

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

WANESSA BARROS CRISPIM

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO
DE DEFEITOS OSSÉOS CRIADOS
CIRURGICAMENTE EM COELHOS ESTIMULADOS
COM O CAMPO MAGNÉTICO**

BAURU
2018

WANESSA BARROS CRISPIM

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO
DE DEFEITOS OSSÉOS CRIADOS
CIRURGICAMENTE EM COELHOS ESTIMULADOS
COM CAMPO MAGNÉTICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação do Prof.^a Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos e Coorientação da Dra. Jéssica Lemos Gulinelli.

BAURU
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com
ISBD

C932a	<p>Crispim, Wanessa Barros</p> <p>Avaliação histomorfométrica do reparo de defeitos ósseos criados cirurgicamente em coelhos estimulados com campo magnético / Wanessa Barros Crispim. -- 2018. 40f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos. Coorientadora: Prof.^a Dra. Jéssica Lemos Gulinelli.</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP</p> <p>1. Reparo Osséo. 2. Campo Magnético. 3. Biomateriais. 4. Bio-Oss. I. Campos, Mirella Lindoso Gomes. II. Gulinelli, Jéssica Lemos. III. Título.</p>
-------	--

WANESSA BARROS CRISPIM

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO REPARO DE DEFEITOS
OSSÉOS CRIADOS CIRURGICAMENTE EM COELHOS
ESTIMULADOS COM CAMPO MAGNÉTICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação do Prof.^a Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos e Coorientação da Dra. Jéssica Lemos Gulinelli.

Bauru, 27 de novembro de 2018.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos
Universidade do Sagrado Coração

Dra. Jéssica Lemos Gulinelli
Instituto Odontológico de Pós Graduação

Prof.^a Dra. Joselene Martinelli Yamashita
Universidade do Sagrado Coração

À minha filha Julia, um ser maravilhoso e amado que trouxe muito mais vida à minha vida desde o momento de seu nascimento e que todo dia me faz lembrar que ela é o sentido do meu viver. Ao meu esposo e pais. Todos vocês são a força que constantemente me motiva!

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos e a Dra. Jéssica Lemos Gulinelli**, pela acolhida como orientada, pelo apoio sem limites e parcerias em todas as etapas do curso.

À **Profa. Dra. Pâmela Letícia Santos**, pela parceria e dedicação na realização em conjunto dos trabalhos.

Ao **Prof. Dr. Joel Santiago**, pela sempre disponibilidade e real vontade de nos transmitir o seu conhecimento.

A todos os professores e funcionários da Universidade do Sagrado Coração, pela ajuda e por serem sempre tão prestativos.

RESUMO

O objetivo foi avaliar o reparo em defeitos ósseos criados cirurgicamente e preenchidos com matriz óssea bovina mineralizada e submetidos a campo magnético. Vinte e quatro coelhos receberam duas ostectomias de 1 cm de diâmetro nas calotas cranianas e foram divididos em: Grupo ACI – enxerto autógeno com estimulação magnética; Grupo ASI – enxerto autógeno sem estimulação magnética; Grupo BCI – matriz óssea bovina mineralizada (Bio-Oss[®]) com estimulação magnética e Grupo BSI - matriz óssea bovina mineralizada (Bio-Oss[®]) sem estimulação magnética. Após os períodos de 30 e 60 dias os animais foram submetidos à eutanásia para a análise histomorfométrica (quantidade de osseo neoformado). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5%. A análise qualitativa evidenciou maior neoformação vascular nos grupos de 30 e 60 dias pós-operatórios submetidos à estimulação magnética. A histomorfometria não evidenciou diferenças significativas no percentual de neoformação óssea entre os grupos com e sem estimulação magnética. Contudo, o percentual de neoformação óssea aos 60 dias pós-cirúrgicos, independente da presença ou não de campo magnético, evidenciou significativamente ($p=0,019$) maior neoformação óssea no grupo com implantação de biomateriais quando comparado ao grupo com enxerto ósseo autógeno. O campo magnético acelerou o reparo ósseo em defeitos criados cirurgicamente no período inicial do processo.

Palavras-chave: Reparo ósseo. Campo Magnético. Biomateriais. Bio Oss.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the repair of bone defects created surgically and filled with mineralized bovine bone matrix and submitted to magnetic field. Twenty four rabbits received two 1 cm diameter osteotomies in the skull caps and were divided into: Group ACI - autogenous graft with magnetic stimulation; ASI group - autogenous graft without magnetic stimulation; Group BCI - mineralized bovine bone matrix (Bio-Oss®) with magnetic stimulation and Group BSI - mineralized bovine bone matrix (Bio-Oss®) without magnetic stimulation. After the periods of 30 and 60 days the animals were submitted to euthanasia for the histomorphometric analysis (amount of neoformed bone). The data were submitted to statistical analysis with significance level of 5%. The qualitative analysis showed greater vascular neoformation in the groups of 30 and 60 postoperative days submitted to magnetic stimulation. Histomorphometry did not show significant differences in the percentage of bone neoformation between the groups with and without magnetic stimulation. However, the percentage of new bone formation at 60 postoperative days, regardless of the presence or absence of magnetic field, significantly showed ($p = 0.019$) greater bone neoformation in the group with implantation of biomaterials when compared to the group with autogenous bone graft. The magnetic field accelerated the bone repair in surgically created defects in the initial period of the process.

Key words: Bone repair. Magnetic field. Biomaterials. Bio Oss.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1	TIPO E MODELO DE ESTUDO	14
2.2	LOCAIS DO ESTUDO	14
2.3	HIPÓTESE	14
2.4	DESCRIÇÃO COMERCIAL DO SUBSTITUTO ÓSSEO	15
2.5	DESCRIÇÃO DOS IMÃS E DISPOSITIVOS METÁLICOS	15
2.6	CÁLCULO DA INTENSIDADE DE CAMPO MAGNÉTICO	15
2.7	CÁLCULO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	17
2.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	18
2.8.1	SEDAÇÃO DOS ANIMAIS	18
2.8.2	TRICOTOMIA	19
2.8.3	ASSEPSIA	19
2.8.4	INFILTRAÇÃO LOCAL E HEMOSTASIA	19
2.8.5	INCISÃO	19
2.8.6	DIVULSÃO E DESCOLAMENTO DOS TECIDOS	20
2.8.7	AFASTAMENTO DOS TECIDOS	20
2.8.8	OSTECTOMIAS NA CALOTA CRANIANA	20
2.8.9	CUIDADOS COM A FERIDA OPERATÓRIA	21
2.8.10	CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS	21
2.8.11	EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS	21
2.8.12	COLETA DAS AMOSTRAS	22
2.8.13	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	22
2.8.14	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	23
2.8.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
3	RESULTADOS	25
3.1	GRUPO DE 30 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO SEM ÍMÃ (ASI30)	25
3.2	GRUPO DE 30 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO COM ÍMÃ (ACI30)	26
3.3	GRUPO DE 30 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL SEM ÍMÃ (BSI30)	27
3.4	GRUPO DE 30 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL COM ÍMÃ (BCI30)	28
3.5	GRUPO DE 60 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO SEM ÍMÃ (ASI60)	29
3.6	GRUPO DE 60 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO COM ÍMÃ (ACI60)	30
3.7	GRUPO DE 60 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL SEM ÍMÃ (BSI60)	30
3.8	GRUPO DE 60 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL COM ÍMÃ (BCI60)	31
3.9	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	33
4	DISCUSSÃO	34

5	CONCLUSÃO	36
	REFERENCIAS.....	37
	ANEXO A- COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	40

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O reparo ósseo em defeitos de elevada extensão continua sendo um dos grandes desafios e interesse da comunidade científica. A procura por novos materiais, técnicas cirúrgicas e dispositivos que auxiliem e acelerem o reparo ósseo vêm sendo alvo de um grande número de pesquisas (ALOISE et al., 2015; DADSETAN et al., 2015; JEON et al., 2016; LAPPALAINEN et al., 2016; SEMYARI et al., 2016).

O tecido ósseo após lesado, apresenta alta capacidade de regeneração, contendo um arranjo estrutural análogo ao osso natural. Esse processo é comparável à osteogênese, pois o local afetado sofre influência da ação dos osteoblastos e osteoclastos, repondo e remodelando o osso, sem deixar cicatriz. Porém, a capacidade de regeneração apresenta algumas limitações, devido à presença de alguns fatores, tais como, ineficácia de suprimento sanguíneo, instabilidade mecânica e grande extensão do defeito, perdendo a capacidade total de reparação óssea e interferindo em sua função fisiológica (MOURA et al., 2014).

Desta forma, técnicas cirúrgicas avançadas e estudos atuais relacionados com a compreensão da fisiologia óssea vêm permitindo que a reconstrução do complexo bucomaxilofacial ocorra de forma eficaz, auxiliando a prática clínica dos cirurgiões dentistas, através da reparação biológica, restituindo a função dos tecidos lesados. Inúmeros estímulos químicos, físicos e biológicos influenciam benéficamente na proliferação, reparo e conseqüentemente na remodelação óssea (LIRANI; CASTRO, 2005; ABREU et al., 2012; ABREU et al., 2016).

As células osteoblásticas são muito sensíveis aos estímulos mecânicos, tais como, estresse, energia e velocidade de deformação, desencadeando assim a formação da matriz óssea e a inibição da reabsorção. Portanto a influência física desempenha um papel relevante no processo de osteogênese. Um exemplo de tal estímulo ocorre através da utilização de campo magnético estático, sobre o local de um defeito, acelerando o processo de reparação óssea (MENG et al., 2013).

O campo magnético é formado a partir de ímãs verdadeiros através da direção vetorial atrativa ou repulsiva dos elétrons que compõe a matéria constituinte das substâncias ferromagnéticas, não dependendo da preexistência de uma fonte de energia elétrica (TOKUEA et al., 2014).

