, n.2, Mar, p.288-92. 1993.

Liang, G., Y. Yang, *et al.* Ectopic osteoinduction and early degradation of recombinant human bone morphogenetic protein-2-loaded porous beta-tricalcium phosphate in mice. Biomaterials, v.26, n.20, Jul, p.4265-71. 2005.

Mah, J., J. Hung, *et al.* The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. Eur J Orthod, v.26, n.5, Oct, p.475-82. 2004.

Mai, R., A. Reinstorf, *et al.* Histologic study of incorporation and resorption of a bone cement-collagen composite: an in vivo study in the minipig. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, v.105, n.3, Mar, p.e9-14. 2008.

Marins, L. V., T. M. Cestari, *et al.* Radiographic and histological study of perineal bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. . J appl Oral Sci, v.12, n.1, p.62-69. 2004.

Marzouk, K. M., A. Y. Gamal, *et al.* Osteoconductive effects of vinyl styrene microbeads in rat calvarial defects. J Oral Maxillofac Surg, v.65, n.8, Aug, p.1508-16. 2007.

Matsumoto, H., M. Ochi, *et al.* Pulsed electromagnetic fields promote bone formation around dental implants inserted into the femur of rabbits. Clin Oral Implants Res, v.11, n.4, Aug, p.354-60. 2000.

Messori, M. R., M. J. Nagata, *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, Apr, p.217-23. 2008.

Midura, R. J., M. O. Ibiwoye, *et al.* Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. J Orthop Res, v.23, n.5, Sep, p.1035-46. 2005.

Mokbel, N., C. Bou Serhal, *et al.* Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. Oral Maxillofac Surg, v.12, n.2, Jul, p.73-8. 2008.

Molina, F. C. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Rev Metab Óseo Min, v.1, n.3, p.91-98. 2003a.

\_\_\_\_\_. Marcadores bioquímicos de remodelado ósseo. Rev Metab Ósseo Min, v.1, n.3, p.91-98. 2003b.

Morris, C. E. e T. C. Skalak. Chronic static magnetic field exposure alters microvessel enlargement resulting from surgical intervention. J Appl Physiol, v.103, n.2, Aug, p.629-36. 2007.

Nasr, H. F., M. E. Aichelmann-Reidy, *et al.* Bone and bone substitutes. Periodontol 2000, v.19, Feb, p.74-86. 1999.

Nicolosi, J. G. e A. M. Moraes. Biomateriais destinados a terapia de queimaduras: estudo entre o custo e o potencial de efetividade de curativos avançados. VI Congresso de Engenharia Química e Iniciação Científica. Campinas. Acesso em 02 de Dezembro de 2008: Págnias 1-6 p. 2005.

Oda, H., K. Nakamura, *et al.* Clinical use of a newly developed calcium phosphate cement (XSB-671D). J Orthop Sci, v.11, n.2, Mar, p.167-74. 2006.

Oliveira, R. C., C. M. Sicca, *et al.* Avaliação histológica e bioquímica da resposta celular ao enxerto de osso cortical bovino previamente submetido a altas temperaturas. Efeito da temperatura no preparo do enxerto xenógeno. Rev Bras Ortop, v.38, n.9, p.551-560. 2003.

Oprita, E. I., L. Moldovan, *et al.* In vivo behavior of osteoblast cells seeded into COL/ $\beta$ -TCP composite scaffold. Cent Eur J Biol, v.3, n.1, p.31-37. 2008.

Peterson, L. J., E. Ellis I I I, *et al.* Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea. São Paulo: Elsevier. 2005

Piesold, J. U., M. Merwald, *et al.* [Rapid setting calcium phosphate cement for craniomaxillofacial surgery. 6 years experience]. Mund Kiefer Gesichtschir, v.8, n.1, Feb, p.5-11. 2004.

Pou, A. M. Update on new biomaterials and their use in reconstructive surgery. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, v.11, n.4, Aug, p.240-4. 2003.

Prado, F. A., A. L. Anbinder, *et al.* Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização de modelo experimental. Revista de Odontologia da Universidade da Cidade de São Paulo, v.18, n.1, p.7-13. 2006.

Pryor, M. E., G. Polimeni, *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, Sep, p.966-72. 2005.

Pryor, M. E., C. Susin, *et al.* Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. J Clin Periodontol, v.33, n.6, Jun, p.455-60. 2006.

Pryor, M. E., J. Yang, *et al.* Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: radiographic observations. J Periodontol, v.76, n.8, Aug, p.1287-92. 2005.

