

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

**REPARO ÓSSEO APÓS ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO E IMPLANTE DE
HIDROXIAPATITA ABSORVÍVEL GRANULADA SOB INFLUÊNCIA DE
CAMPO MAGNÉTICO ESTÁTICO: ESTUDO EXPERIMENTAL EM
CALVÁRIA DE RATOS**

AUTOR:

CD Marcos Miguel Bechstedt Schwengber

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Edela Puricelli

LINHA DE PESQUISA: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

PORTO ALEGRE

2009

Aos meus pais e modelos, Miguel e Elaine:

Pelo amor, pelo carinho e pelos valores a mim ensinados.

Por servirem de exemplos de vida, de união e de constante busca de objetivos.

Pela confiança em mim depositada durante todo meu crescimento, fazendo transparecer minhas qualidades.

Por SEMPRE apoiarem e incentivarem minhas escolhas.

Pelo incondicional estímulo durante todo meu desenvolvimento profissional.

Pela vida que tenho na companhia de meus amados irmãos e de toda nossa família.

Meus sinceros e eternos agradecimentos...

A vocês dedico este trabalho.

Ao meu irmão e melhor amigo Luiz Filipe, pela amizade eterna, pelo companheirismo, pela lealdade, pelo apoio e incentivo na profissão.

À minha irmã e melhor amiga Priscila, pelo carinho, por escutar e entender minhas ansiedades, pela tranquilidade no convívio, pelas constantes e renovadoras risadas.

Aos meus avós paternos, Octacilio (*in memoriam*) e Antonieta, pelos exemplos de superação, de amor e de união. Por me ensinarem a buscar os sentimentos e os valores mais nobres nas coisas mais simples da vida.

Aos meus avós maternos, Raul e Maria, por me acolherem, pela motivação e pela confiança em mim depositada.

À minha tia Élide Denise, pelo incentivo profissional, pelo carinho especial e pelo constante bom humor.

À minha cunhada Cinara e à família Laux, pelo incentivo e pela alegria contagiante.

À Profa. Dra. Edela Puricelli, pelo amor à Odontologia, pela distinção técnica, ética e profissional, pela orientação neste trabalho e pela oportunidade de convívio com uma referência mundial da nossa profissão.

À Profa. Dra. Deise Ponzoni, pela dedicação e responsabilidade, pelo auxílio, disponibilidade e oportunidades durante toda minha vivência na CTBMF/UFRGS.

Aos professores das Disciplinas de Cirurgia: João Júlio da Cunha Filho, Marcel Fasolo de Paris e João Batista Burzlaff, pelo convívio amistoso e pelo importante papel durante minha formação.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'ana Filho, pela possibilidade de realização deste trabalho junto à Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pela disponibilidade, pelo conhecimento transmitido e pela atenção nas discussões acadêmicas.

À bióloga Isabel Lauxen, pelo incentivo, pelo trabalho e pela dedicação exemplares, pelo convívio amistoso e por todos os esforços em função deste trabalho.

Aos demais professores, alunos e funcionários do setor de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pelo auxílio e pela atenção, em especial ao amigo Prof. Dr. Vinícius Carrard, à doutoranda Fernanda Visioli, aos mestrandos Adriana e Fábio e à técnica de laboratório Luciana.

Ao Laboratório de Erros Inatos de Metabolismo, em especial à Profa. Dra. Ângela Wyse e à doutoranda Cristiane Matté, pela possibilidade de realização dos procedimentos bioquímicos, pelo cientificismo e pelo constante auxílio.

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

Ao setor de Radiologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS, em especial ao Prof. Dr. Reni Dalla Bona, pela atenção e pela possibilidade de realização de etapas experimentais naquele setor.

À Capes, pelo auxílio financeiro durante o curso de mestrado.

À UFRGS e à Faculdade de Odontologia, pelo ensino e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

Ao PET-Odonto/UFRGS pelas oportunidades e pelo cientificismo ao longo da minha formação acadêmica.

Ao colega de mestrado em CTBMF e grande amigo Thiago Calcagnotto, pela convivência em sintonia, pelas discussões profissionais, pela amizade e companheirismo.

Ao colega de mestrado em CTBMF Luciano Henrique de Jesus, pela troca de experiências e pelo convívio amistoso.

Aos internos das Disciplinas de Cirurgia Bucomaxilofacial pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos deste trabalho e pela amizade, em especial a Maíra, Lênio, Renan, Felipe, Eliane, Rodrigo, Tales, Luisa e Orion.

Aos funcionários das Disciplinas de Cirurgia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFRGS: Dona Vera, Seu Lopes, Dona Marli, Dona Lourdes, Scheila, Eduardo e Eliane, pela dedicação e por todo amparo e carinho.

Aos funcionários do HCPA, em especial àqueles dos setores Zona 18 e Bloco Cirúrgico, pela amizade, pela convivência e por todo auxílio dispensado à Equipe CIB.

Ao biotério da UFRGS, em especial aos funcionários Sra. Geni, Ângela, Márcio e Paula, pela disponibilidade e generosidade.

A todos meus amigos que, mesmo não estando próximos, demonstraram confiança na minha pessoa. Por todos os momentos em que me ajudaram a encontrar um equilíbrio entre as vidas pessoal e profissional.

Muito Obrigado...

RESUMO

Proposição: avaliar histológica e bioquimicamente o efeito de enxerto ósseo autógeno e implante de hidroxiapatita (HA) sintética (HAP 91[®]), sob influência de campo magnético estático, no reparo ósseo na calvária de ratos. **Materiais**

e métodos: utilizaram-se defeitos críticos de 5 mm realizados na calvária de 60 ratos Wistar. Os animais foram submetidos a quatro diferentes intervenções: enxerto ósseo autógeno ou implante de HA, com e sem a presença de campo magnético estático, sepultado, com intensidade entre 40 e 70 G. Foi realizada análise histológica histométrica e 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. Para controle bioquímico utilizaram-se cinco animais (Naive). **Resultados:** o reparo ósseo foi mais acelerado no grupo de enxerto autógeno sob influência de campo magnético do que no mesmo grupo sem influência magnética. O enxerto ósseo autógeno demonstrou reparo ósseo superior ao implante de HA. A atividade da enzima fosfatase alcalina teve sua maior expressividade em 30 dias pós-operatórios. Neste mesmo tempo operatório, os grupos com aplicação de campo magnético apresentaram atividade enzimática inferior aos grupos sem tal influência. **Conclusões:** o implante de HA demonstrou ser inferior ao enxerto ósseo autógeno no reparo ósseo. O campo magnético estático não causou influência sobre o reparo ósseo. A enzima fosfatase alcalina teve sua atividade diminuída em 30 dias pós-operatórios pela influência do campo magnético estático.

Palavras-chave: enxerto ósseo, hidroxiapatita, defeitos críticos, magnetismo, fosfatase alcalina

ABSTRACT

Purpose: to evaluate histologically and biochemically the effect of autogenous bone graft and synthetic hidroxiapatite (HA) implant (HAP 91[®]), under static magnetic field influence, on bone healing in rat calvaria. **Materials e methods:** 5-mm critical-size defects were created in each calvarium of 60 Wistar rats. They were submitted into four different interventions: autogenous bone graft or HA implant, with or without static magnetic field influence with intensity ranging from 40 to 70 G. Histometric and descriptive analysis of the bone defects were performed in 15, 30 and 60 days after surgery. At the same times, the systemic activity of alkanin phosphatase was measured. Five animals (Naive) were used as biochemical control. **Results:** bone healing was faster in the autogenous bone graft group under magnetic field stimulation than in the same group without the magnetic influence. The autogenous bone graft showed better results for bone healing than the HA implant. Alkanin phosphatase activity had its higher expression in 30 days after surgery. At this time the groups under magnetic stimulation had lower alkanin phosphatase activity than the groups without magnetic field influence. **Conclusions:** the HA implant showed worse bone healing than the autogenous bone graft. The static magnetic field did not cause any influence on bone healing. alkanin phosphatase had its activity lowered in 30 days after surgery in the groups under magnetic field influence.

Keywords: bone graft, hydroxyapatite, critical size defects, magnetism, alkaline phosphatase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ímã e disco de titânio utilizados no estudo.	38
Figura 2: Calvária de rato utilizada para mensuração de campo magnético. Defeito crítico de 5 mm (A) e lojas para adaptação dos artificios metálicos (B)	39
Figura 3: Mensuração da intensidade do campo magnético. Gausímetro (A). Crânio seco e sensor utilizados (B). Mensuração da intensidade do campo magnético no interior do defeito ósseo (C e D).	39
Figura 4: Mensuração do campo magnético no limite anterior (A), no centro (B) e no limite posterior (C) do defeito ósseo.	40
Figura 5: Apresentação comercial da HAP 91® (A), embalagem contendo os grânulos de HA (B), caracterização do material em microscopia eletrônica de varredura, apresentando grânulos com partículas delgadas e pontiagudas (C e D). ..	40
Figura 6: Procedimento realizado nas calvárias dos ratos. Exposição da calota craniana e delimitação da área do defeito ósseo e das ostectomias com grafite (A), utilização da broca trefina (B), defeito ósseo central de 5mm e lojas dos dispositivos metálicos (C), remoção do enxerto autógeno (D), adaptação dos dispositivos metálicos e da HA (E) e adaptação do enxerto ósseo (F).	42
Figura 7: Esquema da obtenção da peça para confecção das lâminas histológicas. Área delimitada pela linha pontilhada preta indica a peça removida para posterior descalcificação. Linha pontilhada vermelha aponta a secção longitudinal mediana da peça após a descalcificação.	43
Figura 8: Histometria. Corte histológico evidenciando o enxerto ósseo autógeno (EOA), os limites do defeito ósseo (LO), a área total do defeito (área delimitada pela linha vermelha) e área de tecido ósseo neoformado (somatório das áreas verdes).	45
Figura 9: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).	51
Figura 10: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).	51
Figura 11: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).	51
Figura 12: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).	52

Figura 13: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autólogo e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina)..... 52

Figura 14: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autólogo e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina)..... 52

Figura 15: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de HA sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).... 53

Figura 16: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de HA sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).... 53

Figura 17: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de HA sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).... 53

Figura 18: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de HA e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).... 54

Figura 19: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de HA e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).... 54

Figura 20: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de HA e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).... 54

Figura 21: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo sem campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico de titânio (DM). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Osso neoformado justaposto ao enxerto ósseo (EOA). Setas largas apontam intensa vascularização. Setas menores indicam neoformação óssea; aumento de 200X (B). Tecido de granulação presente entre o enxerto ósseo (EOA) e o limite do defeito crítico (LO); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina)..... 58

Figura 22: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo sem campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico de titânio (DM). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas pretas indicam neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA) e ao limite do defeito ósseo (LO). Seta vermelha aponta

neoformação óssea ectópica; aumento de 100X (B). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e osso neoformado a partir do enxerto ósseo. Intensa vascularização em osso neoformado (*). Setas apontam neoformação óssea, aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina). 59

Figura 23: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autógeno sem campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico de titânio (DM). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA) com intensa vascularização (*); aumento de 100X (B). Setas apontam neoformação óssea. Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina). 60

Figura 24: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autógeno com campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Seta preta larga indica neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA). Setas vermelhas apontam formação óssea ectópica. Setas menores evidenciam osteoblastos alinhados; aumento de 200X (B). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina). 61

Figura 25: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autógeno com campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas largas indicam neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA) e ao limite do defeito ósseo (LO). Setas menores apontam osteoblastos alinhados; aumento de 100X (B). Seta larga indica neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo; aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina). 62

Figura 26: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autógeno com campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas largas indicam neoformação óssea promovendo união entre enxerto ósseo (EOA) e limite do defeito ósseo (LO); aumento de 100X (B). Setas largas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA); aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina). 63

Figura 27: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA sem campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico (DM). Setas pretas indicam neoformação óssea. Seta vermelha aponta deslocamento de grânulos de HA para o interior da loja óssea; aumento de 40X (A). Setas largas indicam tecido conjuntivo fibroso envolvendo implante de HA. Observa-se delgada camada do material implantado; aumento de 40X (B). Setas largas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*) e tecido de granulação envolvendo os grânulos do material; aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina). 64

Figura 28: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA sem campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o

dispositivo metálico (DM). Seta preta aponta deslocamento de grânulos de HA para o interior da loja óssea; aumento de 40X (A). Escassa neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se tecido de granulação e tecido fibroso no interior do defeito ósseo. Grânulos de HA (*); aumento de 100X (B). Setas pretas indicam neoformação óssea. Seta vermelha aponta grânulos do material deslocados exteriormente ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*); aumento de 100X (C) (hematoxicilina e eosina). 65

Figura 29: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA sem campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico (DM). Seta preta indica neoformação óssea; aumento de 40X (A). Seta preta indica neoformação óssea e osteocondução. Seta vermelha indica quantidade limitada de grânulos de HA. Observa-se tecido de granulação e tecido fibroso; aumento de 100X (B). Setas largas indicam neoformação óssea no interior do defeito ósseo. Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*) e tecido de granulação envolvendo grânulos de HA; aumento de 100X (C) (hematoxicilina e eosina). 66

Figura 30: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA com campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas pretas indicam neoformação óssea. Seta vermelha aponta deslocamento de grânulos de HA para o interior da loja óssea; aumento de 40X (A). Observa-se presença de tecido de granulação envolvendo os grânulos de HA no interior do defeito ósseo; aumento de 100X (B). Setas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*) e tecido de granulação envolvendo os grânulos de HA; aumento de 100X (C) (hematoxicilina e eosina). 67

Figura 31: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA com campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Seta preta indica neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas indicam grânulos de HA envolvidos por tecido de granulação delimitando o implante. Observa-se delgada camada do material implantado; aumento de 100X (B). Setas pretas indicam grânulos de HA envoltos por tecido de granulação. Presença de tecido fibroso e delgada camada de material implantado. Seta vermelha aponta deslocamento de grânulos de HA exteriormente ao limite do defeito ósseo (LO); aumento de 100X (C) (hematoxicilina e eosina). 68

Figura 32: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA com campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Seta indica neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO) envolvendo grânulos de HA. Observam-se tecidos fibroso e de granulação; aumento de 100X (B). Setas largas indicam neoformação óssea no interior do defeito ósseo. Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*); aumento de 200X (C) (hematoxicilina e eosina). 69

Figura 33: Atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica em função do tempo para as intervenções com enxerto ósseo autógeno (A) e com HA (B). Observa-se pico de atividade enzimática em 30 dias pós-operatórios. Dentro do mesmo tempo de observação, letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$). 71

Figura 34: Radiografias das peças removidas das calvárias dos ratos. Observa-se estabilidade dos ímãs em A e magnetos deslocados em B. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de animais dos diferentes grupos de estudo.....	37
Tabela 2: Análise histométrica da neoformação óssea nos defeitos críticos (média percentual \pm desvio-padrão).....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HA: hidroxiapatita

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

BMP: proteína morfogenética óssea

mm: milímetro

cm: centímetro

T: tesla

G: gauss

µm: micrometro

g: grama

CTBMF: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ml: mililitro

kg: quilograma

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Propesq: Pró-Reitoria de Pesquisa

Pronex: Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência

HE: hematoxilina e eosina

Fapergs: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

µl: microlitros

mmol: milimol

nm: nanometro

U: unidade

L: litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. Defeitos ósseos em calvária	20
2.2. Campo magnético e reparo tecidual	24
2.3. Substitutos ósseos e hidroxiapatita (HA)	27
2.4. Fosfatase alcalina	32
3. OBJETIVO	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Cálculo amostral	36
4.2 Grupos de estudo e delineamento experimental	36
4.3 Técnica operatória	41
4.4 Preparo histológico	42
4.5 Análise dos resultados	44
4.5.1 Análise histológica	44
4.5.1.1 Análise histométrica	44
4.5.1.2 Análise histológica descritiva	45
4.5.2 Atividade de fosfatase alcalina	46
4.5.3 Avaliação radiográfica	46
4.5.4 Análise estatística	47
4.6 Considerações éticas	47
5. RESULTADOS	49
5.1 Análise histológica	49
5.1.1 Análise histométrica	49
5.1.2 Análise histológica descritiva	54
5.2 Atividade da enzima fosfatase alcalina	70
5.3 Avaliação radiográfica	71
6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	84
8. REFERÊNCIAS	85
9. ANEXOS	91

9.1. Anexo I: Código Estadual de Proteção aos Animais-----	91
9.2. Anexo II: Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA-----	93
9.3. Anexo III: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS-----	95

1. INTRODUÇÃO ^[1]

O reparo tecidual desempenha importante papel no sucesso das mais variadas intervenções cirúrgicas. Para que esse seja alcançado, é imprescindível o uso de técnicas operatórias com a mínima morbidade e que promovam o rápido estabelecimento de mecanismos biológicos reparadores, evoluindo para a reposição da função do órgão ou tecido lesado em condições de normalidade. Grande parte dos procedimentos cirúrgicos na região bucomaxilofacial envolve intervenção nas estruturas ósseas da face. Redução e fixação de fraturas, ressecções tumorais, enxertias e osteotomias são exemplos desse íntimo envolvimento e apresentam, como objetivo pós-operatório compartilhado, a necessidade de adequada neoformação óssea (Fini, Cadossi *et al.*, 2002).

A osteoindução, definida como o recrutamento de células indiferenciadas e a transformação dessas em pré-osteoblastos, é um mecanismo biológico básico que ocorre no reparo de fraturas e de defeitos ósseos e na integração de implantes (Albrektsson e Johansson, 2001). Vários estudos apontaram glicoproteínas solúveis descritas como BMPs (bone morphogenetic proteins), uma família de fatores de crescimento, como agentes indutivos da neoformação óssea (Takagi e Urist, 1982; Urist, Delange *et al.*, 1983; Schilephake, 2002). Além disso, é estabelecido na literatura que estímulos físicos como stress (Trepczik, Lienau *et al.*, 2007), sinais elétricos (Aaron, Boyan *et al.*, 2004) e campos eletromagnéticos e magnéticos (Fini, Cadossi *et al.*, 2002; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) são capazes de regular positivamente a osteoindução, provavelmente através do aumento da produção de fatores de crescimento. Além dos estímulos físicos, diversos

[1] Citações e referências de acordo com o estilo Autor-Data.

biomateriais também têm sido estudados quanto a suas propriedades de estimulação e condução do reparo ósseo. Destacam-se o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita (HA), ambos já extensamente estudados em diferentes modelos animais (Ripamonti, 1996; Soccol, Bettega *et al.*, 2006), procurando-se evidências para a influência nos eventos de osteocondução e de osteoindução (Gosain, Riordan *et al.*, 2004). Estes materiais apresentam facilidades de aquisição, de esterilização e de armazenamento, o que não ocorre com os enxertos ósseos autógenos (Corsetti, Leite *et al.*, 2008). Particularmente a HA sintética foi apontada como um material com possibilidades promissoras para suas aplicações (Fini, Cadossi *et al.*, 2002; Puricelli, 2002; Kusakabe, Sakamaki *et al.*, 2004), podendo promover reconstruções ósseas e restabelecer forma e função.

Diversos estudos têm utilizado a calvária de ratos para avaliação do reparo ósseo através de defeitos ósseos experimentais. Particular importância é dada aos “defeitos de tamanho crítico”. São estes os defeitos que apresentam tamanho suficiente para que não ocorra o seu reparo espontâneo durante toda a vida do animal (Schmitz e Hollinger, 1986). Tal conceito tem o objetivo de avaliar inequivocadamente o real potencial osteogênico de um implante ou enxerto. Como método de quantificação e comparação dos tecidos presentes nos cortes histológicos a histometria é amplamente utilizada (Fini, Cadossi *et al.*, 2002; Pryor, Yang *et al.*, 2005; Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; De Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008). Diversos estudos também fizeram uso da atividade da fosfatase alcalina para quantificar a neoformação óssea, uma vez que tal proteína é considerada um bom marcador para atividade osteoblástica (Yan, Tomita *et al.*, 1998; Chung, Ahn *et al.*, 2007).