Yan et al. (1998) desenvolveu o trabalho pioneiro no estudo dos campos magnéticos puros, permanentes e constantes, e através deste, buscou avaliar a influência do campo magnético gerado por ímãs verdadeiros, os quais em forma de cunha foram implantados sem micro movimentação no fêmur de ratos, sobre o processo de neoformação óssea, evidenciando o aumento da concentração mineral local.

Além dos estímulos físicos, os biomateriais exercem influência sobre a promoção e condução do reparo ósseo. Estes são materiais de origem sintética ou biológica utilizados com a finalidade de reparação e restauração de perdas teciduais e funções corporais, muitas vezes comprometidas por traumas e processos degenerativos (TURRER; FERREIRA, 2008).

O osso bovino mineralizado (OBM) é um dos substitutos ósseos mais utilizados e pesquisados pela comunidade odontológica, devido a sua grande semelhança com o osso propriamente dito, e por possuir características osteocondutoras (CHACKARTCHI et al., 2011; HUH et al., 2015; LOHMANN et al., 2017; PAKNEJAD et al., 2015; TOVAR et al., 2014).

Poucos estudos relatam a associação de um estímulo físico, como o campo magnético e o uso de biomaterial, como o OBM, no reparo de defeitos ósseos (ABREU et al., 2016; MENG et al., 2013). Desta forma, este trabalho buscou avaliar o reparo ósseo, em calvárias de coelho, através da influência de um campo magnético estático, após utilização de osso bovino mineralizado, Bio-oss[®], no local do defeito.

A literatura científica contempla em seu acervo um número considerável de estudos que avaliam a influência dos campos magnéticos sobre os processo de reparação óssea. A maioria destes estudos, no entanto, utilizam campos eletromagnéticos (ABDELRAHIM et al., 2011; MARTINEZ-RONDANELLI et al., 2014; TROCK, 2000; TSAI et al., 2007;), gerados por fontes elétricas e não campos magnéticos oriundos de ímãs verdadeiros. Um número menor de estudos, por outro lado, focados na estimulação magnética a partir de campos magnéticos puros (ABREU et al., 2016; BRUCE et al., 1987; MENG et al., 2013; PURICELLI et al., 2006; PURICELLI *et al.*, 2009; YAN et al., 1998) não conseguiu estabelecer uma metodologia que permita uma análise adequada da influência de campos magnéticos estáticos e permanentes sobre o reparo ósseo. Logo, baseado na escassez de estudos que empregam o uso de campos magnéticos puros e devido a necessidade de clarear o entendimento do processo de reparo ósseo sob influência específica de campos magnéticos gerados por ímãs verdadeiros, há necessidade de realização de estudo que empregue o uso de campos magnéticos oriundos

de ímãs verdadeiros, capazes de produzir um campo magnético puro, permanente e constante. Assim, as implicações clínicas da interferência no processo de reparação óssea através da estimulação do leito receptor e de biomateriais por meio do emprego de campos magnéticos podem representar um grande avanço nos processos de reconstrução óssea, especialmente dentro das áreas de atuação da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia. Assim, o objetivo do estudo é avaliar o processo de reparo ósseo em defeitos ósseos criados cirurgicamente e preenchidos com matriz óssea bovina mineralizada (Bio-Oss[®]) submetidos a estimulação magnética permanente e constante em calvária de coelhos por meio de análise histomorfométrica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração CEUA/USC sob parecer de N 2254230915 (ANEXO A).

2.1 TIPO E MODELO DE ESTUDO

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

2.2 LOCAIS DO ESTUDO

A etapa cirúrgica do estudo em animais já foi realizada no ano de 2016 como parte integrante do projeto maior executado por alunos de mestrado e doutorado do programa de pós graduação em Cirurgia Buco Maxilo Facial – Biologia Oral da Universidade do Sagrado Coração (USC) no Laboratório de Cirurgia Experimental do Biotério da instituição. Os cálculos do campo magnético foram realizados no Laboratório de Magnetismo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A confecção das lâminas, análises histológica e histomorfométrica e imunoistoquímica serão realizadas no Laboratório de Histopatologia da Universidade Sagrado Coração (USC).

2.3 HIPÓTESE

O biomaterial, matriz óssea bovina mineralizada (Bio-Oss[®]) é osteocondutor, biocompatível, absorvível e o campo magnético permanente e constante estimula o reparo ósseo. Portanto, a utilização deste biomaterial, quando sob estimulação magnética permanente e constante, acelera o processo de reparo ósseo.

2.4 DESCRIÇÃO COMERCIAL DO SUBSTITUTO ÓSSEO

O biomaterial de substituição óssea Bio-Oss→ é um osso desmineralizado, xenógeno (de origem bovina), com propriedade bimodal (superfície hiper porosa e densa) e grânulos com micro e macro poros interconectados e com dimensões dos grânulos variáveis entre 0,25mm e 1,0mm. Comercialmente apresenta-se em embalagens com formato de frascos contendo de 0,5g e 2,0g, contendo grânulos grandes (*Large*) ou pequenos (*Small*).

2.5 DESCRIÇÃO DOS IMÃS E DISPOSITIVOS METÁLICOS

Os dispositivos metálicos e imãs utilizados neste trabalho apresentam a forma de discos com bordos arredondados, possuindo 7,0mm de diâmetro e 1,0mm de espessura. Os imãs são constituídos por uma liga de Ferrite Cerâmico Isotrópico de Bário (New Imãs Indústrias e Comércio LTDA, São Paulo, Brasil) com uma intensidade de campo magnético de 600 Gauss. Os dispositivos metálicos são compostos por uma liga de titânio comercialmente puro (PROMM

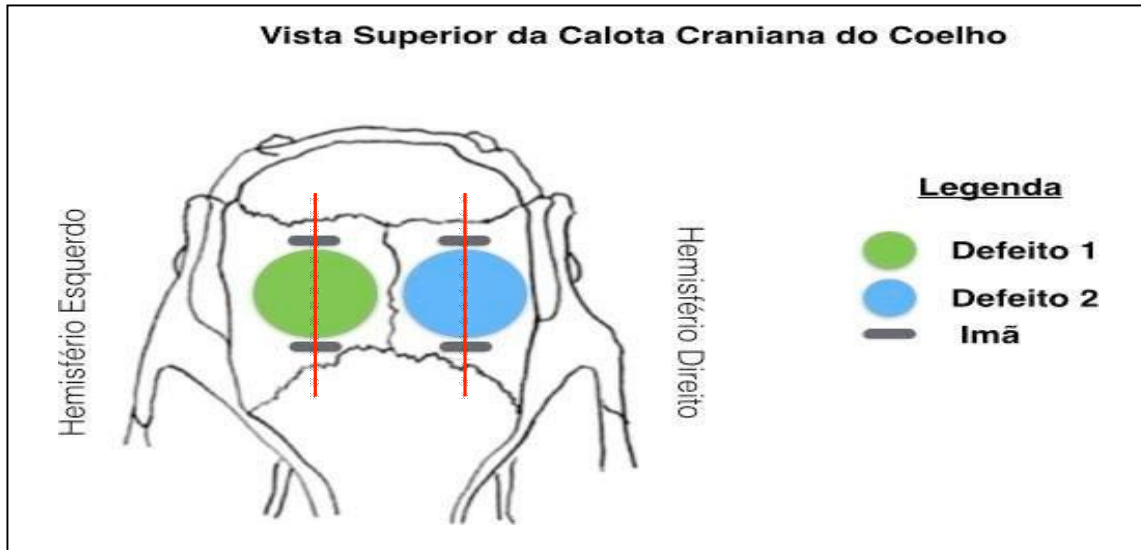
– Indústria de Materiais Cirúrgicos LTDA, Porto Alegre, Brasil) com as mesmas dimensões que os imãs e sem qualquer campo magnético ou imantação temporária associada.

2.6 CÁLCULO DA INTENSIDADE DE CAMPO MAGNÉTICO

O cálculo da intensidade do campo magnético gerado pelos imãs e que agirá no interior do defeito ósseo foi mensurado por um Gaussímetro (Magnet-Physik FH 35 Dr. Steingroever GmbH, Alemanha) e um crânio seco de coelho com os defeitos ósseos realizados e os imãs instalados.

No crânio seco do coelho, conforme figura 1, nos ossos parietais, foram criados cirurgicamente 02 (dois) defeitos ósseos de 10,0mm de diâmetro cada, sendo 01 (um) defeito em cada hemisfério craniano. Os imãs (grupo teste) ou dispositivos metálicos (grupo controle) foram fixados a 1,0mm de distância deste defeito, seguindo uma linha imaginária que corta o defeito longitudinalmente no seu maior diâmetro.

Figura 1 - Desenho esquemático da anatomia do crânio dos coelhos ilustrando em uma vista superior, a disposição dos defeitos ósseos criados cirurgicamente (círculos verde e azul) e posição dos ímãs tangenciando os defeitos ósseos. Linha vermelha pontilhada evidenciando alinhamento dos ímãs



Fonte: Elaborada pela autora.

Cada defeito ósseo foi bi-cortical (envolvendo as duas corticais cranianas) e cirurgicamente criado com broca trefina de 10,0mm de diâmetro (Neodent[®], Curitiba, PR, Brasil) acoplada em contra-ângulo para implante à 800 rpm sob irrigação copiosa com solução fisiológica 0,9%. Estes defeitos foram tangenciados à distância de 1,0mm na porção do seu maior diâmetro no sentido anteroposterior por duas lojas ósseas de 7,0mm de comprimento por 3,5mm de profundidade e 1,0mm de largura, onde foram fixados os dispositivos metálicos (grupo controle) ou os ímãs (grupo teste). No caso dos ímãs, estes foram fixados de forma a manter um campo magnético atrativo entre si.