Puricelli, E., N. B. Dutra, *et al.* Histological evaluation of the influence of magnetic field application in autogenous bone grafts in rats. Head Face Med, v.5, p.1. 2009.

Puricelli, E., L. M. Ulbrich, *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.

Rijnen, W. H., J. W. Gardeniers, *et al.* Impacted bone and calcium phosphate cement for repair of femoral head defects: a pilot study. Clin Orthop Relat Res, v.459, Jun, p.216-21. 2007.

Roy, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. Clin Chem, v.16, n.5, May, p.431-6. 1970.

Saldanha, J. B., S. P. Pimentel, *et al.* Histologic evaluation of the effect of nicotine administration on bone regeneration. A study in dogs. Braz Oral Res, v.18, n.4, Oct-Dec, p.345-9. 2004.

Saraiva, G. L. e M. L. Castro. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. Arq Bras Endocrinol Metab, v.46, n.1, p.72-78. 2002.

Saunders, J. E. Alloplastic bone cements in otologic surgery: long-term follow-up and lessons learned. Otolaryngol Head Neck Surg, v.135, n.2, Aug, p.280-5. 2006.

Schmitz, J. P. e J. O. Hollinger. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res, n.205, Apr, p.299-308. 1986.

Seibel, J. M. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. Arg Bras Endocrinol Metab, v.50, n.4, p.603-620. 2006.

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, May, p.347-55. 1990.

Sinikovic, B., F. J. Kramer, *et al.* Reconstruction of orbital wall defects with calcium phosphate cement: clinical and histological findings in a sheep model. Int J Oral Maxillofac Surg, v.36, n.1, Jan, p.54-61. 2007.

Soccol, A. T., S. Bettega, *et al.* [Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa]. Braz J Otorhinolaryngol, v.72, n.2, Mar-Apr, p.195-9. 2006.

Spivak, J. M. e A. Hasharoni. Use of hydroxyapatite in spine surgery. Eur Spine J, v.10 Suppl 2, Oct, p.S197-204. 2001.

Susin, C. e C. K. Rösing. Praticando a Odontologia Baseda em Evidências. Canoas: Editora da Ulbra. 1999. 176 p.

Tadic, D. e M. Epple. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. Biomaterials, v.25, n.6, Mar, p.987-94. 2004.

Tanag, M. A., K. Yano, *et al.* Orbital floor reconstruction using calcium phosphate cement paste: an animal study. Plast Reconstr Surg, v.114, n.7, Dec, p.1826-31. 2004.

Ten Cate, R. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de janeiro: Guanabara Koogan. 1998

Valerio, P., M. M. Pereira, *et al.* The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. Biomaterials, v.25, n.15, Jul, p.2941-8. 2004.

Vehof, J. W., P. H. Spauwen, *et al.* Bone formation in calcium-phosphate-coated titanium mesh. Biomaterials, v.21, n.19, Oct, p.2003-9. 2000.

Vieira, J. G. H. Considerações sobre marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arq Bras Endocrinol Metab, v.43, n.6, p.415-522. 1999a.

\_\_\_\_\_. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arq Bras Endocrinol Metab, v.43, n.6, p.415-422. 1999b.

\_\_\_\_\_. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. J Bras Patol Med, v.43, n.2, p.75-82. 2007.

Vogelin, E., N. F. Jones, *et al.* Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. J Bone Joint Surg Am, v.87, n.6, Jun, p.1323-31. 2005.

Wiese, K. G. e H. A. Merten. The role of the periosteum in osteointegration of hydroxyapatite granules. Int J Oral Maxillofac Surg, v.22, n.5, Oct, p.306-8. 1993.

Xu, H. H., E. F. Burguera, *et al.* Strong, macroporous, and in situ-setting calcium phosphate cement-layered structures. Biomaterials, v.28, n.26, Sep, p.3786-96. 2007.

Yan, Q. C., N. Tomita, *et al.* Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. Med Eng Phys, v.20, n.6, Sep, p.397-402. 1998.

Yang, Z., H. Yuan, *et al.* Osteogenesis in extraskelentially implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals. Biomaterials, v.17, n.22, Nov, p.2131-7. 1996.

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

Zambuzzi, W. F., M. C. M. Neves, *et al.* Reação tecidual e perfil das fosfatases após o implante de matriz óssea desmineralizada xenogênica em músculo de ratos. Cienc Odontol Bras, v.8, n.2, p.90-98. 2005.

Zhang, Y., Y. Lin, *et al.* [Using platelet-rich plasma (PRP) to improve bone regeneration in implant bone defect]. Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, v.39, n.4, Jul, p.269-72. 2004.