Reduzir ao máximo os insucessos cirúrgicos, devolver forma e função ao tecido alterado no menor tempo possível e tornar as intervenções e o período pós-operatório cada vez menos incapacitantes ao indivíduo são os objetivos das pesquisas envolvendo reparo ósseo. O desenvolvimento de novos materiais osteocondutores e osteoindutores biocompatíveis e a busca pela estimulação endógena mais efetiva do reparo ósseo são as estratégias mais utilizadas nos estudos. A associação das duas estratégias desponta como uma alternativa promissora no estímulo à neoformação óssea (Fini, Cadossi *et al.*, 2002). Não foram encontrados estudos que analisem histométrica e bioquimicamente defeitos ósseos que receberam implante de HA sintética granulada sob influência de campo magnético estático sepultado. A proposta deste estudo foi avaliar o reparo ósseo, em calvária de ratos, sob influência de um campo magnético estático, após enxerto ósseo autógeno ou implante de HA.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Defeitos ósseos em calvária

Diversos tipos de enxertos e implantes vêm sendo testados ao longo dos anos com o objetivo de ser evidenciado um substituto ósseo ideal. Na Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial os enxertos e implantes são amplamente utilizados nos mais variados procedimentos, desde osteotomias e reconstruções após cirurgias de tumores até reabilitações do órgão dentário.

As pesquisas relacionadas a substitutos ósseos utilizaram diferentes animais com defeitos ósseos experimentais localizados principalmente em calvária. Outros sítios estudados incluem fêmur (Yan, Tomita *et al.*, 1998; Vogelin, Jones *et al.*, 2005; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009), mandíbula (Soccol, Bettega *et al.*, 2006), rebordo alveolar maxilar (Paris, Oliveira *et al.*, 2003) e tibia (Almeida Prado, Anbinder *et al.*, 2006). Observa-se a utilização mais freqüente de ratos (Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006; Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; Inoda, Yamamoto *et al.*, 2007; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007; Messoria, Nagata *et al.*, 2008), mini-porcos (Gosain, Song *et al.*, 2000; Rupprecht, Merten *et al.*, 2003), coelhos (Clokie, Moghadam *et al.*, 2002; Haddad, Peel *et al.*, 2006; Ascherman, Foo *et al.*, 2008) e ovelhas (Gosain, Riordan *et al.*, 2004).

Um substituto ósseo deve ser rigorosamente estudado até sua aplicação em humanos ser indicada. Schmitz e Hollinger (Schmitz e Hollinger, 1986) introduziram o conceito de “defeito de tamanho crítico” na pesquisa envolvendo

substitutos ósseos. Segundo os autores, quando um enxerto ou implante é estudado em um modelo animal, o defeito ósseo criado deve ser grande o suficiente para não permitir um reparo espontâneo ao longo da vida do animal. Somente nesta situação o real efeito osteogênico de um substituto ósseo pode ser avaliado. Em um defeito de tamanho crítico sem a presença de um enxerto ou implante, o reparo tecidual ocorrerá através da formação de tecido conjuntivo fibroso ao invés de osso. Os autores realizaram uma ampla revisão da literatura em relação aos modelos animais e tipos de defeitos ósseos utilizados em pesquisa. Após analisarem estudos que fizeram uso de defeitos em calvária e mandíbula de ratos, coelhos, cachorros e macacos, elaboraram um protocolo para avaliação de substitutos ósseos na região bucomaxilofacial. Segundo tal protocolo, os estudos devem ser iniciados com a utilização de defeitos de 8 mm de diâmetro em calvária de ratos. Este modelo apresenta como vantagens o baixo custo de manutenção dos animais, a utilização de pequenas quantidades do material a ser testado e a fácil manipulação e implantação de agentes particulados neste tipo de defeito.

Através de um estudo em calvária de mini-porcões, Gosain e colaboradores (Gosain, Song *et al.*, 2000) objetivaram reavaliar o conceito de defeito crítico apresentado por Schmitz e Hollinger (Schmitz e Hollinger, 1986). Estudaram histologicamente o reparo ósseo em defeitos de 3, 5 e 8 mm após uma, quatro, oito e 12 semanas, através de fechamento linear do defeito e de porcentagem de preenchimento ósseo da área inicial. Sugeriram como melhor metodologia o uso de porcentagem de preenchimento ósseo para avaliação do reparo de defeitos ósseos. Além disso, definiram como crítico aquele defeito ósseo que não é reparado ao longo do período de duração do estudo,

modificando o conceito apresentado por Schmitz e Hollinger (Schmitz e Hollinger, 1986).

Embora alguns trabalhos utilizando calvária de ratos tenham sido realizados em defeitos com 8 mm de diâmetro (Marzouk, Gamal *et al.*, 2007; Messora, Nagata *et al.*, 2008), outros estudos avaliaram o reparo ósseo no mesmo sítio cirúrgico com defeitos de menor diâmetro; 6 mm (Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006) e 5 mm (Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; Inoda, Yamamoto *et al.*, 2007). Tais trabalhos analisaram o potencial osteogênico e/ou osteocondutor de enxertos ósseos e diferentes biomateriais com a adição ou não de fatores de crescimento.

Aalami e colaboradores (Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004) demonstraram que defeitos ósseos de 3, 4 e 5 mm em calvária de ratos com idade adulta (60 dias) apresentaram reparo ósseo de menos de 5% ao longo de oito semanas através de análise radiográfica. A análise histológica envolveu a ocorrência do fechamento linear do defeito ósseo, fato não observado em nenhum animal adulto.

Em relação ao período de duração dos estudos envolvendo a calvária de ratos, aqueles trabalhos que utilizaram defeitos de 8 mm tiveram duração de 12 semanas (Messora, Nagata *et al.*, 2008) e 16 semanas (Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), com pelo menos uma observação anterior com quatro semanas. Nos estudos de Pryor e colaboradores (Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Yang *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006), com defeitos de 6 mm, os autores observaram os resultados com quatro e oito semanas após a intervenção cirúrgica. Já os trabalhos que realizaram defeitos de 5 mm tiveram duração de oito (Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004), nove (Inoda, Yamamoto *et al.*, 2007) e 12

semanas (Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007), também com observações anteriores a estes tempos.

A metodologia empregada para a avaliação dos resultados obtidos com a utilização dos diferentes substitutos ósseos envolve principalmente o uso da histomorfometria (Clokier, Moghadam *et al.*, 2002; Haddad, Peel *et al.*, 2006; Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007; Messoria, Nagata *et al.*, 2008). Trata-se de uma técnica histológica na qual se pode quantificar os diferentes tecidos presentes em determinada área do corte histológico. A descrição histológica dos achados sem a quantificação dos diferentes tecidos também foi utilizada por alguns estudos (Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Inoda, Yamamoto *et al.*, 2007; Ascherman, Foo *et al.*, 2008; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009). A análise radiográfica da área do defeito ósseo também foi empregada em diversos trabalhos (Clokier, Moghadam *et al.*, 2002; Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Pryor, Yang *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007). No entanto, Pryor e colaboradores (Pryor, Susin *et al.*, 2006) demonstraram que tal análise pode revelar discordância com a observação histológica, esta considerada o padrão-ouro. Os autores agruparam os achados histológicos e radiográficos em três categorias, na dependência do fechamento do defeito ósseo: limitado, parcial e completo. Observaram que a concordância entre os achados ocorreu apenas em cerca de 50% dos casos, não recomendando a avaliação exclusiva dos resultados com base em achados radiográficos.

Os defeitos ósseos na calvária de ratos, como previamente demonstrado, apresentam um grande amparo na literatura em relação ao seu uso na pesquisa envolvendo substitutos ósseos. Este modelo experimental

apresenta benefícios econômicos e técnicos. Apesar disso, extrema precaução deve ser tomada no momento da realização do defeito ósseo. A dura-máter encontra-se imediatamente abaixo da calvária, sendo extremamente vulnerável a traumatismos com o uso de brocas ou trefinas. Tal meninge é a principal responsável pela irrigação sangüínea do crânio e seu dano pode causar prejuízos ao processo reparador (Schmitz e Hollinger, 1986; Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Ascherman, Foo *et al.*, 2008), comprometendo os resultados experimentais obtidos.

2.2. Campo magnético e reparo tecidual

Campos eletromagnéticos e magnéticos são bastante estudados em relação a seus efeitos em níveis tecidual, celular e molecular. Os mecanismos de atuação desses estímulos sobre os tecidos são diferentes: os primeiros geram uma corrente elétrica enquanto os últimos criam apenas um campo magnético ou imantado (Bruce, Howlett *et al.*, 1987). Entre os campos eletromagnéticos destacam-se aqueles gerados por pulsos de corrente elétrica, ou campos eletromagnéticos pulsáteis, devido a sua vasta investigação científica e aplicações terapêuticas (Sharrard, 1990; Fredericks, Nepola *et al.*, 2000; Aaron, Boyan *et al.*, 2004). Já os campos magnéticos são aqueles gerados por magnetos (ímãs), podendo ser constituídos de diferentes materiais, com influência direta sobre suas propriedades. Podem ser aplicados interna ou externamente ao organismo, principalmente na forma estática, ou seja, com intensidade constante (Henry, Concannon *et al.*, 2008).

Na natureza existem os magnetos classificados como naturais e estáveis, capazes de gerar campos magnéticos espontâneos, sendo mais conhecidos e amplamente utilizados os de samário-cobalto e de neodímio-ferro-boro. Na área da medicina alternativa estes ímãs vêm sendo utilizados com frequência nas terapias com magnetismo, embora exista um fraco suporte na literatura sobre sua eficácia. Os magnetos são empregados através do contato direto com a parte do corpo a ser tratada. Supõe-se que a ação do campo magnético possa ocorrer de 2 a 5 cm através da pele e estimular o material encontrado, principalmente o ferro encontrado na hemoglobina e oxigênio (Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007).

Os estudos relacionados à aplicação de campos magnéticos estáticos nos tecidos evidenciaram diversos efeitos. Na regeneração tecidual sugere-se ocorrer ativação de fibroblastos e estímulo à angiogênese. No tecido ósseo, o campo magnético parece provocar estímulo à osteogênese através da ativação de osteoblastos e aumento de aporte sangüíneo (Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Com o objetivo de estudar a aplicação do magnetismo na ortodontia, Darendeliler e colaboradores (Darendeliler, Darendeliler *et al.*, 1997) avaliaram em mini-porcos a movimentação dentária de incisivos superiores. Foram realizadas aplicação de campo magnético, campo eletromagnético pulsátil mais artefato ortodôntico ou artefato ortodôntico exclusivo (controle). Observaram maiores movimentações dentárias e reorganização óssea mais intensa nos dois primeiros grupos.

Yan e colaboradores (Yan, Tomita *et al.*, 1998) realizaram o sepultamento de magnetos em fêmures de ratos, objetivando avaliar a

formação óssea e mineral. Observaram que a quantidade de cálcio e a densidade mineral nos fêmures dos animais sob efeito de campo magnético foram maiores. A intensidade do campo magnético utilizada foi de 0.18 tesla (T). Sugeriram que o campo magnético é capaz de influenciar positivamente o metabolismo do tecido ósseo.

Usando campos magnéticos estáticos de alta intensidade (aproximadamente 8 T), Kotani e colaboradores (Kotani, Kawaguchi *et al.*, 2002) estudaram a orientação celular e formação óssea em culturas de osteoblastos. As análises foram realizadas através de fotomicroscopia, radiografias e histologia. Os autores relataram que os osteoblastos orientaram-se paralelamente ao campo magnético, fato que não ocorreu com as células não expostas ao campo. Além disso, após a aplicação de BMP-2, foi observada maior formação óssea nas células submetidas ao magnetismo e uma orientação do tecido formado paralelamente às linhas de campo. Os autores ainda sugeriram a aplicação da formação óssea guiada por campo magnético no tratamento de fraturas e de defeitos ósseos.

O sepultamento de magnetos em fêmures de ratos conceituado por Puricelli (Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009), avaliou histologicamente defeitos ósseos de 2 mm. Descreveram maior formação óssea no grupo em que um campo magnético com cerca de 40 gauss (G), presente através de arruelas de aço inoxidável martensítico e parafusos de titânio, foi aplicado. Sugeriram que o campo magnético aplicado foi capaz de acelerar o processo de reparo ósseo tanto do defeito ósseo vazio ou quando este foi preenchido com enxerto ósseo autógeno.

O uso de magnetos de neodímio-ferro-boro foi testado por Costantino e colaboradores (Costantino, Pogliacomini *et al.*, 2007) no tratamento de fraturas em mão e punho. Em cada caso foram utilizados quatro blocos de ímãs externamente à região da fratura, totalizando um campo magnético de 12.000 G. Quarenta pacientes portadores de tais fraturas foram tratados por imobilização e terapia com magnetos e controlados por radiografias de mão e punho. Comparando com a média de tempo normalmente utilizado na imobilização das fraturas estudadas, os autores relataram uma diminuição de aproximadamente 35% no período de formação do calo ósseo quando os magnetos foram utilizados.

Henry e colaboradores (Henry, Concannon *et al.*, 2008) estudaram a cicatrização de feridas experimentais realizadas no dorso de ratos envolvendo pele, tecido subcutâneo e músculo. Três grupos foram estudados na dependência da intervenção sobre a ferida: recobrimento com magnetos comerciais de 23 G de intensidade, recobrimento com peça de couro sem campo magnético e ferida exposta, sem recobrimento. Observaram que no grupo sob a influência de campo magnético as feridas foram fechadas em aproximadamente 15 dias, enquanto nos demais grupos tal cicatrização ocorreu dentro de 20 dias.

2.3. Substitutos ósseos e hidroxiapatita (HA)

Os enxertos ósseos autógenos continuam sendo o padrão-ouro nas reconstruções ósseas, devido às suas propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução. No entanto, apresentam limitações importantes

como a morbidade cirúrgica, a limitação de quantidade de enxerto e a reabsorção irregular no leito receptor (Albrektsson e Johansson, 2001; Zhou, Peel *et al.*, 2007). Dessa forma, inúmeras pesquisas buscam evidenciar materiais capazes de substituir o tecido ósseo e promover adequada reconstrução anatômica após traumas e cirurgias ablativas.

Os diferentes materiais empregados na substituição de osso pertencem à classe dos biomateriais e devem apresentar propriedades físico-químicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros. Estas propriedades, responsáveis por não ocorrer uma reação de corpo estranho por parte do organismo, caracterizam a biocompatibilidade (Kawachi, Bertran *et al.*, 2000; Corsetti, 2005; Corsetti, Leite *et al.*, 2008).

Inúmeros materiais sintéticos foram desenvolvidos nos últimos anos e muitos estudos envolveram o uso dos compostos de fosfato de cálcio, principalmente pela semelhança com a fase mineral dos tecidos duros do organismo e excelente biocompatibilidade. Os mais amplamente estudados são o tricálcio fosfato e a hidroxiapatita (HA) (Burg, Porter *et al.*, 2000). Tais materiais apresentam importante propriedade de osteocondução e são capazes de promover uma interação direta com o tecido ósseo, sendo classificados como bioativos. Estão disponíveis no mercado em forma de blocos ou partículas, densos ou porosos (Le Guehenec, Layrolle *et al.*, 2004; Corsetti, Leite *et al.*, 2008).

A relação entre as velocidades de neoformação óssea e de absorção do biomaterial é de extrema importância na obtenção do substituto ósseo ideal. Diversas formas de HA já foram estudadas em relação às suas propriedades, sendo evidenciado que as formas densas apresentam lenta degradação ao

longo do tempo. Também é estabelecido que porosidade, cristalinidade, tamanho e forma das partículas são fatores que afetam a velocidade de degradação deste biomaterial (Klein, Driessen *et al.*, 1984; Gosain, Riordan *et al.*, 2004).

Dentre as propriedades citadas, a porosidade parece ser a mais estudada em relação ao processo de absorção do material e sua substituição por tecido ósseo. Acredita-se que o tamanho ideal dos poros de um composto de fosfato de cálcio seja semelhante ao do osso esponjoso. Macroporosidade (com poros maiores que 50 μm) é intencionalmente inserida no material através da adição de substâncias voláteis, principalmente polímeros, antes do processo de sinterização. Gauthier e colaboradores demonstraram que macroporos de cerca de 560 μm são mais favoráveis à neoformação óssea do que poros de 300 μm (Gauthier, Bouler *et al.*, 1999). Já a microporosidade (poros menores que 10 μm) é consequência do processo de sinterização, dependendo da temperatura atingida e do tempo de duração do processo. Já foi demonstrado que a microporosidade permite a circulação de fluidos corporais no interior do material, enquanto a macroporosidade fornece um substrato para a colonização celular osteogênica, sendo ambas as características desejáveis para a formação de tecido ósseo. Poucos materiais disponíveis preservam tanto macro quanto microporosidades (Le Guehenec, Layrolle *et al.*, 2004).

O potencial osteoindutivo da HA também já foi estudado, sendo demonstrada a capacidade de formação óssea em sítios não relacionados com tecido ósseo. Esta osteoindução foi observada no tecido muscular abdominal de macacos babuínos (Ripamonti, 1996) e na subcútis de cachorros (Yamasaki e Sakai, 1992), não sendo relatada em ratos. Os autores sugerem que, além da

composição do material utilizado, o evento osteoindutivo também dependa de características inerentes à espécie e ao sítio onde está sendo implantado.

Diversos estudos também objetivaram evidenciar o potencial de diferentes tipos de HA no fechamento de defeitos ósseos. Rupprecht e colaboradores (Rupprecht, Merten *et al.*, 2003) realizaram defeitos ósseos na calvária de mini-porcos (1,5 X 2,5 mm) e estudaram o preenchimento ósseo até 40 semanas após o implante de um cimento de HA comercial (Bone Source®). Observaram que houve um reparo ósseo de aproximadamente 90% da área total do defeito ósseo inicial.

Thorwarth e colaboradores (Thorwarth, Schultze-Mosgau *et al.*, 2005) estudaram a possibilidade de aplicação de uma HA nanométrica (Ostim®) em defeitos críticos na calvária de porcos. Compararam, em até seis meses pós-operatórios, o preenchimento ósseo dos defeitos com o uso de enxerto autógeno particulado, uma mistura do biomaterial com 25% de osso autógeno particulado ou com a aplicação do biomaterial unicamente, não observando diferenças entre os grupos. Além disso, nenhum dos grupos apresentou um preenchimento da cavidade do defeito acima de 60%. Os autores apontaram a necessidade de maiores investigações para a aplicação do material estudado em defeitos ósseos extensos.

Através de defeitos críticos em calotas de coelhos, Zhou e colaboradores (Zhou, Peel *et al.*, 2007) estudaram o reparo ósseo obtido com o uso de HA comercial pura (C-Graft®) e de tricálcio fosfato bifásico (Algisorb®) com ou sem a adição de carreador e de BMPs. Observaram que os dois materiais não diferiram em relação ao reparo dos defeitos em nenhuma situação. Apontaram um preenchimento da cavidade óssea em torno de 35%

para os materiais estudados e de 82% para enxerto autógeno após seis semanas. Relataram ainda que a adição de carreador e de BMPs aprimoraram a manipulação dos materiais e o potencial reparador, respectivamente.

Diversas publicações também demonstraram o uso de HA em humanos (Puricelli, 2002). Mathur e colaboradores (Mathur, Tatum *et al.*, 2003) relataram o uso de cimento de HA em uma série de 13 pacientes com fraturas craniomaxilofaciais. Apontaram três falhas transoperatórias devido à dificuldade de estabilidade do material. Segundo os autores, as formulações iniciais do material foram utilizadas nos casos em que houve falhas. O surgimento de cimentos de HA mais modernos aparentemente solucionou o problema observado. Os autores também relataram dois casos de infecção pós-operatória devido à exposição do material nas cavidades bucal ou nasal, sugerindo cautela do cirurgião quando utilizar tal material nas adjacências dos sítios citados. David e colaboradores (David, Argenta *et al.*, 2005) também utilizaram um cimento de HA (Bone Source®) para reconstrução de calota craniana em oito pacientes com história de craniosinostose. Relataram complicações em dois casos: uma trans-operatória, devido à dificuldade de estabilidade do material e outra pós-operatória em 12 meses sendo observada deiscência da ferida operatória. Indicaram o uso do cimento em defeitos não extensos com até 2,5 cm de diâmetro.

Utilizando uma combinação de HA e tricálcio fosfato na proporção de 1:1 com osso autógeno particulado, Artzi e colaboradores (Artzi, Weinreb *et al.*, 2008) estudaram histologicamente o resultado de 28 procedimentos para levantamento do seio maxilar visando a adaptação de implantes osteointegráveis. Realizaram biópsias com trefina de 2,5 mm dos seios

maxilares operados após seis ou nove meses e procederam à análise histomorfométrica. Os autores relataram a ocorrência de apenas um caso de sinusite, posteriormente excluído do estudo. Observaram a presença de osso em aproximadamente 30% e 40% da área biopsiada em seis e nove meses, respectivamente. Apontaram a necessidade de acompanhamento dos pacientes em prazos mais longos para determinar a taxa de reabsorção do material em relação à neoformação óssea.

2.4. Fosfatase alcalina

Devido à grande extensão do tecido ósseo e a uma composição mineral importante, exames de imagem que utilizam os raios “X” podem ser utilizados para fins diagnósticos no organismo. No entanto, a fisiologia, o metabolismo e patologias que podem afetar os ossos e que estão em estágios iniciais só serão manifestados em exames de imagem após um tempo considerável (Vieira, 1999).

Os exames laboratoriais coadjuvantes, através da análise de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, têm a capacidade de viabilizar diagnósticos precoces das patologias ósseas. Tal benefício tem como objetivo a diminuição de possíveis seqüelas dessas patologias (Christenson, 1997; Saraiva e Castro, 2002).

Os marcadores bioquímicos do metabolismo do tecido ósseo podem ser divididos em formativos e absorptivos. Esses marcadores são expressos pelo resultado da análise de atividades de enzimas como a fosfatase alcalina, relacionada ao processo de osteogênese, e a fosfatase ácida, envolvida com a

absorção do tecido ósseo (Christenson, 1997; Vieira, 1999; Saraiva e Castro, 2002; Vieira, 2007).

Normalmente as fosfatases alcalina e ácida mantêm um equilíbrio de atividade que é caracterizado pela homeostase óssea (Junqueira e Carneiro, 1995; Christenson, 1997; Ten Cate, 1998; Katchburian e Aranha, 2004). No entanto, em casos de anormalidade, como em doenças osteometabólicas, tais como osteoporose (Saraiva e Castro, 2002; Campos, 2003; Molina, 2003; Seibel, 2006), osteomalácia (Saraiva e Castro, 2002) e Síndrome de Marfan, (Araújo, Simplício *et al.*, 2003) **bem como** durante o reparo de fraturas (Yue, Lu *et al.*, 2005), estas atividades enzimáticas estão alteradas, caracterizando um desequilíbrio no metabolismo ósseo. A fosfatase alcalina destaca-se por estar 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).

Durante o processo de formação óssea, os osteoblastos secretam matriz óssea e com isso ativam muitas enzimas, sendo que uma quantidade considerável dessas é difundida para a corrente sanguínea (Guyton, 1989). Tal fato permite que a atividade da enzima fosfatase alcalina seja dosada no sangue ou plasma sanguíneo (Roy, 1970; Leung, Fung *et al.*, 1993). Dessa forma, a enzima é considerada um bom indicador do índice de formação óssea, podendo ser empregada como marcador periférico do metabolismo ósseo (Guyton, 1989; Seibel, 2006).

A dosagem da enzima fosfatase alcalina é bastante simples e de fácil realização. No entanto, devido ao metabolismo ósseo ser acelerado em pacientes e animais jovens, torna-se difícil estabelecer padrões de

normalidade. Já em pacientes e animais adultos, o metabolismo ósseo encontra-se mais estável, observando-se uma homeostase óssea e aumentando a confiabilidade das provas diagnósticas (Vieira, 1999; Yue, Lu *et al.*, 2005).

A mensuração da atividade da enzima fosfatase alcalina é um importante exame diagnóstico que pode auxiliar no entendimento de fenômenos envolvidos no processo de resposta celular a implantes de materiais aloplásticos (Mah, Hung *et al.*, 2004) e a enxertos ósseos (Zambuzzi, Neves *et al.*, 2005; De Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008) bem como estudar fatores que possam estimular o processo de reparo ósseo em suas diferentes etapas (Yan, Tomita *et al.*, 1998).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar histológica e bioquimicamente o efeito de enxerto ósseo autógeno e implante de HA granulada sintética (HAP 91®), sob influência de campo magnético estático, no reparo ósseo em calvária de ratos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar histologicamente, através de histometria e análise descritiva, o reparo ósseo com a presença do implante de HA granulada sintética (HAP 91®) e compará-lo com o reparo do enxerto ósseo autógeno;

- Avaliar histologicamente, através de histometria e análise descritiva, o reparo ósseo sob a influência de um campo magnético permanente e constante e compará-lo com o reparo sem estímulo magnético;

- Avaliar bioquimicamente a atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica no período de reparo ósseo com o uso de enxerto ósseo autógeno ou HA granulada sintética (HAP 91®), com e sem a influência de um campo magnético.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cálculo amostral

Para determinação do tamanho da amostra deste estudo foi realizada uma consultoria técnica junto ao setor de Epidemiologia e Bioestatística do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínica de Porto Alegre (GPPG/HCPA). O número amostral foi calculado através do software Winpepi[®], módulo Compare2, 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 e colaboradores (Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), que estudaram o reparo ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos, e considerando uma diferença de 20% no preenchimento do defeito ósseo entre os grupos no presente trabalho, chegou-se ao valor de cinco animais por grupo de estudo.

4.2 Grupos de estudo e delineamento experimental

O presente estudo é caracterizado como do tipo experimental em animais. Foram utilizados 65 ratos da cepa Wistar (raça *Rattus norvegicus albinus*) do sexo masculino com oito a dez meses de idade e apresentando em média 500g de massa corporal. Todos os grupos foram compostos por cinco ratos cada. Os tempos de morte envolveram 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Foram estudadas duas diferentes propostas de intervenção nos defeitos

ósseos criados nas calvárias dos ratos: enxerto ósseo autógeno, removido do próprio defeito com broca trefina e implante de HA granulada sintética (HAP 91[®])^[2]. Ambas as intervenções foram avaliadas com e sem a presença de campo magnético. Para controle da atividade da enzima fosfatase alcalina utilizaram-se animais nos quais não foi realizada nenhuma intervenção cirúrgica. Os grupos envolvidos no presente estudo e suas composições estão explicitados na tabela 1.

Tabela 1: Número de animais dos diferentes grupos de estudo.

Morte \ Intervenção	Aut	Aut+Mag	HA	HA+Mag	Naive
15 dias	5	5	5	5	
30 dias	5	5	5	5	5
60 dias	5	5	5	5	

Aut: enxerto autógeno sem influência de campo magnético (padrão-ouro para reparo ósseo);

Aut+Mag: enxerto autógeno sob influência de campo magnético;

HA: implante de HA sem influência de campo magnético;

HA+Mag: implante de HA sob influência de campo magnético.

O campo magnético, quando presente, foi gerado por dois ímãs de neodímio-ferro-boro sepultados externamente ao defeito, com 3 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Nas calvárias dos animais dos grupos controle foram utilizados discos de titânio comercialmente puro (Figura 1). A intensidade de campo magnético utilizada no interior do defeito foi calculada no Laboratório de Magnetismo, Instituto de Física, UFRGS. Foi realizado o defeito ósseo bem como os orifícios para adaptação dos ímãs em um crânio seco de rato,

[2] HAP-91, JHS Laboratório Químico, MG, Brasil.

idênticos aos utilizados no presente estudo (Figura 2). A intensidade do campo magnético no interior do defeito foi mensurada com o uso de um gausímetro (Figura 3), utilizando-se 30 pares de ímãs para tal. Foi calculada a média da intensidade do campo magnético nos limites anterior e posterior e no centro do defeito ósseo (Figura 4). Os valores encontrados foram, respectivamente: 73,40 G, 66,20 G e 43,72 G. Para efeitos de conversão, 1 G (gauss) = 10^{-4} T (tesla). De forma a assegurar que os ímãs fossem sepultados com campo magnético atrativo, e não repulsivo, o pólo norte de todos os magnetos foi demarcado com esmalte branco atóxico e, previamente à inserção, foi realizado um teste de atração entre os ímãs.

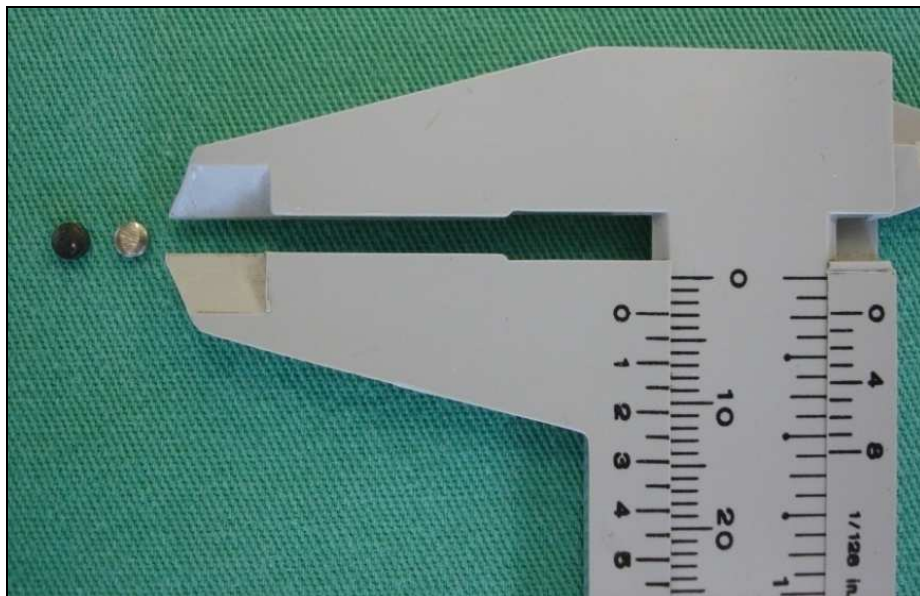


Figura 1: Ímã e disco de titânio utilizados no estudo com 3 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.



Figura 2: Calvária de rato utilizada para mensuração de campo magnético. Defeito crítico de 5 mm (A) e lojas para adaptação dos artifícios metálicos (B)

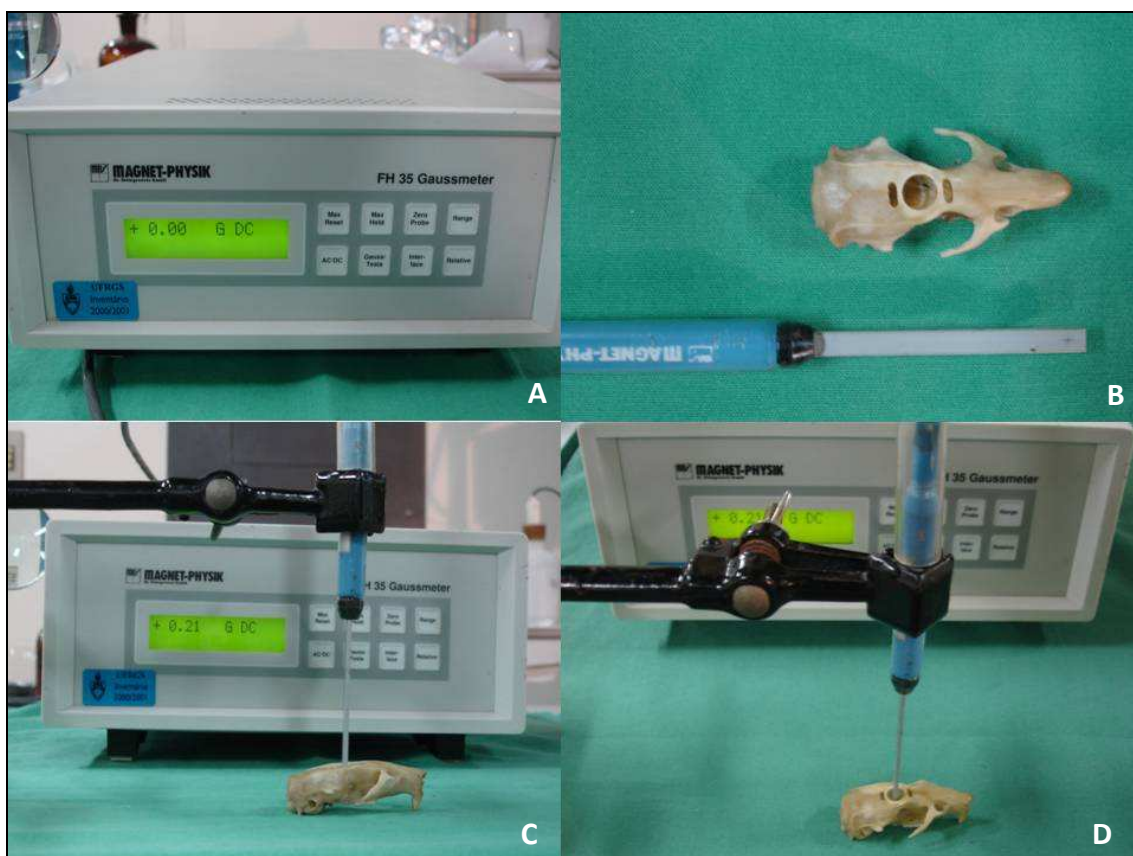


Figura 3: Mensuração da intensidade do campo magnético. Gausímetro (A). Crânio seco e sensor utilizados (B). Mensuração da intensidade do campo magnético no interior do defeito ósseo (C e D).



Figura 4: Mensuração do campo magnético no limite anterior (A), no centro (B) e no limite posterior (C) do defeito ósseo.

A HA granulada utilizada (HAP 91®) é apresentada como absorvível, porosa e com grânulos obtidos em peneira com malha de 2 mm (Figura 5). Segundo as recomendações do fabricante, o produto pode ser usado diretamente no local desejado.

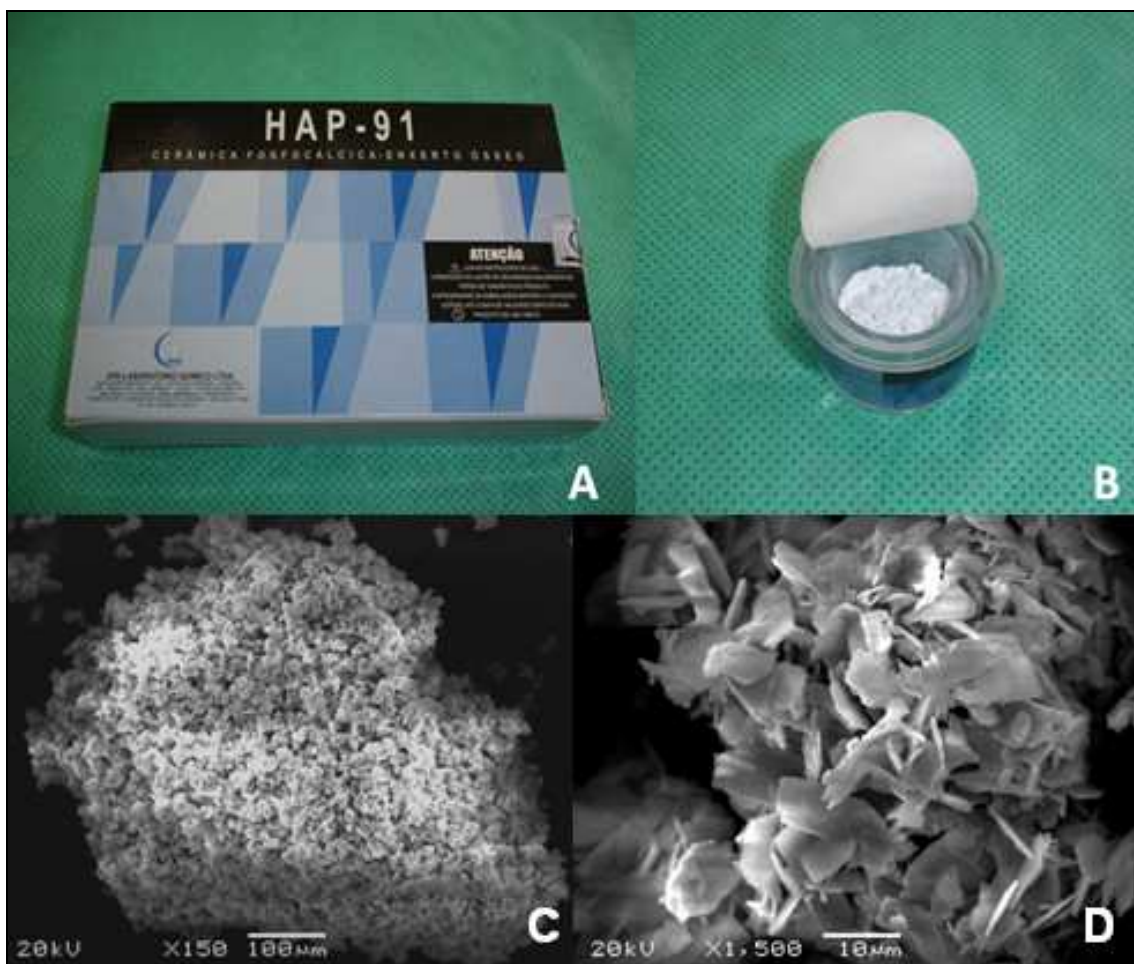


Figura 5: Apresentação comercial da HAP 91® (A), embalagem contendo os grânulos de HA (B), caracterização do material em microscopia eletrônica de varredura, apresentando grânulos com partículas delgadas e pontiagudas (C e D).

4.3 Técnica operatória

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no laboratório de pesquisa da Disciplina de CTBMF da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Durante a realização dos procedimentos a equipe cirúrgica utilizou avental cirúrgico, máscara, gorro e luvas estéreis. A anestesia foi orientada por médico veterinário devidamente registrado no seu Conselho Profissional. Realizou-se a infiltração intraperitoneal de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina na dosagem respectiva de 0,1 ml/kg e 1 ml/kg de peso corporal do animal. Procedeu-se a tricotomia de forma manual na região da calota craniana, seguida da antissepsia com gaze embebida em solução aquosa de clorexidina a 0,12% e preparo do campo operatório. O acesso à cortical da calota craniana foi realizado através de incisão linear com aproximadamente 3,5 cm na linha sagital mediana, seguida de divulsão tecidual, incisão e descolamento do periósteo. Após exposição do tecido ósseo, localizado o osso frontal da calota craniana, realizou-se um defeito ósseo com 5 mm de diâmetro. Com distâncias de 1 mm nas direções anterior e posterior do defeito ósseo foram realizadas duas ostectomias de 2 mm para sepultamento dos ímãs. A figura 6 apresenta o procedimento realizado. Com uma broca trefina localizada na porção central do osso frontal foi realizado o defeito ósseo de 5 mm de diâmetro. As ostectomias de 2 mm para sepultamento dos ímãs foram confeccionadas com broca cilíndrica de mesmo diâmetro. Tais procedimentos utilizando trefina e brocas foram realizados com motor elétrico de baixa rotação sob irrigação de água destilada. Após fixação dos discos imantados ou discos de titânio não

imantados, o enxerto autógeno ou o implante de HA foram depositados no defeito ósseo. A quantidade de material utilizado foi aquela necessária para preencher a totalidade do defeito ósseo. Após limpeza da ferida operatória foi realizada a sutura com fio de mononylon 5-0. Durante a recuperação anestésica os animais foram cobertos com compressas aquecidas e campos cirúrgicos e receberam ração e água em quantidades padronizadas. Analgesia com paracetamol em gotas (200 mg/ml) foi fornecida *ad libidum* nas primeiras 24 horas pós-operatórias. Os animais permaneceram no Biotério da UFRGS até a época da morte, realizada por meio de decapitação sem sedação, quando um novo acesso cirúrgico à calvária já operada foi executado, sendo esta removida para o processamento histológico da peça.

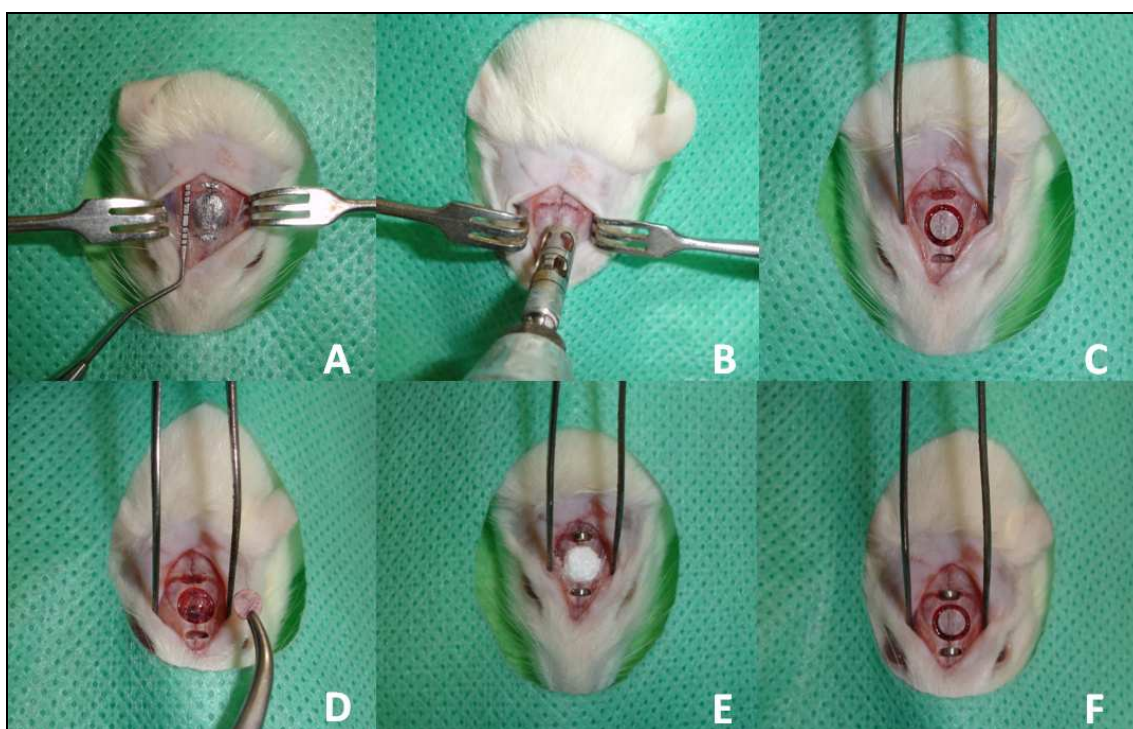


Figura 6: Procedimento realizado nas calvárias dos ratos. Exposição da calota craniana e delimitação da área do defeito ósseo e das osteotomias com grafite (A), utilização da broca trefina (B), defeito ósseo central de 5mm e lojas dos dispositivos metálicos (C), remoção do enxerto autógeno (D), adaptação dos dispositivos metálicos e da HA (E) e adaptação do enxerto ósseo (F).

4.4 Preparo histológico

O preparo das peças foi realizado no Laboratório de Histopatologia "Prof. Dr. J.J.D. Barbachan" do setor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS e teve auxílio financeiro do CNPq, Propesq e Pronex. Após fixação, as peças foram descalcificadas em uma solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20%. Procedeu-se a remoção dos dispositivos metálicos e secção longitudinal mediana da calvária com uso de uma navalha descartável para micrótomos, sendo que o traço da secção incluiu a parte central das duas ostectomias criadas para sepultamento dos ímãs, conforme a figura 7. A seguir as peças foram processadas conforme protocolo de inclusão em parafina e coloração por meio de hematoxilina e eosina (HE). Uma das metades da calvária foi utilizada para realização de três cortes histológicos longitudinais contíguos com espessura de 4 μm , incluindo os dois orifícios das ostectomias, a partir da secção longitudinal mediana, dispostos em seqüência em uma lâmina de vidro.

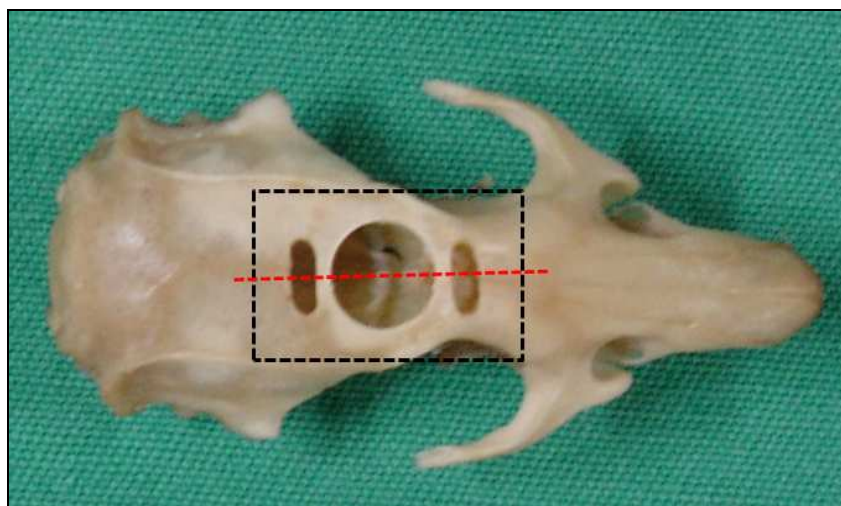


Figura 7: Esquema da obtenção da peça para confecção das lâminas histológicas. Área delimitada pela linha pontilhada preta indica a peça removida para posterior descalcificação. Linha pontilhada vermelha aponta a secção longitudinal mediana da peça após a descalcificação.

4.5 Análise dos resultados

4.5.1 Análise histológica

Uma das metades de cada calvária obtida no preparo histológico foi utilizada para a realização das análises histométrica e histológica descritiva. A outra metade somente foi utilizada nos casos em que a primeira apresentou problemas técnicos. As imagens das peças selecionadas para as análises foram obtidas através de uma câmera de vídeo Olympus® (modelo Qcolor 5, Coollet, 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) em aumento de 40, 100 e 200X. Este equipamento foi obtido pela Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS com o apoio financeiro da Fapergs, PROAP04/2005, número do Processo 0410882.

4.5.1.1 Análise histométrica

Posteriormente à delimitação da área total do defeito ósseo, foi evidenciado o tecido ósseo neoformado, utilizando-se o software Axiovision® (versão 4.6.3) (Figura 8). A quantidade de osso neoformado foi expressa por meio da porcentagem da área do defeito original. 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, um período de calibração intra-examinador foi efetivado. Num intervalo de sete dias, o examinador

realizou duas análises histológicas de dez lâminas. Foi calculada a correlação entre as duas análises histométricas através do coeficiente de correlação intraclasse, encontrando-se o valor de 0,99. A escolha dos cortes histológicos para análise ocorreu de forma aleatória. Todas as lâminas foram codificadas isoladamente durante o preparo histológico de forma que, durante as análises histométrica e histológica descritiva, o examinador desconhecesse a qual grupo pertencia o corte histológico analisado. Os valores de porcentagens obtidos dos cortes de cada calvária foram utilizados para fins estatísticos.

4.5.1.2 Análise histológica descritiva

Para a análise histológica descritiva, os cortes foram examinados em relação à presença ou ausência de neoformação óssea, de tecido de granulação e de reações inflamatórias do tipo corpo estranho. A correlação entre as análises descritivas foi calculada através do valor de kappa. Respectivamente, os valores para neoformação óssea, tecido de granulação e reações inflamatórias foram de 0,8, 1,0 e 1,0. Foi estudada a interface entre o enxerto ou implante e o tecido circundante a estes. Também foi englobada na análise descritiva a área ocupada pelos dispositivos de titânio e pelos ímãs.

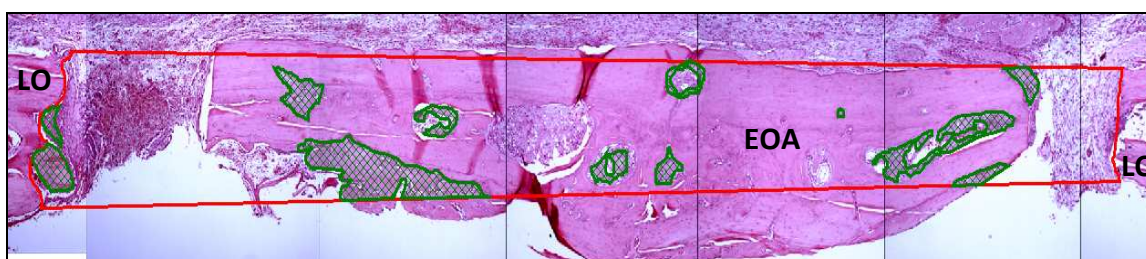


Figura 8: Histometria. Corte histológico evidenciando o enxerto ósseo autógeno (EOA), os limites do defeito ósseo (LO), a área total do defeito (área delimitada pela linha vermelha) e área de tecido ósseo neoformado (somatório das áreas verdes).

4.5.2 Atividade de fosfatase alcalina

A análise bioquímica da atividade da enzima fosfatase alcalina foi realizada no Laboratório 34, no Grupo de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS. Foram coletados 1000 µl de sangue por meio de decapitação do rato e coleta por funil. O sangue coletado foi centrifugado obtendo-se o plasma sanguíneo e através de 50 µl deste foi realizada a dosagem da enzima fosfatase alcalina. A coleta sanguínea e a mensuração enzimática foram realizadas em 15, 30 e 60 dias pós-operatórios em todos os animais envolvidos no estudo. Para o cálculo da atividade enzimática foram utilizados os reagentes do kit Laboratorial Labtest[®][3], tendo como substrato a timolftaleína monofosfato. Esta é um substrato de éster de ácido fosfórico sendo hidrolisada pela enzima fosfatase alcalina. A reação de hidrólise do substrato é cessada pela adição de carbonato de sódio (94 mmol/l) e hidróxido de sódio (250 mmol/l) fazendo com que o produto da hidrólise se core de azul permitindo a mensuração em espectrofotômetro. A mensuração da atividade da enzima foi realizada em espectrofotômetro a 590 nm de acordo com o método proposto por Roy (Roy, 1970), sendo expressa em U/l.

4.5.3 Avaliação radiográfica

Radiografias das calvárias foram realizadas com filme periapical nos três tempos operatórios, visando verificar a estabilidade do enxerto e dos ímãs. As tomadas radiográficas foram realizadas a uma distância de 30 cm entre a

[3] Labtest Diagnóstica S.A., MG, Brasil.

película e o foco do aparelho (Corsetti, 2005). Para fins de orientação, junto à calvária estava posicionada uma pinça com abertura de 5 mm. Uma incidência, com 0,1 segundo de tempo de exposição, foi realizada superiormente em cada calvária, com o feixe de raios “X” perpendicular ao defeito ósseo. Os filmes foram processados pelo método automático.

4.5.4 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS (SPSS version 16 for Macintosh). 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 preenchimento ósseo após transformação inversa. Para a atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica foi utilizado análise variância de uma via seguida pelo *post-hoc* teste de Duncan. A escolha de tais testes estatísticos foi baseada em consultorias técnicas particulares e junto ao setor de Epidemiologia e Bioestatística do GPPG/HCPA.

4.6 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) e foi submetido a parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS, sob o processo número 261/08, sendo considerado aprovado (Anexo III).

5. RESULTADOS

Dois animais foram excluídos do presente trabalho por motivos de infecção pós-operatória e deslocamento dos ímãs durante o período pós-operatório. Os animais pertenciam respectivamente aos grupos “Aut” de 30 dias e “Aut+Mag” de 15 dias, permanecendo estes grupos com quatro animais.

5.1 Análise histológica

5.1.2 Análise histométrica

Os resultados da análise histométrica estão expressos na tabela 2. Para os grupos de enxerto ósseo autógeno, após 15 dias do procedimento cirúrgico, os valores da porcentagem de preenchimento do defeito crítico com osso neoformado foram de, respectivamente, $7,70 \pm 2,89$ e $9,30 \pm 5,90$ para os defeitos com e sem influência de campo magnético. Aos 30 dias pós-operatórios tais porcentagens de preenchimento foram de $22,20 \pm 8,43$ e $16,52 \pm 4,60$, respectivamente. Já em 60 dias após o procedimento cirúrgico, o grupo sob efeito de campo magnético apresentou porcentagem de preenchimento de $26,34 \pm 11,73$, enquanto o grupo sem a influência magnética apresentou $20,23 \pm 5,68$. Para os grupos envolvendo HA, no tempo de 15 dias após o procedimento cirúrgico, os defeitos sob influência de campo magnético e sem influência do magnetismo apresentaram respectivamente os valores de $1,97 \pm 1,91$ e $3,08 \pm 4,43$ para porcentagem de preenchimento com osso neoformado. Tais valores foram de $5,17 \pm 4,85$ e $2,06 \pm 2,47$ para o tempo de 30 dias pós-operatórios e $8,87 \pm 9,89$ e $7,36 \pm 4,56$ quando o defeito foi analisado 60 dias após a intervenção cirúrgica. Dentro de cada tempo operatório, a presença

do campo magnético não promoveu diferenças estatísticas na porcentagem de osso neoformado. Quando comparados os grupos de enxerto ósseo com os de HA, os primeiros apresentaram maiores valores de preenchimento ósseo em 30 e 60 dias.

Quando analisados longitudinalmente, os resultados apontaram que o grupo de enxerto ósseo sob influência magnética apresentou uma variação significativa na quantidade de osso neoformado de 15 para 30 dias, fato observado no mesmo grupo sem influência do campo magnético somente em 60 dias. Os grupos de HA não apresentaram variação no preenchimento ósseo ao longo do tempo.

Tabela 2: Análise histométrica da neoformação óssea nos defeitos críticos (média percentual \pm desvio-padrão).

	15 dias			30 dias			60 dias		
	Média	DP	*	Média	DP	*	Média	DP	*
Aut+Mag	7,70	2,89	A	22,20	8,43	A	26,34	11,73	A
**	a			b			b		
Aut	9,30	5,90	AB	16,52	4,60	A	20,23	5,68	A
**	a			ab			b		
HA+Mag	1,97	1,91	AC	5,17	4,85	B	8,87	9,89	B
**	a			a			a		
HA	3,08	4,43	A	2,06	2,47	B	7,36	4,56	B
**	a			a			a		

* Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos em cada tempo experimental ($p < 0,05$, Bonferroni);

** Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tempos experimentais dentro de cada grupo ($p < 0,05$, Bonferroni).

As figuras de 9 a 14 demonstram a análise histométrica de defeitos ósseos preenchidos com enxerto ósseo autógeno nos três tempos operatórios.

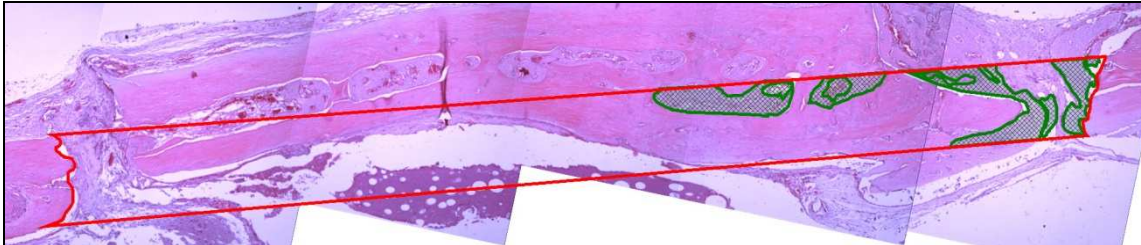


Figura 9: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

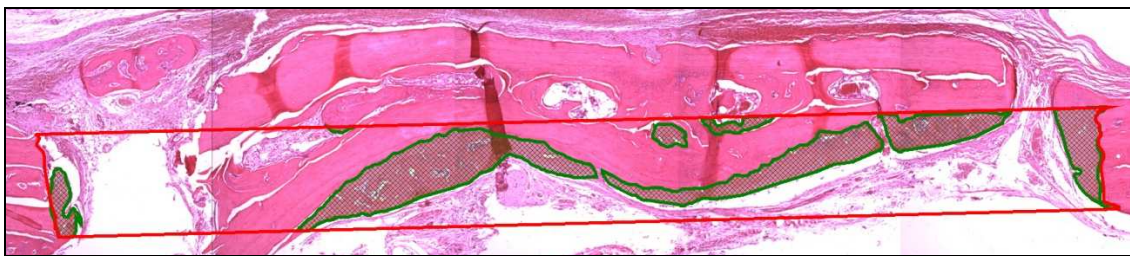


Figura 10: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).



Figura 11: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

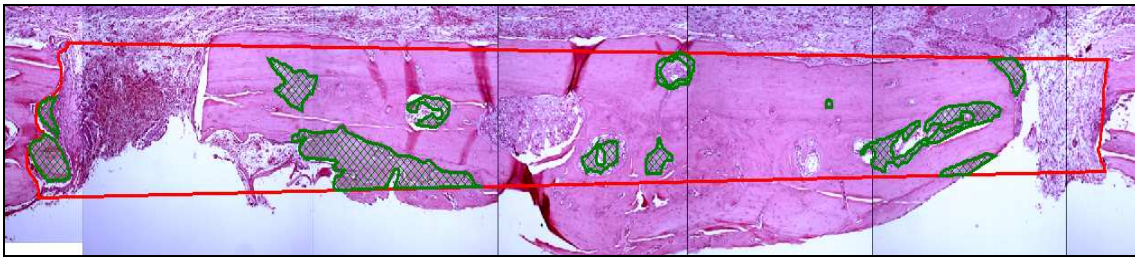


Figura 12: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

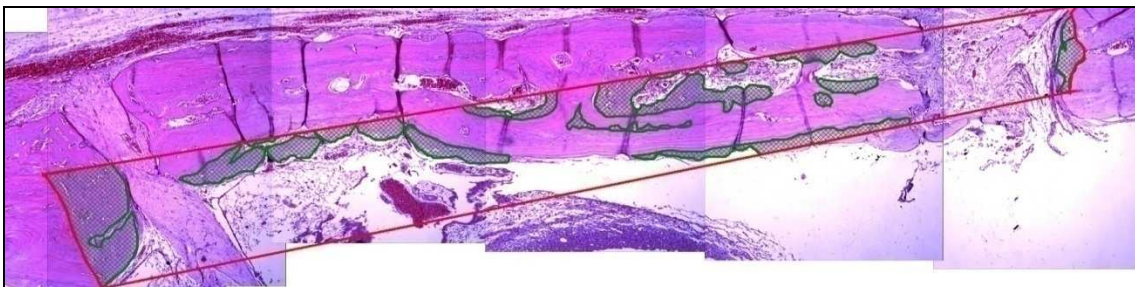


Figura 13: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

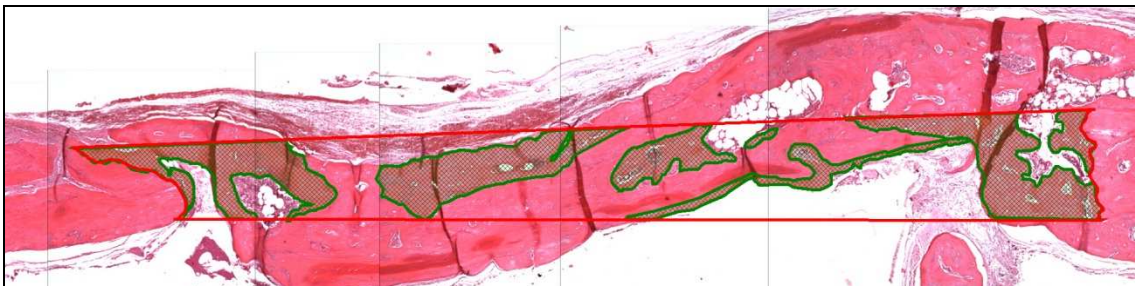


Figura 14: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de enxerto autógeno e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

As figuras de 15 a 20 demonstram a análise histométrica de defeitos ósseos preenchidos com HA nos três tempos operatórios.

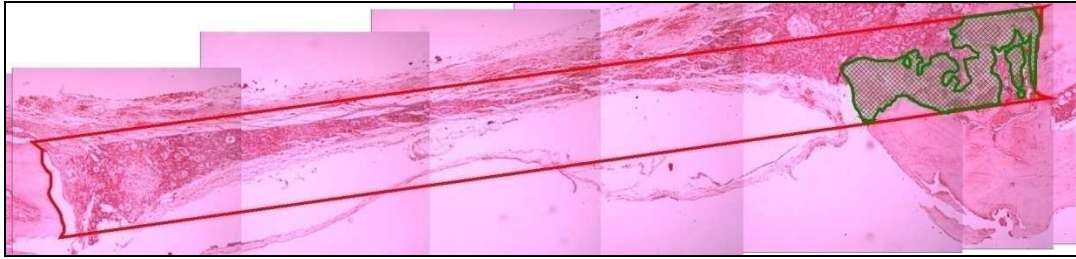


Figura 15: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de HA sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

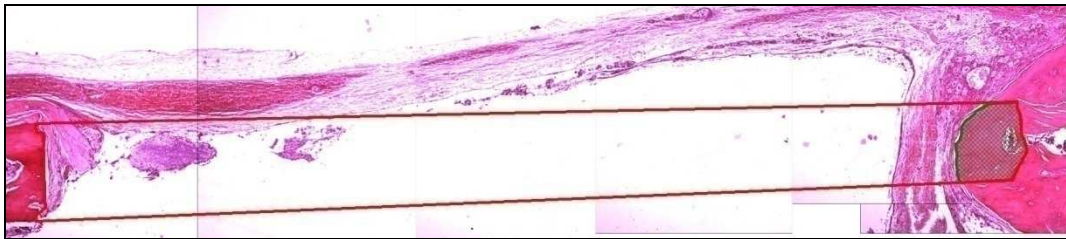


Figura 16: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de HA sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).



Figura 17: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de HA sem aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

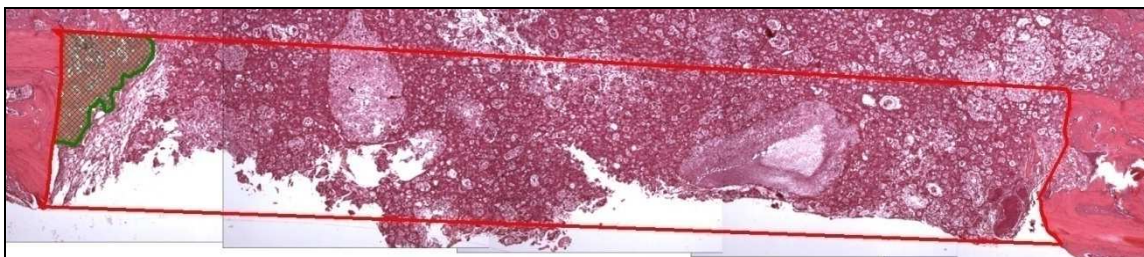


Figura 18: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 15 dias pós-operatórios. Presença de HA e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

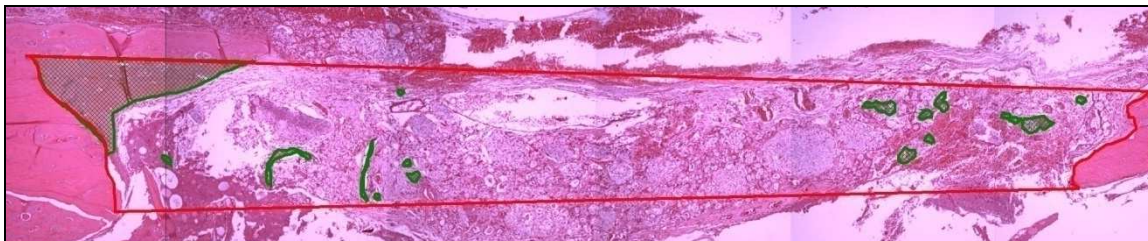


Figura 19: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 30 dias pós-operatórios. Presença de HA e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

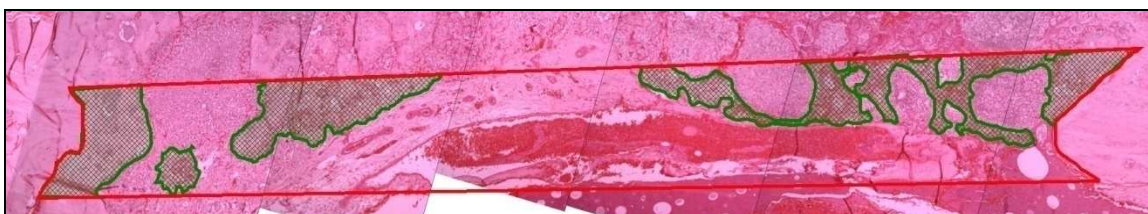


Figura 20: Análise histométrica de defeito crítico com 5 mm realizado na calvária de rato em 60 dias pós-operatórios. Presença de HA e aplicação de campo magnético. Área delimitada por linha vermelha indica defeito original e somatório das áreas verdes indica osso neoformado. Aumento de 40 X (hematoxilina e eosina).

5.1.2 Análise histológica descritiva

As figuras de 21 a 32 evidenciam análises histológicas descritivas das intervenções realizadas nos diferentes tempos. Observou-se fechamento total do defeito ósseo em três calvárias; uma pertencente ao grupo “Aut+Mag” de 30 dias, uma no grupo “Aut+Mag” de 60 dias e outra que recebeu implante de HA com magnetismo, em 60 dias. Não foi observado fechamento do defeito crítico nos animais sem a presença de campo magnético.

Em nenhum corte histológico analisado foram encontrados sinais de rejeição ao enxerto ósseo, ao material implantado ou aos dispositivos metálicos

instalados. Observou-se, tanto nos magnetos quanto nas peças de titânio, em todos os tempos operatórios, o envolvimento dos dispositivos por um tecido conjuntivo fibroso, sem elementos de reação inflamatória. Foram observadas diferentes quantidades de osso neoformado junto aos dispositivos metálicos, tanto nos discos de titânio quanto nos magnetos instalados. Dentro do mesmo grupo, observou-se importante variação na quantidade de neoformação óssea junto aos dispositivos. Nos grupos que receberam implante de HA, evidenciou-se, ainda, a presença de grânulos do material no interior da loja óssea que fixava os dispositivos metálicos (Figura 27A).

A neoformação óssea observada na área do defeito crítico e nas suas imediações, nos grupos que receberam enxerto ósseo autógeno, apresentou-se mais evidente quanto mais tardio o tempo de observação. O osso neoformado foi caracterizado por intensa vascularização, presença de osteoplastos volumosos e osteoblastos alinhados sugerindo atividade osteoblástica (Figura 21B). Foi observada neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo, junto ao limite do defeito ósseo e algumas áreas de formação óssea ectópica (Figuras 22B e 24B). Em algumas calvárias, ocorreu neoformação óssea promovendo a integração do enxerto ósseo com o limite do defeito ósseo, principalmente em 60 dias pós-operatórios (Figura 26B). Também foi evidenciada neoformação óssea no interior do enxerto ósseo, em todos os tempos operatórios (Figuras 9-14). Não foram observadas diferenças no padrão ósseo entre os grupos com e sem a presença de campo magnético, embora os cortes histológicos sugiram que aqueles sob influência do magnetismo tenham apresentado uma formação óssea mais exuberante em 30 dias pós-operatórios. Na grande maioria dos cortes analisados, em todos os

tempos operatórios, a região entre o enxerto ósseo autógeno e o limite do defeito ósseo foi caracterizada pela presença de tecido de granulação, com formação vascular e infiltrado linfo-plasmocitário (Figuras 21C, 22C, 23C, 26C). Em alguns casos observou-se também a presença de tecido fibroso (Figuras 25B, 25C).

Nos grupos que receberam o implante de HA granulada não foi possível observar com clara distinção uma maior neoformação óssea nos grupos de pós-operatório mais tardio. Também não foi possível evidenciar diferenças importantes no defeito ósseo entre os grupos com e sem a aplicação de campo magnético. Na grande maioria dos casos, a neoformação óssea foi observada a partir do limite do defeito ósseo, através de osteocondução promovida pelos grânulos de HA, em todos os tempos operatórios (Figuras 27C, 28C, 30C). Em alguns casos, após 60 dias do procedimento cirúrgico, foi observada neoformação óssea no interior do defeito ósseo, nas intervenções com e sem campo magnético (Figuras 29C, 32C). A presença de osso neoformado apresentou grande variação entre os animais dentro do mesmo grupo. Foram constatadas calvárias com quantidades mínimas de osso, ao passo que outras, do mesmo grupo experimental, apresentaram neoformação óssea considerável. Observou-se, em todos os tempos operatórios, a presença de tecido de granulação e tecido fibroso no interior do defeito ósseo e, em alguns casos, entre os grânulos do material (Figuras 28B, 30B, 31C). O implante de HA foi delimitado por um tecido fibroso ao longo do defeito ósseo (Figura 27B). Em todos os tempos experimentais também foi constatada a presença de inúmeros grânulos de HA localizados exteriormente aos limites do defeito ósseo (Figuras 28C, 30C, 31C, 32C). Além disso, em muitas calvárias, apenas

uma delgada camada do implante estava presente ao longo do defeito ósseo (Figuras 27B, 31B).

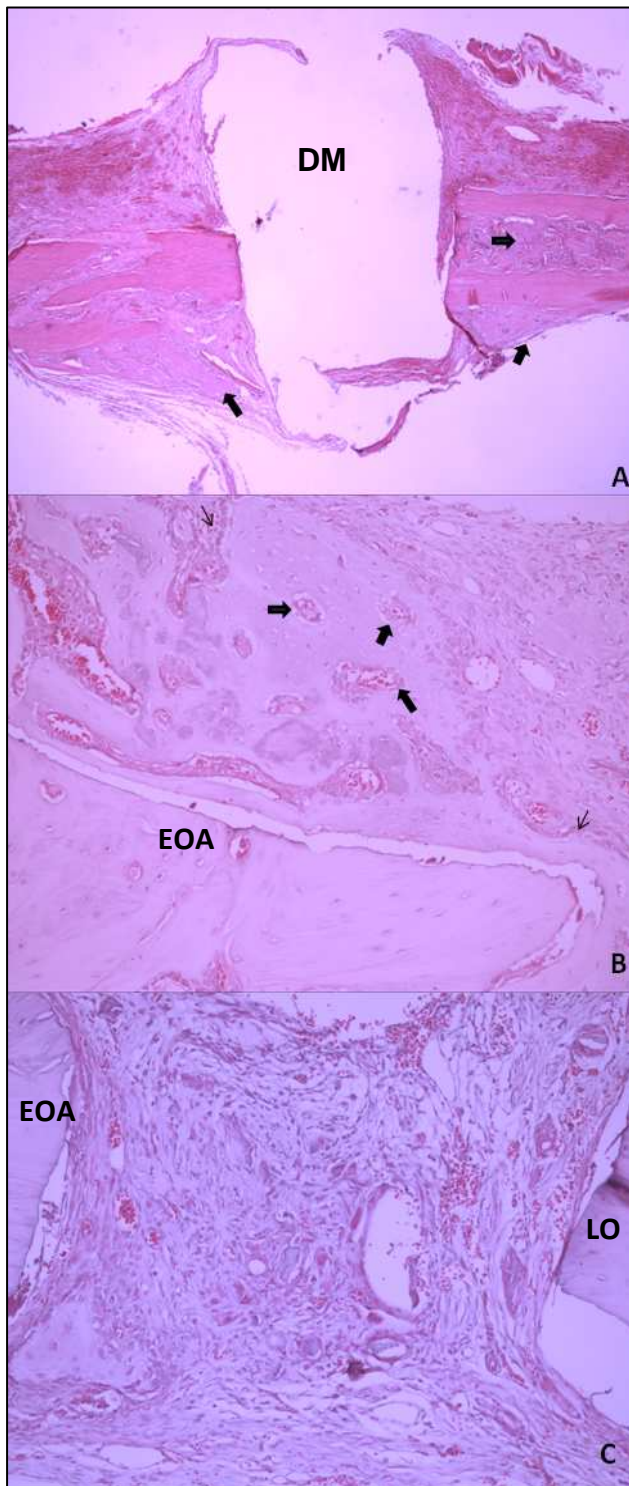


Figura 21: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autógeno sem campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico de titânio (DM). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Osso neoformado justaposto ao enxerto ósseo (EOA). Setas largas apontam intensa vascularização. Setas menores indicam neoformação óssea; aumento de 200X (B). Tecido de granulação presente entre o enxerto ósseo (EOA) e o limite do defeito crítico (LO); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

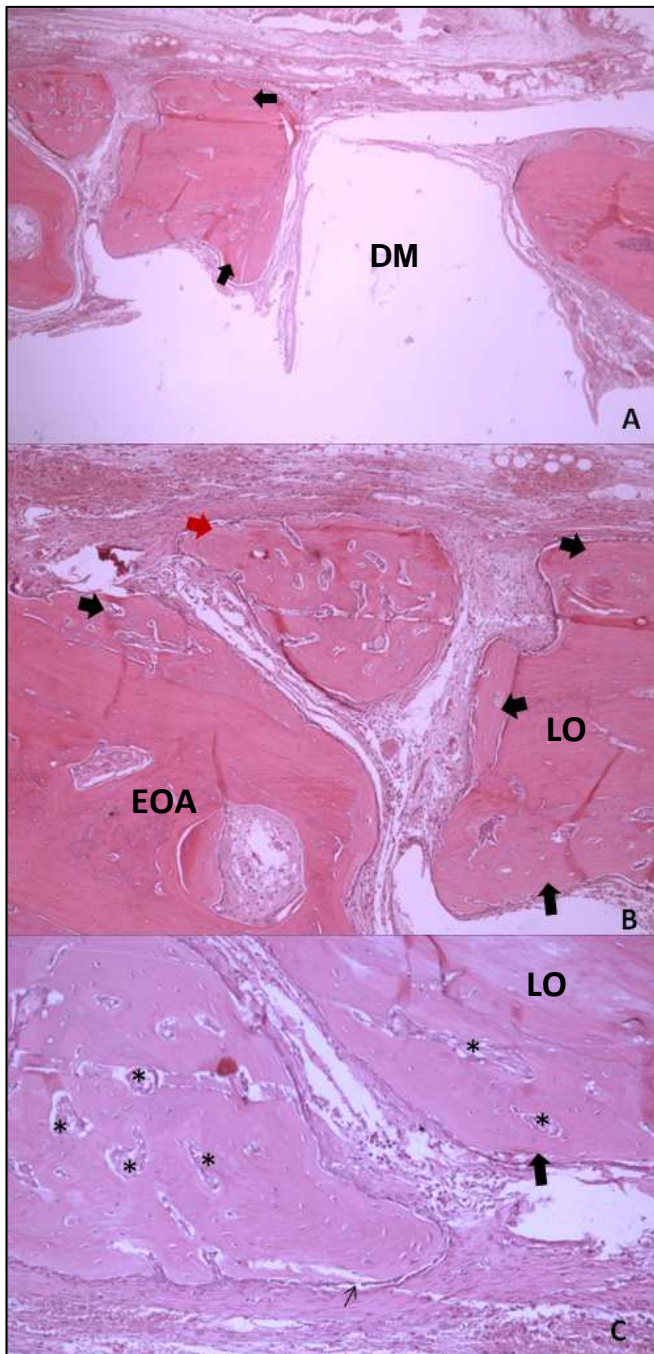


Figura 22: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo sem campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico de titânio (DM). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas pretas indicam neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA) e ao limite do defeito ósseo (LO). Seta vermelha aponta neoformação óssea ectópica; aumento de 100X (B). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e osso neoformado a partir do enxerto ósseo. Intensa vascularização em osso neoformado (*). Setas apontam neoformação óssea, aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina).

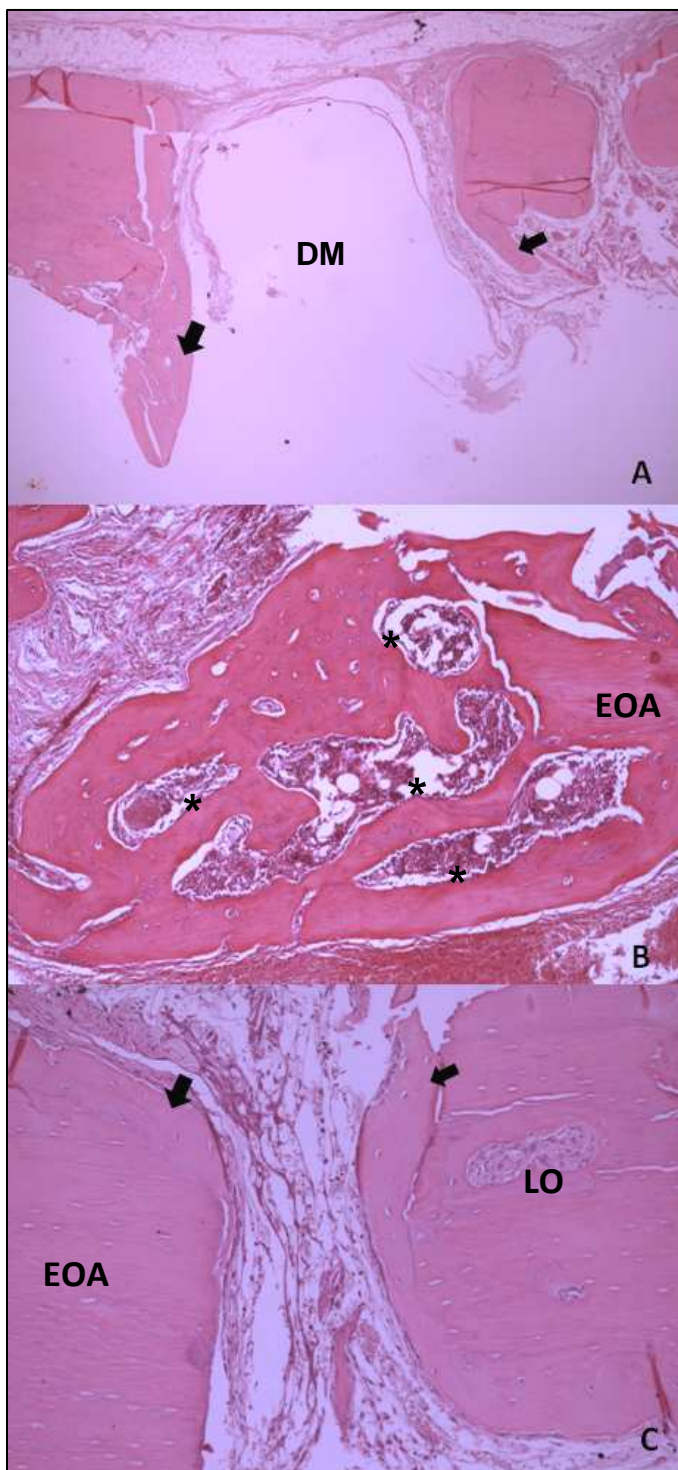


Figura 23: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo sem campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico de titânio (DM). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA) com intensa vascularização (*); aumento de 100X (B). Setas apontam neoformação óssea. Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

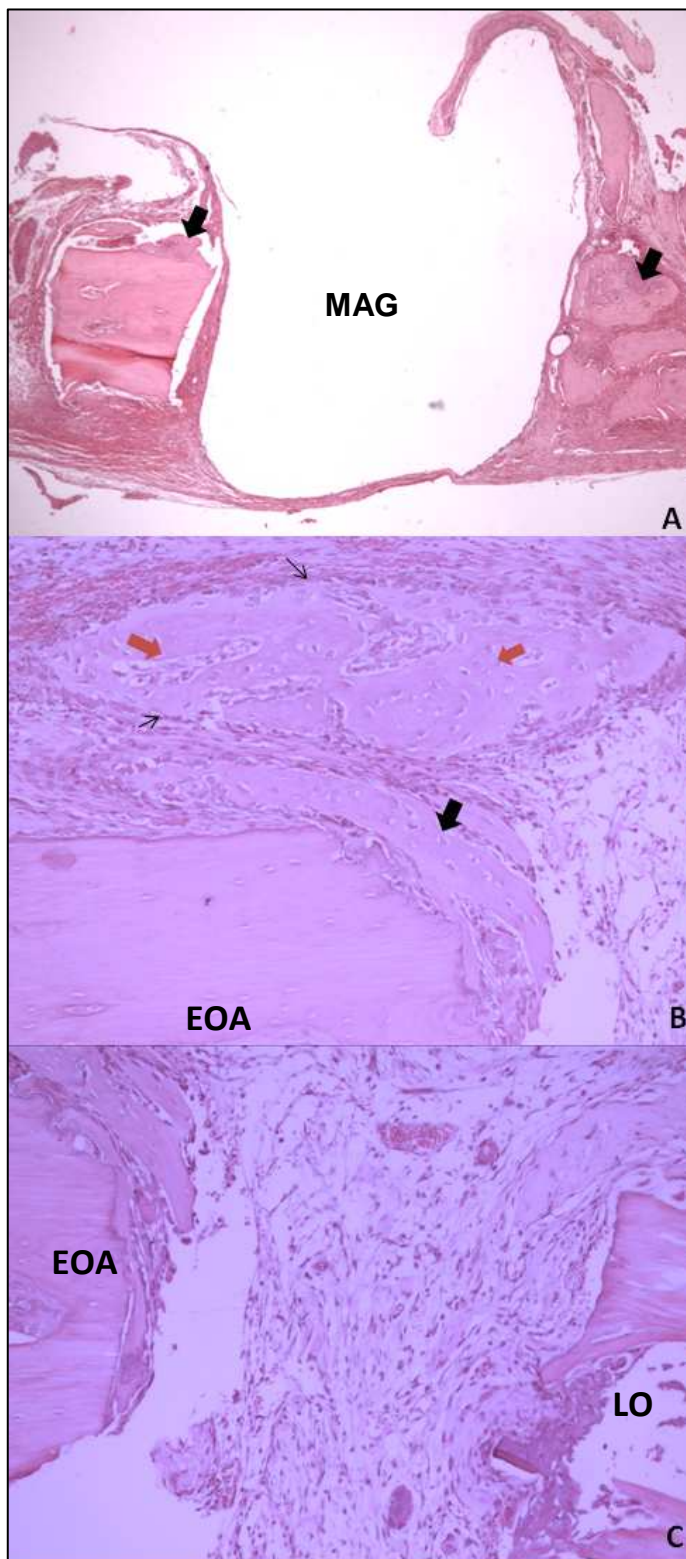


Figura 24: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo com campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Seta preta larga indica neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA). Setas vermelhas apontam formação óssea ectópica. Setas menores evidenciam osteoblastos alinhados; aumento de 200X (B). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

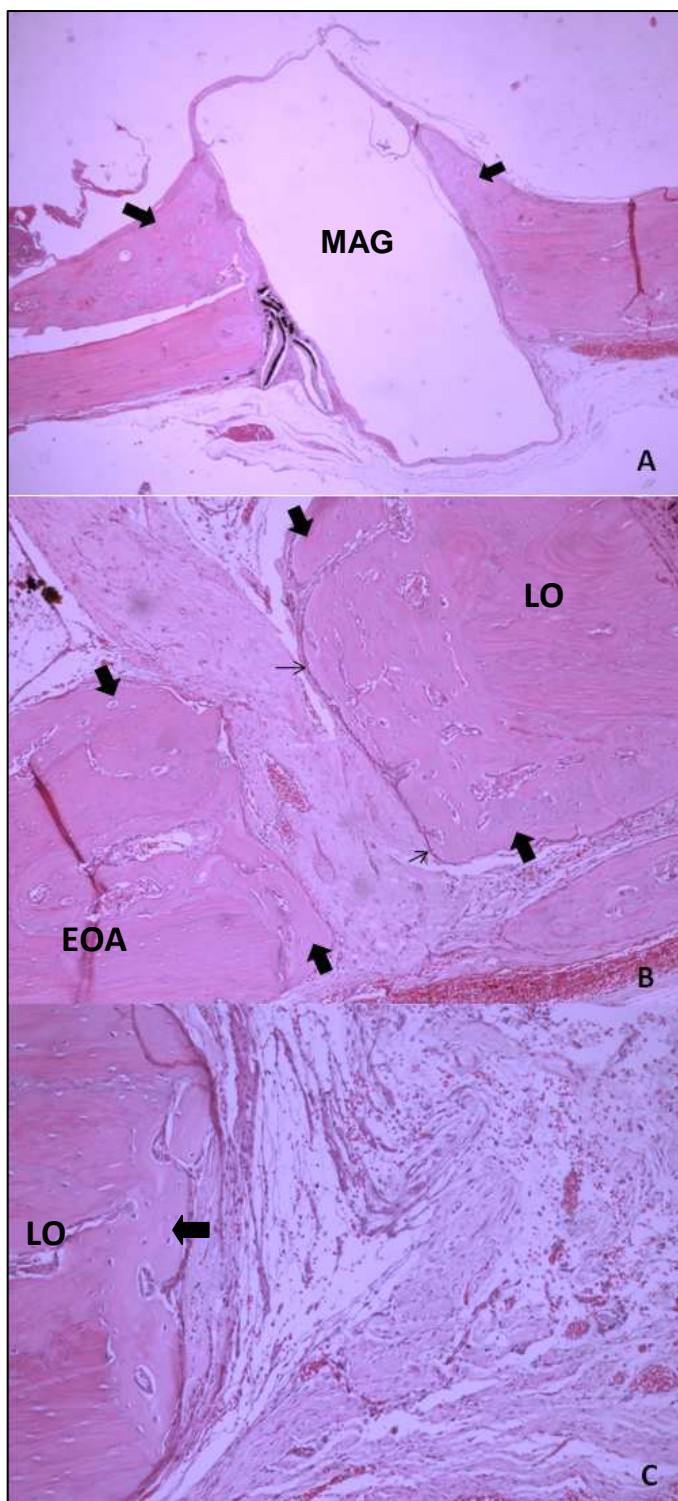


Figura 25: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo com campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas largas indicam neoformação óssea justaposta ao enxerto ósseo (EOA) e ao limite do defeito ósseo (LO). Setas menores apontam osteoblastos alinhados; aumento de 100X (B). Seta larga indica neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo; aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina).

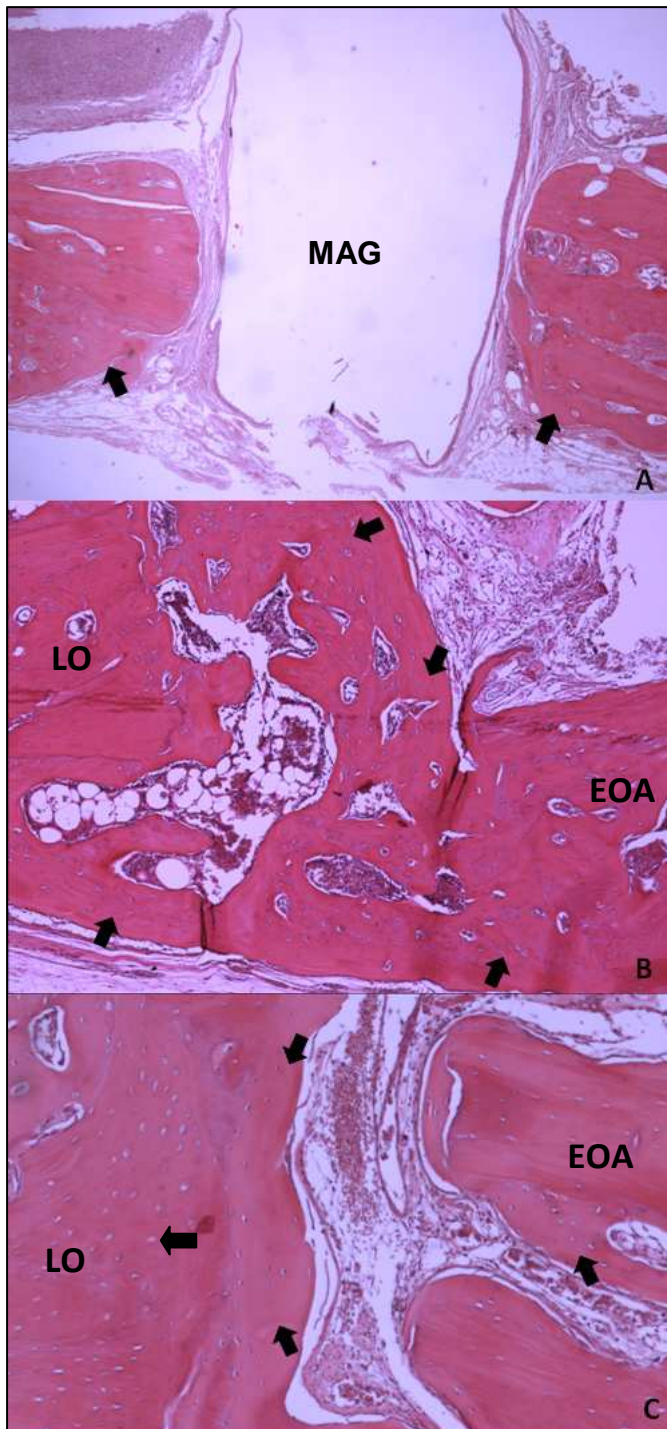


Figura 26: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam enxerto ósseo autólogo com campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas largas indicam neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas largas indicam neoformação óssea promovendo união entre enxerto ósseo (EOA) e limite do defeito ósseo (LO); aumento de 100X (B). Setas largas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA). Tecido de granulação entre o limite do defeito ósseo (LO) e enxerto ósseo (EOA); aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina).

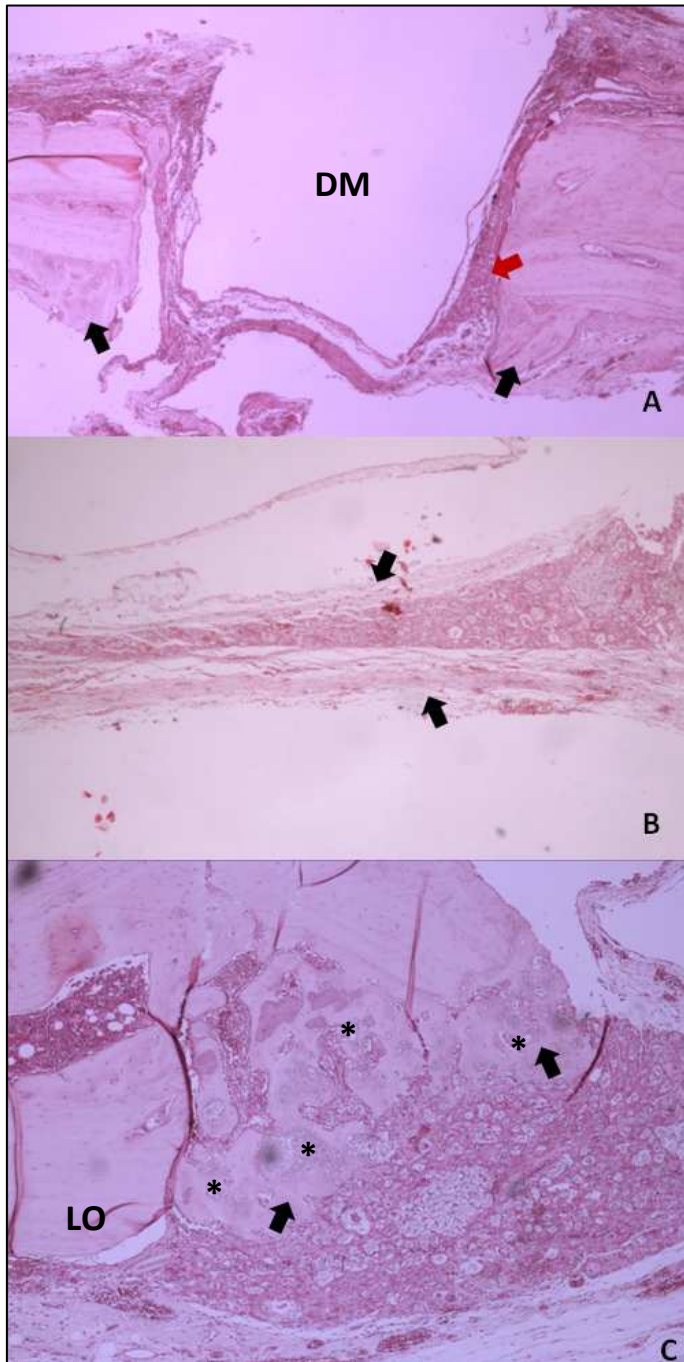


Figura 27: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA sem campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico (DM). Setas pretas indicam neoformação óssea. Seta vermelha aponta deslocamento de grânulos de HA para o interior da loja óssea; aumento de 40X (A). Setas largas indicam tecido conjuntivo fibroso envolvendo implante de HA. Observa-se delgada camada do material implantado; aumento de 40X (B). Setas largas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*) e tecido de granulação envolvendo os grânulos do material; aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

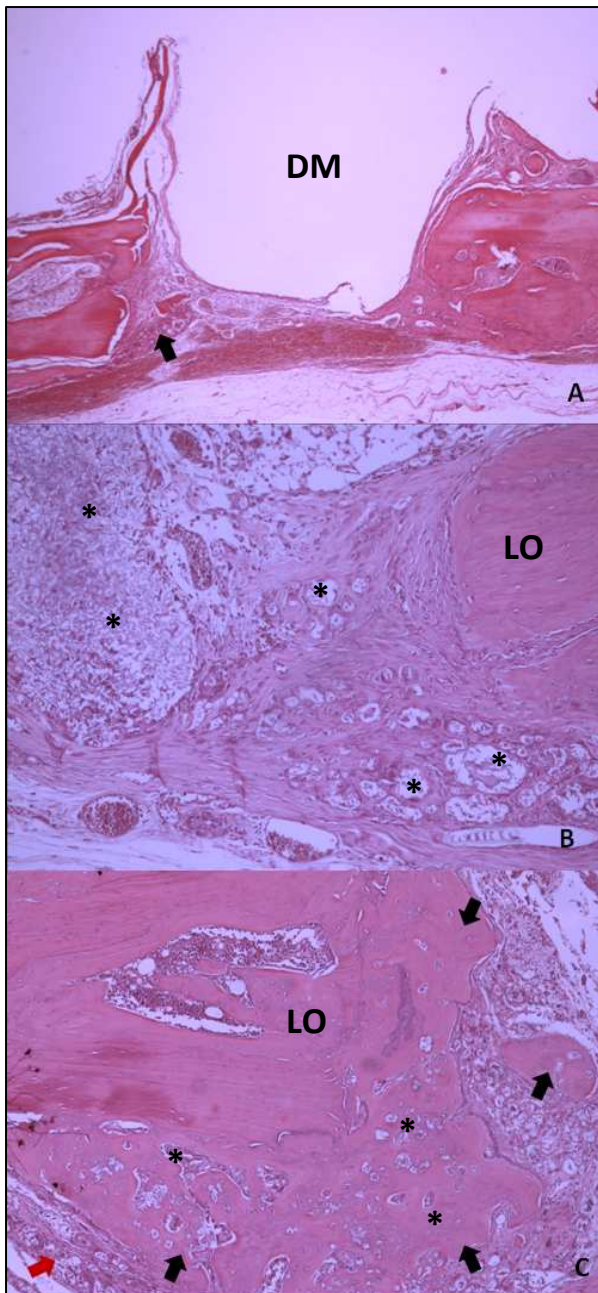


Figura 28: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA sem campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico (DM). Seta preta aponta deslocamento de grânulos de HA para o interior da loja óssea; aumento de 40X (A). Escassa neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se tecido de granulação e tecido fibroso no interior do defeito ósseo. Grânulos de HA (*); aumento de 100X (B). Setas pretas indicam neoformação óssea. Seta vermelha aponta grânulos do material deslocados exteriormente ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

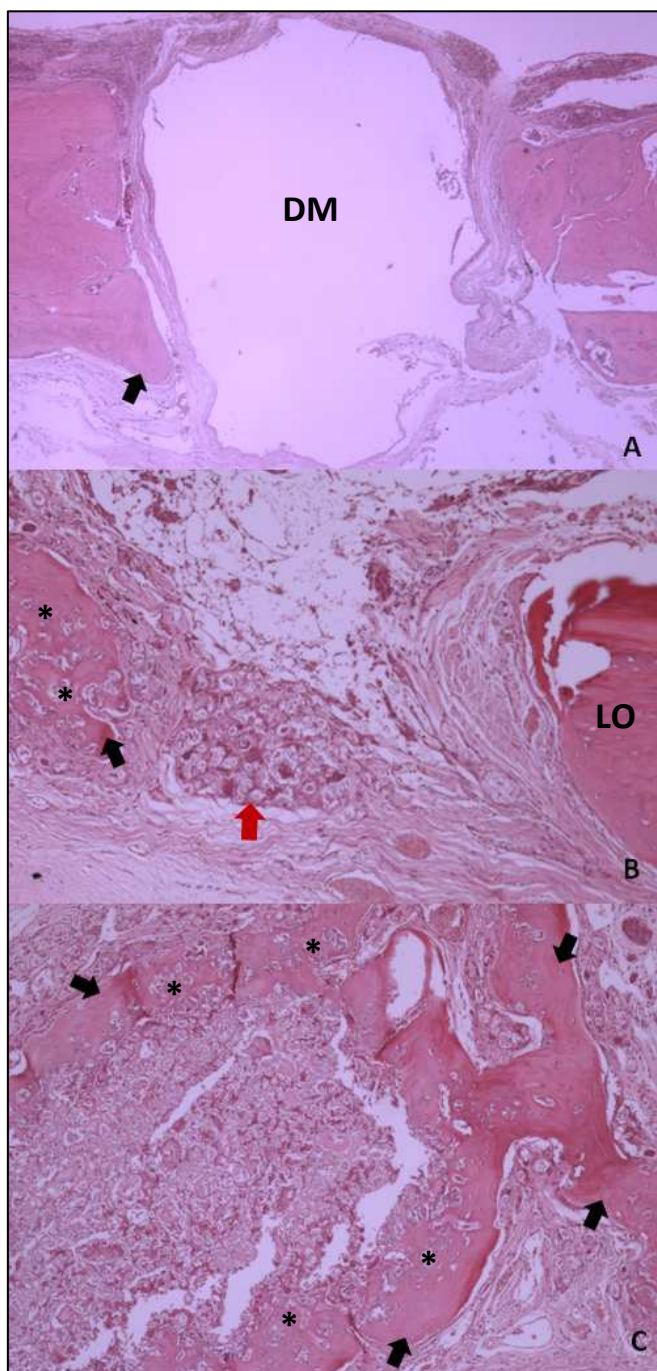


Figura 29: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA sem campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o dispositivo metálico (DM). Seta preta indica neoformação óssea; aumento de 40X (A). Seta preta indica neoformação óssea e osteocondução. Seta vermelha indica quantidade limitada de grânulos de HA. Observa-se tecido de granulação e tecido fibroso; aumento de 100X (B). Setas largas indicam neoformação óssea no interior do defeito ósseo. Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*) e tecido de granulação envolvendo grânulos de HA; aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

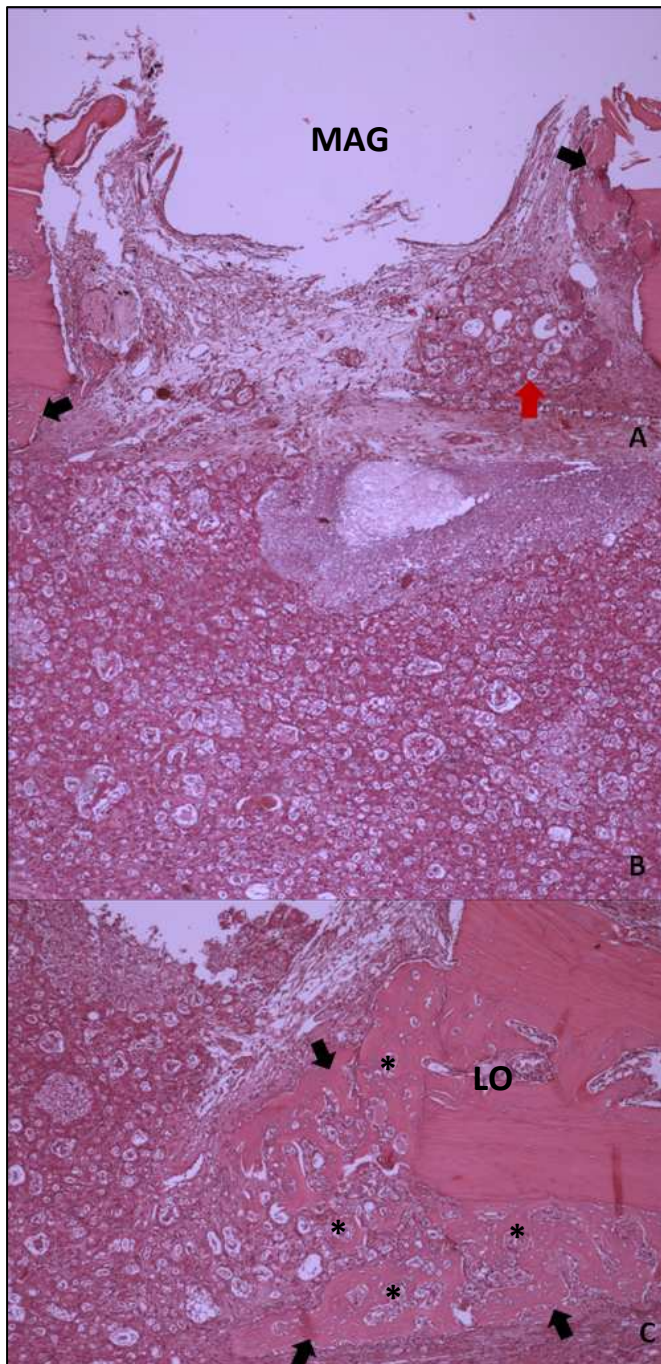


Figura 30: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA com campo magnético em 15 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Setas pretas indicam neoformação óssea. Seta vermelha aponta deslocamento de grânulos de HA para o interior da loja óssea; aumento de 40X (A). Observa-se presença de tecido de granulação envolvendo os grânulos de HA no interior do defeito ósseo; aumento de 100X (B). Setas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO). Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*) e tecido de granulação envolvendo os grânulos de HA; aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

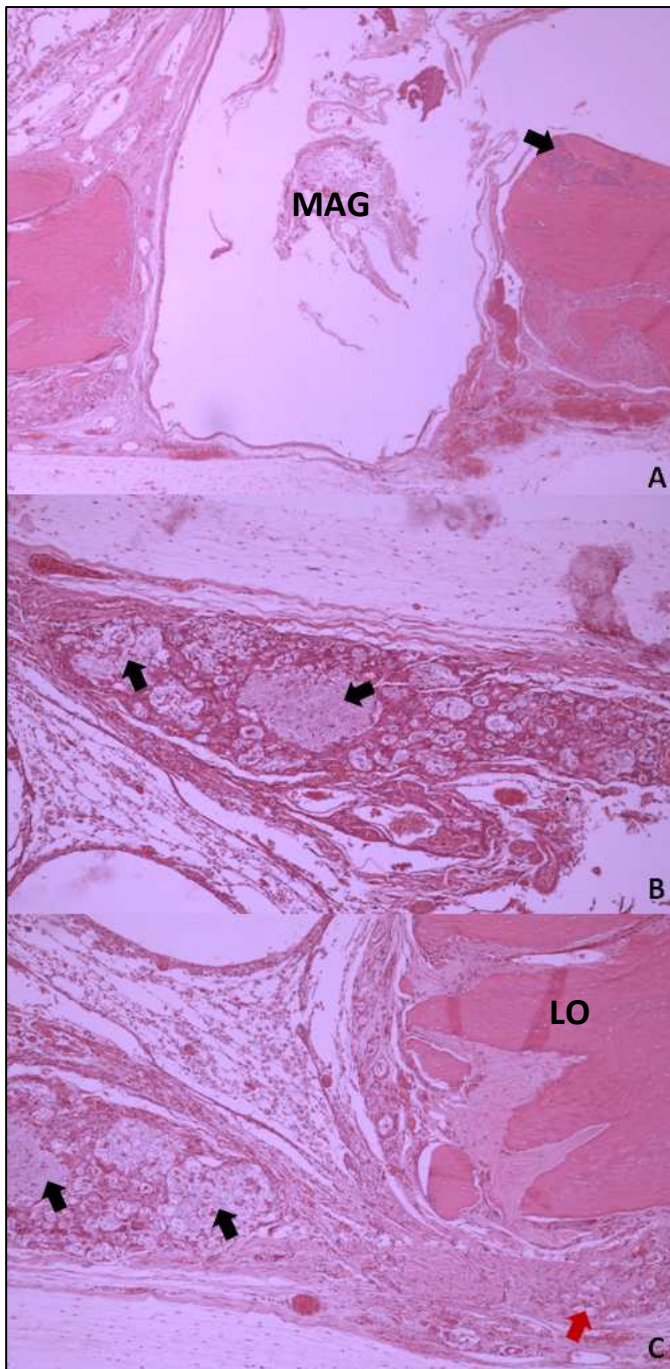


Figura 31: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA com campo magnético em 30 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Seta preta indica neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas indicam grânulos de HA envolvidos por tecido de granulação delimitando o implante. Observa-se delgada camada do material implantado; aumento de 100X (B). Setas pretas indicam grânulos de HA envoltos por tecido de granulação. Presença de tecido fibroso e delgada camada de material implantado. Seta vermelha aponta deslocamento de grânulos de HA exteriormente ao limite do defeito ósseo (LO); aumento de 100X (C) (hematoxilina e eosina).

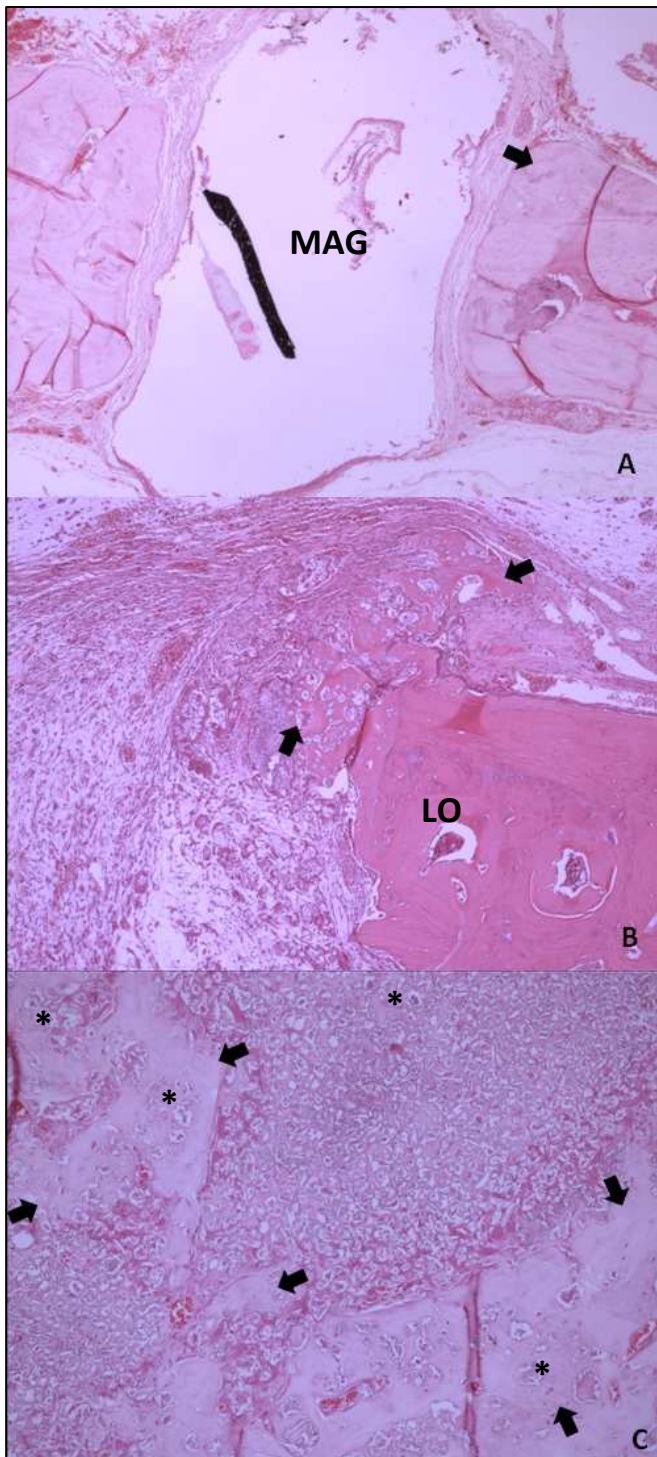


Figura 32: Cortes histológicos da calvária de animais que receberam HA com campo magnético em 60 dias pós-operatórios. Loja óssea onde foi instalado o magneto (MAG). Seta indica neoformação óssea; aumento de 40X (A). Setas indicam neoformação óssea junto ao limite do defeito ósseo (LO) envolvendo grânulos de HA. Observam-se tecidos fibroso e de granulação; aumento de 100X (B). Setas largas indicam neoformação óssea no interior do defeito ósseo. Observa-se osteocondução com grânulos de HA envolvidos por tecido ósseo (*); aumento de 200X (C) (hematoxilina e eosina).

5.2 Atividade da enzima fosfatase alcalina

Os resultados referentes à análise da atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica estão expressos na figura 33. O grupo Naive, composto por cinco animais que não foram submetidos a nenhuma intervenção cirúrgica, apresentou atividade enzimática de $20,02 \pm 1,87$. Os grupos que receberam enxerto ósseo autógeno apresentaram atividade enzimática estatisticamente superior ao grupo Naive, com exceção do grupo "Aut+Mag" de 15 dias. O valor encontrado para este grupo foi de $23,67 \pm 2,63$, ao passo que em 30 e 60 dias os valores para tal intervenção foram de, respectivamente, $30,66 \pm 4,17$ e $29,09 \pm 5,03$. Os animais que receberam apenas enxerto ósseo autógeno sem a presença de campo magnético apresentaram os seguintes valores para atividade enzimática em 15, 30 e 60 dias, respectivamente: $27,65 \pm 4,22$, $35,01 \pm 1,44$ e $25,99 \pm 3,92$. Quando comparados os grupos de enxerto ósseo autógeno com e sem magnetismo, observou-se diferença estatisticamente significativa somente no tempo de 30 dias ($p < 0,05$), com maior atividade enzimática para o grupo sem campo magnético. Todos os grupos que receberam implante de HA com ou sem magnetismo apresentaram atividade enzimática estatisticamente superior ao grupo Naive. Os valores encontrados para a intervenção com a presença de campo magnético foram de $26,02 \pm 3,15$, $33,07 \pm 7,19$ e $27,92 \pm 2,11$ para, respectivamente, 15, 30 e 60 dias. Nos mesmos tempos operatórios, os grupos que receberam apenas o implante de HA apresentaram os seguintes valores de atividade enzimática: $27,26 \pm 5,45$, $40,56 \pm 5,02$ e $26,35 \pm 4,35$. Quando comparados os grupos de implante de HA com e sem magnetismo, observou-se diferença estatisticamente significativa

somente no tempo de 30 dias ($p < 0,05$), com maior atividade enzimática para o grupo sem campo magnético.

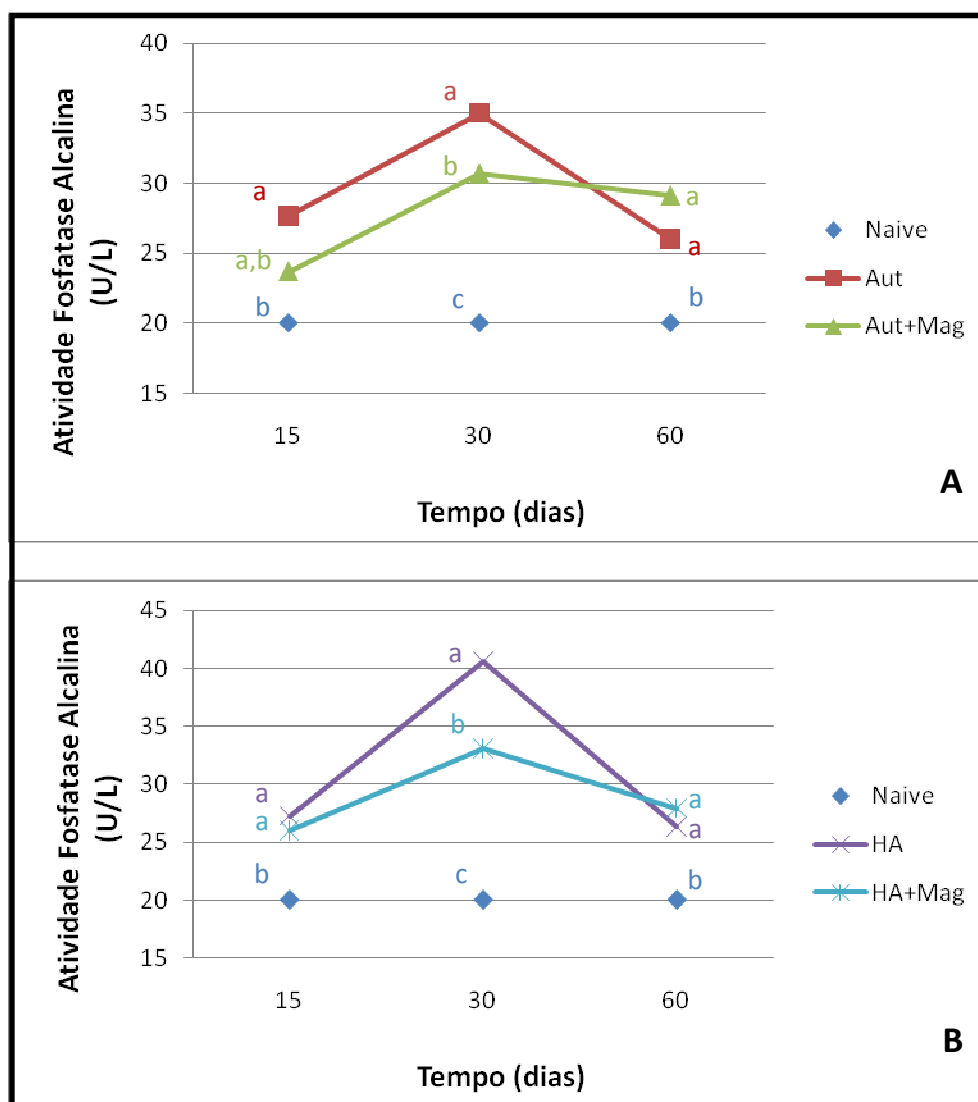


Figura 33: Atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica em função do tempo para as intervenções com enxerto ósseo autólogo (A) e com HA (B). Observa-se pico de atividade enzimática em 30 dias pós-operatórios. Dentro do mesmo tempo de observação, letras diferentes indicam diferença significativa (ANOVA, $p < 0,05$).

5.3 Avaliação radiográfica

Através das radiografias realizadas detectou-se a estabilidade do enxerto ósseo em todas as calvárias. Observou-se, também, a movimentação

dos ímãs em um animal do grupo “Aut+Mag” de 15 dias, sendo este excluído do estudo. Os demais ímãs encontravam-se estáveis (figura 34).

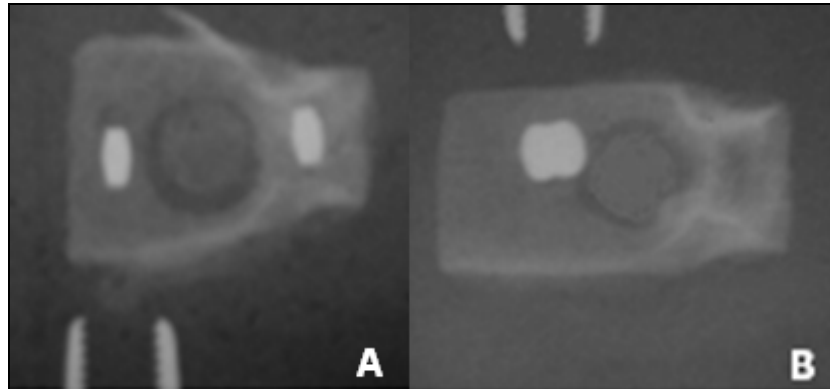


Figura 34: Radiografias das peças removidas das calvárias dos ratos. Observa-se estabilidade dos ímãs em A e magnetos deslocados e atraídos em B.

6. DISCUSSÃO

Enxertos ósseos autógenos, heterógenos e xenógenos bem como diferentes biomateriais tem sido utilizados em procedimentos cirúrgicos reconstrutivos bucofaciais (Puricelli, 2002; Mathur, Tatum *et al.*, 2003; Corsetti, 2005; Artzi, Weinreb *et al.*, 2008). Devido às suas propriedades particulares, o osso autógeno é considerado o padrão-ouro para reconstruções de defeitos ósseos. No entanto, também apresenta contra-indicações e limitações em suas aplicações. Tal fato tem impulsionado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que evidenciem técnicas capazes de apresentar desempenho semelhante àquele do enxerto ósseo autógeno.

Os diversos estudos na área lançaram mão dos defeitos ósseos artificialmente criados para avaliar o potencial osteogênico e osteocondutor de determinado enxerto ou implante (Clokier, Moghadam *et al.*, 2002; Rupprecht, Merten *et al.*, 2003; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007; De Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008; Messora, Nagata *et al.*, 2008; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009). Os modelos animais mais amplamente utilizados para tal propósito foram, até os dias atuais, ratos e coelhos. Em ambos, os defeitos ósseos localizaram-se principalmente na calvária dos animais. Tal sítio cirúrgico permite a criação de defeitos amplos, capazes de avaliar a neoformação óssea dentro do princípio de “defeito de tamanho crítico”, idealizado por Schmitz e Hollinger (Schmitz e Hollinger, 1986) e modificado por Gosain (Gosain, Song *et al.*, 2000). Segundo os autores, o tamanho desse defeito deve ser de 8 mm de diâmetro na calota craniana de ratos. No entanto, estudos mais recentes evidenciaram que defeitos ósseos de 5 e 6 mm, igualmente realizados na calvária de ratos, também são considerados críticos (Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Pryor,

Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006; Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; Inoda, Yamamoto *et al.*, 2007). Alguns trabalhos que utilizaram defeitos ósseos em calota craniana de ratos adotaram a criação de um defeito na linha média da calvária do animal, englobando ambos os ossos parietais e, por conseqüência, a sutura sagital mediana entre esses ossos (Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007). Outros estudos utilizaram defeitos bilaterais, um em cada osso parietal (Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006). Em alguns destes trabalhos, no entanto, é possível evidenciar-se a dificuldade técnica da criação de defeitos bilaterais devido à superfície óssea limitada nos parietais para acomodação de dois defeitos críticos de 5 ou 6 mm (Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Yang *et al.*, 2005). No presente estudo, optou-se pela criação de defeitos ósseos de 5 mm no osso frontal dos animais por possibilitar a inclusão total do defeito em um único osso sem o envolvimento de nenhuma das suturas cranianas. Alguns pesquisadores sugerem que o envolvimento da sutura sagital mediana no defeito ósseo, por tratar-se de tecido conjuntivo fibroso, pode provocar a migração de células deste tipo tecidual para o interior do defeito, dificultando a formação de tecido ósseo (Bosch, Melsen *et al.*, 1998). Dessa forma, o defeito ósseo que foi utilizado no presente estudo é considerado crítico e não envolveu eventuais interferências de tipos celulares que não são da natureza do tecido ósseo. Observou-se, também, a manutenção da integridade da dura-máter durante a confecção dos defeitos ósseos com broca trefina. É estabelecido na literatura que esta meninge tem importante papel na vascularização da calvária do animal e, conseqüentemente, sua injúria pode provocar prejuízos ao processo de reparo

ósseo (Schmitz e Hollinger, 1986; Aalami, Nacamuli *et al.*, 2004; Ascherman, Foo *et al.*, 2008).

As observações histológicas do presente estudo envolveram 15, 30 e 60 dias após a realização da intervenção cirúrgica. Os trabalhos de Pryor e colaboradores (Pryor, Polimeni *et al.*, 2005; Pryor, Yang *et al.*, 2005; Pryor, Susin *et al.*, 2006), que utilizaram defeitos de 6 mm de diâmetro, constataram o preenchimento com osso neoformado de mais de 90% do defeito original nos tempos de 30 e principalmente 60 dias. Dessa forma, no presente estudo, utilizando-se um defeito ósseo ainda menor, foi definido em 60 dias o tempo máximo de observação histológica. Após exame dos cortes histológicos obtidos, constatou-se que um tempo mais prolongado de observação poderia ter sido incluído, a exemplo de outros estudos que utilizaram 90 dias (Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; De Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008; Messoria, Nagata *et al.*, 2008). Em um tempo maior de observação poderiam ter sido evidenciadas maiores quantidades de osso neoformado e um maior número de defeitos fechados pela neoformação óssea. Em diversos cortes histológicos obtidos em 30 e 60 dias pós-operatórios, observou-se tecido ósseo em processo de formação com intensa vascularização, osteoblastos alinhados e osteoplastos volumosos característicos de tecido ósseo jovem, além de tecido de granulação que provavelmente estaria antecedendo a formação de novo osso.

Foi possível, através do presente estudo, a avaliação da utilização de um implante de HA granulada sintética (HAP 91®) para o tratamento de defeitos ósseos de 5 mm, considerados extensos. O material em questão foi manipulado seguindo as recomendações do fabricante, aplicando-se

diretamente no defeito ósseo, criando-se uma “pasta” com os fluidos teciduais no leito receptor.

A avaliação histológica realizada permitiu evidenciar que o material apresentou adequada biocompatibilidade. Não ocorreu, em nenhum animal, o desencadeamento de reação do tipo corpo estranho ao material implantado. Na grande maioria dos casos, os grânulos de HA encontravam-se circundados por tecido de granulação, sugerindo uma possível neoformação óssea futura. Estudos prévios comprovaram a biocompatibilidade de diferentes formas de HA (Burg, Porter *et al.*, 2000; Fini, Cadossi *et al.*, 2002; Le Guehennec, Layrolle *et al.*, 2004). Outra propriedade do material evidenciada neste estudo foi a osteocondução. Observou-se, em todos os tempos operatórios, que o implante de HA foi capaz de conduzir a formação óssea através da superfície de seus grânulos. Tal neoformação óssea teve início principalmente a partir do limite do defeito ósseo criado, podendo ser observada também, em alguns casos, a partir do centro do defeito, junto aos grânulos do material. Foi observado o fechamento total de apenas um defeito, em um animal do grupo “HA+Mag” de 60 dias. A osteocondução observada provavelmente foi favorecida pela presença de micro e macroporos no material estudado, ambas características importantes para a formação óssea (Le Guehennec, Layrolle *et al.*, 2004; Zhou, Peel *et al.*, 2007).

A quantidade de osso neoformado nos animais que receberam o implante de HA foi extremamente variável dentro do mesmo grupo experimental. Enquanto alguns cortes histológicos apresentaram pouca ou nenhuma neoformação óssea, outros, da mesma intervenção e tempo de observação, evidenciaram quantidades consideráveis de osso novo. Tal fato

suscita as hipóteses de que a técnica de utilização do material empregada neste estudo possa ser extremamente delicada (Mathur, Tatum *et al.*, 2003) ou de que variações individuais não observadas durante a realização do procedimento possam influenciar o resultado. Alguns estudos utilizaram substitutos ósseos suportados por membranas ou barreiras (Haddad, Peel *et al.*, 2006; Furlaneto, Nagata *et al.*, 2007; Marzouk, Gamal *et al.*, 2007), não sendo observada a perda de quantidades consideráveis do material implantado para áreas exteriores ao defeito ósseo criado. A utilização do artifício das membranas sintéticas para delimitar e proteger o material implantado poderia contribuir para a homogeneidade dos resultados observados no presente trabalho, mantendo grande parte do material utilizado dentro dos limites do defeito ósseo. O deslocamento de grânulos do material para além dos limites do defeito criado também contribuiu para a existência de apenas uma delgada camada do implante ao longo do defeito ósseo. Tal fato, em diversos casos, não permitiu a manutenção do contorno e da forma do tecido original, ou seja, da calota craniana do rato. Dessa forma, não houve uma situação adequada para neoformação óssea e osteocondução ao longo do defeito ósseo, não sendo possível a percepção de diferenças importantes na quantidade de osso novo entre os tempos operatórios. Foi observada, em alguns cortes histológicos, a presença de tecido fibroso no interior do defeito ósseo, sugerindo a estagnação do processo de formação óssea. Outro fator importante a ser considerado é a possibilidade de o defeito bicortical realizado (5 mm) ser de tamanho inadequado para a utilização do material na forma estudada. A aplicação da HA na forma de pó parece haver indicação para o preenchimento de defeitos ósseos menores (Puricelli, 2002) ou na existência

de um arcabouço natural, como um alvéolo pós-extração (Brandao, Brentegani *et al.*, 2002). Além disso, alguns estudos evidenciaram que a HA na forma de cimento, apresentando uma presa transoperatória, foi capaz de manter a forma e contorno de defeitos ósseos, bem como promover a osteocondução (Rupprecht, Merten *et al.*, 2003; Thorwarth, Schultze-Mosgau *et al.*, 2005; Ascherman, Foo *et al.*, 2008). A utilização de um cimento de HA também poderia contribuir para resultados mais satisfatórios no presente trabalho.

Quando se comparou o reparo do defeito ósseo entre o enxerto ósseo autógeno e o implante de HA nos diferentes tempos operatórios, com e sem a influência de campo magnético, observou-se uma maior neoformação óssea nos animais que receberam o enxerto ósseo autógeno em 30 e 60 dias. As propriedades únicas de osteogênese, osteoindução e osteocondução presentes no enxerto ósseo autógeno foram provavelmente os fatores que determinaram tal resultado. Foi observada neoformação óssea justaposta, interiormente e ectópica ao enxerto autógeno em todos os tempos operatórios. Foi possível evidenciar a presença de tecido de granulação provavelmente antecedendo a neoformação óssea. Em todos os casos ocorreu manutenção do contorno e da forma da calota craniana do animal. Tais resultados sugerem que o implante de HA, utilizado nas condições deste estudo, apresentou desvantagens quando comparado com o enxerto ósseo autógeno (padrão-ouro para reconstruções ósseas). Diversos estudos também apontaram resultados favoráveis ao enxerto ósseo autógeno quando comparado com diferentes substitutos ósseos (Thorwarth, Schultze-Mosgau *et al.*, 2005; Haddad, Peel *et al.*, 2006; Zhou, Peel *et al.*, 2007; De Oliveira, De Oliveira *et al.*, 2008).

A HA sintética é um biomaterial amplamente estudado há diversos anos. Apesar de sua larga utilização, os estudos ainda não alcançaram uma composição desse biomaterial capaz de apresentar propriedades biológicas comparáveis aos enxertos autógenos, que permanecem como padrão-ouro nas reconstruções ósseas.

O presente trabalho também buscou investigar os efeitos de um campo magnético estático e permanente, sepultado nas imediações do defeito ósseo, na neoformação óssea quando utilizado o enxerto autógeno ou o implante de HA. A análise histométrica realizada não evidenciou diferenças significativas na neoformação óssea entre os grupos com e sem a presença de campo magnético dentro de cada tempo experimental, tanto para o enxerto autógeno quanto para o implante de HA. No entanto, quando realizada a análise longitudinal da variação do preenchimento ósseo, foi possível observar que, nos grupos de enxerto ósseo autógeno, a formação óssea foi mais acelerada no grupo sob influência magnética do que naquele sem tal influência. Tal diferença não foi observada nos grupos de HA.

Na análise histológica descritiva, tanto nos grupos com a influência magnética quanto naqueles sem este estímulo, observou-se um padrão de formação óssea semelhante, com a presença de angiogênese, osteoplastos volumosos, osteoblastos alinhados provavelmente secretando matriz óssea e tecido de granulação. No entanto, a neoformação óssea foi mais exuberante nos defeitos de enxerto ósseo autógeno sob influência magnética em 30 dias quando comparada com o mesmo grupo sem a influência do magnetismo. Já na região onde o ímã ou o disco de titânio foram implantados observou-se considerável presença de osso neoformado, em ambas as intervenções,

também com maior exuberância nas lojas imantadas em 30 dias. Dessa forma, a análise histológica qualitativa do presente trabalho suscita a necessidade de realização de uma análise histométrica nas áreas correspondentes às lojas dos ímãs. Fini e colaboradores (Fini, Cadossi *et al.*, 2002) não encontraram diferenças histológicas na neoformação óssea ao redor de implantes de HA entre grupos tratados com e sem campos magnéticos pulsáteis. Apesar disso, relataram maiores valores de microdureza para o osso que recebeu o estímulo magnético.

Muitos estudos apontaram que campos magnéticos estáticos podem acelerar o processo de neoformação óssea ou cicatrização tecidual (Darendeliler, Darendeliler *et al.*, 1997; Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Costantino, Pogliacomì *et al.*, 2007; Henry, Concannon *et al.*, 2008; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009).

Nos trabalhos de Puricelli e colaboradores (Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009) o campo magnético foi aplicado através de arruelas de aço inoxidável martensítico que foram fixadas com parafusos diretamente sobre o defeito ósseo, sem barreiras de isolamento. Ainda nestes estudos, o sítio cirúrgico utilizado foi o fêmur de ratos, osso que apresenta um maior componente esponjoso cujos espaços estão preenchidos pela medula óssea, que oferece abundante disponibilidade celular ao contrário da calvária, predominantemente cortical. No presente estudo, os magnetos, quando presentes, encontravam-se fixados em cavidades ósseas preparadas exteriormente ao defeito ósseo, como forma de manter as peças imóveis.

Alguns estudos sugeriram que, campos eletromagnéticos e magnéticos pulsáteis, nos quais ocorre variação do fluxo magnético, podem influenciar uma

série de funções da membrana celular, modulando a sinalização transmembrana. Além disso, tais campos seriam capazes de estimular a síntese de fatores de crescimento (Aaron, Boyan *et al.*, 2004; Icaro Cornaglia, Casasco *et al.*, 2006).

A orientação dos magnetos utilizada foi baseada no trabalho de Kotani e colaboradores (Kotani, Kawaguchi *et al.*, 2002), que evidenciaram uma orientação dos osteoblastos e da neoformação óssea paralelos ao campo magnético aplicado, na ordem de 8 tesla (cerca de 80.000 gauss). Dessa forma, o campo magnético criado sobre o defeito ósseo, no presente trabalho criaria a tendência de fechamento do mesmo pela neoformação óssea. A intensidade do campo magnético observada no interior do defeito ósseo variou de cerca de 40 gauss até cerca de 70 gauss, com os maiores valores nas proximidades dos magnetos. Tal campo magnético apresentou, portanto, intensidade cerca de 2000 a 1100 vezes inferior à utilizada por Kotani e colaboradores (Kotani, Kawaguchi *et al.*, 2002). No entanto, o campo magnético observado assemelha-se em intensidade ao utilizado por Puricelli e colaboradores (Puricelli, Ulbrich *et al.*, 2006; Puricelli, Dutra *et al.*, 2009), que observaram maior formação óssea nos grupos que receberam o campo magnético em arruelas de aço inoxidável do que os grupos com arruelas não imantadas. Já Yan e colaboradores (Yan, Tomita *et al.*, 1998) utilizaram, em fêmures de rato, ímãs com intensidade de 1800 gauss, sem a mensuração, no entanto, do campo magnético no tecido ósseo. Não realizaram análises histológicas, mas observaram maior densidade mineral nos fêmures que receberam o campo magnético.

Observa-se a existência de vários estudos na literatura envolvendo a utilização de campos magnéticos estáticos. No entanto, muitos desses trabalhos carecem de metodologias mais apuradas para avaliar o real potencial dos campos magnéticos no reparo tecidual. Além disso, a inexistência de estudos que utilizem metodologias semelhantes dificulta ou impossibilita uma comparação dos resultados encontrados.

Por estar relacionada ao metabolismo ósseo e também ao processo de secreção de matriz óssea, a fosfatase alcalina é considerada um marcador periférico deste tecido. Dessa forma, mensurações da sua atividade enzimática podem caracterizar fases do reparo ósseo de defeitos experimentais (Roy, 1970; Christenson, 1997; Molina, 2003).

Através da análise da atividade da enzima fosfatase alcalina sistêmica, foi possível evidenciar um pico de expressividade após 30 dias da realização do procedimento cirúrgico, em todas as intervenções. No entanto, mesmo em 15 e 60 dias pós-operatórios, em todos os grupos, a atividade enzimática mostrou-se superior ao grupo Naive, com exceção do grupo "Aut+Mag" em 15 dias. Dessa forma, a criação de um defeito ósseo provocou uma maior expressividade da enzima quando comparada com o grupo de atividade enzimática fisiológica (Naive). Provavelmente tal atividade, em um tempo operatório mais avançado, estaria em um nível semelhante ao encontrado no grupo Naive, caracterizando a finalização do processo de reparo ósseo. Yan e colaboradores (Yan, Tomita *et al.*, 1998) realizaram a avaliação de tal enzima, em 90 dias pós-operatórios, sem diferença com a mensuração inicial.

Em 15 e 60 dias observou-se que o campo magnético não influenciou a expressão sistêmica da enzima fosfatase alcalina. No entanto, foi possível

evidenciar que nos 30 dias pós-operatórios, quando foi observado o pico de atividade, os grupos que receberam o campo magnético estático apresentaram atividade enzimática inferior aos grupos sem tal influência, tanto para o enxerto ósseo autógeno quanto para o implante de HA. A metodologia empregada no presente estudo não permite apontar os motivos pelos quais tais resultados foram encontrados, principalmente por se tratarem de influências do campo magnético em níveis celular e molecular. No estudo de Yan e colaboradores (Yan, Tomita *et al.*, 1998) também não foi evidenciada diferença na atividade da enzima fosfatase alcalina, em 90 dias pós-operatórios, entre grupos com e sem campo magnético estático.

Outros trabalhos avaliaram a atividade da fosfatase alcalina intracelular nos sítios de interesse, através de imunohistoquímica (Redlich, Perka *et al.*, 1999; Kotani, Kawaguchi *et al.*, 2002). O uso de tal metodologia permitiria determinar a atividade enzimática nas células envolvidas diretamente no reparo ósseo do defeito realizado.

7. CONCLUSÃO

A partir dos objetivos propostos, da metodologia empregada e dos resultados obtidos pode-se concluir que:

- O reparo ósseo com a presença do implante de HA granulada sintética (HAP 91[®]) demonstrou-se inferior ao reparo observado com o enxerto ósseo autógeno, com e sem campo magnético;

- O reparo ósseo foi mais acelerado no grupo de enxerto ósseo autógeno sob influência do campo magnético do que quando o magnetismo não estava presente, segundo a análise histométrica;

- Na análise histológica descritiva, verificou-se presença de matriz óssea e núcleos de angiogênese junto aos limites do defeito crítico e das lojas dos ímãs com maior exuberância em 30 dias quando comparados com os dispositivos metálicos não imantados;

- A atividade sistêmica da enzima fosfatase alcalina foi mais expressiva em 30 dias pós-operatórios. Neste mesmo tempo operatório, os grupos sob influência de campo magnético estático apresentaram menor atividade enzimática;

- Outras propostas de estudo seguindo esta linha de pesquisa devem ser executadas, entre elas, a análise histométrica das áreas ósseas circundantes aos ímãs.

8. REFERÊNCIAS

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.

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

Almeida Prado, F., A. L. Anbinder, *et al.* Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. Rev. Odont. Univ. Cidade São Paulo, v.18, n.1, p.7-13. 2006.

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.

Artzi, Z., M. Weinreb, *et al.* Histomorphometric assessment of bone formation in sinus augmentation utilizing a combination of autogenous and hydroxyapatite/biphasic tricalcium phosphate graft materials: at 6 and 9 months in humans. Clin Oral Implants Res, v.19, n.7, Jul, p.686-92. 2008.

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.

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.

Burg, K. J., S. Porter, *et al.* Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials, v.21, n.23, Dec, p.2347-59. 2000.

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

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

Chung, Y. I., K. M. Ahn, *et al.* Enhanced bone regeneration with BMP-2 loaded functional nanoparticle-hydrogel complex. J Control Release, v.121, n.1-2, Aug 16, p.91-9. 2007.

Clokie, C. M., H. Moghadam, *et al.* Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. J Craniofac Surg, v.13, n.1, Jan, p.111-21; discussion 122-3. 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, UFRGS, Porto Alegre, 2005. 122 p.

Corsetti, A., M. Leite, *et al.* Avaliação da presença demicrorganismos aeróbios em blocos de cimento fosfato de cálcio submetidos a três técnicas de esterilização. Revista da Faculdade de Odontologia de Passo Fundo, v.13, n.2, p.27-32. 2008.

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.

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

David, L., L. Argenta, *et al.* Hydroxyapatite cement in pediatric craniofacial reconstruction. J Craniofac Surg, v.16, n.1, Jan, p.129-33. 2005.

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.

Fini, M., R. Cadossi, *et al.* The effect of pulsed electromagnetic fields on the osteointegration of hydroxyapatite implants in cancellous bone: a morphologic and microstructural in vivo study. J Orthop Res, v.20, n.4, Jul, p.756-63. 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.

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

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.

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

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.

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.

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.

Inoda, H., G. Yamamoto, *et al.* rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rat calvariae. Int J Oral Maxillofac Surg, v.36, n.1, Jan, p.39-44. 2007.

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.518-22. 2000.

Klein, C. P., A. A. Driessen, *et al.* Relationship between the degradation behaviour of calcium phosphate ceramics and their physical-chemical characteristics and ultrastructural geometry. Biomaterials, v.5, n.3, May, p.157-60. 1984.

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.

Kusakabe, H., T. Sakamaki, *et al.* Osseointegration of a hydroxyapatite-coated multilayered mesh stem. Biomaterials, v.25, n.15, Jul, p.2957-69. 2004.

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.

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.

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.

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.

Mathur, K. K., S. A. Tatum, *et al.* Carbonated apatite and hydroxyapatite in craniofacial reconstruction. Arch Facial Plast Surg, v.5, n.5, Sep-Oct, p.379-83. 2003.

- 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 Periodontol Res, v.43, n.2, Apr, p.217-23. 2008.
- Molina, F. Marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Rev Metab Óseo Min, v.1, n.3, p.91-98. 2003.
- Paris, M. F., M. G. Oliveira, *et al.* Reconstrução de osso alveolar, em área dentada, com uso de hidroxiapatita, análise histológica: estudo experimental. Odonto Ciência, v. 18, n. 39, p. 89-98, 2003.
- 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. Avaliação histológica de implantes de hidroxiapatita em defeito ósseo alveolar dentado em humano: relato de caso. R. Fac. Odontol., v.43, n.1, p.34-36. 2002.
- Puricelli, E., 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.
- Redlich, A., C. Perka, *et al.* Bone engineering on the basis of periosteal cells cultured in polymer fleeces. J Mater Sci Mater Med, v.10, n.12, Dec, p.767-72. 1999.
- Ripamonti, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. Biomaterials, v.17, n.1, Jan, p.31-5. 1996.
- 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.
- Rupprecht, S., H. A. Merten, *et al.* Hydroxyapatite cement (BoneSource) for repair of critical sized calvarian defects--an experimental study. J Craniomaxillofac Surg, v.31, n.3, Jun, p.149-53. 2003.
- 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.
- Schilephake, H. Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. Int J Oral Maxillofac Surg, v.31, n.5, Oct, p.469-84. 2002.
- 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. Arq 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.
- Soccol, A. T., S. Bettega, *et al.* [Defect repair in rat mandible with hydroxyapatite cement compared to small intestine submucosa]. Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed), v.72, n.2, Mar-Apr, p.195-9. 2006.
- Takagi, K. e M. R. Urist. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. Clin Orthop Relat Res, n.171, Nov-Dec, p.224-31. 1982.
- Ten Cate, R. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1998
- Thorwarth, M., S. Schultze-Mosgau, *et al.* Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. J Oral Maxillofac Surg, v.63, n.11, Nov, p.1626-33. 2005.
- Trepczik, B., J. Lienau, *et al.* Endochondral ossification in vitro is influenced by mechanical bending. Bone, v.40, n.3, Mar, p.597-603. 2007.
- Urist, M. R., R. J. Delange, *et al.* Bone cell differentiation and growth factors. Science, v.220, n.4598, May 13, p.680-6. 1983.
- Vieira, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arq Bras Endocrinol Metab, v.43, n.6. 1999.
- _____. 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.
- Yamasaki, H. e H. Sakai. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. Biomaterials, v.13, n.5, p.308-12. 1992.
- 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.
- 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.
- Zhou, A. J., S. A. Peel, *et al.* An evaluation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate in combination with Pluronic F127 and BMP on bone repair. J Craniofac Surg, v.18, n.6, Nov,

p.1264-75. 2007.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I: Código Estadual de Proteção aos Animais

Lei Estadual Nº 11.915

21 de maio de 2003

Rio Grande do Sul

TÍTULO II

CAPÍTULO I

Dos Animais de Laboratório

Seção I

Da Vivissecção

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

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

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

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

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

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

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

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

I - um (01) representante da entidade autorizada;

II - um (01) veterinário ou responsável;

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

Art.23 - Compete à comissão de ética fiscalizar:

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

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

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

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

Seção II

Das Disposições Finais

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

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

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

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

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

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

9.2. Anexo II: Resolução Normativa 04/97 da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde/GPPG/HCPA

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

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

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

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

d) procedimentos que possam causar dor ou angústia devem ser desenvolvidos com sedação, analgesia ou anestesia, salvo quando forem os mesmos o objetivo da pesquisa. Devem ser, igualmente, observados cuidados

com assepsia e prevenção de infecções, assim como cuidados para minimizar o desconforto e estresse dos animais em estudo;

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

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

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

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

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

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

9.3. Anexo III: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS



Universidade Federal do Rio Grande do



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: 261/08

Título: REPARO ÓSSEO APÓS IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA ABSORVÍVEL GRANULADA E APLICAÇÃO DE CAMPO MAGNÉTICO PERMANENTE: ESTUDO EXPERIMENTAL EM FÊMURES DE RATOS.

Investigador(es) principal(ais): Edela Puricelli, Deise Ponzoni e CDs. Marcos Miguel Bechstedt Schwengber, Thiago Calcagnotto, 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. Heloísa Emília D. Da Silveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas

Profª. Deise Ponzoni
Coordenadora da Comissão de Pesquisas