Após a confecção dos defeitos ósseos, os ímãs foram agrupados em pares de forma aleatória e cada par foi fixado na borda de um dos defeitos ósseos. O campo magnético foi então mensurado em 05 (cinco) pontos no interior de cada um dos defeitos ósseos: 01 (uma) mensuração no ponto central do defeito e em 04 (quatro) pontos equidistantes entre si no perímetro da circunferência do defeito ósseo (figura 2). Esta, mensuração em cinco pontos visa garantir a homogeneidade da intensidade das forças magnéticas incidentes nos defeitos ósseos para que não ocorra o viés de um par de ímãs gerar maior ou menor intensidade de campo magnético no interior do defeito ósseo. A partir da mensuração da força magnética

incidente no interior do defeito os ímãs foram pareados e esterilizados em óxido de etileno para posterior uso nas cirurgias dos animais.

Para garantir a disposição com força atrativa entre os pares de ímãs, o Polo Norte de todos os ímãs foi marcado com esmalte branco atóxico. A estabilização dos ímãs nas cavidades foi garantida por meio de cola biológica à base de Cianocrilato (Dermabond®, Johnson & Johnson Produtos Profissionais LTDA, São José dos Campos, Brasil).

Figura 2. Desenho esquemático ilustrando numa vista superior os cinco pontos de mensuração do campo magnético no interior dos defeitos ósseos a serem criados na calota de coelhos albinos Nova Zelândia.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.7 CÁLCULO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A amostra selecionada a partir de um cálculo realizado através do software Winpepi→, módulo Compare 2, versão 1.62, atribuindo-se valores de 5% para nível de significância e de 80% para poder da amostra e, considerando uma diferença de 20% no preenchimento do defeito ósseo, chegou-se ao valor de 05 (cinco animais) por grupo experimental, conforme figura 3. Para tanto foram utilizados 24 coelhos *Nova Zelândia*, albinos, machos, adultos jovens, com cerca de 07 (sete) meses de idade e com peso aproximado de 3,0 Kg. Os animais permaneceram todo o período do estudo em gaiolas

metálicas, suspensas, com acomodação individual, regularmente higienizadas, mantidas em ambiente climatizado com temperatura de 23°C (+/- 1°C), ciclos claro e escuro de doze horas, sendo alimentados com ração comercial padrão e água *ad libidum*.

Figura 3. Desenho esquemático ilustrando distribuição do número de animais em cada grupo experimental.



Fonte: Elaborada pela autora.

2.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com cerca de 07 (sete) meses de idade e com peso médio de 3,0 Kg, os coelhos foram submetidos à cirurgia experimental conforme protocolo que segue.

2.8.1 SEDAÇÃO DOS ANIMAIS

Sob orientação de um médico veterinário, os coelhos foram sedados por meio de injeção intraperitoneal utilizando-se Cloridrato de Xylazina à 2% (Virbaxyl 2%, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil) e Cloridrato de Cetamina a 1% (Francotar, Virbac Ltda., São Paulo, Brasil), respectivamente na dosagem de 0,3 ml/Kg e 0,2 ml/Kg do peso corporal do animal.

2.8.2 TRICOTOMIA

Comprovada a sedação do coelho, este foi colocado em posição ventral sobre uma superfície rígida e fixa (mesa cirúrgica) para que se inicie a tricotomia manual do crânio na região respectiva aos ossos parietais.

2.8.3 ASSEPSIA

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

2.8.4 INFILTRAÇÃO LOCAL E HEMOSTASIA

A área a ser operada foi infiltrada com anestésico local de uso odontológico, Mepivacaína à 2% com adrenalina na proporção de 1:100.000, não excedendo 0,9ml/Kg de peso corporal do animal. A aplicação foi realizada lentamente, tendo a finalidade de promover a hemostasia no transcirúrgico e analgesia trans e pós-operatória imediata.

2.8.5 INCISÃO

Após a tricotomia foi realizada a assepsia da pele por meio de solução aquosa de Digluconato de Clorexidina a 0,2%.

Na região do crânio correspondente aos ossos parietais, foi realizada uma incisão de cerca de 3,0cm com direção póstero-anterior correndo sobre uma linha mediana aos ossos parietais do coelho. Esta incisão foi em único plano por meio de bisturi com cabo nº 3 (três) montado com uma lâmina nº 15 (quinze).

2.8.6 DIVULSÃO E DESCOLAMENTO DOS TECIDOS

Após a incisão em plano único, os tecidos foram descolados de forma dermo-priostal com o auxílio de um sindesmótono delicado, permitindo acesso à cortical óssea do crânio do coelho na região dos ossos parietais.

2.8.7 AFASTAMENTO DOS TECIDOS

O afastamento dos tecidos foi realizado por meio de afastadores do tipo Senn-Muller, permitindo adequada visualização do campo sem promover trauma tecidual.

2.8.8 OSTECTOMIAS NA CALOTA CRANIANA

Após adequados divulsão tecidual e exposição dos ossos parietais, foram realizadas as ostectomias para confecção dos defeitos ósseos e lojas dos imãs (grupo teste) ou dispositivos metálicos de titânio (grupo controle), conforme figura 1.

Os defeitos ósseos foram confeccionados de forma bi-cortical (envolvendo a cortical externa e Interna do crânio) por meio da utilização de uma broca trefina de 10,0mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) acoplada no contra-ângulo (NSK SG20, 20:1, Tóquio, Japão) em motor elétrico para implantes (NSK Surg XT Plus, Tóquio, Japão) à velocidade de 800 rpm e torque de 15N e com sistema de irrigação acoplada. Tangenciando estes defeitos ósseos à uma distância de 1,0mm na porção do seu maior diâmetro no sentido anteroposterior, foram confeccionadas duas lojas ósseas com dimensões de 7,0mm de comprimento por 3,5mm de profundidade e 1,0mm de largura, onde foram fixados os dispositivos metálicos de titânio (grupo controle) ou os imãs (grupo teste).

As lojas ósseas foram confeccionadas com uma broca de corte carbide 702 (Miltex Premium Carbide Bur, Manufacturer Integra York, York, USA) acoplada na peça de mão cirúrgica angulada (Kavo Concept 2:1, Kavo do Brasil Ind. e Com. LTDA, Saguaiçu, SC, Brasil) em motor elétrico para implantes (NSK Surg XT Plus, NSK Corporation, Tóquio, Japão) à velocidade 15000 rpm e com sistema de irrigação acoplada.

Os eventos que diferiram entre os animais foram a utilização de imãs nos grupos testes, dispositivos metálicos de titânio nos grupos controle, preenchimento do defeito

ósseo com enxerto ósseo Bio-Oss® nos grupos teste e manutenção apenas de coágulo sanguíneo nos grupos controle. Os defeitos foram agrupados da seguinte forma:

DAI – defeito ósseo preenchido com coágulo e submetido à ação do campo magnético.

DAS – defeito ósseo preenchido com coágulo sem ação de campo magnético.

DBI - defeito ósseo preenchido com osso bovino mineralizado e submetido à ação do campo magnético.

DBS – defeito ósseo preenchido com osso bovino mineralizado sem ação de campo magnético.

2.8.9 CUIDADOS COM A FERIDA OPERATÓRIA

Os cuidados com a ferida envolveram a limpeza do leito cirúrgico com irrigação de solução fisiológica salina a 0,9% e sutura a pontos isolados com fio 5-0 absorvível sintético à base de Ácido Poliglólico (PGA 5015, Techsuture, Ind. e Com. de Prod. Cirúrgicos LTDA.,

2.8.10 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Os cuidados pós-operatórios envolveram a manutenção da temperatura corporal dos animais, analgesia e antibioticoterapia. A temperatura corporal foi mantida por meio de bolsas térmicas preenchidas com água aquecida e lençóis de feltro.

A analgesia ocorreu por meio da administração intramuscular de Cloridrato de Tramadol na dose de 0,10ml/Kg (Dorless 50mg/ml, União Química Farmacêutica Nacional S.A., São Paulo, Brasil) e a antibioticoterapia com injeção intramuscular de Enrofloxacino, na dose de 0,2ml/Kg ou equivalente a 5mg/Kg (Flotril 25mg/ml 2,5%, Schering-Plough S.A., Rio de Janeiro, Brasil) no pós-operatório imediato.

2.8.11 EUTANÁSIA E DESCARTE DOS ANIMAIS

A eutanásia dos animais foi realizada por meio de punção intraperitoneal com Pentobarbital na dose de 200mg/Kg e ocorrerá em 30 (trinta) e 60 (sessenta) dias pós-

operatórios. Em cada um destes momentos pós-operatórios 12 (doze) animais foram eutanaziados.

Todo o processo de eutanásia foi supervisionado por médico veterinário. Após a confirmação da morte dos animais e coleta das amostras, estes foram descartados por meio de incineração no Biotério da Universidade Sagrado Coração.

2.8.12 COLETA DAS AMOSTRAS

Comprovada a eutanásia, os animais foram colocados em posição de decúbito ventral sobre uma mesa cirúrgica, sendo realizado o acesso à calota craniana seguindo o mesmo protocolo de acesso cirúrgico utilizado no momento da confecção dos defeitos ósseos. Após a tricotomia, foi realizada uma incisão de aproximadamente 3,0cm em pele na região correspondente aos ossos parietais do coelho. Os tecidos moles foram divulsionados delicadamente até a exposição do leito operado. Com uma serra de corte delicado a porção da calota craniana contendo os defeitos ósseos e lojas dos imãs foi removida. Na porção anterior da peça, distante dos defeitos ósseos e lojas dos imãs, foi realizada uma marcação com brocas de corte ósseo afim de padronizar a posição da peça durante as tomadas radiográficas, tomográficas e processo inclusão da peça em bloco de parafina. Após, as peças foram imersas em solução de formalina neutra tamponada à 10% por 48 horas.

Os corpos dos animais, após a coleta das peças, foram encaminhados ao Biotério da Universidade Sagrado Coração afim de serem descartados por meio de incineração.

2.8.13 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

O preparo das peças a serem avaliados histologicamente foi realizado no Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Sagrado Coração.

Após a fixação das peças em solução de formalina neutra tamponada a 10% por 48 horas, estas foram descalcificadas em solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20% por aproximadamente 30 dias. A etapa seguinte à descalcificação foi a remoção dos imãs ou dispositivos metálicos, quando a peça permaneceu em estado plástico, e a realização de uma secção da peça na porção central do defeito ósseo, com uma lâmina

descartável para micrótomo, seguindo uma linha imaginária que liga as duas lojas ósseas dos imãs ou dos dispositivos metálicos e que cruza a porção do defeito ósseo. A seguir, as peças foram processadas conforme protocolo para inclusão em parafina e coloração por meio de Hematoxilina e Eosina (HE).

Cada metade do defeito ósseo foi incluída em um bloco de parafina distinto para realização de três cortes histológicos contíguos com espessura de 4 μ m a partir da secção longitudinal mediana, dispostos em sequência em uma lâmina de vidro. As lâminas foram então codificadas para que o observador se mantenha “cego” quanto a distribuição e análise dos grupos de estudo.

O campo histológico a ser analisado foi toda a extensão do defeito ósseo, portanto, de bordo a bordo, nos aumentos de 20X e 40X em microscópio binocular.

2.8.14 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a realização da Histomorfometria, as imagens foram capturadas no aumento de 40X através do fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i, Nikon Instruments INC. 1300 Walt Whitman Road, Melville, NY 11747-3064, USA CÂMERA: QIMAGING Micropublisher 3.3 Cooled, RTV 19535 56th Avenue, Suite 101 Surrey, BC, Canada www.qimaging.com com auxílio do programa Image- Pro Plus® (Versão 5.1.2 para Windows XP). Media Cybernetics, INC. 8484 Georgia Avenue, Suite 200, Silver Spring, MD 20910 USA.

O programa permitiu traçar o contorno da área total do defeito ósseo em micrometro μm^2 e, em seguida, traçar o contorno das áreas de neoformação óssea no interior do defeito ósseo, também em micrômetro μm . A divisão da soma das áreas de neoformação óssea no interior do defeito pela área total do defeito ósseo obteve o percentual de neoformação óssea em cada um dos cortes histológicos e, assim, permitiu a quantificação do processo de reparação óssea em cada grupo estudado.

Após a obtenção dos valores em cada corte histológico, os grupos de estudo foram reagrupados a partir de sua codificação e seus valores foram submetidos à análise estatística. Antes da calibragem foi realizado um treinamento dos avaliadores com patologista bucal com o intuito de padronizar os critérios de identificação do tecido ósseo neoformado na área do defeito ósseo criado. Ainda, a calibragem intra-examinador foi realizada no período pré-análise das lâminas e no decorrer do estudo, sendo que a cada dez lâminas analisadas uma foi sorteada para ser reavaliada. Após a leitura das lâminas foi

realizado o teste “t” pareado, buscando valores entre 0,1% e 0,5%, que estabelecem níveis de confiança de 99,9% e 99,5%, respectivamente.

2.8.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do pacote estatístico SPSS (Versão 15.0 compatível com Software Windows). A unidade analítica a ser considerada é o defeito ósseo e o nível de significância será estabelecido em 5% no padrão de neoformação óssea. Os dados foram apresentados através de médias e desvios-padrão do percentual de neoformação óssea para a análise histológica. Estes valores foram submetidos a testes de homogeneidade e ao teste estatístico One-Way ANOVA, seguido pelos escores múltiplos de Duncan.

3 RESULTADOS

A análise histológica descritiva foi realizada em todos os grupos e tempos experimentais, conforme parâmetros estabelecidos na metodologia.

3.1 GRUPO DE 30 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO SEM ÍMÃ (ASI30)

No período experimental de 30 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a enxertia óssea autóloga sem estimulação magnética, conforme figura 5, observou-se formação de trabéculas ósseas com padrão uniforme. Discreto infiltrado linfoplasmocitário e formação vascular modesta, mais destacada na porção superior da lâmina, parte do defeito em contato com o periósteo que recobre a porção externa do crânio. Também na porção superior da lâmina, observou-se presença de fibroplasia tecidual. Destaca-se a marcada presença de atividade osteoblástica, com presença de osteoblastos e com osteócitos já alocados nas trabéculas ósseas. Escassos osteoclastos promovendo remodelamento ósseo.

Figura 5. Fotomicrografia do grupo ASI30, 30 dias após a craniectomias indicando a) áreas de neoformação óssea b) áreas com discreto infiltrado linfoplasmocitário c) áreas contendo osteoblastos sintetizando matriz óssea d) osteócitos alocados nas trabéculas ósseas e) osteoclastos promovendo remodelamento ósseo f) discreta neoformação vascular. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.

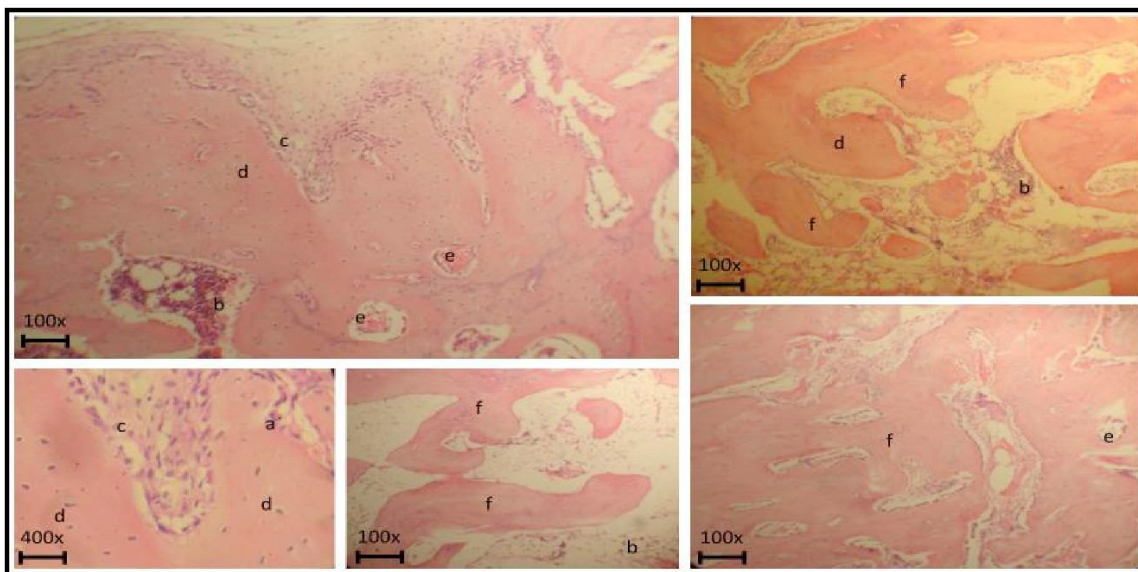


Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 GRUPO DE 30 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO COM ÍMÃ (ACI30)

Nos grupos submetidos a enxertia óssea autógena com estimulação magnética de 30 dias pós-operatórios, conforme figura 6, observou-se discreta atividade osteoclástica e presença de infiltrado linfoplasmocitário, marcadamente localizado na região inferior do defeito ósseo (parte do defeito que fica em contato com a dura-máter). As trabéculas de tecido ósseo apresentaram-se com presença de osteoblastos e osteócitos alocados nas trabéculas ósseas. Presença de neovascularização, mais marcada na porção superior do defeito ósseo. Ainda na porção superior do defeito observa-se atividade osteoblástica mais intensa e também presença de fibroplasia. Na área de inserção do artefato instalado (ímã) observou-se, em diversas lâminas, intensa atividade linfoplasmocitária. As trabéculas ósseas apresentavam distribuição irregular, mostrando um padrão mais constante e homogêneo. Não foram observadas áreas de necrose e/ou reação inflamatória do tipo reação à corpo estranho.

Figura 6. Fotomicrografia do grupo ACI30, 30 dias após a craniectomias indicando a) osteoclastos promovendo remodelamento ósseo b) áreas contendo infiltrado linfoplasmocitário c) osteoblastos sintetizando matriz óssea d) osteócitos alocados na matriz óssea e) áreas de neoformação vascular f) formação morfológica irregular das trabéculas ósseas neoformadas. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.

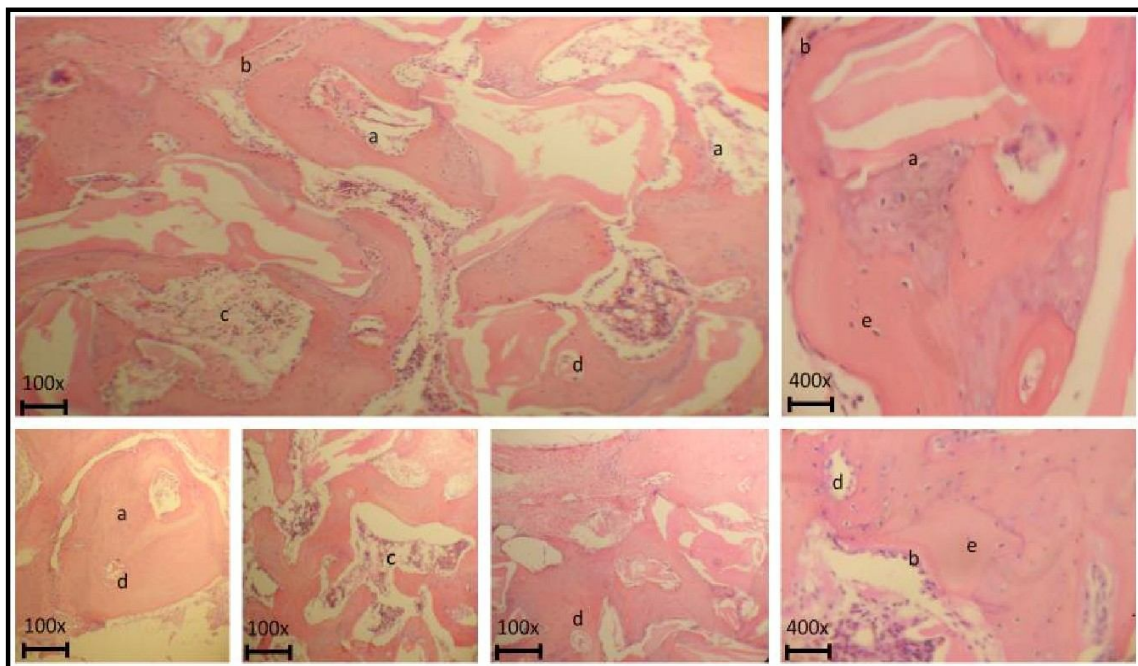


Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 GRUPO DE 30 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL SEM ÍMÃ (BSI30)

No período experimental de 30 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a implantação de biomaterial (Bio-Oss[®]) sem estimulação magnética, conforme figura 7, observou-se intensa formação de trabéculas ósseas no interior do defeito, sendo compostas por tecido ósseo imaturo e ainda caracterizadas por intensa atividade osteoblástica. A atividade osteogênica mostrou-se bastante marcada na área correspondente ao biomaterial, existindo bastante formação de osso novo na periferia do biomaterial, com osteoblastos sintetizando matriz óssea e osteócitos alocados no interior da matriz. Observou-se discreto infiltrado linfoplasmocitário, ausência de supuração ou reação inflamatória do tipo à corpo estanho, não sendo observados macrófagos. A atividade osteoclástica evidenciada foi muito discreta. Por fim, presença de neovascularização presente nas áreas de tecido conjuntivo.

Figura 7. Fotomicrografia do grupo BSI30, 30 dias após a craniectomias indicando a) trabéculas ósseas neoformadas no interior do defeito ósseo e intensa síntese de matriz óssea na periferia do biomaterial b) cordões de osteoblastos sintetizando a matriz óssea c) infiltrado linfoplasmocitário d) neoformação vascular e) osteócitos alocados no interior da matriz óssea. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.

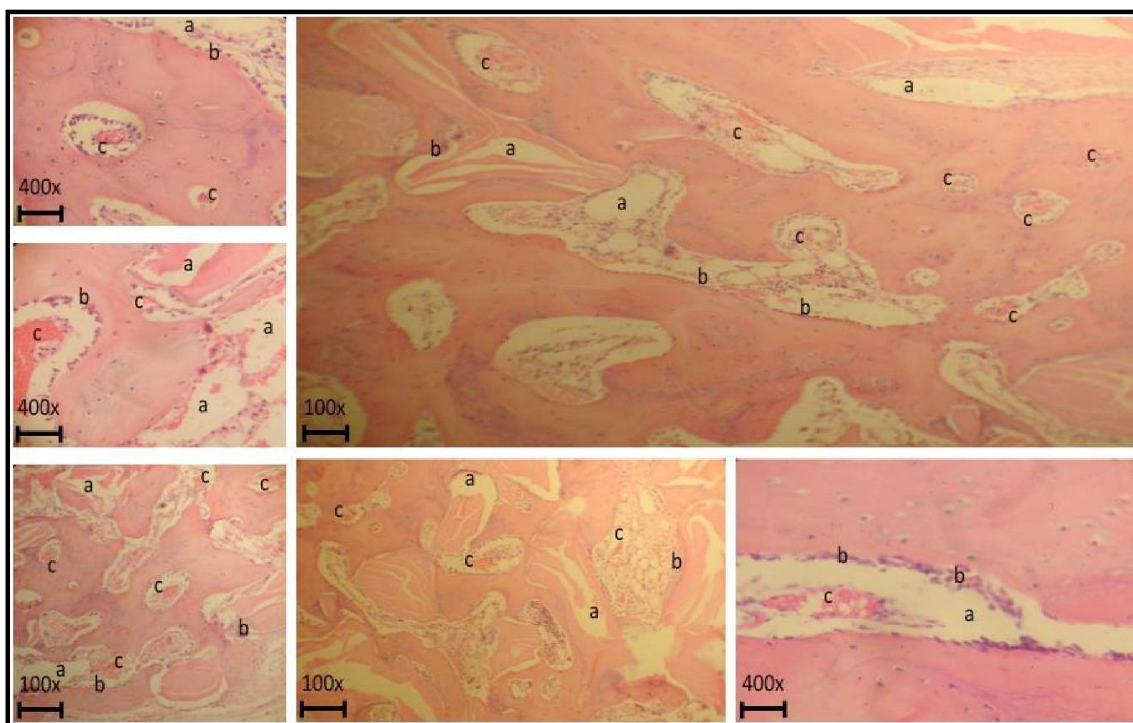


Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 GRUPO DE 30 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL COM ÍMÃ (BCI30)

No período experimental de 30 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a implantação de biomaterial (Bio-Oss®) com estimulação magnética, conforme figura 8, observou-se importante formação de trabeculado ósseo e marcada atividade osteoblástica. Há importante neoformação vascular permeando a área onde se localiza o biomaterial e poucos espaços correspondentes à descalcificação do biomaterial. Na zona superior do defeito ósseo, próximo à área onde se encontra o periósteo, há faixa marcada de tecido ósseo neoformado com atividade osteoblástica. Não foi observado infiltrado inflamatório do tipo reação à corpo estranho e observou-se formação óssea circundando o biomaterial.

Figura 8. Fotomicrografia do grupo BCI30, 30 dias após a craniectomias indicando a) áreas de descalcificação do biomaterial b) cordões de osteoblastos com marcada síntese de matriz óssea e grande quantidade de neoformação óssea c) neoformação vascular abundante. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.

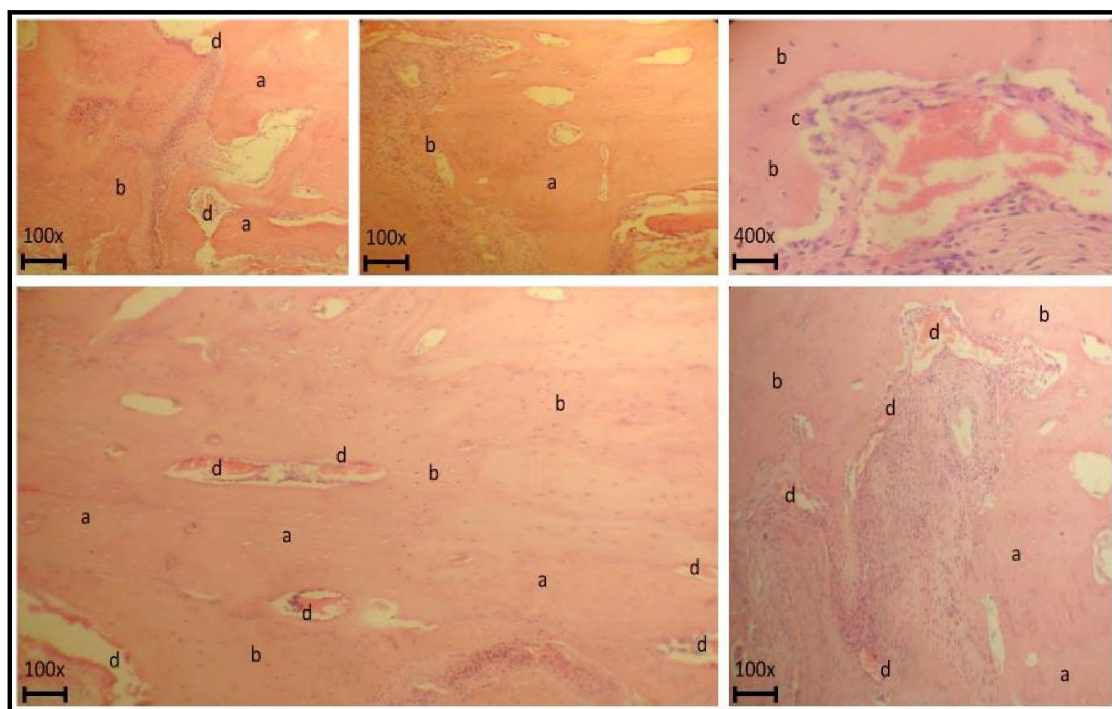


Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 GRUPO DE 60 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO SEM ÍMÃ (ASI60)

No período experimental de 60 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a enxertia óssea autóloga sem estimulação magnética, conforme figura 9, observaram-se trabéculas de tecido ósseo mais maduro preenchendo a área do defeito ósseo e também osteócitos alocados nas trabéculas ósseas neoformadas. Ainda, síntese de matriz óssea por osteoblastos, mas de forma mais moderada. Identifica-se presença de fibroplasia no bordo do defeito ósseo, sendo esta com interposição de tecido conjuntivo. Ausência de infiltrado inflamatório e ausência de sinais inflamatórios do tipo reação à corpo estranho. Observou-se presença de neoformação vascular nas áreas de neoformação óssea e em áreas de osso maduro.

Figura 9. Fotomicrografia do grupo ASI60, 60 dias após a craniectomias indicando a) tecido ósseo maduro b) osteócitos alocados na matriz óssea neoformada c) osteoblastos sintetizando matriz óssea de forma moderada d) neoformação vascular. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.

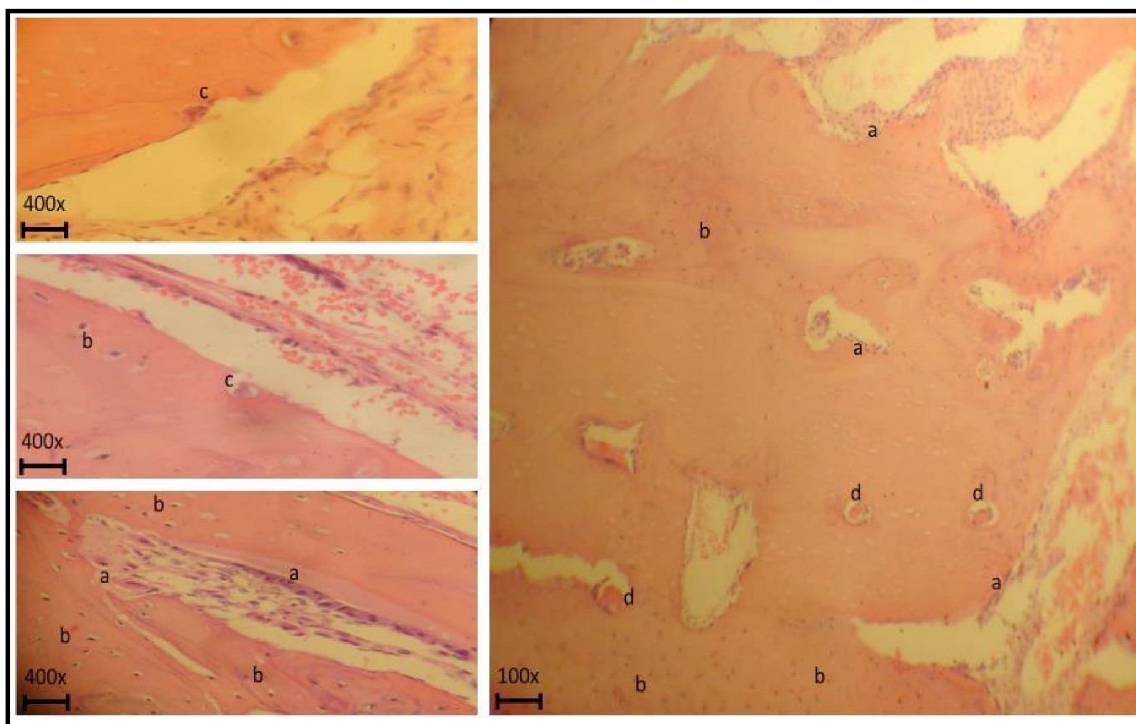


Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 GRUPO DE 60 DIAS COM ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO COM ÍMÃ (ACI60)

No período experimental de 60 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a enxertia óssea autógena com estimulação magnética, conforme figura 10, observou-se atividade osteoblástica com intensidade moderada. Observam-se osteócitos alocados nas trabéculas ósseas neoformadas. Infiltrado linfoplasmocitário ausente e reação inflamatória do tipo à corpo estranho também ausente. Presença de tecido conjuntivo fibroso na região superior do defeito e observam-se lacunas de Howship presentes em diversos campos microscópicos e, estas, contendo osteoclastos promovendo remodelamento ósseo.

Figura 10. Fotomicrografia do grupo ACI60, 60 dias após a craniectomias indicando a) osteoblastos sintetizando moderadamente matriz óssea b) osteócitos alocados na matriz óssea formada c) osteoclastos em lacunas de Howship promovendo remodelação óssea d) Neoformação vascular. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.



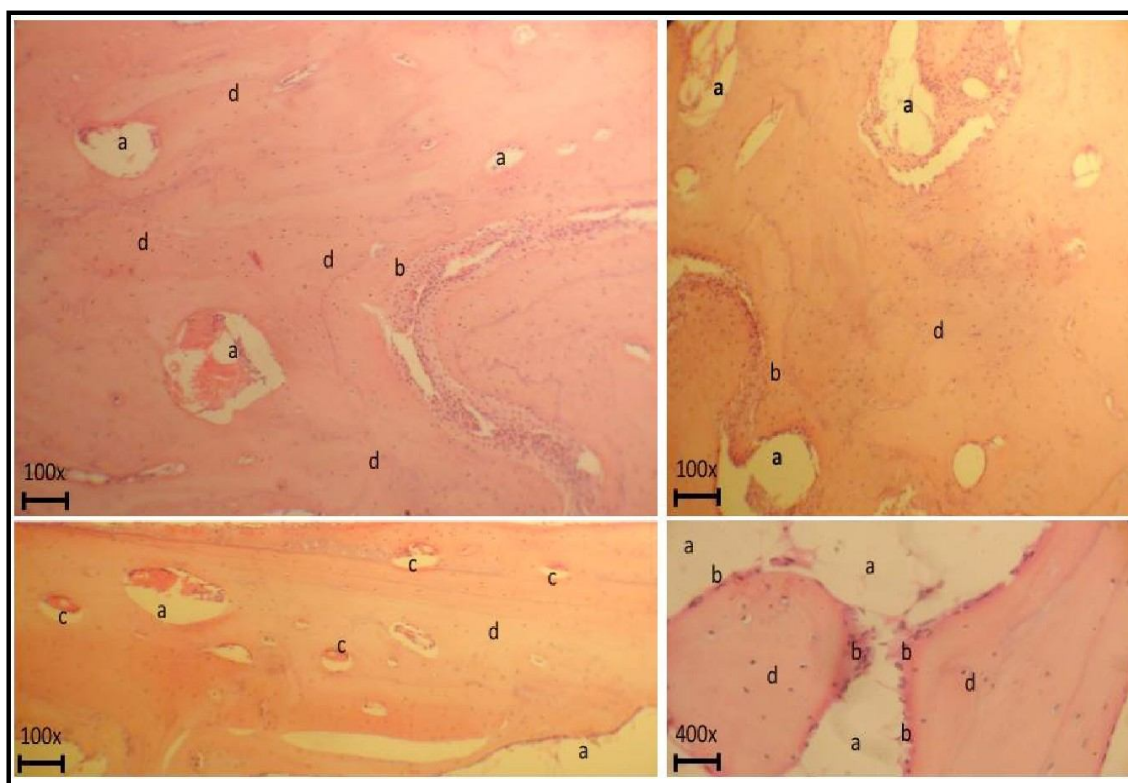
Fonte: Elaborada pela autora.

3.7 GRUPO DE 60 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL SEM ÍMÃ (BSI60)

No período experimental de 60 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a implantação de biomaterial (Bio-Oss®) sem estimulação magnética, conforme figura 11,

observou-se presença de espaços correspondentes à descalcificação do biomaterial utilizado entre as trabéculas ósseas neoformadas. Atividade osteoblástica presente, mas de forma moderada e osteócitos alocados nas trabéculas ósseas neoformadas. A neoformação vascular encontra-se presente, mas também de forma moderada. Não são observadas áreas com infiltrado inflamatório e tampouco reação inflamatória do tipo à corpo estranho.

Figura 11. Fotomicrografia do grupo BSI60, 60 dias após a craniectomias indicando a) espaço do biomaterial descalcificado b) osteócitos alocados na matriz óssea formada c) neoformação vascular d) Osteócitos alocados na matriz óssea neoformada. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.



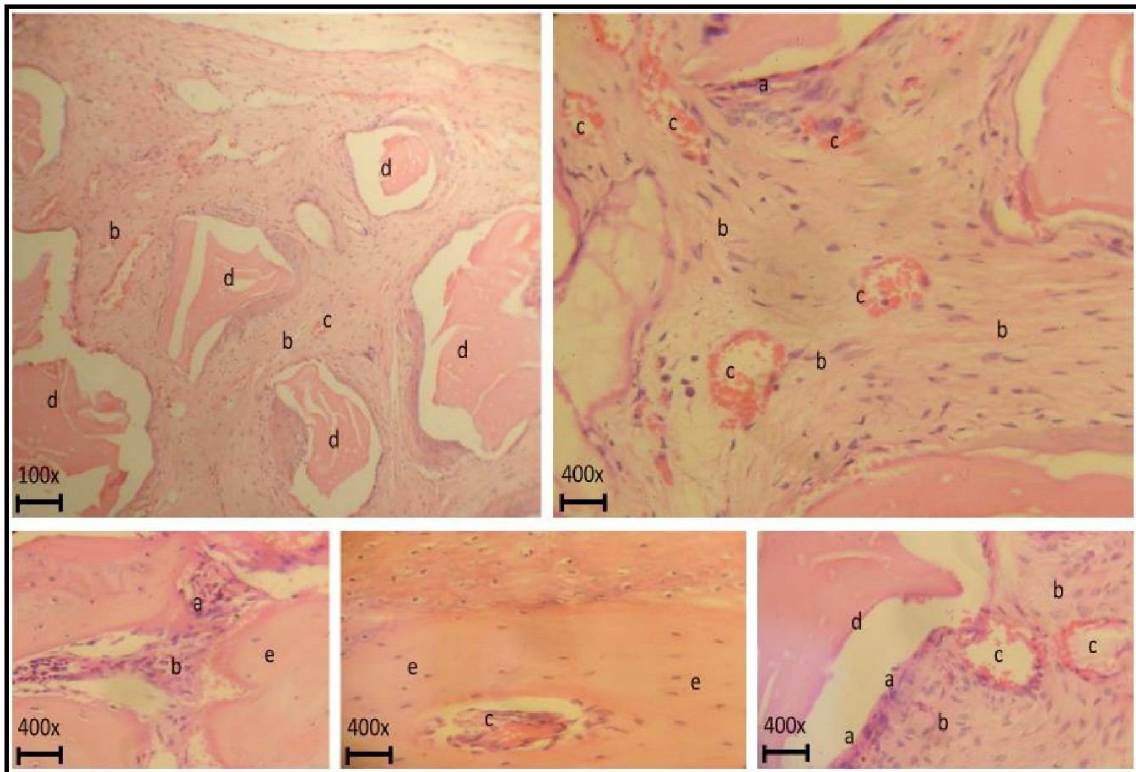
Fonte: Elaborada pela autora.

3.8 GRUPO DE 60 DIAS COM IMPLANTE DE BIOMATERIAL COM ÍMÃ (BCI60)

No período experimental de 60 dias pós-operatórios, nos grupos submetidos a implantação de biomaterial (Bio-Oss[®]) com estimulação magnética, conforme figura 12, observou-se ainda intensa atividade osteoblástica com formação de trabéculas dispostas de forma irregular, com tecido conjuntivo interposto, no qual existe uma intensa proliferação vascular. Ausência de infiltrado linfoplasmocitário e ausência de reação inflamatória do tipo

à corpo estranho. Presença de tecido fibroso sobre o tecido ósseo na porção superior do defeito. Observa-se ainda espaços correspondentes à presença do biomaterial descalcificado.

Figura 12. Fotomicrografia do grupo BCI60, 60 dias após a craniectomias indicando a) osteoblastos sintetizando matriz óssea b) tecido conjuntivo c) neoformação vascular d) espaços da descalcificação do biomaterial e) osteócitos alocados na matriz óssea formada. Aumentos de 100x e 400x com coloração de HE.

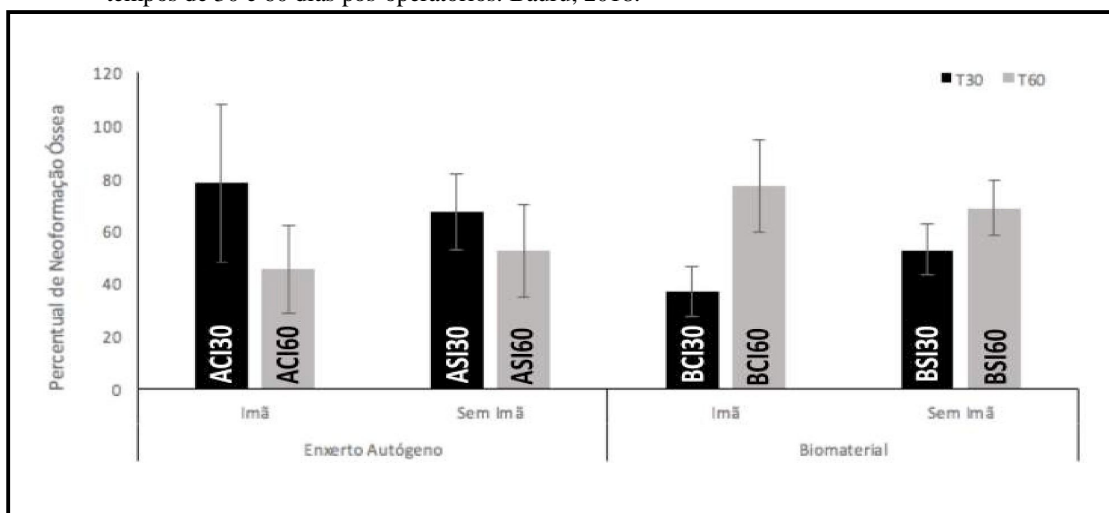


Fonte: Elaborada pela autora.

3.9 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histomorfométrica do percentual de neoformação óssea, no interior dos defeitos ósseos, não evidenciou diferenças significativas entre as comparações de percentual de neoformação óssea entre os grupos com e sem estimulação magnética, tanto nos grupos submetidos à enxertia óssea autógena quanto nos grupos que utilizaram biomateriais, conforme ilustrado no gráfico abaixo (Gráfico 1), mostrando que o campo magnético não promoveu alterações estatisticamente significantes no processo de reparo ósseo.

Gráfico 1. Gráfico ilustrando o percentual de neoformação óssea da análise histomorfométrica respectivamente nos grupos ACI30, ACI60, ASI30, ASI60, BCI30, BCI60, BSI30 e BSI60, nos tempos de 30 e 60 dias pós-operatórios. Bauru, 2018.



Fonte: Elaborada pela autora.

4 DISCUSSÃO

Quando lesado, o tecido ósseo exibe um alto potencial de regeneração, iniciando-se por uma fase inflamatória, seguida de reparo e finalmente remodelação. A duração de cada fase está ligada a alguns fatores sendo estes: o tipo de osso envolvido, a idade do indivíduo, o estado de saúde geral e nutricional, a intensidade do trauma, irrigação local, presença ou ausência de forças mecânicas, imobilização e ausência de infecção, para que o tecido ósseo seja capaz de constituir um osso com capacidade de receber carga funcional (TEM CATE, 2001).

Entretanto, esta capacidade de regeneração, pode não se manifestar em defeitos de grandes dimensões, como em defeitos congênitos, patologias e traumas, uma vez que para haver uma finalização do processo de reparo, é necessário a existência de um seguimento óssea local (BAPTISTA et al., 2003; KAMIJOU et al., 1994).

Nestes casos, o tecido ósseo não apresenta capacidade de regeneração espontânea, necessitando de procedimentos operatórios reconstrutivos, que apresenta na enxertia óssea sua principal técnica de tratamento (SERVICE, 2000; SICCA et al., 2000).

Este estudo utilizou defeitos ósseos na calvária de coelhos. Tal sítio cirúrgico permitiu a criação de defeitos amplos, capazes de avaliar a neoformação óssea dentro do princípio de defeito de tamanho crítico.

Inúmeros estímulos químicos, físicos e biológicos influenciam beneficemente na proliferação, reparo e conseqüentemente na remodelação óssea (ABREU et al., 2016; LIRANI E CASTRO 2005). Poucos estudos relatam a associação de um estímulo físico, como o campo magnético, no reparo de defeitos ósseos (ABREU et al., 2016; MENG et al., 2013).

Desta forma, este trabalho buscou avaliar o reparo ósseo em defeitos criados cirurgicamente e preenchidos com coágulo e submetidos à estimulação magnética permanente e constante em calvária de coelhos por meio de histomorfometria. Pela metodologia aqui utilizada foi possível observar, que no grupo de animais sob influência do campo magnético, houve um percentual de preenchimento ósseo significativamente superior ao grupo sem influência do estímulo magnético, no tempo pós operatório de 30 dias, mas essa diferença não foi verificada aos 60 dias pós operatórios. O campo magnético avaliado no presente estudo acelerou o reparo ósseo em defeitos criados cirurgicamente no período inicial do processo.

O primeiro estudo envolvendo a aplicação de campos magnéticos puros, oriundo de ímãs permanentes sepultados no tecido ósseo, e não provenientes de dispositivos metálicos imantados ou derivados de fontes elétricas, evidenciaram um aumento da densidade óssea nas adjacências dos dispositivos imantados quando comparados aos grupos sem estimulação magnética. Não houve avaliação histológica já que não foi realizado um defeito ósseo e, por isso, a influência do campo magnético sobre o reparo ósseo propriamente dito não pôde ser avaliado como o foi neste estudo. Ainda, os resultados não evidenciaram efeitos sistêmicos nas concentrações de cálcio ou mesmo alteração na atividade sistêmica da enzima fosfatase alcalina (YAN et al., 1998). Estes achados não permitem comparações diretas com os resultados da metodologia que aqui foi empregada, uma vez que aqui avaliou-se o reparo ósseo propriamente dito. Porém, mesmo não possuindo uma avaliação histológica, os resultados de Yan (YAN et al., 1998) evidenciaram, claramente, que o campo magnético é capaz de gerar alterações sobre o leito ósseo.

A partir da determinação de que o remodelamento ósseo está na dependência da existência de forças mecânicas sobre o tecido ósseo, conforme proposto pela lei de Wolff (RUBIN E HAUSMAN, 1988; TROCK, 2000) destaca-se que os resultados deste estudo foram obtidos por meio de uma metodologia que usou um defeito ósseo realizado na calota craniana do coelho e, portanto, trata-se de uma área cuja força muscular que age sobre o tecido ósseo é menor do que a força mecânica que é exercida pela musculatura na região do fêmur. Tal fato, pode ser mais um aspecto que explique o porquê de os resultados evidenciarem a inexistência de diferenças significativas no reparo ósseo entre grupos com e sem estimulação magnética enquanto em outros trabalhos constata-se maior neoformação óssea quando sob estimulação magnética (PURICELLI et al., 2006; PURICELLI et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

Pôde-se concluir que o campo magnético acelerou o reparo ósseo em defeitos criados cirurgicamente no período inicial do processo.

REFERÊNCIAS

1. ABDELRAHIM, A.; HASSANEIN, H. R.; DAHABA, M. Effect of pulse
2. ABREU, M.C.; PONZONI, D.; LANGIE, R.; ARTUZI, F.E.; PURICELLI, E. Effects of a buried magnetic field on cranial bone reconstruction in rats. **J Appl Oral Sci**, v.24, n. 2, p.162-70, 2016.
3. ALOISE, A.C.; PELEGRINE, A.A.; ZIMMERMANN, A.; DE MELLO E OLIVEIRA R.; FERREIRA, L.M. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stem cells or autogenous bone with or without collagen membrane: a histomorphometric study in rabbit calvaria. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.30, n.1, p. 208-15, 2015.
4. AYDIN, N.; BEZER, M. The effect of an intramedullary implant with a static magnetic field on the healing of the osteotomised rabbit femur. **Int Orthop**. v.35, n.1, p.135-41, 2011.
5. BAPTISTA, A. D. et al. Estudo histológico dos enxertos ósseos homólogos humanos. **Acta Ortop Bras**. v.11, n.4, p.220-24, 2003.
6. BRUCE, G. K.; HOWLETT, C. R.; HUCKSTEP, R. L. Effect of a static magnetic field on fracture healing in a rabbit radius. Preliminary results. **Clin Orthop Relat Res**, n. 222, p. 300-6, 1987.
7. CHACKARTCHI, T. ; IEZZI, G.; GOLDSTEIN, M.; KLINGER, A.; SOSKOLNE, A.; PIATELLI, A.; SHAPIRA, L. Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, v. 22, n. 5, p. 473-80, 2011.
8. DADSETAN, M.; GUDA, T.; RUNGE, M.B.; MIJARES, D.; LEGEROS, R.Z.; LEGEROS, J.P.; SILLIMAN, D.T.; LU, L.; WENKE, J.C.; BROWN BAER, P.R.; YASZEMSKI, M.J. Effect of calcium phosphate coating and rhBMP-2 on bone regeneration in rabbit calvaria using poly(propylene fumarate) scaffolds. **Acta Biomater**. p.18:9-20, 2015.
9. HUH, J. B. et al. Effect of rhBMP-2 Immobilized Anorganic Bovine Bone Matrix on Bone Regeneration. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 7, p. 16034-52, 2015.
10. JEON, Y.R.; JUNG, B.K.; ROH, T.S.; KANG, E.H.; LEE, W.J.; RAH, D.K.; LEW, D.H.; YUN, I.S. Comparing the Effect of Nonactivated Platelet-Rich Plasma, Activated Platelet- Rich Plasma, and Bone Morphogenetic Protein-2 on Calvarial Bone Regeneration. **J Craniofac Surg**, v.27, n.2, p.317-2, 2016

11. LAPPALAINEN, O.P.; KARHULA, S.; HAAPEA, M.; KYLLÖNEN, L.; HAIMI, S.; MIETTINEN, S.; SAARAKKALA, S.; KORPI, J.; YLIKONTIOLA, L.P.; SERLO, W.S SÁNDOR, G.K. Bone healing in rabbit calvarial critical-sized defects filled with stem cells and growth factors combined with granular or solid scaffolds. **Childs Nerv Syst**, n.32, v.4, p.681-8, 2016.
12. KAMIJOU, T.; NAKAJIMA, T.; OZAWA, H. Effects of osteocytes on osteoinduction in the autogenous rib graft in the rat mandible. **Bone**, v. 15, n. 6, p. 629-37, Nov-Dec 1994.
13. LOHMANN, P.; WILLUWEIT, A.; NEFFE, A.; GEISLER, S.; GEBAUER, T.P.; BEER, S.; COENEN, H.H.; FISCHER, H.; HERMANN-SACHWEH, B.; LENDLEIN, A.; SHAH, N.J.; KIESSLING, F.; LANGEN, K.J. Bone regeneration induced by a 3D architected hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. **Biomaterials**, v.113, p. 158-169, 2017.
14. MARTINEZ-RONDANELLI, A.; MARTINEZ, J.P.; MONCADA, M.E.; MANZI, E.; PINEDO, C.R.; CADAVID, H. Electromagnetic stimulation as adjuvant in the healing of diaphyseal femoral fractures: a randomized controlled trial. **Colomb Med (Cali)**, v. 45, n. 2, p. 67-71, 2014.
15. MENG, J.; XIAO, B.; ZHANG, Y.; LIU, J.; XUE, H.; LEI, J.; KONG, H.; HUANG, Y.; JIN, Z.; GU, N.; XU, H. Super-paramagnetic responsive nanofibrous scaffolds under static magnetic field enhance osteogenesis for bone repair in vivo. **Sci Rep**, v. 3, p. 2655, 2013.
16. LIRANI, A.P.; LAZARETTI-CASTRO, M. Evidences of physical agents action on bone metabolism and their potential clinical use. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.49, n.6, p.891- 6, 2005.
17. MOURA, J.M.; FERREIRA, J.F.; MARQUES, L.; HOLGADO, L.; GRAEFF, C.F.; KINOSHITA, A. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. **J Mater Sci Mater Med**. v.25, n.9, p.2111-20, 2014.
18. PAKNEJAD, M.; ROKN, A.; ROUZMEH, N.; HEIDARI, M.; TITIDEJ, A.; KHARAZIFARD, M.J.; MEHRFARD, A. Histologic evaluation of bone healing capacity following application of inorganic bovine bone and a new allograft material in rabbit calvaria. **J Dent (Tehran)**, v. 12, n. 1, p. 31-8, 2015.
19. PURICELLI, E.; DUTRA, N. B.; PONZONI, D. Histological evaluation of the influence of magnetic field application in autogenous bone grafts in rats. **Head Face Med**, v. 5, p. 1, 2009.
20. PURICELLI, E.; ULBRICH, E.; PONZONI, D.; FILHO, J.J. Histological analysis of the effects of a static magnetic field on bone healing process in rat femurs. **Head Face Med**, v. 2.

21. RUBIN, C. T.; HAUSMAN, M. R. The cellular basis of Wolff's law. Transduction of physical stimuli to skeletal adaptation. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 14, n. 3, p. 503-17, Dec 1988.
22. SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**. v. 289, n. 5484, p.1498-500, 2000.
23. SEMYARI, H.; RAJIPOUR, M.; SABETKISH, S.; SABETKISH, N.; ABBAS, F.M.; KAJBAFZADEH, A.M. Evaluating the bone regeneration in calvarial defect using osteoblasts differentiated from adipose-derived mesenchymal stem cells on three different scaffolds: an animal study. **Cell Tissue Bank**, v.17, n.1, p. 69-83, 2016.
24. SICCA, C. M. et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB**. v. 8, n.1-2, p.1-10, 2000.
25. TOKURA, Y.; SEKI, S.; NAGAOSA, N. Multiferroics of spin origin. **Rep Prog Phys**, v. 77, n. 7, p. 076501, 2014.
26. TOVAR, N.; JIMBO, R.; GANGOLLI, R.; PEREZ, L. MANNE, L.; YOO, D.; LORENZONI, F.; WITEK, L.; COELHO, P.G. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 2, p. 251-60, 2014.
27. TENCATE, R. A. R. **Histologia Bucal**. 8a Edição. Elsevier, 2013. 220.
28. TROCK, D. H. Electromagnetic fields and magnets. Investigational treatment for musculoskeletal disorders. **Rheum Dis Clin North Am**, v. 26, n. 1, p. 51-62, 2000.
29. TSAI, M. T.; CHANG, W.H.; CHANG, K.; HOU, R.J.; WU, T.W. Pulsed electromagnetic fields affect osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering. **Bioelectromagnetics**, v. 28, n. 7, p. 519-28, 2007.
30. TURRER, C.L.; FIGUEIREDO, A.R.; ORÉFICE, R.L.; MACIEL, P.E.; SILVEIRA, M.E.; GONÇALVES, S.D.E. P; BARBI, J.S. Bioceramic and polymeric bioactive composite implants in orbit zygomatic complex reconstruction: a new prospect for biomaterials. **Arq Bras Oftalmol**. v.71, n.2, p.153-61, 2008.
31. YAN, Q. C.; TOMITA, N.; IKADA, Y. Effects of static magnetic field on bone formation of rat femurs. **Med Eng Phys**, v. 20, n. 6, p. 397-402, 1998.
32. ZENG, X.B.; HU, H.; XIE, L.Q.; LAN, F.; JIANG, W.; WU, Y.; GU, Z.W. Magnetic responsive hydroxyapatite composite scaffolds construction for bone defect reparation. **Int J Nanomedicine**. v.7, p.3365-78, 2012.

ANEXO A COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA, IMUNOISTOQUÍMICA E TOMOGRÁFICA DO REPARO DE DEFEITOS ÓSSEOS CRIADOS CIRURGICAMENTE EM CALVÁRIAS DE COELHOS ESTIMULADOS COM CAMPO MAGNÉTICO", protocolado sob o CEUA nº 2254230915, sob a responsabilidade de **Jéssica Lemos Gulinelli** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Sagrado Coração (CEUA/USC) em reunião de 09/11/2015.

We certify that the proposal "EVALUATION HISTOMORPHOMETRIC, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND TOMOGRAPHY OF BONE DEFECTS SURGICALLY CREATED IN RABBITS CALVARIA REPAIR WITH MAGNETIC FIELD", utilizing 20 Rabbits (20 males), protocol number CEUA 2254230915, under the responsibility of **Jéssica Lemos Gulinelli** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Sagrado Coração University (CEUA/USC) in the meeting of 11/09/2015.

Vigência da Proposta: de 10/2015 a 10/2016

Área: Ciências Da Saúde

Procedência: Biotério Externo

Espécie: Coelhos

Gênero: Machos

idade: 7 meses

N: 20

Linagem: Nova Zelândia

Peso: 3 Kg

Nota: O estudo consiste na avaliação do processo de reparo ósseo em defeitos de calota craniana criadas cirurgicamente em coelhos sob a ação de campo magnético e preenchido com o biomaterial composto por matriz óssea bovina mineralizada, um dos substitutos ósseos mais utilizados na prática clínica odontológica. A avaliação será realizada utilizando 3 ferramentas metodológicas: histomorfometria do osso neoformado por meio do software Image J, imunoistoquímica por meio das expressões das proteínas da matriz óssea Osteocalcina, Osteopontina e TRAP e através da microtomografia verificando as imagens tomográficas tridimensionais do processo de reparo.

Bauru, 10 de novembro de 2015

Prof. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração