FERNANDO KENDI HORIKAWA

**Reparo ósseo em mandíbula de coelho após osteotomia vertical:
Análise histomorfométrica e tomográfica.**

São Paulo

2017

FERNANDO KENDI HORIKAWA

**Reparo ósseo em mandíbula de coelho após osteotomia vertical:
Análise histomorfométrica e tomográfica.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Celso Augusto Lemos-Junior

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Horikawa, Fernando Kendi.

Reparo ósseo em mandíbula de coelho após osteotomia vertical: análise histomorfométrica e tomográfica / Fernando Kendi Horikawa ; orientador Celso Augusto Lemos-Junior. -- São Paulo, 2017.

102 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Cirurgia ortognática. 2. Osteotomia. 3. Mandíbula. 4. Reparo ósseo. 5. Cortical. I. Lemos-Junior, Celso Augusto. II. Título.

Horikawa FK. Reparo ósseo em mandíbula de coelho após osteotomia vertical: Análise histomorfométrica e tomográfica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 23 /03 /2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Jeferson Xavier de Oliveira

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Marcos Barbosa Salles

Instituição: UNINOVE

Julgamento: Aprovado

Profa. Dra. Camila Barros Gallo

Instituição: FOUSP

Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Marcelo Zillo Martini

Instituição: Externo

Julgamento: Aprovado

Dedico a minha mãe Neusa, meu irmão Fabio, meus tios Elio, Laura e Isabel
pelo apoio, força, auxílio, incentivo, e amizade.

Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

- Ao programa de Pós-graduação em Diagnóstico Bucal da FOUSP.
- Ao **Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Junior** pela devida orientação, com inestimável atenção, compreensão e paciência durante toda a pós-graduação.
- Aos demais professores da disciplina de Estomatologia Clínica, **Prof. Dr. Dante Antonio Migliari**, **Prof. Dr. Norberto Nobuo Sugaya**, **Prof. Dr. Fábio de Abreu Alves**, **Profa. Dra. Andrea Lusvarghi Witzel**, **Profa. Dra. Camila de Barros Gallo**, pelos ensinamentos e apoio; bem como a todos os funcionários do departamento especialmente a **Nina** e ao **Laerte**.
- Ao meu tio **Prof. Dr. Elio Hitoshi Shinohara** pelos ensinamentos, orientação, auxílio no desenvolvimento deste trabalho e exemplo de profissional, que até hoje me inspiram e pautam minha vida profissional.
- A **Profa. Dra. Emilia Satoshi Miyamaru Seo** por ter aberto as portas dos laboratórios do IPEN, para o desenvolvimento da fase laboratorial deste trabalho.
- A **Dra. Juliana Seo** pela orientação e auxílio, que foram de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.
- A **Profa. Dra. Nanci do Nascimento** responsável pelo Biotério do IPEN pelo apoio e autorização na utilização do biotério e toda sua estrutura.

- Ao técnico de laboratório do Biotério do IPEN **Sr. Cícero** pelo auxílio e apoio técnico excepcional.
- A **Dra. Maura Massako Ito e Dr. Plínio Jun Iti Yokoyama** da Alpha X radiologia pela realização dos exames de tomografias realizados neste trabalho.
- Aos colegas do Hospital Regional de Osasco em especial, **Dr. Iron Ricardo Machado Snidei, Dr. Avelino Pera Pires.**
- Aos colegas de pós-graduação pelo companheirismo, convívio e aprendizado.

A grandeza de um homem não está no quanto ele sabe, mas no quanto ele tem consciência que não sabe.

Professores brilhantes ensinam para uma profissão.
Professores fascinantes ensinam para a vida.

Augusto Cury

RESUMO

Horikawa FK. Reparo ósseo em mandíbula de coelho após osteotomia vertical: Análise histomorfométrica e tomográfica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

As osteotomias mandibulares são procedimentos consagrados para o tratamento de prognatismo e para outros reposicionamentos cirúrgicos mandibulares. As técnicas mais utilizadas são: a osteotomia sagital de mandíbula (OSM) e a osteotomia vertical de ramo mandibular (OVRM), cada técnica tem suas indicações e limitações. A OVRM é considerada efetiva devido ao sucesso clínico e análise imaginológica, entretanto não existem estudos que descrevam seu processo de reparação óssea, pois nesta técnica o osso mandibular fica sobreposto num contato cortical sobre cortical. O objetivo deste trabalho foi avaliar a reparação óssea cortical-cortical da técnica de osteotomia vertical de ramo mandibular em mandíbulas de coelho. Após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (Protocolo: 014/2014) foram utilizados 12 animais, divididos em quatro grupos de três. Os animais foram submetidos a osteotomia em “L” invertido no ângulo mandibular bilateralmente, este fragmento ósseo obtido foi deslizado anteriormente e fixado com parafuso sobre a basal mandibular anterior, num dos lados de um animal de cada grupo foi realizada somente a osteotomia, sendo este utilizado como controle cirúrgico; um dos grupos foi submetido a processo de infiltração de marcadores fluorocromáticos. Os animais foram divididos em G1 (eutanasiados em 15 dias), G2 (eutanasiados em 30 dias), G3 (eutanasiados em 45 dias) e G4 (protocolo de marcadores fluorocromáticos e eutanasiados com 56 dias). Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram mantidos em biotério padrão, nos tempos determinados foram eutanasiados, as mandíbulas foram dissecadas, tomografadas em tomógrafo de feixe cônico e analisadas sob microscopia de fluorescência. Na análise tomográfica observou-se que existe correlação entre os valores de densidades nas áreas operadas e na região do controle, e que há correlação significativa entre as áreas de sobreposição óssea e onde foi realizado somente a osteotomia (controle cirúrgico). Com relação a análise de microscopia de fluorescência, observa-se que as proporções do marcador

alizarina são superiores a calceína no osso neoformado, tanto na área operada, quanto na região onde foi feita somente a osteotomia (controle cirúrgico). Concluímos que houve consolidação óssea quando da sobreposição cortical-cortical, e que os valores de densidades tomográficas quando da sobreposição óssea ou não, são similares, e que há maior formação óssea no primeiro mês no processo de reparação.

Palavras-chave: Cirurgia ortognática. Osteotomia vertical de mandíbula. Reparação óssea cortical-cortical,

ABSTRACT

Horikawa FK. Bone repair in rabbit mandible after intra-oral vertical osteotomy: Histomorphometric and tomographic analysis [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Mandibular osteotomy is a well-established intervention for the treatment of prognathism and other conditions requiring mandibular repositioning. The most commonly used osteotomy techniques are intraoral vertical ramus osteotomy (IVRO) and sagittal split ramus osteotomy (SSRO), each of which has particular indications and limitations. Although IVRO is considered effective owing to observations of clinical success and imaging analyses, there are no studies describing the bone repair processes that follow IVRO because, in this technique, the mandibular bone is overlaid at a cortical-cortical contact site. The purpose of this study was to evaluate cortical-cortical bone repair in rabbit mandibles following IVRO. After approval of the Ethics and Research Committee on Animals of the Faculty of Dentistry of the University of São Paulo (Protocol: 014/2014), 12 rabbits, divided into four groups of three, were used. The four groups, G1, G2, G3, and G4, were euthanized 15 days, 30 days, 45 days, and 56 days post-IVRO; the animals in G4 were also infused with fluorochemical markers. All 12 animals were submitted to a bilateral inverted "L" osteotomy at the mandibular angle. On one side, the released bone fragment was advanced anteriorly and fixed with a screw onto the anterior mandibular basal bone; on the other side, only the osteotomy was performed to serve as a within-animal control site. After the operations, the animals were kept in a standard room until they were euthanized at the group-designated time points. Upon euthanasia, the mandibles were dissected, imaged digitally by conical beam tomography, and analyzed under fluorescence microscopy. The tomographic analysis results revealed a correlation between density values in the operated IVRO sites of bone overlap and the contralateral osteotomy-only surgical control sites. Fluorescence microscopy analysis revealed the presence of elevated alizarin marker (above calcein levels) in the neoformed bone, both in the operated side and in the osteotomy-only control side. Bone growth was greater at the 15-day and 30-day time points than at the later time points. In conclusion, bone consolidation occurred at cortical-cortical overlap

sites, tomographic densities were similar between bone overlapping and nonoverlapping (control) sides, bone formation was maximal during the first month of repair.

Keywords: Orthognathic surgery. Intra oral vertical osteotomy. Cortical-cortical bone repair.

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Formulação, dosagem e tempo de aplicação de marcadores fluorocromáticos	58
Tabela 5.1 - Média das medidas de densidade obtidas para os sete coelhos analisados	71
Tabela 5.2 - Correlação entre o lado operado (direito e esquerdo) com controle tomográfico (direito e esquerdo)	73
Tabela 5.3 - Coelho I – Com estatísticas descritivas – medidas de densidade.....	74
Tabela 5.4 – Áreas das lâminas de microscopia fluorescência	77

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Técnica intra-oral para osteotomia de ramo vertical através de utilização de serra oscilante angulada.....	21
Figura 1.2	Sobreposição de segmentos após reposicionamento posterior da porção anterior da mandíbula. O segmento proximal que contém o côndilo está sobreposto na face lateral da porção anterior do ramo.....	22
Figura 4.1	Medicamentos utilizados para a sedação dos animais	48
Figura 4.2	Iniciando do lado esquerdo: contra-ângulo e micromotor (WH [®]), peça cirúrgica angulada (Kavo [®]), acima das pontas está o kit de parafusos de enxerto ósseo (Synthes [®]), e a direita o motor elétrico Osteosset 200(Nobel Biocare [®])	49
Figura 4.3	Tomógrafo utilizado para a obtenção das imagens tomográficas, com FOV pequeno	50
Figura 4.4	Local de armazenamento dos animais com, gaiolas individuais e climatizadas	51
Figura 4.5	Divisão dos grupos de estudo.....	52
Figura 4.6	Simulação num crânio seco da osteotomia em “L” invertida realizada .	53
Figura 4.7	Simulação do local onde foi realizada a sobreposição óssea, com colocação de parafusos	53
Figura 4.8	Incisão submandibular	55
Figura 4.9	Divulsão por planos e exposição de ângulo mandibular	56
Figura 4.10	Realizando a osteotomia em “L” invertido no ângulo mandibular	57

Figura 4.11 Sobreposição óssea cortical/cortical mais fixação com parafuso de enxertia	57
Figura 4.12 Imagem tomográfica corte axial, demonstrando a região de controle cirúrgico do lado D, e a região de sobreposição óssea no lado E	60
Figura 4.13 Densidade em HU, coletados pelo programa NobelClinician, nas regiões de sobreposição óssea, controle cirúrgico e controle tomográfico	60
Figura 4.14 Utilizando o Image J, mostrando a contagem de áreas neoformadas, contornando as áreas coradas com as cores vermelho acastanhadas (Alizarina) e verdes (Calceína)	63
Figura 4.15 Microscopia fluorescência na região de controle cirúrgico (osteotomia), onde as áreas coradas com coloração vermelho acastanhadas foram marcadas pela alizarina, portanto regiões neoformadas nas primeiras três semanas pós-trauma; enquanto que as áreas esverdeadas foram coradas pela calceína, formadas na quarta e quinta semana pós-operatória.....	64
Figura 4.16 Microscopia de fluorescência de controle cirúrgico, porém a área neoformada foi contada de uma única vez, por meio de saturação de cores; onde a região avermelhada foi à região marcada pela calceína. 65	65
Figura 4.17 Lâmina em aumento de 2,5 X, mostrando que ocorreu reparação óssea na região de sobreposição óssea cortical-cortical	66
Figura 4.18- Lâmina em aumento de 10 X - Presença de estruturas: Seta branca observa-se a matriz osteoide sob as quais estão dispostos os osteoblastos (célula óssea em atividade), Seta azul mostra lamelas com osteócito (celula ossea madura)	66
Gráfico 5.1 - As médias das densidades obtidas tanto nas áreas operadas quanto controle de cada animal encontra-se representada no gráfico	
Gráfico 5.2 - Distribuição (Box plot) das medidas de densidade – Coelho I: lado direito operado com sobreposição cortical/cortical, controle tomográfico do lado direito e controle cirúrgico do lado esquerdo (osteotomia).....	74

Gráfico 5.3	Medidas de densidade do lado direito operado com sobreposição cortical/cortical e do lado direito com controle cirúrgico (osteotomia) no coelho I.....	75
Gráfico 5.4	Médias de proporção de área com neoformação óssea, coradas com os marcadores fluorocromáticos alizarina (três semanas pós-trauma) e calceína (quarta e quinta semana pós-trauma); bem como o comparativo entre as regiões com sobreposição óssea cortical/cortical e controle cirúrgico (osteotomia)	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação têmporo-mandibular
BMM	Bloqueio maxilo-mandibular
CEUA	Comitê Ética Uso de Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DTM	Disfunção têmporo-mandibular
FOV	Field of view (campo de visão)
HE	Hematoxilina e Eosina
HU	Unidades Hounsfield
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Ltda	Limitada
OSM	Osteotomia sagital de mandíbula
OVRM	Osteotomia vertical de ramo mandibular
TC	Tomografia computadorizada
2D	Duas dimensões
3D	Três dimensões

LISTA DE SÍMBOLOS

kg	Quilogramas
ml	Mililitros
®	Marca registrada
%	Porcentagem
mm	Milímetros
°C	Grau Celsius
mg	Miligramas
cm	Centímetros
ui	Unidades internacionais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Ortognática	26
2.2	Reparo ósseo.....	29
2.3	Marcadores fluorocromáticos.....	36
2.4	Tomografia.....	38
3	PROPOSIÇÃO	44
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
4.1	Material.....	47
4.1.1	Protocolo animal.....	47
4.1.2	protocolo cirúrgico	47
4.1.3	Marcadores fluorocromáticos.....	49
4.1.4	Protocolo tomográfico.....	50
4.2	Métodos.....	51
4.2.1	Procedimento cirúrgico	51
4.2.2	Protocolo de marcadores fluorocromáticos.....	58
4.2.3	Análise da micro TC	59
4.2.4	Preparação de espécimes	61
4.2.5	Análise histomorfométrica.....	62
4.2.6	Análise estatística.....	67
5	RESULTADOS.....	68
5.1	Tomografia de FOV pequeno.....	69
5.2	Análise de marcadores fluorocromáticos.....	76
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS.....	87
	ANEXOS	102

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tratamento das deformidades esqueléticas maxilofaciais, particularmente das deformidades mandibulares, desenvolveu-se como arte bem como ciência ao longo do tempo. A primeira correção cirúrgica de má-oclusão foi descrito por Hüllihen em 1849 (Norman; Painter, 1980). No entanto, foi no início da década de 1950 que a cirurgia ortognática começou realmente a ser difundida (Obwegeser, 2007).

O tratamento das deformidades dento-faciais muitas vezes constitui um desafio para os cirurgiões bucomaxilofaciais. As duas osteotomias mais utilizadas pelos cirurgiões para tratar as deformidades mandibulares são a osteotomia sagital de ramo mandibular (OSM) e osteotomia vertical de ramo mandibular (OVRM). Ambas osteotomias são tipicamente realizadas por meio de abordagem intraoral. No entanto, a OVRM está limitada a procedimentos de recuo mandibular para o tratamento de prognatismo ou avanço mandibular de até 02 mm; enquanto a OSM é utilizada tanto em prognatismo quanto retrognatismo mandibular. Além disso, as assimetrias mandibulares podem ser tratadas por OSM bilaterais ou uma combinação de OVRM unilateral e OSM contralateral (Aziz; Roser, 2012).

A cirurgia ortognática para pacientes com deformidades mandibulares, objetiva resolver os problemas funcionais e estéticos que acometem a mandíbula. Este tratamento também contribui para melhorar a auto estima dos pacientes, porque freqüentemente relatam dificuldades com as interações sociais e interpessoais (Proffit; Turvey, 2003).

Atualmente a cirurgia para correção de prognatismo mandibular é procedimento eletivo e disseminado. E diferentes técnicas já foram descritas, sendo a osteotomia mandibular o procedimento cirúrgico mais utilizado para a correção das deformidades dento-facial. Em grande parte por ser um procedimento com resultado previsível e baixos índices de complicações (Ghalli; Sikes, 2000).

O procedimento de OVRM consiste na osteotomia vertical de espessura total do ramo a incisura mandibular, com a criação de um segmento proximal onde ficam o côndilo e parte posterior do ramo e uma extremidade distal segmento contendo o

ramo anterior, processo coronoide, nervo alveolar inferior, da mandíbula e os dentes (McKenna; King, 2016) (Figura 1.1).