## ANEXOS

### Anexo I – Lei de Proteção aos Animais

#### LEI Nº 11.915, DE 21 DE MAIO DE 2003.

*Institui o Código Estadual de Proteção aos Animais, no âmbito do Estado do*

*Rio Grande do Sul.*

O GOVERNADOR DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL.

Faço saber, em cumprimento ao disposto no artigo 82, inciso IV, da Constituição do Estado, que a Assembléia Legislativa aprovou e eu sanciono e promulgo a Lei seguinte:

#### TÍTULO I

##### CAPÍTULO I - Das Disposições Gerais

Art. 1º - Institui o “Código Estadual de Proteção aos Animais” estabelecendo normas para a proteção dos animais no Estado do Rio Grande do Sul, visando a compatibilizar o desenvolvimento sócioeconômico com a preservação ambiental.

Art. 2º - É vedado:

I - ofender ou agredir fisicamente os animais, sujeitando-os a qualquer tipo de experiência capaz de causar sofrimento ou dano, bem como as que criem condições inaceitáveis de existência;

II - manter animais em local completamente desprovido de asseio ou que lhes impeçam a movimentação, o descanso ou os privem de ar e luminosidade;

III - obrigar animais a trabalhos exorbitantes ou que ultrapassem sua força;

IV - não dar morte rápida e indolor a todo animal cujo extermínio seja necessário para consumo;

V - exercer a venda ambulante de animais para menores desacompanhados por responsável legal;

VI - enclausurar animais com outros que os molestem ou aterrorizem;

VII - sacrificar animais com venenos ou outros métodos não preconizados pela Organização Mundial da Saúde - OMS -, nos programas de profilaxia da raiva.

#### CAPÍTULO II

##### Dos Animais Silvestres

##### Seção I - Fauna Nativa

Art. 3º - Consideram-se espécies da fauna nativa do Estado do Rio Grande do Sul as que são originárias deste Estado e que vivam de forma selvagem, inclusive as que estão em migração, incluindo-se as espécies de peixes e animais marinhos da costa gaúcha.

Art. 4º - Os animais silvestres de qualquer espécie, em qualquer fase de seu desenvolvimento, bem como os seus ninhos, ovos e abrigos são considerados bens de interesse comum do Estado do Rio Grande do Sul, exercendo-se este direito respeitando os limites que a legislação estabelece.

##### Seção II - Fauna Exótica

Art. 5º - A fauna exótica compreende as espécies animais não originárias do Estado do Rio Grande do Sul que vivam em estado selvagem.

Art. 6º - Nenhuma espécie poderá ser introduzida no Estado do Rio Grande do Sul sem prévia autorização do órgão competente.

Art. 7º - Todo vendedor de animais pertencentes à fauna exótica deverá possuir certificado de origem e licença de importação fornecida pela autoridade responsável.

Parágrafo único - No caso de o vendedor ou possuidor não apresentar a licença de importação, será confiscado o animal e encaminhado à Fundação Zoobotânica deste Estado que tomará as providências necessárias.

##### Seção III - Da Pesca

Art. 8º - São de domínio público todos os animais e vegetação que se encontram nas águas dominiais.

Art. 9º - Toda alteração no regime dos cursos de água, devido a obras, implicará em medidas de proteção que serão orientadas e fiscalizadas por entidade estadual competente.

### CAPÍTULO III - Dos Animais Domésticos

#### Seção I - Dos Animais de Carga

Art. 10 - Será permitida a tração animal de veículos ou instrumentos agrícolas e industriais, somente pelas espécies bovinas, eqüinas e muares.

Art. 11 - É vedado:

- I - atrelar animais de diferentes espécies no mesmo veículo;
- II - utilizar animal cego, enfermo, extenuado ou desferrado em serviço, bem como castigá-lo;
- III - fazer viajar animal a pé por mais de 10 (Bermudez, Boltong *et al.*) quilômetros sem lhe dar descanso;
- IV - fazer o animal trabalhar por mais de 6 (seis) horas seguidas sem lhe dar água e alimento.

#### Seção II - Do Transporte de Animais

Art. 12 - Todo o veículo de transporte de animais deverá estar em condições de oferecer proteção e conforto adequado.

Art. 13 - É vedado:

- I - transportar em via terrestre por mais de 12 horas seguidas sem o devido descanso;
- II - transportar sem a documentação exigida por lei;
- III - transportar animal fraco, doente, ferido ou em adiantado estado de gestação, exceto para atendimento de urgência.

### CAPÍTULO IV - Dos Sistemas Intensivos de Economia Agropecuária

Art. 14 - Consideram-se sistemas intensivos de economia agropecuária os métodos cuja características seja a criação de animais em confinamento, usando para tal fim um alto grau de tecnologia que permita economia de espaço e trabalho e o rápido ganho de peso.

Art. 15 - Será passível de punição toda a empresa que utilizar o sistema intensivo de economia agropecuária que não cumprir os seguintes requisitos:

- I - os animais deverão receber água e alimento, atendendo-se, também, suas necessidades psicológicas, de acordo com a evolução da ciência, observadas as exigências peculiares de cada espécie;
- II - os animais devem ter liberdade de movimento de acordo com as suas características morfológicas e biológicas;
- III - as instalações devem atender às condições ambientais de higiene, circulação de ar e temperatura.

Parágrafo único - Não será permitida, em nenhuma hipótese, a engorda de aves, suínos e outros animais por processos mecânicos, químicos e outros métodos que sejam considerados cruéis.

### CAPÍTULO V - Do Abate de Animais

Art. 16 - Todo frigorífico, matadouro e abatedouro no Estado do Rio Grande do Sul tem a obrigatoriedade do uso de métodos científicos e modernos de insensibilização, aplicados antes da sangria, por instrumentos de percussão mecânica, processamento químico, elétrico ou decorrentes do desenvolvimento tecnológico.

Art. 17 - VETADO

## 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 II – Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG do  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre: Resolução  
Normativa 04/97**

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 tricafina, benzocaína e irradiação por microondas;

h) as técnicas aceitas, de forma condicional, são as seguintes: hipoxia por deslocamento cervical, 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.

**Anexo III – Aprovação do Projeto de Pesquisa pelo Comitê de Ética  
em Pesquisa**

 **UFRGS**  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

 **Faculdade de Odontologia**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**RESOLUÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

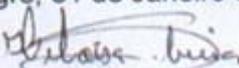
**Número: 259/08**

**Título: AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E BIOQUÍMICA DO REPARO ÓSSEO EM FÊMURES DE RATOS APÓS IMPLANTE DE CIMENTO DE FOSFATO DE CÁLCIO (MIMIX TM) SOB CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE.**

**Investigador(es) principal(ais): Edela Puricelli, Deise Ponzoni, CDs. Thiago Calcagnotto, Marcos Miguel B. Shwangber, Marcel Fasolo de Paris.**

O Projeto foi aprovado na reunião do dia 22/01/2008, Ata nº 01/08 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 31 de Janeiro de 2008.

  
Profª. Heloisa Emília Dias da Silveira  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas

  
Profª. Deise Ponzoni  
Coordenadora da Comissão de Pesquisas

## Anexo IV – Aprovação do Projeto por Banca Examinadora

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ATA DE DEFESA DE PROJETO DE DISSERTAÇÃO**

Aos **04 (quatro)** dias do mês de **Dezembro** de **2007**, na sala **401-A** da Faculdade de Odontologia da UFRGS, reuniu-se a comissão examinadora de projeto de dissertação composta pelos professores Doutores **Prof. Dr. Clóvis Milton Duval Wannmacher** e **Prof. Dr. João Batista Burzloff**, sob a presidência da professora Doutora **Edela Puricelli**, orientadora do candidato **Thiago Calcagnotto**, para avaliar o projeto intitulado **Avaliação histológica e bioquímica do reparo ósseo em fêmures de ratos após implantes de cimento de fosfato de cálcio (Mimix™) sob campo magnético permanente**.

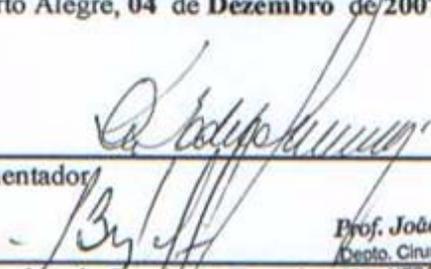
O candidato apresentou seu projeto, foi argüido pelos membros da banca, discutiu com a platéia e, ao final, a banca examinadora considerou o projeto

- ( **X** ) aprovado na íntegra  
(   ) aprovado com alterações  
(   ) reprovado.

Desta sessão, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo orientador e pelos membros da comissão de avaliação.

Porto Alegre, **04** de **Dezembro** de **2007**.

Orientador

  
Prof. João B. Burzloff  
Cento. Cirurgia e Ortopedia  
UFRGS - CRO 5260

Membro da Comissão Examinadora

Membro da Comissão Examinadora