Fig 1.1 - Técnica intra-oral para osteotomia de ramo vertical através de utilização de serra oscilante angulada (Tucker; Farrell, 2014)

Após a mandíbula atingir a oclusão planejada, completa-se o bloqueio maxilo mandibular (BMM); os segmentos proximais das osteotomias devem ser checados para assegurar o correto posicionado da articulação temporomandibular, o segmento proximal, onde estão contidos o côndilo e a parte posterior do ramo mandibular fica lateralmente ao coto distal, posicionado de forma passiva e com sobreposição e contato ósseos adequados, bem como se a posição vertical do segmento proximal é adequada (Tucker; Farrell, 2014) (Figura 1.2).

Fig 1.2 - Sobreposição de segmentos após reposicionamento posterior da porção anterior da mandíbula. O segmento proximal que contém o côndilo está sobreposto na face lateral da porção anterior do ramo (Tucker; Farrell, 2014)

Arimoto et al. (2013), realizaram trabalho retrospectivo onde analisaram o reparo ósseo por meio de imagens tomográficas seriadas pós-operatórias de pacientes submetidos a recuos mandibulares, e concluíram que há processo de reparo do ponto de vista tomográfico. Porém não há relatos estudos clínicos mais aprofundados que quantifiquem a formação óssea entre fragmentos após OVRM para deformidades mandibulares.

As osteotomias para correção de deformidades faciais produzem trauma local, com a consequente instalação de processo inflamatório. As fases deste processo de reparação são a inflamação propriamente dita e o processo de reparo, que se inicia junto à inflamação, porém estendendo-se muito além do término desta. A inflamação é uma resposta do organismo que inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas, que buscam eliminar a causa da lesão inicial. Patógenos infecciosos e tecidos lesados são combatidos, com isso ocorre sua função protetora por meio de diluição, destruição ou neutralização dos agentes nocivos (Alegrini et al., 2003).

Na osteotomia sagital da mandíbula geralmente ocorre um processo de remodelação óssea por primeira intenção, pois as bordas dos segmentos são precisamente posicionadas com o mínimo de espaço entre eles, havendo contato ósseo entre porções medulares, e exige fixação interna estável mais imobilização para promover a reparação mais rápida e diminuir a formação de cicatrizes e risco de infecção. Quando conseguimos estabilidade absoluta dos cotos ósseos ocorrerá reparação por ossificação intramembranosa com a mínima formação de calo, sendo descrita como reparação por primeira intenção (Shapiro, 2008). Agora na osteotomia vertical de ramo mandibular ocorre reparação por segunda intenção, pois não há perfeito contato dos cotos ósseos, havendo espaço residual entre as duas extremidades ósseas. Nesses casos em que acontece um movimento significativo entre os fragmentos ósseos ou quando há um espaço grande entre eles, há primeiro a formação de calo cartilaginoso intermediário, que posteriormente se torna ossificado; a este processo dá-se a denominação de ossificação endocondral (Kwong; Harris, 2008).

A capacidade de regeneração óssea da mandíbula difere dos outros tecidos, pelo período de reabsorção e aposição óssea. Isto é explicado, principalmente, pela dinâmica da reabsorção óssea e aposição de osso normal. O reparo está diretamente relacionado ao tamanho do defeito ósseo, localização anatômica, idade, patologia sistêmica, dentre outros (Schmitz; Hollinger, 1986).

Todo este processo de entendimento da biologia óssea avançou muito nas últimas décadas, principalmente em virtude dos estudos relacionados às reabilitações bucais. O avanço da reabilitação oral por meio de implantes dentários tornou-se modalidade de tratamento rotineiro (Chiapasco; Zaniboni, 2011). A deficiência óssea requer, em muitos casos, procedimentos de enxertia para adequar o volume para a instalação de implantes. Os defeitos ósseos alveolares podem ter origem de extrações dentárias, fraturas ou processos patológicos. Estes defeitos podem comprometer a instalação ideal de implantes, prejudicando a reabilitação protética. Nestes casos o aumento do rebordo alveolar pode ser alcançado por uma variedade de técnicas e materiais, como membranas, enxertos ósseos em bloco e/ou particulado, distrações osteogênicas, dentre outras (McAllister; Haguighat, 2007).

Quando há necessidade de enxertia óssea o leito receptor é preparado para receber este enxerto, onde são realizados desgastes e/ou perfurações para acomodação do fragmento ósseo e principalmente pelo melhor suprimento sanguíneo, auxiliando desta forma no processo de reparo.

Já na técnica de OVRM que é das mais utilizadas nas deformidades mandibulares, dá-se de maneira diferente, pois não há nenhum tipo de preparo nas interfaces ósseas para guiar ou incrementar a reparação óssea. Nesta técnica fundamentalmente os seguimentos proximais ficam posicionados lateralmente aos distais, perfazendo uma interface de contato cortical-cortical. Sabe-se que há consolidação óssea quando da sobreposição de duas corticais. Afirmativa esta baseada em estudos clínicos e análise tomográfica, porém não existem trabalhos que descrevem histologicamente como se dá este processo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Ortognática

As origens da cirurgia ortognática mandibular situam-se ao longo dos bancos do rio Ohio, onde o cirurgião da Virgínia Ocidental, chamado Simon Hüllihen descreveu o primeiro procedimento cirúrgico para a correção de protrusão mandibular dentoalveolar sendo descrito no *Journal of Dental Science* em janeiro de 1849 (Norman; Painter, 1980). Tecnicamente, tratava-se de osteotomia de cunha bicúspide bilateral na topografia de corpo mandibular bilateralmente para "retroceder" o segmento dentoalveolar mandibular, como tratamento de mordida aberta esquelética. A osteotomia não violou a borda inferior da mandíbula (Aziz; Simon, 2004). Em publicação de Jaboulay e Berard (1898), também relataram a osteotomia bilateral do colo de côndilo mandibular para o correção do prognatismo.

Posteriormente o desenvolvimento da cirurgia ortognática mandibular foi realizado por Vilray Blair, que projetou a "operação de St. Louis", que consistia em osteotomias na topografia do corpo mandibular bilateral para tratamento de prognatismo mandibular em 1897. Vários tipos de osteotomias mandibulares foram desenvolvidas e descritas por cirurgiões americanos e europeus para correção de deformidades mandibulares. Sendo que sempre eram necessárias incisões extraorais, assim como o sacrifício do nervo alveolar inferior (Aziz; Roser, 2012).

A OVRM foi desenvolvida pela primeira vez no Walter Reed Medical por Jack Caldwell e George Letterman em 1954 (Caldwell; Letterman, 1954). Originalmente realizado a partir de abordagem extraoral e usado para tratar prognatismo mandibular. Sua novidade residia no fato que esta osteotomia minimizava a lesão do nervo mandibular. Em 1970, Jon Kent e Ed Hinds (da Universidade do Texas-Houston) projetaram uma serra em 90 graus numa forma de realizar a osteotomia por acesso intra-oral (Herbert et al., 1970).

Durante os anos 1970 e 1980, David Hall (da Universidade de Vanderbilt) refinou a OVRM, demonstrando que esta técnica poderia ser usada não somente

para prognatismo mandibular, mas também para casos de retrognatismo leve, onde fosse necessário avanço de até 02 mm. Além disso, Hall e McKenna defenderam também a OVRM como tratamento mais indicado para pacientes com deformidades mandibulares associadas às disfunções temporomandibulares (DTM) (Hall; McKenna, 1987).

Diariamente muitos procedimentos cirúrgicos são realizados na mandíbula, e as OVRM e a OSM têm sido as técnicas mais comumente realizadas para o tratamento de prognatismo e/ou assimetrias mandibulares (Costa et al., 2001; Ghali; Sikes, 2000; Chang et al., 2006; Bell, 1992). Segundo Ghali e Sikes (2000) e Chang et al. (2006), a OVRM é útil no tratamento do prognatismo, onde suas principais vantagens são: simplicidade técnica e menor tempo cirúrgico do que a OSM, pois requer apenas uma única linha de osteotomia.

A OVRM é procedimento tecnicamente simples que pode ser realizada de forma eficiente e com baixa morbidade; inicialmente como grande vantagem era descrita a boa visualização, porém apresentava como desvantagem a presença de cicatriz externa e potencial lesão ao nervo facial pelo acesso (Caldwell; Letterman, 1954). Devido estas desvantagens vários autores modificaram a técnica, e desenvolveram instrumentais mais específicos (Bell et al., 1980).

Moose em (1964), foi o primeiro a descrever a técnica por meio de acesso intra-bucal, e desde então diversos autores foram refinando a técnica. Neste artigo Moose relatou 25 casos de pacientes tratados com sucesso pela osteotomia subcondilar intraoral por abordagem medial (Moose, 1964). O primeiro a utilizar a osteotomia subcondilar de ramo mandibular utilizando abordagem lateral foi Winstanley (1968), que descreveu a técnica de osteotomia vertical por acesso intra-oral, e citam como principais vantagens a prevenção de cicatriz facial e de potencial prejuízo ao ramo mandibular do nervo facial e ao nervo alveolar inferior. A principal desvantagem desta técnica é a pouca visibilidade do campo cirúrgico.

Outra vantagem descrita é a não necessidade de fixação interna rígida, e com isso existe a possibilidade de mudança e/ou acomodação do segmento ósseo proximal, deixando o côndilo numa posição anatômica (Parker et al., 1989). Devido a esta característica a OVRM tem obtidos bons resultados em pacientes que

apresentam disfunções temporomandibulares e má oclusão promovendo alívio no desconforto da DTM (Hall et al., 2000; Park et al., 2013).

A osteotomia vertical de ramo mandibular é tipicamente realizada para prognatismo, entretanto existem outras indicações para esta técnica, como a má oclusão secundária a fratura mandibular, hiperplasia condilar com prognatismo assimétrico, e assimetria mandibular (Manor et al., 2001). Como na maioria dos procedimentos cirúrgicos ortognáticos, atualmente a OVRM é geralmente realizada transoralmente. Por este acesso, a visibilidade é limitada e utilização de material de fixação quando necessário é possível, porém de grande dificuldade (Hall et al., 2000; Aziz; Roser, 2012).

Na maioria dos casos os pacientes que são submetidos à OVRM, permanecem sob BMM por pelo menos 03 semanas. Esta necessidade de bloqueio maxilo mandibular (BMM) no pós-operatório é tido como a deficiência primária deste procedimento (Kaneko et al., 2012). Dentre as vantagens sobre da OVRM a mais destacada é a baixa incidência de perturbação neurosensorial, que varia de 0% a 35%, enquanto que a OSM pode chegar a 85% (Westermarck et al., 1998; Al Bishri et al., 2005).

A OVRM geralmente pode ser realizada em pacientes com disfunção temporomandibulares que possuem ou não deformidade nos maxilares, especialmente prognatismo mandibular ou assimetria mandibular, baseado nos movimentos inerentes do côndilo, pois nos movimentos de rotação e translação do côndilo, o disco permanece na posição posterior e com isso há a descompressão da articulação temporomandibular (Park et al., 2013).

O procedimento de OVRM envolve dissecação larga que resulta em desprendimento dos músculos em torno do ramo mandibular, e osteotomia para sobreposição dos segmentos proximais. Esta sobreposição lateral resulta em alterações posturais e angulares imediatas do côndilo. Seguidas por mudanças posicionais dinâmicas durante o processo de remodelação (Aziz; Roser, 2012). Pode ocorrer deslocamento condilar ou luxação da fossa glenóide, que ocorre provavelmente pela extensão do descolamento do músculo pterigóideo mediano (Ghali; Sikes, 2000; Al-Bishri et al., 2005).

Outra grande complicação é interferência óssea entre os cotos proximal e distal. Essas complicações foram consideradas como relacionadas à falta de fixação interna e ao recuo inadequado (Yamauchi et al., 2007; Jung et al., 2013). Kawase-Koga et al. (2016), estudaram os índices de complicações relacionadas ao trajeto da linha de osteotomia e concluiu que se forem feitas osteotomias oblíquas, as complicações relacionadas a luxações e interferências osseas seriam minimizadas.

Embora a OVRM seja feito por meio de única osteotomia, lesões arteriais e neurológicas podem ser causadas se esta for feita na posição errada. A eminência antilingual é a principal estrutura de referência para OVRM, porque muitas vezes é correlacionado com a posição da língua o ponto de entrada do feixe neurovascular na mandíbula, entretanto em muitos pacientes esta proeminência na face vestibular do ramo mandibular não é visível (Hogan; Ellis 3rd, 2006).

Troulis et al. (2000), descreveram a técnica de OVRM por via endoscópica extra-oral. E a primeira série de resultados clínicos usando tal técnica foi por meio de estudo retrospectivo de série de casos em 2004 e como conclusão do trabalho é que o procedimento era possível e com resultados aceitáveis (Troulis; Kaban, 2004).

A osteotomia vertical de ramo mandibular por via endoscópica extra-oral foi descrita primeiramente Troulis et al. (2000). Esta abordagem reduz significativamente o trauma da dissecação e com isso contribui para a redução de sangramento e inchaço local, devido à natureza contida e localizada da óptica. Em contraste com acessos intraorais endoscopicamente assistida, onde a osteotomia é realizada com visibilidade limitada e o endoscópio é usado para confirmar a posição após a conclusão da osteotomia (Robiony et al., 2007).

2.2 Reparo ósseo

Os tratamentos cirúrgicos das deformidades dentofaciais possuem como princípio básico o restabelecimento da função e consequentemente harmonia facial. Para que ocorra o sucesso deste procedimento, se faz necessário o entendimento da biologia óssea que acontece durante o período de reparação óssea.

O tratamento das fraturas e a reparação óssea são processos pós-natais que refletem muitos dos eventos ontológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário do esqueleto e que foram extensivamente revisados em outros lugares (Bolander, 1992; Einhorn 1998; Fergusson et al., 1999; Gerstenfeld et al., 2003). Acredita-se que a cura da fratura é dos poucos processos pós-natais verdadeiramente regenerativos, restaurando o órgão esquelético danificado à sua composição celular, estrutura e função biomecânica pré-lesão.

Quando da realização de osteotomia mandibular, implica na promoção de trauma local. Nestes casos o processo de reparação óssea depende do espaço existente entre os traços da fratura. Quando não se utiliza material de fixação rígida como nos casos de OVRM, espera-se reparação por segunda intenção; com a instalação de processo inflamatório. Este processo de reparação óssea inicia com uma cascata de acontecimentos sequenciais que ocorrem durante algumas semanas (Einhorn; Gerstenfeld, 2015).

O tecido ósseo pode sofrer injúrias dos mais diversos mecanismos, dentre os quais podemos citar traumas, infecções, tumores e deficiência de suprimento sanguíneo. A reparação óssea é processo fisiológico, onde ocorre substituição deste tecido lesado por novo osso, renovando assim as propriedades mecânicas e biológicas semelhantes ao tecido antes da injúria (Buckwalter et al., 2007). Este processo envolve interação complexa de eventos biológicos ocorrendo migração celular nas proximidades do local da lesão, juntamente com as forças mecânicas de impacto existentes neste local. Osso tem capacidade substancial de reparação em resposta à fratura; envolvendo a integração complexa de células, fatores de crescimento, e matriz extracelular. As restaurações de reparo de fratura e a regeneração dos tecidos lesados, eventualmente ocorrem sem aumentar o volume do osso (Al-Aql et al., 2008).

A reparação óssea se dá basicamente por meio de três estágios: inflamatório, fibroblástico e de remodelação. O estágio inflamatório começa imediatamente após a lesão e persistem por até cinco dias, onde inicialmente ocorre vasoconstrição com formação de coágulo, e então as células com propriedades inflamatórias e fagocíticas são atraídas para região. O estágio fibroblástico envolve os fibroblastos, formação de fibrina e aumento da vascularização da ferida durante as próximas três

semanas. Finalmente o estágio de remodelação envolve a reorganização e fortalecimento da ferida (Hupp, 2003).

Assim que ocorre o traumatismo, há a formação de um coágulo, que é constituído por células do sangue periférico e intramedular, bem como células da medula óssea. A lesão inicia resposta inflamatória que é necessário para o processo de reparação progredir (Gerstenfeld et al., 2003). O pico da resposta inflamatória aguda ocorre dentro das primeiras 24 horas e está completa após sete dias, embora moléculas pró-inflamatória também desempenham papel importante mais tarde na regeneração (Cho et al., 2002).

Imediatamente após o trauma, a cascata de processos inflamatórios se inicia com a migração celular para o local do trauma para mediar o processo inflamatório, onde macrófagos locais e células danificadas liberam fatores de vasodilatação (interleucina 1 e fator de necrose tumoral), e moléculas de adesão de polimorfonucleares. Esta mudança resulta na migração de leucócitos polimorfonucleares para o local da lesão. Imediatamente adjacente à linha de fratura, formará calo cartilaginoso, e adjacente a esta região central, nas bordas dos novos tecidos de cartilagem, o inchaço do periósteo e formação óssea primária se inicia (Phillips, 2005; Buckwalter et al., 2007).

O processo de reparação óssea pode ser descrito como sucessão de fases. Inicialmente ocorrem imediata resposta inflamatória, que recruta células-tronco mesenquimais e as diferenciam posteriormente em condrócitos que produzem cartilagem e osteoblastos. Depois de matriz de cartilagem que é produzida, é transformada a partir de cartilagem mineralizada para o osso. Esta formação de osso primário é seguido de remodelação, na qual o calo ósseo primário é remodelado por reabsorção e seguida pela formação de osso secundário para restaurar a estrutura anatômica e funcional do referido osso (Gerstenfeld et al., 2003).

Quando falamos sobre trauma ocorre ruptura da estabilidade óssea bem como da vascularização local; nesses casos quando conseguimos uma estabilidade absoluta dos cotos ósseos ocorrerá reparação por ossificação intramembranosa com a mínima formação de calo, sendo descrita como cicatrização por primeira intenção (Shapiro, 2008).

O reparo inicia-se com o restabelecimento do suprimento sanguíneo, reabsorção dos tecidos necróticos, diferenciação e proliferação de células mesenquimais, liberação de mediadores químicos e estimulação de células osteogênicas, envolvendo, portanto, uma série de eventos celulares e moleculares extremamente complexos (Robbins, 1991).

A resposta proliferativa de células osteoprogenitoras no periósteo, endósteo e medula óssea e a produção de matriz de cartilagem, fibrocartilagem e calo fibro-osseo podem ser conceituadas como resultado de interações celulares (reação inflamatória, hematoma e estágio de formação de calo) e interações de matriz de células (fase de remodelação) (Rahn, 2002).

A vascularização do tecido ósseo é realizada por dois terços do suprimento são fornecidos por centrifugação das artérias endóstias e um terço é proveniente das artérias do perióstio. Quando ocorre o trauma há a formação de hematoma e de coágulo de fibrina no local do trauma. Posteriormente há o influxo de várias células migratórias (por exemplo, neutrófilos, linfócitos, monócitos, macrófagos, mastócitos, plaquetas). E estas células libertam várias citocinas, incluindo fatores de crescimento B, crescimento derivado de plaquetas, interleucinas de 1 a 6. Todo este ambiente favorece o aumento da permeabilidade capilar, quimiotaxia e dilatação de pequenos vasos (Rahn, 2002).

Após a organização do coágulo, a regeneração se inicia com a diferenciação das células osteoprogenitoras, presentes no coágulo, em osteoblastos, que depositam matriz osteóide. Secundariamente, a rede de osso imaturo é gradualmente reforçada por osso lamelar de fibras paralelas depositadas concentricamente, se iniciando nas proximidades das paredes mesial e distal do defeito, como continuação do córtex original. O final deste processo ocorre quando os primeiros espaços intertrabeculares atingem o porte de canais corticais regulares, e em conjunto com as lamelas concêntricas circundantes, constituem os ósteons primários. O início da remodelação óssea ocorre com a formação dos ósteons secundários, no osso recente formado, fechando a margem do defeito (Williams, 2008; Williams, 2009).

Devido ao aumento da tensão no centro da fratura, novos vasos sanguíneos não podem se formar, resultando em áreas de baixa tensão de oxigênio. Em áreas

de alta ou baixa concentração de oxigênio não há formação óssea. Nestes casos é favorecida a formação de cartilagem, pois possui baixas exigências de oxigênio (Claes et al., 2002). Episódio mais importante ainda que os baixos índices de oxigênio propiciem a ativação do fator de transcrição que for induzido pela hipoxia, e é crítico na indução da produção de condrócitos; que são os responsáveis pela produção de colágeno tipo II e proteoglicanas (Cramer et al., 2004).

À medida que o intervalo entre os cotos ósseos se enche de cartilagem, aumenta a estabilidade mecânica e os condrócitos sofrem diferenciação hipertrófica. Esta estabilidade aumentada diminui tensão, permitindo a neovascularização, que é modulada pelos factores angiogénicos (Glowacki, 1998). Macrófagos e osteoclastos são atraídos, que fazem com que ocorra a remoção da cartilagem e da fibrocartilagem. Finalmente, em direção ao final do calo macio, verifica-se aumento da produção de proteínas morfogenéticas que recrutarão os osteoblastos (Castillo et al., 2005).

A reparação do defeito ósseo supracortical é semelhante aos padrões do crescimento ósseo intramembranoso e seu desenvolvimento ocorre por meio de sequência de remodelação. Sob condições mecânicas estáveis, o osso é formado de forma direta ou primária, dado que duas condições essenciais estejam presentes: suprimento sanguíneo amplo e base sólida para a deposição óssea (Williams, 2008; Williams, 2009). No caso de acontecer movimento significativo ou quando há espaço grande entre as faces ósseas, ocorre primeiro a formação de calo cartilaginoso intermediário, que posteriormente se torna ossificado; a este processo dá-se a denominação de ossificação endocondral (Kwong; Harris, 2008).

Fraturas normalmente reparam pela combinação de ossificação intramembranosa e endocondral. A formação óssea endocondral se inicia externo ao perióstio, ao lado do local da fratura, em regiões que são mecanicamente menos estáveis. Já a ossificação intramembranosa ocorre interna ao perióstio, e forma calo duro (Dimitriou et al., 2005).

Para a regeneração óssea progredir, o calo cartilaginoso primário necessita ser reabsorvido e substituído por calo ósseo duro. Esta etapa de cura da fratura, em certa medida, recapitula desenvolvimento embriológico ósseo com combinação de

proliferação celular e diferenciação, aumento do volume celular e aumento da deposição de matriz (Breur et al., 1991).

Osso é tecido dinâmico, onde é constantemente sujeito a reabsorção e remodelação. E os tipos de células que consistem na sua composição são osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Schenk, 1992). Osteoblastos são derivados de células precursoras pluripotenciais. Esses osteoblastos produzem osteóide, a matriz orgânica do osso, que se transformará em osso calcificado.

Os osteócitos são derivados dos osteoblastos, este processo se dá quando alguns osteoblastos param de produzir osteóide e se transformam em osteócitos, que estão ligados com as camadas mais profundas de células. Osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivados dos macrófagos, que tem como função a destruição óssea (Hupp, 2003).

Embora a consolidação da fratura indireta consista de ossificação tanto intramembranosa como endocondral, ocorre a formação de um calo cartilaginoso que depois é reabsorvido e é então substituído com o osso é a sua característica chave deste processo. Seguindo a formação do hematoma primário, forma-se um tecido de granulação rico em fibrina (Einhorn; Gerstenfeld, 2015).

A utilização de modelos animais tornou possível investigar a consolidação da fratura de todas as perspectivas, como histologia, bioquímica e biomecânica e tem sido, portanto, ferramenta muito importante na compreensão da biologia no local fratura (Bonnarens; Einhorn, 1984).

Os roedores conquistaram um lugar de destaque, sendo os mais utilizados até hoje, pois atendem a várias características, tais como: docilidade, fácil domesticação, tamanho reduzido, ciclo reprodutivo curto, prole numerosa, precocidade e adaptação ao cativeiro. Em modelos animais (rato, coelho), o pico de formação de calo mole ocorre 7-9 dias pós-trauma, com pico em tanto o tipo procolágeno I e proteína do núcleo proteoglicano marcadores extracelulares (Einhorn, 1998). A consolidação da fratura exige suprimento de sangue e revascularização, sendo essencial para o sucesso da reparação óssea (Keramaris et al., 2008).

A capacidade de regeneração óssea na mandíbula difere da dos outros tecidos, pois a reparação ocorre principalmente pela formação de tecido cicatricial. Isto é explicado, principalmente, pela dinâmica da reabsorção óssea e aposição de osso normal. O reparo está diretamente relacionado ao tamanho do defeito ósseo, localização anatômica, idade, dentre outros (Schmitz; Hollinger, 1986).

Osso é tecido mineralizado, composto de matérias orgânicas e minerais, e a formação óssea e sua mineralização são formados por balanço de regeneração osteoblástica e reabsorção osteoclástica. O processo de remodelação óssea quando da existência de fraturas, injúrias traumáticas e defeitos ósseos envolve processo dinâmico histomorfológico e análise histoquímica do osso esponjoso e do osso neoformado (Mori et al., 2010; Einhorn; Gerstenfeld, 2015).

Segundo Albrektsson (1980), que avaliou a reparação de enxertos ósseos autógenos, concluiu que o osso cortical tem menor reabsorção, porém apresenta processo de revascularização mais demorado. Enquanto que o osso esponjoso, também chamado de osso trabecular, fornece pluripotentes ou células precursoras osteogênicas e ocasionando processo mais acelerado de revascularização óssea (Rawashdeh; Telfah, 2008).

Blinder et al. (2010), descreveram que forças musculares influenciam diretamente na formação óssea e sugere que estas forças tensionais que agem sobre o ângulo mandibular provocam sua reabsorção, em vez de movimentar o segmento proximal da mandíbula.

Daimoto et al. (1997), relataram que o aumento entre as distâncias dos fragmentos ósseos foi acompanhada por quantidade significativa de exsudato e teve sua vascularização adiada. O que corrobora com os resultados de Arimoto et al. (2013), que constataram que a recuperação de valores de TC em pacientes com movimentos mandibulares extenso ocorreu mais tarde quando comparados com pacientes com menos movimento sobre os lados inferiores.

2.3 Marcadores fluorocromáticos

O uso do fluorcromo em pesquisa de tecido ósseo é técnica bem aceita e utilizada para o estudo da formação e remodelamento ósseo. Os marcadores de fluorcromo permitem a determinação cronológica e da localização da mineralização bem como a direção e velocidade da formação óssea (Sridharan; Shankar, 2012).

Fluorescência é definida como a propriedade que determinada substância possui de conversão de onda de luz curta, por meio de radiação de luz em se transformar numa onda mais longa e desta forma se tornar mais visível. A fluorescência primária (autofluorescência) é a capacidade inerente das substâncias para fluorescer quando exposto a uma excitante luz ultravioleta, já a fluorescência secundária é a fluorescência induzida em substâncias pela aplicação de compostos fluorescentes ou corantes (fluorocromos).

A microscopia de fluorescência é usada para estudar substâncias que convertem a luz ultra-violeta, quase ultravioleta, ou luz azul-violeta, em luz visível para cores específicas. No microscópio de luz fluorescente parte da luz utilizada é absorvida para tecidos específicos, e a cor que é visualizada pelo observador representa a porção não absorvida do espectro de radiação. Em contraste, na microscopia de fluorescência, a porção não absorvida pela luz não é usada (Boyne; Kruger, 1962).

Alizarina vermelha S tem sido usada há muito tempo como marcador ósseo para estudar o crescimento e remodelação do osso. Primeiramente Hunter (1837), e posteriormente Brash (1929), foram os primeiros a usar esta raiz em experiências de alimentação em suínos. Nestes trabalhos embora seus efeitos tenham sido bastante difusos, as zonas de crescimento e desenvolvimento de osso e cemento foram indicados por uma coloração vermelha.

Embora este agente tenha sido usado desde os tempos antigos até o presente, como no tingimento de tecidos pelos primeiros egípcios, não foi até 1826 que Robiquet e Colin (como citado por Cameron 1930) isolaram a alizarina vermelho. Tentativas de sintetizar a droga foram finalmente aperfeiçoadas por Perkin e Story em 1931. Quimicamente, a substância é o sal sódio de monossulfônico alizarina.

Alizarina S vermelho, embora classificado como corante ácido, não é em si um corante, mas forma pigmentos insolúveis ou lago com hidróxidos que são então depositados nos tecidos. Apresenta-se como colóide na presença de soro. O sal de sódio é obtido por sulfonação direta da alizarina. O grupo ácido sulfónico torna-o mais solúvel do que a alizarina simples. A alizarina é pouco solúvel em água, mas prontamente solúvel em óleos fixos ou soluções alcalinas (Rubin; Bisk, 1969).

No passado, a cura de feridas de extração dentária foi investigada em nível microscópico utilizando animais experimentais e em biópsias de material humano, com a utilização de vários métodos histológicos. E assim, através do desenvolvimento de indicadores vitais e técnicas histoquímicas, foram feitas tentativas para determinar com mais precisão a localização, o tempo de formação e a natureza de diferentes áreas de deposição óssea na extração (Amler et al., 1960).

Num esforço para se obter uma área de coloração menos difusa, e que fosse possível ser mais quantitativa, a técnica de injeções foram introduzidas e se tornaram mais efetivas. Idealmente, este método deve produzir uma linha vermelha acentuada na zona de crescimento dos dentes ou osso. A quantidade de deposição óssea representa a quantidade mensurável entre duas linhas vermelhas, representando duas injeções (Buyske et al., 1960).

Pesquisas recentes indicaram a possibilidade de uso de antibióticos da série de tetraciclina como terceiro tipo de material marcador no tecido ósseo. Por meio de injeção parenteral de tetraciclina, é possível produzir linhas incrementais fluorescentes no osso neoformado e submetido à proliferação e calcificação no momento da administração da droga (Rall et al., 1957).

Milch et al. (1958), demonstraram a localização de composto fluorescente em regiões de nova proliferação óssea após administração de antibióticos de tetraciclina. Eles observaram que a tetraciclina foi fixada no osso neoformado, e uma vez fixado, a tetraciclina permaneceu aparente até a área de remodelação ter sido destruída. Agora o osso que já estava mineralizado ou parcialmente mineralizado, quando a tetraciclina foi administrada, não foi marcado (Rubin; Bisk 1969). As trabéculas do osso marcadas com tetraciclina foram, portanto, interpretadas como tendo estado no processo de formação quando o animal recebeu o fármaco. Sendo

possível desta forma, traçar eficazmente os estágios de um processo tão dinâmico como a reparação óssea.

2.4 Tomografia

A tomografia computadorizada (TC) foi descoberta pela primeira vez por Godfrey Hounsfield na Inglaterra no início da década de 1970 (Beckmann, 2006). E posteriormente ele e Allan MacLeod Cormack receberam um prêmio Nobel em 1979 (Shampo; Kyle, 1996). A TC é baseada em análise de geometria projetiva dos dados da fatia gerado pela rotação em torno de um paciente como resultado do movimento síncrono da fonte de raios X ao sensor (Rogalla et al., 2009).

Foi no final dos anos 1960 que Hounsfield primeiro conceituou que era possível determinar o conteúdo no interior de uma caixa através de radiografias tomadas de vários ângulos em torno de um objeto. Baseado em princípios básicos da geometria projetiva, o primeiro scanner de TC foi construído com um raio X móvel, e o tubo e sensor conectados por haste com o pivô ponto como o foco. Em 1971, a primeira TC de scanner comercial foi desenvolvido para o cérebro, que foi posteriormente seguido pelo scanner de corpo inteiro (Sittig et al., 2006).

A densidade óssea é definida nas imagens em unidades Hounsfield (nomeado após Hounsfield) (Brooks, 1977). As unidades Hounsfield (HU), são uma medida da diferença entre os tecidos do ar ao osso, em que podem ser calculadas disparidades de apenas 1%. As HU podem ser usadas para massa óssea, mas não qualidade (Hohlweg-Majert et al., 2011). Pode ser possível, contudo, converter as HU numa classificação de duro, normal e mole, com base em micro-TC histomorfométrica (Rebaudi et al., 2010).

A TC de feixe cônico é tecnologia de imagem transversal baseada em forma de cone com um detector, que produz raios X de volume definido para reconstruir imagens axiais (Mozzo et al., 1998). É alternativa a TC convencional, e é própria para grande gama de indicações craniomaxilofaciais, para imagens em corte

transversal e reconstrução de imagens tridimensionais (Vannier et al., 1997; Cavalcante; Vannier, 1998; Ziegler et al., 2002).

Desde o seu desenvolvimento na década de 1990, a TC de feixe cônico tornou-se ferramenta bem aceita para os cirurgiões bucomaxilofaciais, principalmente devido as suas vantagens de auxiliar no diagnóstico, dose de radiação mais baixa, menores custos, fácil acesso e menor área de aquisição quando comparada ao tomógrafo convencional (El; Palomo, 2010; Lenza et al., 2010).

A TC de feixe cônico tem a capacidade de usar algoritmos computacionais poderosos, que processam grande número de imagens seccionais, podendo desta forma reconstruir imagens 3-D, sendo desta forma uma melhoria em relação à secção 2-D de imagiologia de tomografia simples (Elke, 1995).

TC de feixe cônico produzem imagens que à primeira vista parecem ser consideravelmente semelhantes aos produzidos pelos tomografos multiplanares, entretanto não só as imagens podem ser ortogonais (sagittais, axiais e coronais), mas também o tegumento dos tecidos moles pode ser representado por variações em valores de densidade de escala de cinza. Sendo assim, na TC de feixe cônico a aquisição de dados incluindo a geometria da projeção (assim como a fonte de raios-X e o detector) é muito diferente da utilizada no tomógrafo convencional (Molteni, 2008).

Quando da realização de exame de tomografia de feixe cônico, existe um potencial valor clínico, sendo possível a medição da densidade do osso intramedular e possível locais de colocação de implante na imagem transversal. Entretanto, os resultados de numerosos autores comparando a confiabilidade, consistência e precisão da densidade óssea mensurada em unidades de Hounsfield (HU), com base absoluta, são equívocos (Hohlweg-Majert et al., 2011; Bryant et al., 2008) e causam preocupação com utilização quantitativamente (Pauwels et al., 2013).

Avanços recentes na TC de feixe cônico fizeram com que atualmente os escaneres se tornassem acessíveis para cirurgiões orais e maxilofaciais, que agora utilizam esta imagem em corte transversal, sendo tecnologia diária para ampla variedade de situações clínicas (Molteni, 2013; Arisan et al., 2013)

Vannier (1997) descreveu que a tomografia de feixe cônico foi uma "tecnologia disruptiva", ou seja, que mudou o curso da indústria. Pois é relativamente barata e compacta, podendo ser facilmente acomodado em um escritório, onde espaço e os custos operacionais representam grande vantagem, além de diminuição significativa da dose de radiação.

Nas TC multiplanares podemos relacionar a densidade em HU com a resistência óssea, portanto correlacionando à densidade óssea com a qualidade do osso (De Vos et al., 2009). Na radiologia dentomaxilofacial, é foco principal a imagem linear e volumétrica de três dimensões dos crânios, com isso podemos obter informações anatômicas adequadas para o diagnóstico, planejamento cirúrgico e preservação. Durante a última década a TC de feixe cônico tem sido usada para obtenção de imagens faciais 3-D. Este exame permite a aquisição rápida e adequada de imagens volumétricas verdadeiras e com alta resolução espacial. Além da excelente propriedade de imagem, doses baixas de radiação e custos menores do que TC multiplanar (Pauwels et al., 2013; Jaffray et al., 2002; Ding et al., 2007).

Contudo, a TC de feixe cônico apresenta algumas desvantagens, dentre as quais se destacam que os valores de escala de densidade óssea que são exibidos são arbitrários, e não correspondem para a escala da unidade de Hounsfield (HU) utilizada na TC convencional. Pois supostamente diferem de dispositivo para dispositivo (Arisan et al., 2013).

Na TC multiplanar, as unidades Hounsfield (HU) são proporcionais ao grau de atenuação radiográfica, e são atribuídos a cada pixel para mostrar a imagem. Em contraste o grau de atenuação radiográfica na TC feixe cônico é mostrado pelo valor de cinza (valor voxel). Há controvérsia quanto à comparação entre as densidades das tomografias de feixes cônicos e multiplanares, discussões estas que se dão desde a sua introdução. Há contradições sobre se a TC de feixe cônico pode ser usada para avaliar a qualidade do osso por medição da escala de Hounsfield comparável ao uso de HU em TC multiplanares (Gonzales Garcia; Monje, 2013; Hohlweg-Majert et al., 2011; Bryant et al., 2008; Molteni, 2013; Arisan et al., 2013).

A precisão da tomografia de feixe cônico em comparação com a tradicional mostrou-se metricamente semelhante em vários estudos (Kobayashi et al., 2004; Lascalea et al., 2004; Marmula et al., 2005; Ludlow et al., 2007). Por outro lado, foi

demonstrado que estes dispositivos apresentam algumas desvantagens para o tomógrafo convencional, como artefatos mais fortes de endurecimento do feixe com implantes de metal (Draenert et al., 2007).

Nas máquinas de feixe cônico, os escaneres em uso para obtenção das imagens maxilofacial, regularmente funcionam com um fotão de energia eficaz inferior, além de realizar uma varredura em volume limitado, consequentemente aumentam a resolução e diminuir a dose de radiação (De Vos et al., 2009).

A TC de feixe cônico recebeu recentemente atenção como nova ferramenta de diagnóstico padrão, capaz de representar com precisão a forma 3D e a posição da mandíbula com as vantagens de baixo custo, fácil acessibilidade, baixa dose de radiação em comparação com a TC convencional (Swennen et al., 2009; De Vos et al., 2009; Cevdanes et al., 2006). No entanto, o principal obstáculo é que a imagem de feixe cônico não pode fornecer dados detalhados de morfologia dental e relações interoclusais precisas, devido à limitada resolução de varredura e artefatos de raia causados por restaurações dentárias radiopacas ou braquetes (Nkenke et al., 2004; Santler et al., 1998; Batista et al., 2013; Molteni, 2013).

A TC utiliza a unidade Hounsfield (HU) como unidade de medida. É um valor numérico usado na TC tradicional para a interpretação que caracteriza a densidade tecidual em determinada localidade. No entanto, ao contrário do TC convencional, as tensões dos tubos dos tomógrafos de feixe cônico variam muito de fabricante para fabricante. Portanto, os valores numéricos num mesmo tecido apresentam grandes desvios entre os tomógrafos feixe cônico, desta forma as medições em unidades Hounsfield geralmente não se aplicam a maioria das máquinas de tomografia feixe cônico (Mah et al., 2010; Ye et al., 2012). Apenas algumas máquinas produzem valores que podem ser matematicamente ligados a HU. Além disso, a precisão de volume dos tomógrafos feixe cônico o modelo é afetado pelo limiar de segmentação (Ye et al., 2012).

Ye et al. (2012), referiram que os diferentes voxels escaneados pela TC feixe cônico durante a segmentação tiveram grande efeito sobre as medições volumétricas dos dentes. Os objetivos deste estudo foram examinar a influência dos diferentes voxels escaneados pela TC, e definição do limiar na precisão do registo, e tentar encontrar uma segmentação adequada e voxel de varredura para aplicações.

Por definição a escala de Hounsfield, dentro de ambiente padronizado, na TC multiplanar é calculada a partir do coeficiente de atenuação linear (μ) valor de cada tecido e leva em consideração o coeficiente de atenuação linear de água. Para este cálculo, a radiodensidade de água destilada, a pressão e temperatura padrão é definida como zero HU, enquanto que a radiodensidade do ar pressão padrão e temperatura é definida como 1000 HU. Portanto o ar e a água são 1000 e 0 HU, respectivamente podendo variar de -1000 a + 1000. O desvio tolerável ± 4 HU (MHRA, 2003). Estas são aplicáveis a padrões de qualidade para os escaneres dos tomógrafos multiplanares, enquanto os sistemas de feixe cônico não há uma definição geralmente aceita em relação à exatidão do número HU. Dentro desta realidade, a natureza policromática do feixe cônico podem dar pequenas variações nos valores de HU mesmo o mesmo objeto está sendo escaneado consecutivamente.

A tomografia computadorizada pode fornecer informações como alterações morfológicas e valores numéricos (expressos em unidades de Hounsfield) de coeficientes de atenuação linear de densidade óssea em locais selecionados. TC também podem descrever a qualidade óssea (Wyatt; Pharoah, 1998).

Existem grandes diferenças interindividuais e específicas, do local de captação da densidade óssea, bem como outros efeitos, exemplo, na região craniomaxilofacial, causada por intervenções como remoção de dentes, periodontite, inserção do implante, procedimentos de aumento e carregamento com conseqüências distróficas (Hohlweg-Majert et al., 2006).

A atrofia geral da mandíbula humana parece ter alguns fatores com variáveis, como idades relacionadas e corre em paralelo com aumento da cortical, porosidade e diminuição da densidade óssea esponjosa. Atrofia óssea está presente na maxila e na mandíbula; a perda óssea relacionada ao sexo e à idade é relativamente mais pronunciada no osso esponjoso do que na cortical (Devlin; Ferguson, 1991; Klemetti; Vainio, 1994).

Há muitas referências que relatam valores para massa óssea ou densidade na coluna vertebral, mas, infelizmente, não há literatura que forneça esta informação para a maxila e mandíbula sem inserção de implante dentário (Hohlweg-Majert et al., 2006).

Na TC de feixe cônico, o feixe é em forma de cone de fótons de raios-X, enquanto na tomografia tradicional os fotons possuem um feixe em forma de leque. A forma do cone pode ser redonda ou retangular. Desta forma pode escanear a região de interesse em até uma única rotação de 360° em contraste com as rotações múltiplas requeridas pelo multislice usado um feixe por vez. Outra vantagem é que o feixe cônico interroga um volume muito menor de tecido, daí também tem sido chamado de "micro-TC".

Willi Kalender desenvolveu o scanner de feixe cônico na década de 1980, e tornou-se dispositivo acessível para o desenvolvimento e planejamento dos cirurgões oral e maxilo-facial. Neste tipo de exame, reduziu-se drasticamente a dosagem de radiação para a varredura de pacientes em ambiente odontológico comparado com a radiação para tomografias computadorizadas helicoidais (Kalender et al., 1990).

O campo de visão (FOV) é definido como o diâmetro máximo na imagem reconstruída e abrange a faixa de 12 a 50 cm. Escolher um FOV pequeno significa reduzir o tamanho do "voxel", uma vez que se utiliza toda a matriz de reconstrução para região menor do que no caso de um FOV mais extenso. Isto traz a vantagem de melhorar a resolução espacial da imagem. Ao se selecionar o FOV deve ser ponderado se todas as regiões com possíveis sinais de doença foram incluídas. O FOV muito pequeno pode excluir sinais relevantes da doença.

Cevidanes et al. (2005), foram os primeiros a utilizar o método baseado no voxel para superposição 3D automatizada de tomografias de feixe cônico obtendo com isso os volumes em odontologia (Cevidanes et al., 2005).

Segundo Arimoto et al. (2013), não existem relatórios clínicos sobre o uso de tomografia computadorizada (TC), valores para quantificar a formação óssea entre fragmentos, após a OVRM para deformidades da mandíbula.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a reparação óssea cortical-cortical após a realização de uma simulação de osteotomia vertical em mandíbulas de coelhos, utilizando-se marcadores fluorocromáticos, histomorfometria e a tomografia de feixe cônico de campo de visão pequeno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Protocolo Animal

Para o estudo foram utilizados doze coelhos brancos adultos (machos), tipo Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), com peso aproximado de 03 Kg. Os animais foram adquiridos na Granja R.G. Agropecuária Animais e Derivados, e foram mantidos no biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) da Universidade de São Paulo.

A experimentação animal seguiu os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O procedimento cirúrgico foi realizado seguindo estes critérios e foi aprovado pelo Comitê Ética Uso de Animal (CEUA) da FOU SP e registrado sob o número de 014/2014 (Anexo A).

4.1.2 Protocolo cirúrgico

Para a realização da sedação foram utilizadas três agulhas hipodérmicas 13x 3,8 (Becton Dickinson), três seringas de 01 ml (Becton Dickinson). Os medicamentos utilizados Cloridrato de (2-2-xilidino) -5,6- dihidro - 4H - 1,3 - tiazina (Rompum-Bayer do Brasil) que é sedativo, analgésico e relaxante muscular; Acepromazina (Acepran[®]1% - Univet) que é um derivado fenotiazínico da terceira série (adrenolítica) usada frequentemente na rotina anestésica, tanto por seu efeito tranquilizante quanto potencializador dos agentes anestésicos; Cloridrato de Ketamina (Ketamina[®]-Agener), utilizado para indução e manutenção da anestesia (Figura 4.1).

Os animais foram submetidos a profilaxia antibiótica com benzilpenicilina benzatina (Benzetacil[®]), e para o controle de pragas foi aplicado Ivermectin (Ivomec[®]).

Figura 4.1 - Medicamentos utilizados para a sedação dos animais

Para a realização do procedimento cirúrgico utilizou-se agulhas gengival 30G (Terumo®), tubetes anestésicos de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepivalen® AD - Dentsply), digluconato de clorexidina 4% (Riohex® - Bioquímica), lâminas de bisturi 15c (Swann Morton®), fios de sutura seda 3-0 (Ethicon®), compressas de gaze (Cremer), 200ml de solução salina a 0,9% (soro fisiológico Eurofarma®), 01 seringa de 20ml (Becton Dickinson®), uma agulha hipodérmica 40x12 (Descarpac®), Dipirona Sódica (Novalgina® – Hoechst).

As osteotomias foram realizadas com motor elétrico OsseoSet 200 e micromotor da Nobel Biocare (WH®), peça de mão cirúrgica angulada Kavo Konzept 1:2 (Kavo®), broca carbide cirúrgica número 701 (Je®t), parafusos de enxerto de 1.5mm (Synthes®) (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Iniciando do lado esquerdo: contra-ângulo e micromotor (WH[®]), peça cirúrgica angulada (Kavo[®]), acima das pontas está o kit de parafusos de enxerto ósseo da (Synthes[®]), e a direita o motor elétrico Osteoset 200 (Nobel Biocare[®])

4.1.3 Marcadores fluorocromáticos

Foram utilizados como marcadores ósseos a Alizarina (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), a Calceína (Labsynth produtos para laboratórios LTDA), e a Tetraciclina (Fosfato complexo de tetraciclina – Bristol-Meyer Squibb Brasil), diluídas em solução Tampão- Na_2HPO_4 (Sódio Fosfato Dibásico anidro), injetadas na dorso do animal com agulha 30G (Descarpac[®]), e uma seringa de 10 ml (Becton Dickinson[®]).

Para a preparação das lâminas foram utilizados emblocamento em resina Technovit[®], álcool absoluto, coloração de Stevenels Blue, micróto mo da Exack[®], cianoacrilato (Loctite[®]) e lâminas de vidro. Após a confecção das lâminas, estas foram analisadas com Para a análise das lâminas foi utilizado o programa ImageJ

4.1.4 Protocolo tomográfico

O tomógrafo utilizado para realização das tomografias foi o aparelho ORTHOPHOS XG (Sirona) (Figura 4.3). Após a aquisição das imagens, que foram obtidas com campo de visão de 5x5, as imagens foram gravadas em DICOM, e manipuladas no software Nobel Clinician (Nobel Biocare)

Figura 4.3 - Tomógrafo utilizado para a obtenção das imagens tomográficas, com FOV pequeno

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimento cirúrgico

Os coelhos ficaram em gaiola individual, com água e ração seca adequada (NUVITAL[®]) sem restrições. O ambiente esteve sob temperatura controlada (21°C), e sistema de iluminação padrão internacional com períodos de 12 horas escuros e 12 horas de claro sob luz artificial, controlados por temporizadores (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Local de armazenamento dos animais com gaiolas individuais e climatizadas

Os animais foram divididos em quatro grupos de 03 animais cada (G1, G2, G3 e G4), onde G1 foi eutanasiado com 15 dias, e os demais grupos subsequentemente a cada 15 dias, sendo que G4, foi submetido a protocolo de marcadores fluorocromáticos (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Divisão dos grupos de estudo

Todos animais foram submetidos a procedimento cirúrgico de osteotomia de mandíbula em “L invertido” na borda inferior e posterior da mandíbula, semelhante à osteotomia vertical de ramo mandibular (Figura 4.6). Este procedimento foi realizado com auxílio de micromotor e peça reta, e foi utilizado broca 701 para a realização da osteotomia, que se deu sob irrigação abundante. Após a osteotomia foi feita a sobreposição do fragmento ósseo obtido com a cortical da basal mandibular imediatamente anterior a área doadora. Este fragmento foi fixado com parafuso para enxerto ósseo da marca Synthes que mediam 1.5 x 08 mm (Figura 4.7). Desta forma houve contato cortical-cortical na basal mandibular.

Figura 4.6 - Simulação num crânio seco da osteotomia em “L” invertida realizada

Figura 4.7 - Simulação do local onde foi realizada a sobreposição óssea, com colocação de parafusos

Os animais do G 4, foram submetidos à infiltração de substâncias que marcam a neoformação óssea, essas substâncias são denominadas marcadores fluorocromáticos. Neste estudo foram utilizadas três substâncias: alizarina, calceína e tetraciclina. Estes marcadores foram administrados por duas vezes consecutivas cada uma delas para melhor mensuração das áreas formadas. Para melhor administração e absorção esses marcadores foram misturados a solução tampão de Na_2HPO_4 (Sódio Fosfato Dibásico anidro), diluídas em 02 ml de água destilada para injeção. Primeiramente utilizou-se a alizarina na 2^a. e na 3^a. semanas, a calceína na 4^a. e 5^a. semanas do pós-operatório, ambas administradas no tecido subcutâneo. Enquanto a administração de tetraciclina foi realizada na 6^a. e 7^a semana de pós-operatório, de forma intramuscular. Os animais deste grupo foram eutanasiados após 56 dias.

Em cada grupo, dois animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de sobreposição óssea cortical/cortical bilateralmente, e em um dos animais, em um dos lados foi realizado duas osteotomias distantes aproximadamente 20 mm uma da outra, porém sem sobreposição óssea nem deslocamento deste fragmento. Este lado da mandíbula sem a sobreposição cortical-cortical foi utilizado como controle cirúrgico, totalizando, portanto 05 peças por grupo de sobreposições de enxertia cortical/cortical, mais uma peça de controle cirúrgico em cada um dos grupos.

Anteriormente ao procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos a protocolo anestésico com medicação intramuscular. Para a sedação, analgesia e relaxamento muscular foram utilizados o Cloridrato de (2-2-xilidino) –5,6- dihidro - 4H - 1,3 - tiazina (Rompum-Bayer do Brasil) – dosagem: 5,0mg/Kg; como efeito tranqüilizante a Acepromazina (Acepran[®] 1% - Univet – dosagem: 0,75mg/Kg.); como anestésico geral o Cloridrato de Ketamina (Ketamina[®] Agener – dosagem: 35mg/Kg). Com esta dosagem, os animais permaneceram sob profunda narcose, durante um período de 60 a 90 minutos.

Após a indução anestésica dos coelhos, os animais foram anestesiados com cloridrato de mepivacaína 2% com epinefrina 1:100.000 (Mepivalen[®] AD - Dentsply) na topografia do ângulo mandibular bilateralmente. Após a realização dessa

anestesia local, realizou-se procedimento de tricotomia digital manual, seguida de antissepsia da pele com digluconato de clorexidina 4% (Riohex[®] - Bioquímica).

Após a preparação o leito cirúrgico, iniciou a incisão submandibular de aproximadamente 03 cm de comprimento, a fim de expor os tecidos moles subjacentes (Figura 4.8).

Figura 4.8 - Incisão submandibular

Após a incisão, foi realizada a divulsão por planos, afastamento desses tecidos, até a visualização da alça pterigo-massetérica. A musculatura massetérica foi então incisada, e o periósteo descolado para a completa exposição do ângulo mandibular, procurou-se evitar o descolamento da face lingual do ângulo mandibular na tentativa de preservar o suprimento sanguíneo proveniente desta região, onde se insere o músculo pterigoideo medial (Figura 4.9).

Figura 4.9 - Divulsão por planos e exposição de ângulo mandibular

Após o ângulo mandibular ter sido exposto, foi feita uma osteotomia em “L invertido” com auxílio de peça reta multiplicadora 1:2 da Kavo e broca cirúrgica para peça reta número 701 longa. Osteotomia esta que se iniciou pela parte posterior do ramo mandibular, se estendendo por aproximadamente 30 mm para a parte mediana do ramo mandibular, desta posição a osteotomia se direcionou para baixo em direção a basal mandibular, até a secção completa e separação do ângulo mandibular. Desta maneira foi preservado o perímetro mandibular, a ligação do côndilo e a incisura mandibular, evitando com isso qualquer alteração na mastigação durante o pós-operatório (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Realizando a osteotomia em “L” invertido no ângulo mandibular

Este fragmento de cortical óssea obtido com esta osteotomia da parte posterior da mandíbula foi sobreposto sobre a basal mandibular imediatamente anterior a região de ressecção, e este bloco ósseo foi fixado com parafuso de titânio posicional de dimensão 1,5 x 08 mm (Figura 4.11). Terminado a fixação óssea a ferida operatória foi suturada or planos e descontaminada.

Figura 4.11 - Sobreposição óssea cortical-cortical com fixação com parafuso de enxertia

Para analgesia pós-operatória utilizamos Dipirona Sódica (Novalgina® – Hoechst) dissolvida na garrafa do bebedouro (500 ml), na quantidade de 0,3 ml (equivalentes a 150 mg).

4.2.2 Protocolo de marcadores fluorocromáticos

Para determinar quantitativamente as áreas de neoformação óssea, bem como o período e direção de sua formação, os animais do G 4, receberam aplicações de marcadores ósseos fluorocromáticos diferentes e em períodos de tempo distintos. Os marcadores seguirão protocolos anteriormente descritos por Allegrini et al. (2003), como na tabela a seguir:

Tabela 4.1 - Formulação, dosagem e tempo de aplicação de marcadores fluorocromáticos

Tempo	Substância	Doses	Injeção (mg/kg)
14 dias	ALIZARINA* (C ₁₄ H ₈ O ₄)	30 mg/Kg	3g/100ml + 2g Na ₂ HPO ₄
21 dias	ALIZARINA* (C ₁₄ H ₈ O ₄)	30 mg/Kg	3g/100ml + 2g Na ₂ HPO ₄
28 dias	CALCEÍNA** (C ₃₀ H ₂₆ N ₄ O ₁₃)	10 mg/Kg	1g/100ml + 2g Na ₂ HPO ₄
35 dias	CALCEÍNA** (C ₃₀ H ₂₆ N ₄ O ₁₃)	10 mg/Kg	1g/100ml + 2g Na ₂ HPO ₄
42 dias	TETRACICLINA***	60 mg/Kg	6g/100ml + 2g Na ₂ HPO ₄
49 dias	TETRACICLINA***	60 mg/Kg	6g/100ml + 2g Na ₂ HPO ₄
56 dias	SACRIFÍCIO		

*Alizarina (Labsynth produtos para laboratórios Ltda)

**Calceína (Labsynth produtos para laboratórios Ltda)

***Tetraciclina (Fosfato complexo de tetraciclina – Bristol-Meyer Squibb Brasil)

4.2.3 Análise da micro TC

Após a eutanásia dos animais, foi feita a dissecação das mandíbulas, e estas após remoção foram colocadas em formol a 10%. Estas mandíbulas de coelhos foram então submetidas à realização de exames tomográficos, optou-se pela utilização de tomografias do tipo feixe cônica com campo de visão pequeno (FOV), permitindo com isso um melhor detalhamento da área de cicatrização óssea. Os exames tomográficos foram realizados pelo mesmo radiologista, e as mandíbulas foram posicionadas da mesma forma sobre o sensor, apoiadas numa caixa de acrílica invertida, e todos os exames realizados numa mesma kilovoltagem e miliampereagem.

Estas imagens foram obtidas com a utilização de um aparelho Orthophos XG (Sirona), e gravadas em Dicom. Estas imagens tomográficas foram visualizadas utilizando o software NobelClinician (Nobel Biocare). Com a utilização deste software, realizou-se a reconstrução em 3D das mandíbulas. Após a reconstrução da mandíbula, observou-se que tomograficamente havia reparação óssea na área operada (Figura 4.12).

Para confirmação desta afirmativa, traçou-se uma linha vestibulo-lingual sobre a área onde fora realizada a sobreposição óssea, e sobre esta linha foi feita uma contagem sequencial da densidade óssea, em áreas puntiformes posicionadas sobre esta linha, por meio de unidades Hounsfield. A mesma técnica foi realizada numa área mais anterior da mandíbula, onde não havia realizado nenhum procedimento, sendo que esta nova área funcionaria como controle nos valores de densidade em unidade HU. Pois foram obtidos no mesmo animal, realizados no mesmo tomógrafo, e no mesmo horário, evitando com isso as alterações nas unidades hounsfield que podem ocorrer nos exames realizados em tomógrafos do tipo feixe cônico.

Nos lados da mandíbula onde foram realizados os controles cirúrgico (osteotomia), sem a sobreposição cortical-cortical, a linha para a medida das densidades foram realizadas antero-posteriormente, pois desta forma a obtenção das mensurações foram realizadas perpendicularmente a osteotomia (Figura 4.13).

Figura 4.12 Imagem tomográfica corte axial, demonstrando a região de controle cirúrgico do lado E, e a região de sobreposição óssea no lado D

Figura 4.13 Densidade em HU, coletados pelo programa NobelClinician, nas regiões de sobreposição óssea, controle cirúrgico e controle tomográfico

4.2.4 Preparação de espécimes

Quando da eutanásia dos animais, primeiramente foi realizado novamente o protocolo anestésico, com xilazina/acepran/ketamina, e após narcose profunda, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico, e feitos à retirada da mandíbula.

Os grupos G1, G2 e G3, foram sacrificados respectivamente em 15, 30 e 45 dias após o procedimento cirúrgico, onde se verificará histologicamente o processo de reparação óssea. No ultimo grupo (G4) os animais foram sacrificados após 56 dias, após serem submetidos à infiltração dos marcadores ósseos fluorocromáticos, conforme esquema descrito anteriormente. Evidenciando os períodos de deposição do novo osso.

Nos animais que foram submetidos os marcadores de fluorescência (G4) foram feita a retirada, das áreas operadas com as sobreposições ósseas. Estas áreas foram emblocadas em resina seguindo o protocolo da Resina Technovit® 9100 NEU até a etapa de obtenção das lâminas.

Foi feita a microtomia que consiste na obtenção de finas secções ou cortes do bloco de resina permitindo a confecção de lâminas histológicas. Assim utilizando um micrótomo em fita de diamante (Exakt Cutting Systems da Exakt®), o bloco foi posicionado no longo eixo do parafuso. Desta maneira nas lâminas obtidas pode observar o longo eixo do parafuso e toda a área óssea que estava adjacente ao parafuso. Estes equipamentos são de fácil manuseio, requerendo um pouco de experiência do operador para posicionar o plano de corte. O principal cuidado a ser tomado é o aperto do bloco na pinça do equipamento, pois qualquer movimentação do bloco pode empenar ou quebrar o disco ou a fita.

Cada corte obtido possui aproximadamente 500 micrometros de espessura e colocados individualmente em lâminas de vidro utilizando uma gota de cianoacrilato com pressão constante. Posteriormente as lâminas foram desgastadas com lixas de carbetto de silício para a avaliação histológica.

Após a confecção das lâminas, um exemplar de cada bloco de resina, foi corado com a substância Stevenels Blue. Este processo histológico foi desenvolvido para secções de tecido contendo implantes metálicos, pode ser bem utilizado em implantes cerâmicos e poliméricos, e possuem boa visualização de tecidos mineralizados. As células e estruturas extracelulares são coradas em tons de graduação azul e as fibras colágenas, em azul esverdeado. A alizarina vermelha cora o cálcio, assim o tecido mineralizado aparece em tons de laranja a púrpura.

O processo de coloração se dá por meio de um conjunto de etapas a que submetemos a lâmina histológica para observarmos com clareza diferentes contrastes: A) imersão das lâminas em cubeta contendo Stevenels blue (1 grama de metileno em 75ml de solução de água + 1,5 grama de permanganato de potássio em 75ml de solução de água destilada) a 60 graus, em banho maria, por 15 minutos; B) lavagem em água destilada a 60 graus; C) secagem com ar seco; D) imersão das lâminas em Van Giesons (fucsina ácida 1% e ácido pícrico aquoso) em temperatura ambiente por 5 minutos; E) lavagem rápida em álcool absoluto; F) secagem com ar seco; G) pipetagem de pequena quantidade de alizarina vermelha 2 %, na superfície da lâmina de resina, por 5 minutos em temperatura ambiente; H) lavagem em água destilada; I) secagem com ar seco.

Os outros blocos não foram corados, para melhor visualização e análise na microscopia de fluorescência e consequentemente na contagem das áreas neoformadas. Estas lâminas não coradas, foram visualizadas em microscópios de fluorescência, e como padrão realizou-se fotomicroscopias contornado todo o longo eixo dos parafusos de enxerto. Optou-se por escolher as fotos que apresentavam as melhores áreas de neoformação óssea.

4.2.5 Análise histomorfométrica

As demais lâminas histológicas sem coloração foram analisadas por microscopia de fluorescência, o que facilita sua análise. Cada imagem foi

fotografada em coloração monocromática com diferentes filtros. As imagens foram captadas no microscópio da Patologia da FOUSP, com câmera acoplada.

Para a análise dessas lâminas com microscopia de fluorescência, verificação e mensuração de áreas neoformadas de tecido ósseo, foi utilizado o programa image J. Para quantificar a área marcada com cada substância, nos respectivos períodos de infiltração, as imagens foram mensuradas em pixels. Cada imagem colorida com a cor verde representa a área pigmentada pela calceína, vermelho/acastanhado representando a alizarina e alaranjado seria a tetraciclina.

Foram obtidas três medidas de cada lâmina. A primeira medida foi de área total que possuía tecido biológico, a segunda medida foi contornando cada região individualmente corada com a cor avermelhada, dessa forma obteve-se o somatório de áreas vermelhas que significaria que foram formadas o durante a segunda e terceira semana de reparação. E por fim repetiu-se o processo com as áreas coradas na cor verde, que representam as áreas formadas nas quarta e quinta semanas (Figura 4.14).

Figura 4.14 - Utilizando o Image J, mostrando a contagem de áreas neoformadas, contornando as áreas coradas com as cores vermelho acastanhadas (Alizarina) e verdes (Calceína)

As áreas de osteotomia sem sobreposição óssea, que foram realizadas como forma de simulação de reparação por primeira intenção, sendo denominadas de controle cirúrgico, foram submetidas ao mesmo processo de mensuração de áreas (Figura 4.15), para verificação de períodos de formação óssea e se havia diferenças entre as regiões com ou sem sobreposição óssea. Quando possível fez-se a contagem das áreas demarcadas pelos marcadores ósseos de uma única vez, por meio de saturação e diferença de cores, desta forma foi possível quantificar a área demarcada de forma mais fidedigna a mensuração de área de neoformação óssea (Figura 4.16).

Figura 4.15 - Microscopia fluorescência na região de controle cirúrgico (osteotomia), onde as áreas coradas com coloração vermelho acastanhadas foram marcadas pela alizarina, portanto regiões neoformadas nas primeiras três semanas pós-trauma; enquanto que as áreas esverdeadas foram coradas pela calceína, formadas na quarta e quinta semana pós-operatória

Figura 4.16 - Microscopia de fluorescência de controle cirúrgico, porém a área neoformada foi contada de uma única vez, por meio de saturação de cores; onde a região avermelhada foi à região marcada pela calceína

Estes dados de mensurações de áreas foram realizados por dois pesquisadores independentes, onde um pesquisador não teve acesso aos dados do outro. Após a obtenção desses dados que quantificavam as áreas, foi realizado uma tabulação desses resultados.

Nas lâminas coradas com coloração de Stevenels Blue é possível ver a área de neoformação óssea. Quando da realização da sobreposição óssea cortical-cortical, pela histomorfometria é possível verificar a reparação óssea entre as corticais óssea que foram sobrepostas, como verificado na imagem a seguir com aumento na objetiva de 2,5 X (Figura 4.17). Na imagem de maior aumento, com aumento na objetiva de 10 X (Figura 4.18) é possível verificar que a matriz óssea neoformada não mostra as lamelações características do osso maduro, sendo as fibras colágenas orientadas mais ou menos ao acaso. A região corada em azul escuro é a matriz óssea não mineralizada (osteóide), e sobre ela ficam dispostos os osteoblastos. Os osteoblastos são células em ativa síntese protéica, tem núcleo volumoso com cromatina frouxa e nucléolo evidente, além do citoplasma basófilo.

Figura 4.17 - Lâmina em aumento de 2,5 X, mostrando que ocorreu reparação óssea na região de sobreposição óssea cortical/cortical

Figura 4.18 - Lâmina em aumento de 10 X - Presença de estruturas: Seta branca observa-se a matriz osteoide sob as quais estão dispostos os osteoblastos (célula óssea em atividade), Seta azul mostra lamelas com osteócito (célula óssea madura)

4.2.6 Análise estatística

Processamento foi realizado por meio do pacote estatístico SPSS versão 20. Após a análise dos dados de densidades obtidos nas áreas operada tanto direita quanto esquerda; correlacionando estes dados com as medidas de densidade de controle também bilaterais, por meio de teste de Kolmogorov-Smirnov, teste esse não paramétrico onde testamos a normalidade. Salientamos que estes dados foram comparados isoladamente num mesmo animal, para que não houvesse dados alterados devido à variação de densidades decorrentes do tipo de tomógrafo utilizado.

Agora no Coelho I onde temos todas as amostras, sendo área operada com sobreposição óssea, área de osteotomia ou controle cirúrgico e controle de densidade em HU. A diferença entre as densidades coletadas na área operada, e no controle cirúrgico foi avaliado por meio de teste t pareado de Student.

Com relação ao período de formação óssea, utilizando os marcadores fluorocromáticos, foi feita uma média das áreas coradas por cada substâncias aplicadas, comparando os valores de médias da área total, correlacionados a porcentagem de áreas coradas com alizarina e calceína. Reiteramos que não houve marcação com a tetraciclina. E as medidas foram coletadas tanto na área operada com sobreposição óssea, bem como no controle cirúrgico que possuía apenas uma medida.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Tomografia de FOV pequeno

Após o período de reparação os animais foram eutanasiados conforme descrito nos materiais e métodos, as mandíbulas desses animais foram dissecadas e colocadas em formol a 10%. Com a obtenção dessas mandíbulas, foi realizado tomografia de feixe cônico em cada uma dessas peças anatômicas, exames estes realizados pelo mesmo profissional, as peças foram posicionadas na mesma posição no sensor, com a mesma kilovoltagem (KV) e miliamperagem (MA).

As tomografias foram realizadas em campo de visão pequeno, em aparelho da marca Sirona e gravados em Dicon. Posteriormente estes exames foram manipulados no programa Nobelclinician da Nobel Biocare[®], para ser possível a reconstrução em três dimensões.

Os exemplares obtidos estão listados a seguir, sendo que alguns dos exemplares foram descartados da amostra, pois durante o processo de reparo houve a reabsorção completa da área enxertada.

Coelho A: operado lado direito e esquerdo;

Coelho B: operado lado direito e esquerdo;

Coelho C: operado lado direito e esquerdo;

Coelho D: operado lado direito e esquerdo;

Coelho E: operado lado direito e esquerdo;

Coelho F: controle cirúrgico somente osteotomia;

Coelho H: coelho operado lado direito e esquerdo;

Coelho I: operado lado direito e controle cirúrgico somente osteotomia a esquerda.

Cada um desses exames tomográficos foi reconstruído no Nobelclínician[®], onde nas áreas operadas com sobreposição óssea, realizou-se uma linha imaginária transversalmente a área de maior sobreposição óssea, e por meio do programa fez-se a contagem das densidades em Hounsfield de áreas puntiformes que foram obtidas de maneira sequencial sobre esta linha imaginária.

Como forma de se obter o controle dessas medidas de densidade, traçou-se uma segunda linha anteriormente a primeira com o cuidado de ter a certeza de estar localizada em região da mandíbula que não havia sofrido nenhum tipo de trauma cirúrgico. Com isso teria a garantia de que esses dados de densidade seriam similares a uma mandíbula que não fora traumatizada.

Nas regiões onde foram feitas somente a osteotomia, utilizadas neste caso como um controle cirúrgico, a linha imaginária por onde fez-se as coletas das densidades, foi posicionada de medial para distal, de modo que as medidas ocorressem de forma transversal a linha de osteotomia, para a variação de densidade se dar desde um osso normal, passando pelo osso onde foi reparado e retornando ao osso sem trauma.

Portanto a partir da aquisição das medidas de densidade em Hounsfield, realizados nas mandíbulas dos coelhos, foram mensuradas medidas de densidade entre os operados (com sobreposição) e de controle cirúrgico (sem sobreposição), além das medidas de controle em cada imagem da mandíbula.

Como descrito por vários autores que a medida de densidades coletadas em Hounsfield, não se vale da mesma forma que os tomógrafos de multicanais, pois há diferenças das densidades de acordo com o aparelho utilizado, bem como o horário da aquisição do exame. Para eliminar estas alterações, as mandíbulas dos coelhos foram analisadas de forma individual, e comparadas às áreas operadas e controle entre os lados; e desta forma eliminamos algum tipo de incoerência entre as medidas.

Essas medidas produziram os seguintes resultados detalhados a seguir (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Média das medidas de densidade obtidas para os sete coelhos analisados					
Coelhos	Operados Cortical/cortical	Desvio Padrão	Controle Tomográfico	Desvio Padrão	No. de medidas (2)
A (1)	417,2	178,7	626,7	171,0	9
B (2)	190,5	89,7	497,2	254,8	10
C (3)	468,6	212,9	600,6	274,6	9
D (4)	524,0	152,9	490,8	213,0	9
E (5)	407,9	188,7	488,5	199,3	10
H (7)	359,2	186,6	544,2	183,1	10
I (8*)	446,3	86,8	542,8	224,9	4

Fonte: Dados coletados pelo pesquisador

Nota: (1) Médias de densidade em Housfield, considerando-se os lados direito e esquerdo tanto para os que foram submetidos a operação como para controle.

(2) Os número de medidas considerados são as positivas e balanceadas entre operados e controle.

(*) Para esse coelho as medidas de densidade foram coletadas somente para o lado direito.

Gráfico 5.1 - As médias das densidades obtidas tanto nas áreas operadas quanto controle de cada animal encontra-se representada no gráfico

Fonte: Dados coletados pelo pesquisador

Nota: Médias considerando ambos os lados (direito e esquerdo).

(*) Para esse coelho (I) apenas a medida de densidade do lado direito.

Pelo gráfico 5.1, nota-se que a média de densidade dos operados obtida para o coelho 2 foi bem distinta das demais, abaixo de 200. Na maioria das unidades que sofreram a operação, a média da densidade foi abaixo da apresentada pelo controle, exceção para o coelho 4, onde a média do operado foi um pouco acima da apresentada pelo controle.

Após testar e verificar a normalidade da distribuição das variáveis, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, verificamos que as medidas de densidade entre o conjunto de dados de operados direito e esquerdo e os devidos controles são correlacionados ou não (correlação de Pearson).

Tabela 5.2 - Correlação entre o lado operado (direito e esquerdo) com controle tomográfico (direito e esquerdo)

Coelhos	Correlação (1)	p (sig.)
A (1)	0,67	0,05
B (2)	0,26	0,47
C (3)	-0,16	0,67
D (4)	-0,20	0,60
E (5)	-0,23	0,52
H (7)	0,38	0,28
I (8*)	0,31	0,68

Fonte: Dados coletados pelo pesquisador.

Nota: (1) Correlação de Pearson.

Todas as correlações mostraram-se **não significantes**, ($p \geq 0,05$), ou seja, não rejeitamos a hipótese de que não existe correlação.

Coelho I

Para o coelho I foram coletadas além de informações sobre o lado direito operado com sobreposição cortical/cortical e lado direito controle tomográfico, além de dados de osteotomia (controle cirúrgico) no lado esquerdo; este animal foi utilizado como padrão pois tinham as três marcações tomográficas, sendo portanto passíveis de comparações. Com os dados obtidos, foi realizada tabela com estatística descritivas com a média das densidades em HU (Tabela 5.3). Além disso foi realizado ilustração, onde é possível realizar a comparação, entre as três áreas onde foram coletados os dados num mesmo animal (Gráfico 5.2). Bem como o comparativo entre os valores de densidade entre as áreas de reparação óssea com ou sem sobreposição óssea (Gráfico 5.3).

Tabela 5.3 - Coelho I – Com Estatísticas descritivas – medidas de densidade

	Média		No. de
Coelho I	densidade	DP	medidas
Lado	432,6	75,8	7
direito			
operado			
Osteotomia	393,1	117,2	7

Fonte: Dados coletados pelo pesquisador.

Gráfico 5.2 - Distribuição (Box plot) das medidas de densidade – Coelho I: lado direito operado com sobreposição cortical/cortical, controle tomográfico do lado direito e controle cirúrgico do lado esquerdo (osteotomia)

Fonte: Dados coletados pelo pesquisador.

Nota: (1) n=7 para as medidas de densidade do lado direito operado e osteotomia e n=4 para direito controle.

Gráfico 5.3 - Medidas de densidade do lado direito operado com sobreposição cortical/cortical e do lado direito com controle cirúrgico (osteotomia) no coelho I

Fonte: Dados coletados pelo pesquisador.

A correlação de Pearson entre as medidas de densidade do lado direito operado e os de osteotomia foi igual a 0,954, com **nível de significância $p=0,001$** . Indicando que são altamente correlacionados positivamente.

A diferença de médias entre as densidades dos operados e a de osteotomia foi avaliada por meio do teste t pareado de Student. Sob a hipótese nula de igualdade das médias, a diferença a ser testada é de que a diferença é igual a zero. Não rejeitamos essa hipótese sob o nível de significância de 5%, ou seja, as médias podem ser consideradas iguais ($t=2,078$; $p=0,083$).

5.2 Análise de marcadores fluorocromáticos

Os animais grupo 4 (G 4) foram submetidos a infiltrações de marcadores fluorocromáticos, a substância utilizadas foram a alizarina, nos períodos de 14 e 21 dias, aplicações estas realizadas no tecido subcutâneo com solução tampão e diluídas em água destilada. Posteriormente, no período de 28 e 35 dias, foram aplicadas a calceína, da mesma forma que a primeira substância. E por fim foi feita a infiltração de tetraciclina, no período de 42 e 49 dias, que se deu com injeção em tecido muscular da substância que também foi misturada a solução tampão e diluídas em água destilada.

Após a eutanásia dos animais do G 4, que foram submetido a injeções de marcadores fluorocromáticos, foi realizada com 56 dias. As mandíbulas foram dissecadas e as peças colocadas e formol. Após isso as peças foram incluídas em resina e feitas lâminas para observação em microscópios de fluorescência.

Após a confecção das lâminas histológicas, foram feitas fotografias das lâminas num foto microscópio, imagens estas que foram realizadas adjacente ao longo eixo dos parafusos, nas regiões onde se verificava a área de realização de sobreposição óssea.

Utilizando-se do programa Image J, nas imagens das lâminas foram coletados dados numéricos em pixel, referentes aos valores de área total de tecido presente na lâmina, bem como das áreas que foram coradas tanto pela alizarina como calceína. Neste presente estudo não se conseguiu áreas marcadas com tetraciclina.

Os valores que se encontram na tabela a seguir refletem a média entre as medidas de formação de área de regeneração observadas após o uso dessas substâncias, verificadas por dois pesquisadores que realizaram contagem independente. O valor do total corresponde à área total da lâmina considerada. O controle refere-se a uma área sem a sobreposição (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Área de neoformação óssea corada com alizarina e calceína correlacionadas com a área total (Coehos do G 4)

Lâminas	Área de regeneração				Total	%
	Alizarina	%	Calceína	%		
A3E	164.691	12,5	110.650	8,4	1.315.826	100,0
A31D	56.359	5,7	13.243	1,3	996.143	100,0
A42E	118.702	23,6	24.289	4,8	502.797	100,0
A43D	104.446	9,5	55.805	5,1	1.095.918	100,0
B2D	379.653	30,2	47.740	3,8	1.258.893	100,0
B3E	258.971	20,0	26.960	2,1	1.293.454	100,0
Controle	315.571	18,8	168.681	10,0	1.680.759	100,0

Fonte: Dados coletados por dois pesquisadores.

Por meio da média das substâncias aplicadas observa-se pelo gráfico abaixo que as proporções de alizarina são superiores as de calceína tanto nas lâminas quanto no controle. Porém a proporção de calceína alcançada no controle (10,0%) mostrou ser superior a da exibida pelas médias das lâminas (4,3%).

A substância alizarina primeiramente aplicada demonstra que ocorre uma maior formação óssea no início do processo de reparação, pois foi neste período de infiltração da alizarina. A diferença entre as médias de proporções de alizarina e calceína é de 12,6, e o teste de diferença de médias aponta para a não igualdade entre elas ou seja, rejeitado a hipótese de que são iguais ($t=3,221$; $p=0,023$) (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 - Médias de proporção de área com neoformação óssea, coradas com os marcadores fluorocromáticos alizarina (três semanas pós-trauma) e calceína (quarta e quinta semana pós-trauma); bem como o comparativo entre as regiões com sobreposição óssea cortical/cortical e controle cirúrgico (osteotomia)

6 - DISCUSSÃO

As duas osteotomias mandibulares mais comuns utilizadas no tratamento das deformidades mandibulares são a OSM e a OVRM. Cada técnica possui suas vantagens e limitações. Dentre as principais vantagens da OVRM podemos citar a menor incidência de lesão ao nervo alveolar inferior, sendo descrita de 0% a 6% (Lima Júnior et al., 2009; Hashemi, 2008) comparando com 39% a 85% para OSM (Hall, 1992); simplicidade técnica, menor tempo cirúrgico e capacidade de reposicionar o côndilo (Hu et al., 2000; Ueki et al., 2002; Al-Moraissi; Ellis, 2015; Ko et al., 2009; Ghali; Sikes, 2000), item este, ainda não solucionado na OSM.

Como complicações e dificuldades desta técnica, os autores descrevem a baixa visibilidade do campo cirúrgico (Aziz; Roser, 2012). Também é citado o movimento descendente da região anterior, observado no pós-operatório da OVRM, acarretando em mordida aberta (Nihara et al., 2013; Yoshioka et al., 2008).

Já OSM é procedimento mais dinâmico, podendo ser utilizada tanto em avanços como recuos mandibulares. As contraindicações para OSM incluem a presença de segundos molares não irrompidos, atresias antero-posterior quanto latero-medial, e e mandíbulas finas, com pouco ou nenhum osso medular no ramo mandibular; e assimetrias mandibulares muito severas (Wolford, 2000). Outra diferença é que a OSM é fixada rigidamente. Já a OVRM normalmente não utiliza material de fixação, pois o acesso aos pontos proximais e distal é limitado, desta forma geralmente o paciente permanece sob BMM por no mínimo três semanas (Ueki et al., 2002; Yamauchi et al., 2007).

Ainda que a experimentação animal não possa ser integralmente transportada ao homem, mas sim como parte do processo de entendimento da biologia. Neste trabalho concluiu-se que tanto as áreas com sobreposição óssea cortical/cortical, quanto à área onde foi realizado somente a osteotomia, houve reparação óssea com valores de densidade equivalentes entre as duas técnicas. Isso se deve possivelmente a criação do evento biológico do processo de reparo.

Durante a realização deste trabalho tivemos dificuldade com o processo de descalcificação das mandíbulas, que seriam utilizadas na realização de histologia óssea pelo processo de Hematoxilina e Eosina (HE), proposto originalmente; este processo seria utilizado para demonstrar a celularidade nos diferentes períodos de reparação (G1, G2 e G3). Acreditamos que isto ocorreu devido a baixa temperatura da solução do ácido etinodiamino tetra-acético, que foi a escolhida para a descalcificação ou mesmo a concentração utilizada não ser a ideal. No nosso entendimento este método ainda necessita de melhor clarificação. Desta forma optou-se por realizar somente a histomorfometria das lâminas que foram coradas com Stevenels Blue.

A utilização de marcadores fluorocromáticos em pesquisas que estudam o processo de formação e remodelação óssea é pratica antiga e bem aceita (Sridharan; Shankar, 2012). Seu uso possibilita diminuir o número de animais utilizados nas pesquisas, pois num mesmo animal seria possível verificar diferentes períodos do processo de reparo, podendo determinar, neste modelo, a cronologia, direção e velocidade de formação óssea.

Segundo Buyske et al. (1960), estes marcadores ósseos começaram a ser utilizados nas pesquisas há quase dois séculos, inicialmente eram utilizados na alimentação dos animais para posterior estudo. Adiante verificou-se que a via intramuscular melhorava a qualidade e quantidade de marcações. Os autores, começaram a melhorar as técnicas de infiltrações dessas substâncias. Idealmente estes marcadores devem ser injetados em duas etapas, e com isso a área demarcada entre as duas linhas seria a zona óssea formada no período determinado. Método este empregado neste estudo.

Rubin e Bisk (1969), descreveram que embora tenha sido amplamente aceito que uso de alizarina S vermelho seja efetivo como marcador, perceberam que a coloração era menos nítida ou intensa dependendo das vias de administração. Pelo estudo realizado, notou-se que as manchas formadas pelos marcadores ósseos nas áreas de neoformação óssea, não são como anéis de crescimento, separadas por período de formação, como até então estava descrito, mas sim por meio de processo mais dinâmico, onde numa mesma área existem períodos de maturação óssea em estágios diferentes.

Milch et al. (1958), demonstraram a localização de composto fluorescente em regiões de neoformação óssea após a administração de tetraciclina. Entretanto Rubin e Bisk (1969) relataram que caso a área já esteja mineralizada ou mesmo parcialmente mineralizada quando da administração deste fármaco, não ocorre a marcação.

Em nosso estudo observamos que o processo de neoformação óssea é bem dinâmico, e numa mesma região, se tem tecido ósseo em vários estágios de formação. Foi utilizada a técnica europeia de marcação óssea, onde utilizam vários marcadores, e o tecido neofomado em determinados períodos são corados de acordo com o período de infiltração destes marcadores.

Com relação aos marcadores utilizados neste estudo, tivemos maior formação de áreas vermelho acastanhadas, portanto regiões que foram coradas pela alizarina, sendo correspondente ao tecido ósseo formado nas primeiras três semanas pós-trauma, pois foi neste período que se infiltrou a alizarina.

Já às áreas coradas entre a quarta e quinta semanas, que foram marcadas pela calceína; foi possível observar que na região onde foi feita a sobreposição óssea cortical-cortical, houve a formação quase quatro vezes menor de áreas marcadas por calceína. Já na região de controle cirúrgico (osteotomia), essa diferença é menor, e a área corada com calceína é um pouco maior que a metade da alizarina.

Agora quando comparadas as áreas de sobreposição óssea e de controle cirúrgico (osteotomia), com relação à média de área neoformada, esta foi maior tanto na alizarina quanto na calceína, o que denota que quanto menor o trauma, mais rápida será a regeneração óssea independente do movimento cirúrgico.

Reiteramos que em nenhum dos exemplares houve a marcação pela tetraciclina. Como descrito no estudo de Rubin e Bisk (1969), acreditamos que devido o metabolismo dos coelhos serem mais acelerados, no período de infiltração desta substância, ou o tecido ósseo já estava totalmente maturado, por isso não houve sua marcação.

O interesse em escaneres de feixe cônico dedicados para a região maxilofacial tem aumentado exponencialmente desde a sua introdução na final dos anos 90 (Arai et al., 1999; De Vos et al., 2009). Novas possibilidades e aplicações deste tipo de

exame surgiram nas diversas áreas da odontologia, contribuindo muito com o melhor diagnóstico das doenças. Outros benefícios importantes da TC de feixe cônico incluem o potencial de escaneamento vertical em posição natural sentado, fácil manuseio, compatibilidade DICOM e alta resolução (De Vos et al., 2009).

Entretanto uma discussão permanece em pauta, que é a falta de consenso entre os fabricantes, que constroem grande variedade de escaneres. Entre os vários tomógrafos de feixe cônico, existem variações operacionais, como na reconstrução dos algoritmos, no posicionamento da fonte do feixe em relação ao detector, ou no processo de digitalização dos dados que são adquiridos a partir de arco completo ou de apenas arco parcial de rotação em torno do objeto escaneado (Ludlow et al., 2007).

Os fabricantes dos sistemas de TC de feixe cônico não concordaram com o sistema padrão para dimensionar os valores reconstruídos. Por isso vários artigos relataram que o método de TC convencional de multicanais e a TC de feixe cônico, com relação a densidade óssea não é homogênea. Embora estas produzissem distribuições semelhantes de valores de cinza, não estão em correlação com a escala padrão de unidade Hounsfield (Naitoh et al., 2009, Naitoh et al., 2010; Nomura et al., 2010). Segundo Shahlaie et al. (2003), a utilização de diferentes softwares, a inclusão do osso cortical na mensuração e o uso de imagens reformatadas para avaliar a densidade óssea, são fatores que limitam as inferências da TC feixe cônico sobre outros estudos.

Hagino et al. (1996) e Richman e Laskin (1964), relataram que existe evidências clínicas de reparação óssea no espaço de clivagem entre os fragmentos ósseos após OVRM, e que a reparação está estável seis meses após a cirurgia. De acordo com Hasegawa et al. (2011) e Nemoto et al. (2001), a reparação óssea dos fragmentos após OVRM continuaram a sofrer remodelação por muito tempo. Em estudo de Arimoto et al. (2013), onde avaliaram com TC a OVRM, e mostraram claramente que os valores de densidade na TC entre os fragmentos ósseos aumentou significativamente ao longo do tempo (1 mês, 6 meses, 1 e 2 anos) após a cirurgia, e o valor das densidades na TC aos seis meses foi inferior ao pré-operatório.

Na execução deste trabalho, partimos de 12 animais, entretanto ao final dos experimentos fizemos uso de 08 exemplares, pois em 04 houve reabsorção do fragmento ósseo. Essa perda se deve possivelmente a impossibilidade de manutenção do animal com restrição de movimentos mandibulares. Destes 08 animais restantes, em 7 deles a média das densidades ossea em HU nas regiões de sobreposição óssea, sempre foi abaixo da região de controle tomográfico, que era a região que não sofreu nenhum trauma cirúrgico. Portanto com relação à recuperação da qualidade óssea, ou não estava totalmente completada quando da eutanásia dos animais, ou então mesmo com a neoformação e maturação óssea total, a densidade medida em HU não atingiu os números pré-trauma.

Os valores de HU obtidos nas áreas operadas com ou sem sobreposição óssea e na área controle, foram avaliados e comparados individualmente em cada animal. Desta forma, os dados obtidos se mostraram fidedignos, minimizando a variabilidade das alterações descritas na literatura, como variações de algoritmos tomográficos. Como resultados da análise dos animais, onde foram realizadas comparações entre os lados operados e controle, concluiu-se por meio da correlação de Pearson que todas as correlações mostraram-se não significantes, com $p > 0,05$. Desta forma concluímos que as medidas de densidade são correlacionadas no mesmo animal, mas não entre os animais. O que leva a acreditar, que há grande variação na maturação esquelética e cronológica, e/ou variação nos algoritmos tomográficos.

Pela análise dos resultados obtidos, onde a diferença de médias entre as densidades das regiões com sobreposição óssea cortical e a de osteotomia (controle cirúrgico), foi avaliada por meio do teste t pareado de Student, sob o nível de significância de 5%, com $p = 0,001$, ou seja, as médias podem ser consideradas iguais. Desta forma, em nosso estudo, tanto a região com sobreposição óssea cortical/cortical, quanto onde realizou somente osteotomia houve reparação óssea de maneira muito semelhante. O que leva a crer que ambas as osteotomias mandibulares (OSM e OVRM), se reparam produzindo ponte óssea.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Considerando o modelo animal utilizado e as limitações da metodologia empregada, é lícito concluir que:

- Pela análise da microscopia de fluorescência obteve-se que na área de controle cirúrgico (somente osteotomia), houve neoformação óssea 2% maior marcada pela alizarina; e mais que o dobro de área óssea formada na quarta e quinta semana pós-trauma, marcada pela calceína quando comparada as áreas de sobreposição de corticais.
- No coelho I, as medidas de densidade do lado operado e osteotomia obtiveram nível de significância de $p=0,001$, indicando que os processos de reparo com ou sem sobreposição óssea, são semelhantes.
- A média das densidades em unidades HU (Hounsfield) nas áreas operadas com sobreposição óssea foi menor do que a da densidade apresentada pela região controle.
- As maiores média de densidade óssea foram: área controle > regiões com sobreposição óssea > controle cirúrgico (osteotomia).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*. 2008 Feb;87(2):107-18.

Al-Bishri A, Barghash Z, Rosenquist J, Sunzel B. Neurosensory disturbance after sagittal split and intraoral vertical ramus osteotomy: as reported in questionnaires and patients' records. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 May;34(3):247-51.

Albrektsson T. Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1980;14(1):1-12.

Allegrini S Jr, Yoshimoto M, Salles MB, König B Jr. The effects of bovine BMP associated to HA in maxillary sinus lifting in rabbits. *Ann Anat*. 2003 Jul;185(4):343-9.

Al-Moraissi EA, Ellis E 3rd. Is There a Difference in Stability or Neurosensory Function Between Bilateral Sagittal Split Ramus Osteotomy and Intraoral Vertical Ramus Osteotomy for Mandibular Setback? *J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Jul;73(7):1360-71. doi: 10.1016/j.joms.2015.01.010.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1960 Jul;61:32-44.

Arai Y, Tammisalo E, Iwai K, Hashimoto K, Shinoda K. Development of a compact computed tomographic apparatus for dental use. *Dentomaxillofac Radiol*. 1999 Jul;28(4):245-8.

Arimoto S, Hasegawa T, Kaneko K, Tateishi C, Furudo S, Shibuya Y, Komori T. Observation of osseous healing after intraoral vertical ramus osteotomy: focus on computed tomography values. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Sep;71(9):1602.e1-1602.e10. doi: 10.1016/j.joms.2013.02.021.

Arisan V, Karabuda ZC, Avsever H, Özdemir T. Conventional multi-slice computed tomography (CT) and cone-beam CT (CBCT) for computer-assisted implant placement. Part I: relationship of radiographic gray density and implant stability. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Dec;15(6):893-906. doi:10.1111/j.1708-8208.2011.00436.x.

Aziz SR , Roser SM. Mandibular Orthognathic Surgery: Vertical Ramus Osteotomy vs. Sagittal Split Osteotomy. In *Current therapy in oral and maxillofacial surgery*. St Louis: Elsevier saunders; 2012. Chapter 78. p. 650-8.

Aziz SR. Simon P. Hullihen and the origin of orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Oct;62(10):1303-7.

Batista WO, Navarro MV, Maia AF. Development and implementation of a low-cost phantom for quality control in cone beam computed tomography. *Radiat Prot Dosimetry*. 2013 Dec;157(4):552-60. doi: 10.1093/rpd/nct177.

Beckmann EC. CT scanning the early days. *Br J Radiol*. 2006 Jan;79(937):5-8.

Bell WH, Profitt WR, White RP. Surgical correction of dentofacial deformities. W B Saunders, Philadelphia; 1980.

Bell WH. Mandibular prognathism. Modern practice in orthognathic and reconstructive surgery. Philadelphia: PA Saunders; 1992. p.2111–37.

Blinder D, Peleg O, Yoffe T, Taicher S. Intraoral vertical ramus osteotomy: a simple method to prevent medial trapping of the proximal fragment. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Mar;39(3):289-91. doi: 10.1016/j.ijom.2009.12.015.

Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1992 Jun;200(2):165-70.

Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res*. 1984;2(1):97-101.

Boyne PJ, Kruger GO. Fluorescence microscopy of alveolar bone repair. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1962 Mar;15:265-81.

Brash JC. The Growth of the Jaws and Palate. In *The Growth of the Jaws, Normal and Abnormal, in Health and Disease*, London. Dental Board of the United Kingdom; 1929. p. 23-66.

Breur GJ, VanEnkevort BA, Farnum CE, Wilsman NJ. Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth in growth plates. *J Orthop Res*. 1991 May;9(3):348-59.

Brooks RA. A quantitative theory of the Hounsfield unit and its application to dual energy scanning. *J Comput Assist Tomogr*. 1977 Oct;1(4):487-93.

Bryant JA, Drage NA, Richmond S. Study of the scan uniformity from an i-CAT cone beam computed tomography dental imaging system. *Dentomaxillofac Radiol*. 2008 Oct;37(7):365-74. doi: 10.1259/dmfr/13227258.

Buckwalter JA, Einhorn TA, O'Keefe RJ, American Academy of Orthopaedic Surgeons. *Orthopaedic basic science: foundations of clinical practice*. 3rd edition. Rosemont (IL): American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2007. p. 331–46.

Buyske DA, Eisner HJ, Kelly RG. Concentration and persistence of tetracycline and chlortetracycline in bone. *J Pharmacol Exp Ther*. 1960 Oct;130:150-6.

Caldwell JB, Letterman GS. Vertical osteotomy in the mandibular ramal for correction of prognathism. *J Oral Surg (Chic)*. 1954 Jul;12(3):185-202.

Cameron GR. The Staining of Calcium, *J Path Bact*. 1930; 33: 929.

Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM; LEAP Study Group.. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. *J Orthop Trauma*. 2005 Mar;19(3):151-7.

Cavalcanti MG, Vannier MW. Quantitative analysis of spiral computed tomography for craniofacial clinical applications. *Dentomaxillofac Radiol*. 1998 Nov;27(6):344-50.

Cevitanes LH, Bailey LJ, Tucker GR Jr, Styner MA, Mol A, Phillips CL, Proffit WR, Turvey T. Superimposition of 3D cone-beam CT models of orthognathic surgery patients. *Dentomaxillofac Radiol*. 2005 Nov;34(6):369-75.

Cevindanes LH, Styner MA, Proffit WR. Image analysis and superimposition of 3-dimensional cone-beam computed tomography models. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 May;129(5):611-8.

Chang HP, Tseng YC, Chang HF. Treatment of mandibular prognathism. *J Formos Med Assoc*. 2006 Oct;105(10):781-90.

Chiapasco M, Zaniboni M. Failures in jaw reconstructive surgery with autogenous onlay bone grafts for pre-implant purposes: incidence, prevention and management of complications. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2011 Feb;23(1):1-15, v. doi: 10.1016/j.coms.2010.10.009.

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002 Mar;17(3):513-20.

Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res*. 2002 Sep;20(5):1099-105.

Costa F, Robiony M, Politi M. Stability of sagittal split ramus osteotomy used to correct Class III malocclusion: review of the literature. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg*. 2001;16(2):121-9.

Cramer T, Schipani E, Johnson RS, Swoboda B, Pfander D. Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jun;12(6):433-9.

Daimoto M, Sugawara J, Mitani H, et al. Postoperative stability of mandible and occlusion following intraoral vertical ramus osteotomy: Comparison with sagittal split ramus osteotomy with rigid fixation by titanium miniplate. *J Jaw Deform*. 1997. 7: 120.

De Vos W, Casselman J, Swennen GR. Cone-beam computerized tomography (CBCT) imaging of the oral and maxillofacial region: a systematic review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Jun;38(6):609-25. doi: 10.1016/j.ijom.2009.02.028.

Devlin H, Ferguson MW. Alveolar ridge resorption and mandibular atrophy. A review of the role of local and systemic factors. *Br Dent J*. 1991 Feb 9;170(3):101-4.

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec;36(12):1392-404.

Ding GX, Duggan DM, Coffey CW, Deeley M, Hallahan DE, Cmelak A, Malcolm A. A study on adaptive IMRT treatment planning using kV cone-beam CT. *Radiother Oncol*. 2007 Oct;85(1):116-25.

Draenert FG, Coppenrath E, Herzog P, Müller S, Mueller-Lisse UG. Beam hardening artefacts occur in dental implant scans with the NewTom cone beam CT but not with the dental 4-row multidetector CT. *Dentomaxillofac Radiol*. 2007 May;36(4):198-203.

El H, Palomo JM. Measuring the airway in 3 dimensions: a reliability and accuracy study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010 Apr;137(4 Suppl):S50.e1-9; discussion S50-2. doi: 10.1016/j.ajodo.2010.01.014.

Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S7-21.

Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jan;11(1):45-54. doi: 10.1038/nrrheum.2014.164.

Elke M. One century of diagnostic imaging in medicine. *Experientia*. 1995 Jul 14;51(7):665-80.

Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev*. 1999 Sep;87(1-2):57-66.

Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Tsay A, Fitch J, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res*. 2003 Sep;18(9):1584-92.

Ghali GE, Sikes JW Jr. Intraoral vertical ramus osteotomy as the preferred treatment for mandibular prognathism. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Mar;58(3):313-5.

Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S82-9.

González-García R, Monje F. The reliability of cone-beam computed tomography to assess bone density at dental implant recipient sites: a histomorphometric analysis by micro-CT. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Aug;24(8):871-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02390.x.

Hagino H, Sawaki Y, Oda T, et al: Clinical study of intraoral vertical ramus osteotomy—Part 1. Radiologic study of proximal segments. *J Jaw Deform*. 1996. 6:32.

Hall HD. Mandibular prognathism, in Bell WH (ed): *Modern Practice in Orthognathic And Reconstructive Surgery*. Philadelphia, PA, WB Saunders. 1992. p 2111

Hall HD, McKenna SJ. Further refinement and evaluation of intraoral vertical ramus osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg*. 1987 Aug;45(8):684-8.

Hall HD, Navarro EZ, Gibbs SJ. One- and three-year prospective outcome study of modified condylotomy for treatment of reducing disc displacement. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Jan;58(1):7-17; discussion 18.

Hasegawa T, Tateishi C, Uchida R, Nishi C, Furudo S, Shibuya Y, Yokoo S, Komori T. Osseous healing after a sagittal splitting ramus osteotomy. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011 May;40(5):475-82. doi: 10.1016/j.ijom.2010.12.006.

Hashemi HM. Evaluation of intraoral verticosagittal ramus osteotomy for correction of mandibular prognathism: a 10-year study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Mar;66(3):509-12. doi: 10.1016/j.joms.2007.03.033.

Hebert JM, Kent JN, Hinds EC. Correction of prognathism by an intraoral vertical subcondylar osteotomy. *J Oral Surg*. 1970 Sep;28(9):651-3.

Hogan G, Ellis E 3rd. The "antilingula"--fact or fiction? *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Aug;64(8):1248-54.

Hohlweg-Majert B, Schmelzeisen R, Pfeiffer BM, Schneider E. Significance of osteoporosis in craniomaxillofacial surgery: a review of the literature. *Osteoporos Int*. 2006 Feb;17(2):167-79.

Hohlweg-Majert B, Metzger MC, Kummer T, Schulze D. Morphometric analysis - Cone beam computed tomography to predict bone quality and quantity. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011 Jul;39(5):330-4. doi: 10.1016/j.jcms.2010.10.002.

Hunter J. Experiments and observations on the growth of bone. London: J E Palmer, editor; 1837.

Hu J, Wang D, Zou S. Effects of mandibular setback on the temporomandibular joint: a comparison of oblique and sagittal split ramus osteotomy. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Apr;58(4):375-80; discussion 380-1.

Hupp J. Wound repair. In Peterson LE, Hupp JR, Tucker MR, editors. Contemporary oral and maxillofacial surgery. St Louis: Mosby; 2003. 49-62.

Jaboulay M, Berard L. Traitement chirurgical du prognathisme inferieur. *Presse Med*. 1898; 30:173–6.

Jaffray DA, Siewerdsen JH, Wong JW, Martinez AA. Flat-panel cone-beam computed tomography for image-guided radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2002 Aug 1;53(5):1337-49.

Jung HD, Jung YS, Kim SY, Kim DW, Park HS. Postoperative stability following bilateral intraoral vertical ramus osteotomy based on amount of setback. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Dec;51(8):822-6. doi: 10.1016/j.bjoms.2013.02.001.

Kalender WA, Vock P, Polacin A, Soucek M. [Spiral-CT: a new technique for volumetric scans. I. Basic principles and methodology]. *Rontgenpraxis*. 1990 Sep;43(9):323-30.

Kaneko K, Tateishi C, Imai Y, et al: Observation of osseous healing after intraoral vertical ramus osteotomy (IVRO). *J Jaw Deform*. 2012; 22:216.

Kawase-Koga Y, Mori Y, Fujii Y, Kanno Y, Chikazu D, Susami T, Takato T. Complications after intraoral vertical ramus osteotomy: relationship to the shape of the osteotomy line. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Feb;45(2):200-4. doi: 10.1016/j.ijom.2015.07.008.

Kerammaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S45-57. doi: 10.1016/S0020-1383(08)70015-9.

Klemetti E, Vainio P. Effect of maxillary edentulousness on mandibular residual ridges. *Scand J Dent Res*. 1994 Oct;102(5):309-12.

Ko EW, Huang CS, Chen YR. Characteristics and corrective outcome of face asymmetry by orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Oct;67(10):2201-9. doi: 10.1016/j.joms.2009.04.039.

Kobayashi K, Shimoda S, Nakagawa Y, Yamamoto A. Accuracy in measurement of distance using limited cone-beam computerized tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004 Mar-Apr;19(2):228-31.

Kwong FN, Harris MB. Recent developments in the biology of fracture repair. *J Am Acad Orthop Surg*. 2008 Nov;16(11):619-25.

Lascalea CA, Panella J, Marques MM. Analysis of the accuracy of linear measurements obtained by cone beam computed tomography (CBCT-NewTom). *Dentomaxillofac Radiol*. 2004 Sep;33(5):291-4.

Lenza MG, Lenza MM, Dalstra M, Melsen B, Cattaneo PM. An analysis of different approaches to the assessment of upper airway morphology: a CBCT study. *Orthod Craniofac Res*. 2010 May;13(2):96-105. doi: 10.1111/j.1601-6343.2010.01482.x.

Lima Júnior SM, Granato R, Marin C, de Souza Maliska MC, Gil JN. Analysis of 40 cases of intraoral verticosagittal ramus osteotomies to treat dentofacial deformities. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Sep;67(9):1840-3. doi: 10.1016/j.joms.2009.04.028.

Ludlow JB, Laster WS, See M, Bailey LJ, Hershey HG. Accuracy of measurements of mandibular anatomy in cone beam computed tomography images. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Apr;103(4):534-42.

Mah P, Reeves TE, McDavid WD. Deriving Hounsfield units using grey levels in cone beam computed tomography. *Dentomaxillofac Radiol*. 2010 Sep;39(6):323-35. doi: 10.1259/dmfr/19603304.

Manor Y, Blinder D, Taicher S. Intra-oral vertical ramus osteotomy: a modified technique for correction of mandibular prognathism. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Oct;30(5):443-4.

Marmulla R, Wörtche R, Mühling J, Hassfeld S. Geometric accuracy of the NewTom 9000 Cone Beam CT. *Dentomaxillofac Radiol*. 2005 Jan;34(1):28-31.

McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):377-96.

McKenna SJ, King EE. Intraoral Vertical Ramus Osteotomy Procedure and Technique. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2016 Mar;24(1):37-43. doi: 10.1016/j.cxom.2015.10.002.

Milch RA, Rall DP, Tobie JE. Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1958 Jul;40-A(4):897-910.

MHRA (Medicines and Healthcare products Regulatory Agency, UK). 03066 ImPACT Report on GE Lightscan Ultra Advantage CT Scanner Technical Evaluation. June 2003.

Molteni R. Prospects and challenges of rendering tissue density in Hounsfield units for cone beam computed tomography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Jul;116(1):105-19. doi: 10.1016/j.oooo.2013.04.013.

Molteni R. The so-called cone beam computed tomography technology (or CB3D, rather!). *Dentomaxillofac Radiol*. 2008 Dec;37(8):477-8. doi: 10.1259/dmfr/51832728.

Moose SM. Surgical correction of mandibular prognathism by intraoral subcondylar osteotomy. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv*. 1964 May;22:197-202.

Mori M, Motohashi M, Nishikawa T, Masuno K, Tanaka A, Ohta T, Sumitomo S, Shikimori M. Biological implications of growth factors in bone remodeling following fracture, surgical resection and bonegrafting. Part 1: Transforming growth factors, bone morphogenetic proteins and related factors. *Asian J Oral Maxillofacial Surg*. 2010; 22; 117–25.

Mozzo P, Procacci C, Tacconi A, Martini PT, Andreis IA. A new volumetric CT machine for dental imaging based on the cone-beam technique: preliminary results. *Eur Radiol.* 1998;8(9):1558-64.

Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, Arijii E. Evaluation of voxel values in mandibular cancellous bone: relationship between cone-beam computed tomography and multislice helical computed tomography. *Clin Oral Implants Res.* 2009 May;20(5):503-6. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01672.x.

Naitoh M, Hirukawa A, Katsumata A, Arijii E. Prospective study to estimate mandibular cancellous bone density using large-volume cone-beam computed tomography. *Clin Oral Implants Res.* 2010 Dec;21(12):1309-13. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01950.x.

Nemoto T, Akizuki H, Mich K: Osseous healing after sagittal splitting ramus osteotomy in mandibular prognathism: Threedimensional CT measurement. *J Jpn Stomatol Soc.* 2001; 50:227.

Nihara J, Takeyama M, Takayama Y, Mutoh Y, Saito I. Postoperative changes in mandibular prognathism surgically treated by intraoral vertical ramus osteotomy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Jan;42(1):62-70. doi: 10.1016/j.ijom.2012.06.024.

Nkenke E, Zachow S, Benz M, Maier T, Veit K, Kramer M, Benz S, Häusler G, Neukam FW, Lell M. Fusion of computed tomography data and optical 3D images of the dentition for streak artefact correction in the simulation of orthognathic surgery. *Dentomaxillofac Radiol.* 2004 Jul;33(4):226-32.

Nomura Y, Watanabe H, Honda E, Kurabayashi T. Reliability of voxel values from cone-beam computed tomography for dental use in evaluating bone mineral density. *Clin Oral Implants Res.* 2010 May;21(5):558-62. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01896.x.

Norman JE, Painter DM. Hyperplasia of the mandibular condyle. A historical review of important early cases with a presentation and analysis of twelve patients. *J Maxillofac Surg.* 1980 Aug;8(3):161-75.

Obwegeser HL. Orthognathic surgery and a tale of how three procedures came to be: a letter to the next generations of surgeons. *Clin Plast Surg.* 2007 Jul;34(3):331-55.

Papadaki ME, Kaban LB, Troulis MJ. Endoscopic vertical ramus osteotomy: a long-term prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Mar;43(3):305-10. doi: 10.1016/j.ijom.2013.09.012.

Parker MG, Lehman JA Jr, Martin DE. Mandibular prognathism. *Clin Plast Surg.* 1989 Oct;16(4):677-85.

Park KR, Kim SY, Park HS, Jung YS. Surgery-first approach on patients with temporomandibular joint disease by intraoral vertical ramus osteotomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013 Dec;116(6):e429-36. doi: 10.1016/j.oooo.2011.11.038.

Pauwels R, Nackaerts O, Bellaiche N, Stamatakis H, Tsiklakis K, Walker A, Bosmans H, Bogaerts R, Jacobs R, Horner K; SEDENTEXCT Project Consortium.. Variability of dental cone beam CT grey values for density estimations. *Br J Radiol.* 2013 Jan;86(1021):20120135. doi: 10.1259/bjr.20120135.

Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury.* 2005 Nov;36 Suppl 3:S5-7.

Proffit WR, Turvey TA: Dentofacial asymmetry. In Proffit WR, White RA Jr, Sarver DM. Contemporary treatment of dentofacial deformity. St Louis: CV Mosby; 2003.

Rahn BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. In: Fackelman, GE. Bone in clinical orthopedics. Stuttgart: Thieme; 2002. p. 287-326.

Rall DP, Loo TL, Lane M, Kelly MG. Appearance and persistence of fluorescent material in tumor tissue after tetracycline administration. *J Natl Cancer Inst.* 1957 Jul;19(1):79-85.

Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Dec;46(8):665-70. doi: 10.1016/j.bjoms.2008.07.184.

Rebaudi A, Trisi P, Cella R, Cecchini G. Preoperative evaluation of bone quality and bone density using a novel CT/microCT-based hard-normal-soft classification system. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010 Jan-Feb;25(1):75-85.

Richman PT, Laskin DM: The healing of experimentally produced fractures of the zygomaticomaxillary complex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1964 Jun;17:701-11.

Robbins LS. *Patologia estrutural e funcional. Inflamação e Reparo.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p.33-73.

Robiony M, Polini F, Costa F, Sembronio S, Zerman N, Politi M. Endoscopically assisted intraoral vertical ramus osteotomy and piezoelectric surgery in mandibular prognathism. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Oct;65(10):2119-24.

Rogalla P, Kloeters C, Hein PA. CT technology overview: 64-slice and beyond. *Radiol Clin North Am.* 2009 Jan;47(1):1-11. doi: 10.1016/j.rcl.2008.10.004.

Rubin PL, Bisk F. Comparative efficacy of differing modes of administering alizarin red S in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1969 Jul;28(1):122-5.

Santler G, Kärcher H, Ruda C. Indications and limitations of three-dimensional models in cranio-maxillofacial surgery. *J Craniomaxillofac Surg.* 1998 Feb;26(1):11-6.

Schenk R. Biology of fracture repair. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG. *Skeletal trauma.* Philadelphia: Saunders; 1992. p.31-75.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr;(205):299-308.

Shampo MA, Kyle RA. Allan Cormack--codeveloper of computed tomographic scanner. *Mayo Clin Proc.* 1996 Mar;71(3):288.

Shahlaie M, Gantes B, Schulz E, Riggs M, Crigger M. Bone density assessments of dental implant sites: 1. Quantitative computed tomography. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Mar-Apr;18(2):224-31.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater.* 2008 Apr 1;15:53-76.

Sittig DF, Ash JS, Ledley RS. The story behind the development of the first whole-body computerized tomography scanner as told by Robert S. Ledley. *J Am Med Inform Assoc*. 2006 Sep-Oct;13(5):465-9.

Sridharan G, Shankar AA. Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 May;16(2):251-5. doi: 10.4103/0973-029X.99081.

Swennen GR, Mollemans W, De Clercq C, Abeloos J, Lamoral P, Lippens F, Neyt N, Casselman J, Schutyser F. A cone-beam computed tomography triple scan procedure to obtain a three-dimensional augmented virtual skull model appropriate for orthognathic surgery planning. *J Craniofac Surg*. 2009 Mar;20(2):297-307. doi: 10.1097/SCS.0b013e3181996803.

Troulis MJ, Nahlieli O, Castano F, Kaban LB. Minimally invasive orthognathic surgery: endoscopic vertical ramus osteotomy. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2000 Aug;29(4):239-42.

Troulis MJ, Kaban LB. Endoscopic vertical ramus osteotomy: early clinical results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jul;62(7):824-8.

Tucker MR, Farrell BB. Correction of dentofacial deformities, in Hupp PR, Ellis III E, Tucker MR (6 ed): *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. St. Louis, MO, Elsevier. 2014. P 519-57

Ueki K, Marukawa K, Nakagawa K, Yamamoto E. Condylar and temporomandibular joint disc positions after mandibular osteotomy for prognathism. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Dec;60(12):1424-32; discussion 1432-4.

Vannier MW, Hildebolt CF, Conover G, Knapp RH, Yokoyama-Crothers N, Wang G. Three-dimensional dental imaging by spiral CT. A progress report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997 Nov;84(5):561-70.

Westermarck A, Bystedt H, von Konow L. Inferior alveolar nerve function after mandibular osteotomies. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Dec;36(6):425-8.

Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials*. 2009 Oct;30(30):5897-909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.

Winstanley RP. Subcondylar osteotomy of the mandible and the intraoral approach. *Br J Oral Surg.* 1968 Nov;6(2):134-6.

Wolford LM. The sagittal split ramus osteotomy as the preferred treatment for mandibular prognathism. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Mar;58(3):310-2.

Wyatt CC, Pharoah MJ. Imaging techniques and image interpretation for dental implant treatment. *Int J Prosthodont.* 1998 Sep-Oct;11(5):442-52.

Yamauchi K, Takenobu T, Takahashi T. Condylar luxation following bilateral intraoral vertical ramus osteotomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Dec;104(6):747-51.

Ye N, Jian F, Xue J, Wang S, Liao L, Huang W, Yang X, Zhou Y, Lai W, Li J, Wang J. Accuracy of in-vitro tooth volumetric measurements from cone-beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012 Dec;142(6):879-87. doi: 10.1016/j.ajodo.2012.05.020.

Yoshioka I, Khanal A, Tominaga K, Horie A, Furuta N, Fukuda J. Vertical ramus versus sagittal split osteotomies: comparison of stability after mandibular setback. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Jun;66(6):1138-44. doi: 10.1016/j.joms.2007.09.008.

Ziegler CM, Woertche R, Brief J, Hassfeld S. Clinical indications for digital volume tomography in oral and maxillofacial surgery. *Dentomaxillofac Radiol.* 2002 Mar;31(2):126-30.

ANEXOS A – Parecer do Comitê de Ética Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **014/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Celso Augusto Lemos Júnior** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa **“Reparo ósseo em mandíbula de coelho após osteotomia vertical: Análise Histológica, Morfométrica e Tomográfica”** do qual participa(am) o(s) pesquisador(es) **Marília Trierveiler Martins, Fernando Kendi Horikawa, e Juliana Seo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **18/08/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 18 de agosto de 2014.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP