SAMANTHA CRISTINE SANTOS XISTO BRAGA CAVALCANTI

**Avaliação da reparação da fratura de côndilo mandibular e da simetria facial
em ratos tratados com metotrexato**

São Paulo

2011

SAMANTHA CRISTINE SANTOS XISTO BRAGA CAVALCANTI

**Avaliação da reparação da fratura de côndilo mandibular e da simetria facial
em ratos tratados com metotrexato**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia
Buco-Maxilo-Faciais.

Orientador: Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz

São Paulo

2011

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

Cavalcanti, Samantha Cristine Santos Xisto Braga

Avaliação da reparação da fratura de côndilo mandibular e da simetria facial em ratos tratados com metotrexato [versão original] / Samantha Cristine Santos Xisto Braga Cavalcanti; orientador João Gualberto de Cerqueira Luz. -- São Paulo, 2011.

103p. : fig., graf.; 30 cm.

Dissertação -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Côndilo mandibular – Fratura – Reparação. 2. Simetria facial. I. Luz, João Gualberto de Cerqueira. II. Título.

Cavalcanti SCSXB. Avaliação da reparação da fratura de côndilo mandibular e da simetria facial em ratos tratados com metotrexato. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / / 2011

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

***Dedico este trabalho a toda minha família,
especialmente a meus pais Helenice
Maria dos Santos e Laércio Xisto Braga
Cavalcanti (in memoriam), que sempre me
apoiaram, me amaram e me ensinaram a
viver.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por iluminar meu caminho.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, pelas oportunidades oferecidas durante o curso de graduação, especialmente aos professores **Roger William Fernandes Moreira** e **Marcelo Giannini** e aos colegas **Cecília Luiz Pereira Stabile** e **Marcelo Tavares Oliveira** pelos primeiros ensinamentos em iniciação científica e pelo incentivo constante.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Rodney Garcia Rocha**, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES**, pela concessão de bolsa de mestrado CAPES/Demanda Social (Cota da Pró-Reitoria) no período de setembro de 2009 a fevereiro de 2010.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP**, pela concessão de bolsa de mestrado a partir de março de 2010 até o final do curso, processo nº 2009/03376-6.

Aos professores **João Gualberto de Cerqueira Luz**, **Maria Cristina Zindel Deboni** e **Suzana Beatriz Verríssimo Mello** pelas importantes arguições realizadas no exame de qualificação acrescentando conhecimento a este trabalho.

Ao meu estimado orientador **Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz** por todo ensinamento e apoio em cada passo deste trabalho.

À **Prof. Dra. Luciana Corrêa** pela co-orientação e confiança, é um exemplo de pesquisadora e professora.

Ao **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior** pelos ensinamentos em microscopia e pela ajuda com as fotos das lâminas histológicas.

À **Prof. Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano**, pela ajuda na análise estatística dos dados.

Aos professores **Antônio Carlos de Campos, Fernando Melhem Elias, João Gualberto de Cerqueira Luz, Maria Cristina Zindel Deboni, Maria da Graça Naclério-Homem, Andréa Aparecida Traina, José Luiz Piratininga, Marcos Vianna Gayotto e Marina Cleia Palo Prado** e a **Dra. Vera Regina Pereira Pozzani** por me receberem tão bem nesta nova etapa de minha vida e a quem eu tenho um carinho especial desde então.

Aos **funcionários da FOUSP**, em especial aos **funcionários do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial** pela ajuda com as questões burocráticas e aos **funcionários do Laboratório de Patologia** pela paciência em ensinar e por toda ajuda no processamento laboratorial.

Aos colegas do curso de pós-graduação **Alexandre Viana Frascino, Leandro Botelho Hanna, Rodrigo Foronda, Ophir Ribeiro Júnior, Gabriel Denser Campolongo, Maria Del Pilar Rodrigues Sanchez, Mariana Aparecida Brozowski** pelo companheirismo durante o curso.

Aos colegas egressos **Rogério Bonfante Moraes e Lucimar Rodrigues** por me ensinarem os princípios e me ajudarem nos procedimentos experimentais.

A todas minhas amigas pelo apoio incondicional por todas as dificuldades que passei nesse momento e pelo maior presente que já recebi: o **Louis**. E agradeço por participar ativamente neste trabalho minhas amigas **Ana Paula de Oliveira Ribeiro**

e **Ivania Juliane Ribeiro** por me ajudarem nos procedimentos cirúrgicos e a **Juliana Nishiyama** por me ajudar no transporte dos animais.

Aos **colegas de graduação da FOP-UNICAMP** que nunca esqueço e que continuam sempre ao meu lado, mesmo estando longe. Com certeza formamos uma família.

Aos **pacientes** por acreditarem em nossa competência.

Aos **animais** que devem ser sempre valorizados e sem os quais a ciência não estaria tão avançada na área da saúde.

Ao meu tio **Marcos Fernando Xisto Braga Cavalcanti** pelo companheirismo e por toda ajuda profissional.

Ao meu namorado **Eduardo Samir Galeno Souto** por fazer com que cada momento se torne especial, por crescer e me ajudar a crescer cada dia mais.

Ainda tenho tantos para agradecer que este espaço não seria suficiente, portanto agradeço a todos que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho.

No meio do caminho

No meio do caminho tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
tinha uma pedra
no meio do caminho tinha uma pedra.
Nunca me esquecerei desse acontecimento
na vida de minhas retinas tão fatigadas.
Nunca me esquecerei que no meio do caminho
tinha uma pedra
tinha uma pedra no meio do caminho
no meio do caminho tinha uma pedra

Carlos Drummond de Andrade

In: Revista de Antropofagia, Julho de 1928.

RESUMO

Cavalcanti SCSXB. Avaliação da reparação da fratura de côndilo mandibular e da simetria facial em ratos tratados com metotrexato [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

O Metotrexato (MTX) é utilizado em altas doses no tratamento de neoplasias e em baixas doses como antiinflamatório. O objetivo deste estudo foi avaliar a reparação da fratura de côndilo mandibular e a simetria facial em ratos tratados com MTX. Foram utilizados 100 ratos, Wistar, machos que foram submetidos a procedimento cirúrgico utilizando modelo experimental de fratura de côndilo do lado direito. Os ratos foram distribuídos em quatro grupos e receberam os seguintes tratamentos: Controle - soro (um mL/semana); Dexametasona - dexametasona (0,15 mg/Kg); MTX Baixa dose - MTX (três mg/kg/semana); MTX Alta dose - MTX (30 mg/Kg). Os períodos de sacrifício foram de um dia, sete, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório (n=cinco). O peso dos animais foi documentado. Foi realizada coleta de sangue para análise bioquímica de proteínas totais e fosfatase alcalina. Foi realizado exame radiográfico das cabeças em norma axial para análise cefalométrica. Foram realizadas mensurações lineares da maxila e mandíbula, bem como angulares do desvio mandibular. As amostras foram processadas histologicamente sendo obtidas lâminas com cortes no sentido coronal. Os dados quantitativos foram submetidos a análises estatísticas ($\alpha=0,05$). Os animais recuperaram peso ao longo do tempo, exceto no grupo MTX Alta dose. Os níveis séricos de proteínas totais mostraram aumento nos períodos iniciais e os de fosfatase alcalina queda nos períodos de formação do calo ósseo no tratamento com MTX. Houve redução no comprimento mandibular com alterações também na maxila e desvio progressivo da mandíbula em relação à base do crânio no grupo MTX Alta dose. A análise histológica revelou que houve reparo da fratura, pela formação de calo ósseo, e das estruturas da articulação sendo que no grupo MTX Alta dose ocorreu um retardo neste processo, havendo desvio do côndilo e em um espécime houve anquilose fibrosa. A histomorfometria revelou que a área de neoformação óssea foi menor no grupo MTX Alta dose. Foi concluído que o tratamento com MTX em alta dose teve efeito deletério na simetria facial de ratos submetidos à fratura do processo condilar e

prejudicou a formação do calo ósseo e o reparo da articulação temporomandibular, com possível indução de anquilose fibrosa.

Palavras-Chave: Cirurgia Maxilofacial. Côndilo Mandibular. Metotrexato. Fraturas Maxilares. Articulação Temporomandibular.

ABSTRACT

Cavalcanti SCSXB. Evaluation of mandibular condyle fracture repair and facial symmetry in rats treated with methotrexate [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.

The methotrexate (MTX) is used in high doses in the treatment of neoplasias and in low doses as an antiinflammatory. The aim of this study was to evaluate the healing of the mandibular condyle fracture and facial symmetry in rats treated with MTX. 100 Wistar male rats undergone surgery using an experimental model of mandibular condyle fracture of the right side. The rats were distributed in four groups and received the following treatments: Control – Saline (1 ml/week); Dexamethasone – dexamethasone (0,15mg/kg); MTX Low dose – MTX (3 mg/kg/week); MTX High dose – MTX (30 mg/kg). Animals were sacrificed at one, seven, 15, 30 and 90 days postoperatively (n=5). Animals body weight were recorded. Blood has been taken to provide the biochemical analysis of total proteins and alkaline phosphatase. Radiographic axial exams from the heads were provided to cephalometric analysis. Linear measures of jaw and mandible, as well as angular measures of the mandibular deviation were done. The samples were histologically processed and coronal sections were obtained. Quantitative data were submitted to statistical analysis ($\alpha=0,05$). The animals regained body weight over the time, except in MTX High dose group. Total protein serum levels demonstrated the increase in initial periods and the alkaline phosphatase levels showed decrease in the periods of bone callus formation. There was reduction in the mandibular length and also changes in the jaw and progressive deviation in the mandible in relation to the skull basis in the MTX High dose group. The histological analysis revealed that there were repair of the bone and temporomandibular joint although in the MTX High dose group there was a delay in this process, in wich there was deviation of the condyle and one specimen was fibrous ankylosis. Histomorphometry revealed that the new bone formation area was lower in MTX High dose group. It was concluded that treatment with high dose MTX had a deleterious effect on facial symmetry of rats submitted to

fracture of the condylar process and damaged the bone callus formation and repair of the temporomandibular joint, with possible induction of fibrous ankylosis.

Keywords: Surgery, Oral. Mandibular Condyle. Methotrexate. Maxillary Fractures. Temporomandibular Joint.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Forma de apresentação dos medicamentos utilizados no estudo. **A:** Grupo Dexametasona (Decadron®). **B:** Grupos MTX Baixa dose e MTX Alta dose (Miantrex®).....36
- Figura 4.2 - Procedimento cirúrgico. **A.** Tricotomia do lado direito da face. **B.** Incisão pré-auricular da pele. **C.** Incisão do plano muscular e divulsão dos tecidos subjacentes ao osso. **D.** Posicionamento da pinça mosquito (*Halstead*) para fratura de côndilo.....37
- Figura 4.3 - Fratura do processo condilar com desvio medial.....38
- Figura 4.4 - Forma de apresentação do analgésico cloridrato de tramadol (Tramal®)38
- Figura 4.5 - Esquema de posicionamento do aparelho de raio X e do filme periapical para tomada radiográfica40
- Figura 4.6 - Pontos cefalométricos para mensuração das distâncias no crânio. BT = Bula timpânica, FI = Forame infraorbitário e PI = Ponto incisal superior.....42
- Figura 4.7 - Pontos cefalométricos para mensuração das distâncias na mandíbula PA = Processo angular, II = Inserção do incisivo e PI' = Ponto incisal inferior.....42
- Figura 4.8 - Pontos cefalométricos para mensuração do ângulo α . BT = Bula timpânica e PI' = Ponto incisal inferior.....43
- Figura 4.9 - Pontos cefalométricos para mensuração do ângulo A. BT = Bula timpânica, PI = Ponto incisal superior e PI' = Ponto incisal inferior44
- Figura 4.10 - Imagem da tela do *software* Imagelab®. **A:** Imagem inicial. **B:** Imagem inicial. **C:** Após utilização de ferramenta para mensuração da área de neoformação óssea em mm². **D:** Após utilização de ferramenta para mensuração da área de cartilagem articular em mm².....45
- Figura 5.1 - Grupo Controle. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Exsudato fibrino hemorrágico e coto da fratura viável, com exsudato inflamatório no tecido muscular. 100x. **C:** Disco articular preservado acompanha o côndilo 100x. H&E.....65
- Figura 5.2 - Grupo Controle. Sete dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. 100x. **C:** Maior espessura da zona proliferativa da fibrocartilagem articular.100x. H&E.....65

- Figura 5.3 - Grupo Controle. 15 dias. **A:** Local da fratura com organização do calo ósseo. 25x. **B:** Coto da fratura desvitalizado, tecido cartilaginoso entre os cotos. 100x. H&E.66
- Figura 5.4 - Grupo Controle. 30 dias. **A:** Côndilo reposicionado na cavidade articular. 25x. **B:** Calo ósseo maduro, presença de medula hematopoiética na região da fratura.100x. **C:** Disco articular interposto junto ao côndilo. 100x. H&E.....66
- Figura 5.5 - Grupo Controle. 90 dias. **A:** Região subcondilar, com sinais de remodelação óssea, reorganização das fibras musculares. 100x. **B:** Côndilo bem posicionado, camadas da fibrocartilagem organizadas, disco articular interposto. 100x. H&E.....67
- Figura 5.6 - Grupo Dexametasona. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Coto da fratura vitalizado e intenso exsudato fibrino hemorrágico. 100x. **C:** Disco articular preservado acompanha o côndilo. 100x. H&E.....69
- Figura 5.7 - Grupo Dexametasona. Sete dias. **A:** Disco articular acompanha o côndilo. Aumento da zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. **B:** Coto da fratura com presença de células gigantes multinucleadas em lacunas de reabsorção e tecido de granulação. 100x. **C:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. 100x. H&E.....70
- Figura 5.8 - Grupo Dexametasona. 15 dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 15 dias. 25x. **B:** Áreas focais de tecido cartilaginoso, início da formação do calo ósseo. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. Aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. H&E.70
- Figura 5.9 - Grupo Dexametasona. 30 dias. **A:** Côndilo reposicionado na fossa articular com disco articular interposto. 25x. **B:** Calo ósseo maduro com remanescentes de tecido cartilaginoso em seu interior e sinais de medula hematopoiética. 100x. H&E.....71
- Figura 5.10-Grupo Dexametasona. 90 dias. **A:** Côndilo reposicionado na fossa articular e ausência de sinais de calo ósseo. 25x. **B:** Disco articular interposto entre o côndilo e cavidade articular, aumento da zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. H&E.71
- Figura 5.11-Grupo MTX Baixa dose. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Coto da fratura viável, exsudato inflamatório no tecido muscular. 100x. **C:** Côndilo, atrofia da fibrocartilagem articular. Disco articular acompanha o côndilo. 100x. H&E.74

- Figura 5.12-Grupo MTX Baixa dose. Sete dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Disco articular acompanha o côndilo. Atrofia da fibrocartilagem articular. 100x. **C:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. Presença de tecido cartilaginoso indicando formação do calo ósseo. 100x. H&E..... 74
- Figura 5.13-Grupo MTX Baixa dose. 15 dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. 100x. H&E..... 75
- Figura 5.14-Grupo MTX Baixa dose. 30 dias. **A:** Côndilo centralizado na cavidade articular e calo ósseo na região de fratura. 25x. **B:** Presença de tecido cartilaginoso e neoformação óssea compondo o calo ósseo. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. 100x. H&E. 75
- Figura 5.15-Grupo MTX Baixa dose. 90 dias. **A:** Côndilo reposicionado na cavidade articular. 25x. **B:** Disco articular acompanha o côndilo, havendo maior espessura da fibrocartilagem articular. 100x. H&E. 76
- Figura 5.16-Grupo MTX Alta dose. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Presença de exsudato fibrino hemorrágico. Inflamação muscular. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. Aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. **D:** Presença de fratura óssea em duas regiões. 25x. **E:** Cotos da fratura desvitalizados. 100x. H&E..... 79
- Figura 5.17-Grupo MTX Alta dose. Sete dias. **A:** Disco articular acompanha o côndilo. 25x. **B:** Fratura com presença de fragmentos ósseos e tecido de granulação. 25x. **C:** Coto da fratura com extensa área desvitalizada e sinais de neoformação óssea. 100x. H&E. 80
- Figura 5.18-Grupo MTX Alta dose. 15 dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Tecido de granulação. Coto da fratura parcialmente desvitalizado. 100x. **C:** Tecido cartilaginoso indicando sinais de formação do calo ósseo. 100x. H&E..... 80
- Figura 5.19-Grupo MTX Alta dose. 30 dias. **A:** Desvio para medial persistente. 25x. **B:** Calo ósseo maduro. 100x. H&E..... 80
- Figura 5.20-Grupo MTX Alta dose. 90 dias. **A:** Côndilo com ligeiro desvio medial. 25x. **B:** Disco articular interposto entre o côndilo e a cavidade articular. Sinais de atrofia da fibrocartilagem articular. 100x. **C:** Disco articular rompido. Presença de tecido conjuntivo fibroso no espaço da cavidade articular sugerindo anquilose fibrosa da ATM. 25x. H&E..... 81

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 - Média de peso (g) dos animais do grupo controle no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais48
- Gráfico 5.2 - Média de peso (g) dos animais do grupo tratado com dexametasona no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais.....49
- Gráfico 5.3 - Média do peso (g) dos animais do grupo tratado com metotrexato baixa dose no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais.....49
- Gráfico 5.4 - Média do peso (g) dos animais do grupo tratado com metotrexato alta dose no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais.....50
- Gráfico 5.5 - Média da taxa de ganho ou perda de peso (g) segundo os períodos experimentais. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....52
- Gráfico 5.6 - Valores da média de proteínas totais (g/dL) dos animais dos animais por grupo em cada período experimental. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....54
- Gráfico 5.7 - Valores da média de fosfatase alcalina (U/L) dos animais dos animais por grupo em cada período experimental. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....55
- Gráfico 5.8 - Valores da média de área da cartilagem articular (mm²) dos animais por grupo em cada período experimental. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....82
- Gráfico 5.9 - Valores da média de área de neoformação óssea (mm²) por grupo nos períodos de sete, 15 e 30 dias. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Médias e desvios padrão da taxa de ganho ou perda de peso dos animais (g). Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....51
- Tabela 5.2 - Valores da média e desvio padrão (DP) dos testes bioquímicos de sangue para proteínas totais (g/dL) dos animais, por grupo em cada período de sacrifício. Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%53
- Tabela 5.3 - Valores da média e desvio padrão (DP) dos testes bioquímicos de sangue para fosfatase alcalina (U/L) dos animais, por grupo em cada período de sacrifício. Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%55
- Tabela 5.4 - Valores da média e desvio padrão (DP) das mensurações cefalométricas (mm) do crânio dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo. (*) Representa diferença estatística no teste de t de Student entre o lado direito e esquerdo. Nível de significância de 5%57
- Tabela 5.5 - Resultados da Análise de Variância, dois critérios, das mensurações cefalométricas do crânio dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício58
- Tabela 5.6 - Valores da média e desvio padrão (DP) das mensurações cefalométricas (mm) da mandíbula dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo. (*) Representa diferença estatística no teste de t de Student entre o lado direito e esquerdo. Nível de significância de 5%60

- Tabela 5.7 - Resultados da Análise de Variância, dois critérios, das mensurações cefalométricas da mandíbula dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício61
- Tabela 5.8 - Valores da média e desvio padrão (DP) das mensurações cefalométricas, em graus, dos ângulos α e A. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo e letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício. Nível de significância de 5%62
- Tabela 5.9 - Valores da média e desvio padrão (DP) das áreas de cartilagem articular (mm^2). Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....82
- Tabela 5.10 -Médias e desvios padrão (DP) das áreas de neoformação óssea (mm^2). Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.....83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ad libitum</i>	Do latim “à vontade”
ATM	Articulação temporomandibular
BT	Bula timpânica
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO	Monóxido de carbono
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
et al.	<i>Et alii</i> , do latim “e outros”
EUA	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FI	Forame infraorbitário
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina-eosina
II	Inserção do incisivo inferior
LD ₅₀	Dose letal mediana (<i>Lethal Dosis</i> 50%)
LIDO	Laboratório de informática dedicado a odontologia
Ltda	Limitada
MTX	Metotrexato
NY	Nova York
PA	Processo angular
PI´	Ponto incisal inferior
PI	Ponto incisal superior
RNA	Ácido ribonucléico
SP	São Paulo
RPM	Rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

Cm	Centímetros
dL	Decilitros
°C	Graus Celsius
H	Horas
L	Litros
®	Marca registrada
m ²	Metros quadrados
mm ²	Milímetros quadrados
µm	Micrometros
µmols	Micromols
mA	Miliampères
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
nº	Número
Kg	Quilogramas
KV	Quilovolts
%	Por cento
pH	Potencial hidrogeniônica
S	Segundos
UI	Unidades internacionais
x	Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Fratura de côndilo e modelos experimentais.....	24
2.2 MTX e Dexametasona.....	27
3 PROPOSIÇÃO.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Parecer do comitê de ética em pesquisa.....	34
4.2 Seleção e manutenção dos animais.....	34
4.3 Grupos experimentais.....	35
4.4 Procedimento cirúrgico.....	36
4.5 Coleta de sangue e períodos de sacrifício.....	39
4.6 Exame radiográfico.....	39
4.7 Preparo histológico.....	40
4.8 Análise bioquímica do sangue.....	41
4.9 Análise cefalométrica.....	41
4.10 Análise histológica em microscopia óptica.....	44
4.11 Análise histomorfométrica.....	45
4.12 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	48
5.1 Achados macroscópicos.....	48
5.2 Avaliação do peso dos animais.....	48
5.3 Testes bioquímicos de sangue.....	52
5.3.1 Proteínas totais.....	52
5.3.2 Fosfatase alcalina.....	54
5.4 Avaliação cefalométrica.....	56
5.4.1 Crânio.....	56
5.4.2 Mandíbula.....	59
5.4.3 Ângulos α e A.....	61
5.5 Avaliação histológica.....	63
5.5.1 Grupo Controle.....	63
5.5.2 Grupo Dexametasona.....	67

5.5.3 Grupo MTX Baixa dose.....	72
5.5.4 Grupo MTX Alta dose.....	76
5.6 Avaliação histomorfométrica.....	81
5.6.1 Cartilagem articular.....	81
5.6.2 Neoformação óssea.....	83
5.6.3 Tecido cartilaginoso.....	84
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

O Metotrexato (MTX), ácido 4–amino-N10-metilpteroiglutâmico, é uma droga sintética também conhecida como ametofterina (Bleyer, 1978). É um antimetabólito, estruturalmente análogo ao ácido fólico, que interfere na síntese e reparo do DNA, na replicação celular e apresenta propriedades antiinflamatórias (Olsen, 1991; Cronstein, 1996; Martins; Arruda, 2004).

O MTX é utilizado clinicamente no tratamento de neoplasias específicas, doenças autoimunes e gravidez ectópica (Lovechio et al., 2008). Para cada tratamento o diferencial é a dose administrada do medicamento. Altas doses são indicadas para o tratamento oncológico (Delepine et al., 1996; Jaffe; Gorlick, 2008) enquanto a terapia com baixas doses é indicada para o tratamento de doenças crônicas inflamatórias como psoríase e artrite reumatóide (May et al., 1994; Warren et al., 2008).

Os agentes quimioterápicos além de apresentarem mecanismo de ação sobre as células agressoras também têm ação em células normais, sendo que as ativamente proliferativas tais como células da medula óssea, células fetais, das mucosas bucais e intestinais, espermatozônias e células da bexiga urinária são geralmente mais sensíveis às ações farmacológicas do metotrexato (Lovechio et al., 2008). A administração de altas doses de MTX pode causar osteopenia, dor e fratura nos ossos e está relacionada com um aumento da reabsorção óssea (Ragab et al., 1970; Stanisavljevic; Babcock, 1977; Holzer et al., 2003). Em baixas doses, o MTX pode diminuir a formação óssea, devido à diminuição na síntese de matriz óssea por osteoblastos (May et al., 1994; May et al., 1996).

O corticosteróide, dexametasona, é uma droga antiinflamatória, imunossupressora classicamente usada no tratamento de diversas doenças (Pochapski et al., 2009). Segundo Sinigaglia et al. (2008) e McDonough et al. (2008) o uso prolongado desta droga pode resultar em perda óssea, e a osteoporose induzida por corticosteróides é freqüente. Migliaccio et al. (2007) relatou que os corticosteróides prejudicam a homeostase dos osteoblastos e induzem apoptose

simultaneamente em osteoblastos e osteócitos, levando a uma supressão da formação óssea.

O processo condilar está frequentemente envolvido em fraturas de mandíbula (Ellis et al., 1985; Silvennoinen et al., 1992; Thorén et al., 1997; Maladière et al., 2001; Iida et al., 2003; Eckelt et al., 2006). Geralmente estas fraturas ocorrem com desvio medial (Silvennoinen et al., 1992; Joos; Kleinheinz, 1998; Teixeira et al., 2006). O tratamento de fratura de côndilo pode ser cirúrgico ou conservador, sendo o conservador mais favorável no prognóstico de tratamentos de crianças e adolescentes (Joos; Kleinheinz, 1998; Luz; Araújo, 2001; Yücel et al., 2002). Teixeira et al., em 1998, estabeleceu um modelo experimental de fratura de côndilo em ratos que permite a avaliação da reparação da fratura e possíveis alterações na articulação temporo mandibular.

Tendo em vista a utilização do MTX no tratamento sistêmico de pacientes, como agente quimioterápico em neoplasias específicas, em altas doses, e como agente antiinflamatório em doenças como a psoríase e artrite reumatóide, em baixas doses, é importante saber qual o seu efeito, nas diferentes doses, na reparação óssea em uma fratura e em lesão articular para eleição de um tratamento favorável ao paciente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fratura de côndilo e modelos experimentais

A articulação temporomandibular é uma articulação composta, constituída pelo côndilo, o disco articular e o osso temporal. O côndilo é um dos centros de crescimento da face (Koski, 1968), por conta disto a morfologia da articulação temporomandibular se torna um fator de interferência no processo de desenvolvimento do complexo craniofacial.

Fraturas crânio maxilo faciais são comuns sendo que a mandíbula é o osso mais envolvido nessas fraturas e a fratura de côndilo representa entre 17,5% e 52% das fraturas mandibulares (Zachariades et al., 1983; Bochlogyros, 1985; Zachariades; Papavassiliou, 1990; Stylogianni et al., 1991; Silvennoinen et al., 1992; Newman, 1998; Marker et al., 2000; de Riu et al., 2001; Villarreal et al., 2004; Zachariades et al., 2006; Sawazaki et al., 2010). A fratura de côndilo unilateral com desvio medial é freqüente (Silvennoinen et al., 1992; Teixeira et al., 2006).

O tratamento da fratura de côndilo pode ser conservador e cirúrgico (Palmieri et al., 1999; Eckelt et al., 2006), sendo que o conservador tem um prognóstico favorável para crianças e adolescentes (Joos; Kleinheinz, 1998; Luz; Araújo, 2001; Yücel et al., 2002; Teixeira et al., 2006).

Para avaliação histológica da resposta ao trauma na articulação temporomandibular em animais Luz et al., em 1991, utilizaram ratos adultos submetidos ao trauma indireto da articulação temporomandibular no lado direito, sendo o esquerdo como controle e verificaram que apesar do trauma os animais tiveram aumento de peso. Houve fratura na fossa articular e lesões na superfície articular e no disco articular. O remodelamento foi por formação de calo ósseo e após o período de três meses foram observadas estruturas articulares com características de normalidade e sinais de remodelamento ósseo.

Yamamoto et al. (1997) realizaram exodontia unilateral de incisivo superior em ratos jovens e avaliaram cefalometricamente, por incidências axiais e rostro-caudais do crânio e laterais das hemimandíbulas, seus efeitos no crescimento facial. Foi observada assimetria facial apenas na região anterior da maxila com desvio para o lado operado.

Teixeira et al. (1998) estabeleceram um modelo experimental de fratura de côndilo, com desvio medial, em ratos, com utilização de pinça mosquito (*Halstead*) que permite a avaliação do reparo ósseo e das estruturas da articulação temporomandibular. Neste modelo experimental foi possível realizar avaliações histológicas. Foi concluído que o reparo da fratura experimental foi por formação de calo ósseo com reposicionamento do côndilo centralizado na cavidade articular.

Luz e Araújo (2001) utilizaram o modelo experimental de fratura de côndilo para avaliar o desvio mandibular em relação à base do crânio em ratos jovens, sendo verificada uma tendência de desvio da mandíbula para o lado fraturado.

Teixeira et al. (2006) utilizaram o modelo experimental de fratura de côndilo para avaliar alterações esqueléticas em ratos em fase de crescimento e concluíram que a fratura induz mudanças degenerativas no côndilo e causa assimetria mandibular com consequências na maxila.

Rodrigues (2008) utilizou o modelo experimental de fratura de côndilo para avaliação de testes bioquímicos de sangue, proteínas totais, albumina, cálcio sérico, fosfatase alcalina, ferro sérico e creatinina, em ratos saudáveis e desnutridos. O sangue utilizado para realização dos testes bioquímicos foi colhido por punção intracardíaca no momento do sacrifício dos animais, nos períodos de 24 h, Sete, 15, 30 e 90 dias após a realização da fratura condilar. Foi verificado que os valores de proteínas totais mostraram queda nos períodos iniciais, sendo maior a queda no grupo desnutrido. O grupo saudável apresentou picos nos valores de fosfatase alcalina nos períodos de sete e 30 dias. A autora concluiu que os testes de bioquímica do sangue mostraram queda, principalmente nos períodos iniciais, para os valores de proteínas totais e albumina, bem como para cálcio sérico em todos os períodos, significante para o grupo desnutrido.

Moraes et al. (2010) avaliaram experimentalmente a ação do bloqueador de canais de cálcio amlodipina, um anti-hipertensivo, na reparação de fratura mandibular. O grupo experimental recebeu amlodipina e o grupo controle recebeu água. Foram realizadas análises cefalométrica e histológica do defeito ósseo e também bioquímica do sangue para fosfatase alcalina e cálcio. Os níveis de fosfatase alcalina foram maiores no grupo controle nos períodos iniciais de um dia, sete e 14 dias. Os autores concluíram que o uso crônico de amlodipina compromete o processo de reparo de defeito ósseo em mandíbula de ratos, mas não impede a ocorrência da consolidação da fratura.

Rodrigues et al. (2010) utilizaram o modelo experimental para avaliação histológica do reparo da fratura de côndilo em ratos submetidos à desnutrição protéica e concluíram que a desnutrição prejudica a formação do calo ósseo e pode causar anquilose fibrosa na articulação temporomandibular.

Li et al. (2010) utilizaram o modelo experimental para avaliação do papel do disco na reparação de fratura de côndilo, em ratos em fase de crescimento. Foram realizadas fraturas de côndilo com e sem lesão do disco articular em ratos, em fase de crescimento, assim como em ratos adultos. Os animais foram sacrificados três meses após o procedimento cirúrgico e foram realizadas mensurações do desvio mandibular em relação à base do crânio, do peso dos animais e também avaliação histológica. O desvio mandibular foi maior em ratos em fase de crescimento quando o disco articular foi lesado e esta lesão causou um reparo desfavorável na fratura de côndilo. Os autores concluíram que o tratamento conservador em crianças deve ser eleito quando não há lesão no disco articular, do contrário este deve ser eleito com certo critério.

Rodrigues et al. (2011) utilizaram o modelo experimental para avaliar o desvio da linha média mandibular em relação à linha média maxilar, em ratos saudáveis e em ratos submetidos à desnutrição protéica. E pode-se observar que houve desvio da linha média mandibular para o lado fraturado, sendo o desvio maior nos ratos desnutridos. Os resultados do trabalho mostraram que a desnutrição protéica prejudica o reparo da fratura experimental de côndilo em ratos.

Carvalho et al. (2011) avaliaram o efeito da laserterapia no processo inflamatório de articulação temporomandibular de ratos induzida pela carreginina. Foi realizada avaliação histomorfométrica da espessura da membrana sinovial de cortes histológicos coronais, em articulação temporomandibular com inflamação induzida por injeção de carreginina. Os resultados demonstraram que a aplicação de laser na região inflamada apresentou benefícios e alterou a espessura da membrana sinovial e o processo de inflamatório. Os autores concluíram que a laserterapia apresenta resultados positivos na redução do infiltrado inflamatório e na diminuição do número de camadas da membrana sinovial da articulação temporomandibular induzida a processo inflamatório pela injeção de carreginina.

2.2 MTX e Dexametasona

O MTX é um antagonista do ácido fólico que inibe uma série de reações intracelulares dependentes de folato. Ele se liga ao sítio catalítico ativo da enzima diidrofolato redutase impedindo a conversão de hemocisteína a metionina a qual seria responsável pela produção de S-Adenosil-Metionina que promove a metilação de fosfolípidos, proteínas, RNA, DNA entre outras moléculas biologicamente ativas (Cronstein, 1996). Para Cronstein (1996) a metilação de todas essas moléculas biologicamente ativas é importante para manutenção da função e sobrevivência celular, particularmente no sistema imune. Esta droga foi inicialmente desenvolvida para inibição da proliferação de células malignas nos anos de 1940, em estudos realizados em pacientes com leucemia no Hospital das Crianças de Los Angeles (Bleyer, 1978). Com a utilização intermitente e continuada da droga em outros estudos foi possível verificar a propriedade antiinflamatória do fármaco em baixas doses (Chan; Cronstein, 2002).

A dexametasona é um medicamento antiinflamatório esteroide que inibe a ação da fosfolipase A2, que é responsável pela atuação nos fosfolípidos das membranas celulares liberando ácido araquidônico, e sintetiza prostaglandinas e leucotrienos, reduzindo a quimiotaxia de polimorfonucleares (Pochapski et al., 2009). O ácido araquidônico é rapidamente metabolizado em dois diferentes sistemas

enzimáticos: o da ciclooxygenase e o da lipoxigenase, que são responsáveis pela liberação de mediadores da inflamação como prostaglandinas e leucotrienos (Vergne et al., 1998).

May et al. (1994) avaliaram o efeito da baixa dose de MTX no metabolismo ósseo em ratos. A dose do medicamento utilizada foi determinada comparando-se o nível sérico de MTX em pacientes em tratamento para artrite reumatóide ($0,58 \pm 0,20$ μ mols) com o nível sérico de MTX em ratos em seis doses diferentes, sendo que a dose aplicada nos animais que se assemelhou à dose em pacientes foi de 3 mg/Kg ($0,60 \pm 0,20$ μ mols). Esta dose foi aplicada semanalmente, sendo diluída em soro fisiológico em quantidade suficiente para um mL no grupo tratado com MTX e um mL de soro fisiológico foi aplicado semanalmente nos animais do grupo controle. Após o período de 16 semanas os animais foram sacrificados e foi realizada análise histomorfométrica dos fêmures e análise bioquímica de sangue para fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina apresentou valores menores no grupo tratado com MTX. Os autores concluíram que a administração prolongada de baixas doses de MTX causa osteopenia significativa pela supressão da atividade de osteoblastos e estimulação do recrutamento de osteoclastos, o que resulta num aumento da reabsorção óssea.

Como o MTX causou uma osteopenia caracterizada pela diminuição da função osteoblástica sem a diminuição no número de osteoblastos e um aumento da reabsorção óssea, que acreditava-se ser por uma resposta fisiológica de remodelação dos osteoclastos, May et al. (1996) avaliaram o efeito da baixa dose de MTX em cultura de células osteoblásticas e osteoclásticas e concluíram a partir dos resultados obtidos que o MTX causa uma diminuição da função de sintetização e calcificação da matriz óssea pelos osteoblastos e não apresenta interferência na função das células osteoclásticas.

Le Bricon et al. (1995) analisaram o efeito da injeção intraperitoneal de uma dose única quimioterápica de MTX (30 mg/Kg) no metabolismo protéico de ratos saudáveis e ratos portadores de hepatoma. Neste estudo também foi avaliado o peso dos animais nos períodos de dois, quatro e seis dias. Os animais continuaram se alimentando e recuperaram peso, sendo que os animais saudáveis tratados com

MTX tiveram uma recuperação de peso maior que os ratos portadores de tumor. O tratamento quimioterápico foi efetivo contra o hepatoma e a dose foi tolerada. Ambos os grupos apresentaram sinais clínicos de toxicidade como ereção dos pelos, mucosite, diarreia e letargia no período de dois a cinco dias, porém sobreviveram até o final do experimento. Os autores concluíram que, nestas condições, o MTX interfere no metabolismo protéico.

Novaes et al. (1996), avaliaram experimentalmente o efeito do tratamento com MTX em baixa dose nas variáveis da inflamação no fluido sinovial da cavidade articular de joelhos. Os coelhos foram induzidos à artrite e distribuídos em grupos e receberam os seguintes tratamentos: MTX (0,25 mg/Kg), dexametasona (0,15 mg/Kg), indometacina (4 mg/Kg) e solução salina como controle, aplicadas por via intramuscular. Foi então realizada a análise do infiltrado inflamatório do fluido articular. Os tratamentos demonstraram uma redução significativa nos mediadores da inflamação na região analisada. Os autores concluíram que parte da ação antiinflamatória do MTX e da dexametasona se deve ao fato da diminuição do afluxo de leucócitos e do infiltrado inflamatório na membrana sinovial, bem como da concentração de mediadores da inflamação no fluido sinovial de coelhos como a prostaglandina E_2 , tromboxana B_2 e interleucina- 1β .

Vergne et al. (1998) avaliaram o efeito do MTX na síntese de prostaglandina E_2 em cultura de células sinoviais humanas reumatóides. As células sinoviais foram obtidas a partir de tecidos de pacientes com artrite reumatóide que foram submetidos à sinovectomia. As células foram incubadas com diferentes concentrações de MTX. A viabilidade celular não foi afetada pela aplicação do MTX. Os autores concluíram que o MTX causa uma diminuição na liberação de prostaglandina E_2 em cultura de células sinoviais reumatóides humanas.

Mello et al. (2000) avaliaram o efeito do MTX na atividade enzimática das ciclooxigenases. Foi obtido sangue de pacientes saudáveis e tratados com MTX, para realização de testes para quantificação da atividade enzimática da COX-1 e COX-2. Os resultados revelaram que testes, realizados com o sangue dos pacientes tratados com MTX, inibiram preferencialmente a atividade enzimática da COX-2 quando comparados aos resultados do sangue dos pacientes saudáveis. Os autores

concluíram que o efeito antiinflamatório do MTX em baixas doses é parcialmente mediado pela inibição preferencial da atividade enzimática da COX-2.

Fuskevåg et al. (2000) aplicaram MTX por infusão na veia jugular externa para investigar a dose máxima tolerada em um modelo de toxicidade aguda em ratos. Este estudo foi realizado para determinar a dose máxima tolerada de MTX durante o período de 8 h. Os autores afirmaram que muitos protocolos de toxicidade são realizados onde a dose aplicada permite a sobrevivência de 50% dos animais, LD₅₀, sendo que em carcinogênese a dose máxima tolerada é a que permite a sobrevivência de 90% dos animais durante o uso crônico de determinada droga. Foi utilizada neste estudo a tolerância de 90% de sobrevida em um curto período de tempo. Os autores observaram que a dose máxima tolerada de MTX estava entre 3 a 5 g/Kg.

Davies et al. (2002) avaliaram o efeito do MTX e da dexametasona em cultura de células osteoblásticas humanas derivadas de osso infantil. Os resultados demonstraram que o MTX e a dexametasona diminuíram o número de células osteoblásticas em cultura, sem afetar a produção de fosfatase alcalina. Os autores concluíram que estes agentes podem contribuir para a osteopenia no tratamento quimioterápico infantil pela relação direta com o número de células osteoblásticas.

Laurindo et al. (2003) avaliaram o efeito do tratamento com MTX em baixa dose na densidade mineral óssea de coelhos em fase de crescimento. Os coelhos foram distribuídos em três grupos que receberam os seguintes tratamentos: Solução salina, MTX e MTX associado a ácido fólico, aplicados por via intramuscular, semanalmente. Foram realizados exames de densitometria óssea, antes e após o tratamento e análise histomorfométrica da quarta vértebra lombar dos animais. Os resultados de densidade mineral óssea mostraram que houve um aumento, quando comparado antes do tratamento, na concentração média de mineral do grupo tratado com solução salina. Em contraste, não foi observado este aumento no grupo tratado com MTX, enquanto que no grupo tratado com a associação de MTX e ácido fólico também houve um aumento na densidade mineral óssea. A análise histomorfométrica mostrou resultados análogos aos da densidade mineral óssea. Os

autores concluíram que o MTX tem ação deletéria no metabolismo ósseo, a qual é prevenida com a associação de ácido fólico ao tratamento, e que esses dados são particularmente significantes para a terapia pediátrica.

Silva et al. (2006) avaliaram histologicamente o efeito no reparo ósseo do MTX, na dose de 15 mg/Kg, via intraperitoneal, aplicado logo após a condilectomia unilateral de camundongos, com 30 dias de idade, de ambos os gêneros. Os autores concluíram que nestas condições o MTX não interferiu no processo de reparo.

Alves et al. (2007) avaliaram o efeito do tratamento com MTX em carcinossarcoma mandibular induzido em ratos. Foram comparados os tratamentos com MTX, bifosfonato alendronato, associação MTX e alendronato, solução salina (controle positivo) em animais portadores de carcinossarcoma de Walker na mandíbula e solução salina em animais sem tumor (controle negativo). A implantação do tumor foi em alvéolo de terceiro molar inferior logo após procedimento de exodontia. A dose utilizada de MTX foi de 25 mg/m² de superfície corpórea, aplicada semanalmente por via intraperitoneal. Os animais foram acompanhados até o momento da morte espontânea ou até a morte programada no 35º dia. O MTX apresentou significativa atividade antitumoral e os animais tratados com este quimioterápico apresentaram aumento de sobrevida, sendo este de 16 dias no grupo controle positivo e de 23 dias no grupo tratado com MTX. A associação de MTX e alendronato também foi eficiente no tratamento do carcinossarcoma. Os autores concluíram que esta associação é uma alternativa no tratamento de neoplasias malignas dos maxilares com invasão e comprometimento ósseo, pela diminuição do envolvimento ósseo e formação de osteóide.

Carvas (2007) avaliou a influência do MTX (3 mg/Kg/semana) e do ministrado de forma isolada e associado ao ácido folínico ou ao ácido zoledrônico, na osseointegração de implantes de titânio realizados seis semanas após o início da administração das drogas em coelhos, sendo utilizado como controle a aplicação de solução salina semanalmente. Foram realizados exames de densitometria mineral óssea, antes da administração dos medicamentos e após o período de 18 semanas, e histomorfométrico, 12 semanas após a colocação dos implantes. Os resultados demonstraram que os tratamentos com MTX, de forma isolada, associado ao ácido

folínico ou ao ácido zoledrônico, não alteraram os resultados dos exames de densitometria mineral óssea assim como não alteraram os índices de contato osso-implante.

Carvas et al. (2010) avaliou a influência do corticosteróide ministrado de forma isolada ou associado ao ácido zoledrônico, na osseointegração de implantes de titânio realizados seis semanas após o início da administração das drogas em coelhos, sendo utilizado como controle a aplicação de solução salina semanalmente. Foram realizados exames de densitometria mineral óssea, antes da administração dos medicamentos e após o período de 18 semanas, e histomorfométrico, 12 semanas após a colocação dos implantes. Os resultados da densitometria mineral óssea mostraram que o corticosteróide, de forma isolada causou uma perda óssea cortical e quando associado ao ácido zoledrônico essa perda foi revertida. A histomorfometria demonstrou resultados similares aos da densitometria mineral óssea. Os autores concluíram que uma única dose de ácido zoledrônico é capaz de reverter os efeitos negativos dos corticosteróides na osseointegração de implantes de titânio.

Aguiar et al. (2010) avaliou o efeito do MTX na reparação tecidual de um defeito ósseo simulando fratura de mandíbula em ratos. Os ratos foram submetidos a defeito ósseo em mandíbula com utilização de broca multilaminada tronco cônica. Foram comparados os seguintes tratamentos: Dexametasona na dose única de 0,15 mg/Kg e MTX nas doses semanais de 1,6 mg/Kg e de 0,25 mg/Kg. Os períodos de sacrifício foram de um, sete, 15 e 30 dias pós-operatórios. Foram realizadas análises radiográficas, histológicas e histomorfométricas da região da fratura. Os resultados mostraram que o tratamento com MTX na dose maior e com dexametasona afetaram desfavoravelmente o processo de reparo ósseo, apresentando menor preenchimento do defeito ósseo ao final do experimento, de fratura mandibular em ratos.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar a reparação da fratura de côndilo mandibular e a simetria facial em ratos tratados com metotrexato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parecer do comitê de ética em pesquisa

O presente projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa – Subcomissão de Bioética de animais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sob o protocolo 09/2009, o qual aprovou no dia 06 de Abril de 2009 a realização do mesmo (Anexo A).

4.2 Seleção e manutenção dos animais

Para realização deste estudo foram utilizados 100 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos e com média 12 semanas de idade e de 339,75 g de peso corporal, os quais foram obtidos junto ao Centro de Bioterismo da Fundação Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, com água e alimentação, ração granulada para roedores (Labina[®], Agribands Purina, São Paulo, SP, Brasil), *ad libitum*, temperatura ambiente de 25 °C, com exaustão de ar, ventilação, ciclos claro/escuro de 12 horas, sob responsabilidade dos realizadores do estudo.

4.3 Grupos experimentais

Os ratos foram distribuídos em quatro grupos experimentais com 25 espécimes cada.

- **Grupo Controle:** Recebeu soro fisiológico numa dose semanal de um mL, via intraperitoneal, sendo a primeira dose aplicada duas horas antes do procedimento cirúrgico.
- **Grupo Dexametasona:** Recebeu dexametasona (Decadron[®], Prodome Química e farmacêutica Ltda, Campinas, SP, Brasil), numa dose única de 0,15 mg/Kg de peso vivo, via intraperitoneal logo após o procedimento cirúrgico (Novaes et al.,1996) (Figura 4.1 A).
- **Grupo MTX Baixa dose:** Recebeu uma dose (três mg/kg de peso vivo) (May et al., 1994) semanal de metotrexato (Miantrex[®], Laboratórios Pfizer Ltda, Guarulhos, SP, Brasil), diluída em água para injetáveis em quantidade suficiente para um mL, via intraperitoneal, sendo a primeira dose aplicada duas horas antes do procedimento cirúrgico (Figura 4.1 B).
- **Grupo MTX Alta dose:** Recebeu uma dose única de metotrexato (Miantrex[®]) (30 mg/kg de peso vivo) (Le Bricon et al., 1995) diluída em água para injetáveis em quantidade suficiente para um mL, via intraperitoneal, sendo a primeira dose aplicada duas horas antes do procedimento cirúrgico (Figura 4.1 B).

Figura 4.1 - Forma de apresentação dos medicamentos utilizados no estudo. **A:** Grupo Dexametasona (Decadron®). **B:** Grupos MTX Baixa dose e MTX Alta dose (Miantrex®)

4.4 Procedimento cirúrgico

Foi realizada profilaxia antibiótica, 15 minutos antes da anestesia, com a injeção intraperitoneal do antibiótico Benzetacil (Benzetacil®, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) numa dose de 80.000 UI/kg de peso vivo.

A indução anestésica foi realizada por meio da via intraperitoneal, pela injeção de cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hotolândia, SP, Brasil), na dose de 0,8mg/Kg de peso vivo, seguido pela aplicação de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda., Hotolândia, SP, Brasil), na dose de 50mg/Kg de peso vivo.

Após a anestesia, foi realizada tricotomia da do lado direito da face, na região da articulação temporomandibular (Figura 4.2 A), e antissepsia com solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodo a 10%. O campo operatório foi isolado por aposição de campos esterilizados descartáveis. Foram utilizados gorro, máscara, luvas estéreis e roupa cirúrgica limpa. Os instrumentos foram autoclavados previamente ao procedimento cirúrgico.

Foi realizada uma incisão da pele de um cm na região pré-auricular (Figura 4.2 B) utilizando-se lâmina de bisturi nº 15, montada em cabo nº três seguida da incisão do plano muscular e divulsão dos tecidos subjacentes ao osso que foram mantidos afastados (Figura 4.2 C). Foi então realizada a fratura do processo condilar utilizando-se uma pinça mosquito (*Halstead*) (Figura 4.2 D). O processo condilar foi rotacionado medialmente (Figura 4.3), tendo cuidado para não danificar as superfícies articulares. Os planos teciduais superficiais foram suturados em posição utilizando fio de sutura de nylon 5-0 (Ethicon®, Johnson&Johnson, São Paulo, SP, Brasil).

Figura 4.2 - Procedimento cirúrgico. **A.** Tricotomia do lado direito da face. **B.** Incisão pré-auricular da pele. **C.** Incisão do plano muscular e divulsão dos tecidos subjacentes ao osso. **D.** Posicionamento da pinça mosquito (*Halstead*) para fratura de côndilo

Figura 4.3 - Fratura do processo condilar com desvio medial

Após a intervenção cirúrgica, foi administrada medicação analgésica opióide, cloridrato de tramadol (Tramal[®], Laboratório Pfizer Ltda., Guarulhos, SP, Brasil) (Figura 4.4) na dose de 0,3 mg/Kg, por via intraperitoneal, no pós operatório imediato e a cada 12 h, por 48h. A seguir os animais foram alojados em gaiolas adequadas, sendo que a ração foi fragmentada nos primeiros 15 dias. Foi feita a pesagem dos animais antes da aplicação das drogas e no momento do sacrifício, a fim de determinar se houve ganho ou perda de peso nos animais.

Figura 4.4 - Forma de apresentação do analgésico cloridrato de tramadol (Tramal[®])

4.5 Coleta de sangue e períodos de sacrifício

A coleta de três mL de sangue para realização de testes bioquímicos de proteínas totais e fosfatase alcalina foi realizada após anestesia geral dos animais, no momento do sacrifício, nos períodos de um dia, sete, 15, 30 e 90 dias de pós-operatório (cinco ratos de cada grupo em cada período, n=cinco). O sangue foi colhido por punção intracardíaca, utilizando-se seringa hipodérmica tratada com EDTA 10% (pH 7,4) para evitar a coagulação sanguínea.

O sangue coletado foi vertido em tubo vácuo seco que foi submetido a centrifugação (Macro Centrífuga Coleman Mod. 90-1. Coleman Equipamentos para Laboratórios Comércio e Importação Ltda., São Paulo, Brasil) numa velocidade de 3000 RPM num intervalo de 15 min. O soro obtido foi então retirado com uma pipeta, inserido em tubo Eppendorf e estocado a uma temperatura de -sete °C.

Após a coleta de sangue, os ratos, ainda sob efeito da anestesia geral, foram sacrificados por asfixia em câmara de gás monóxido de carbono (CO). As cabeças dos animais foram removidas, mantendo-se os tecidos moles adjacentes e fixadas em formol tamponado a 10% pelo período mínimo de 24 horas.

4.6 Exame radiográfico

A cabeça do animal foi submetida a exame radiográfico, em norma axial, no regime de 56 kV, 10 mA e 0,4 s de exposição com emprego de aparelho de raios X odontológico (Spectro II, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), utilizando filme radiográfico do tipo periapical dental de 3,0 cm x 4,0 cm (Kodak Ektaspeed Plus®, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) posicionado a uma distância de 30 cm do cilindro localizador do aparelho (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Esquema de posicionamento do aparelho de raio X e do filme periapical para tomada radiográfica

4.7 Preparo histológico

As cabeças foram seccionadas ao meio no plano sagital com a utilização de microsserra cirúrgica (Stryker Co., Michigan, EUA). O lado direito (fraturado) foi lavado com água corrente durante 20 minutos e em seguida introduzido em solução de EDTA a 10% (pH 7,4) durante o período de um mês, sendo esta solução trocada semanalmente para descalcificação. As peças descalcificadas foram cortadas longitudinalmente no sentido coronal na região da articulação temporo mandibular, e submetidas ao processamento laboratorial. Cada peça foi lavada em água corrente durante cinco horas, desidratada em soluções de concentração crescente de álcool etílico, diafanizada em xilol e incluída em parafina. Três cortes seriados de cinco μm de espessura foram realizados em micrótomo, corados com hematoxilina-eosina e analisados por meio de microscopia óptica.

4.8 Análise bioquímica do sangue

O soro obtido da coleta de sangue foi submetido a reação com os respectivos kits de reagente e padrão para proteínas totais e fosfatase alcalina (Labtest[®], São Paulo, Brasil), de acordo com as normas estipuladas pelo fabricante. A quantificação da reação foi feita em espectrofotômetro (Coleman, Mod. 35-D, Coleman Equipamentos para Laboratórios Comércio e Importação Ltda., São Paulo, Brasil) previamente calibrado. Um período prévio para calibração das amostras foi necessário. Os valores de referência dos testes bioquímicos de sangue dos animais foram obtidos pelos valores do controle negativo e os relatados por Mitruka e Rawnsley (1977) (Anexo B).

4.9 Análise cefalométrica

As radiografias foram analisadas por cefalometria computadorizada. As imagens foram digitalizadas e os dados foram mensurados pelo *software* Imagelab[®] (Softium Informática, São Paulo, Brasil) no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia (LIDO) da FOU SP.

Das radiografias axiais da cabeça as seguintes distâncias foram medidas bilateralmente no crânio: Do ponto na região anterior da bula timpânica (BT) na base do crânio até o ponto no vértice do forame infraorbitário (FI); E do FI até o ponto da interseção da face palatina dos incisivos superiores com a linha média craniana, no forame incisivo (PI) (Figura 4.6) (Teixeira et al., 2006). E na mandíbula, as seguintes distâncias foram medidas bilateralmente: Do processo angular (PA) até o ponto da interseção da incisal dos incisivos inferiores e a linha média mandibular (PI'); E do PA até o ponto de inserção do incisivo inferior (II) (Figura 4.7).

Figura 4.6 - Pontos cefalométricos para mensuração das distâncias no crânio. BT = Bula timpânica, FI = Forame infraorbitário e PI = Ponto incisal superior

Figura 4.7 - Pontos cefalométricos para mensuração das distâncias na mandíbula. PA = Processo angular, II = Inserção do incisivo e PI' = Ponto incisal inferior

Para quantificar o desvio da linha média entre a maxila e a mandíbula foram mensurados dois ângulos com pontos de referência distintos, o ângulo α e o ângulo A. Foi traçada uma linha a partir do ponto médio da linha traçada entre pontos BT direito e esquerdo até o ponto PI', o ângulo formado no lado direito, foi denominado ângulo α (Figura 4.8) (Luz; Araújo, 2001). Para análise do ângulo A foram traçadas duas retas a partir do ponto médio da linha traçada entre pontos BT direito e esquerdo, sendo uma até o ponto PI e a outra até o ponto PI', o ângulo formado entre essas duas retas foi denominado ângulo A (Figura 4.9) (Rodrigues, 2011).

Figura 4.8 - Pontos cefalométricos para mensuração do ângulo α . BT = Bula timpânica e PI' = Ponto incisal inferior

Figura 4.9 - Pontos cefalométricos para mensuração do ângulo A. BT = Bula timpânica, PI = Ponto incisal superior e PI' = Ponto incisal inferior

4.10 Análise histológica em microscopia óptica

As amostras histológicas foram analisadas em microscópio óptico e foram relatados descritivamente dados como remodelação óssea da região, neoformação e reabsorção óssea, linha de fratura e viabilidade do coto da fratura, presença de osteoblastos e osteoclastos, intensidade e tipo de reação inflamatória, hemorragia, presença de tecido conjuntivo e cartilaginoso e condição das estruturas da articulação temporomandibular.

4.11 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, foi utilizado um sistema de captação de imagens que consiste de uma câmera acoplada a um microscópio óptico com objetiva para aumento de 40x que faz a transferência das imagens ao monitor Sony Triniton (Sony Co., Japão) do microcomputador IBM-PC (International Business Machines Corporation, EUA). As imagens obtidas foram então transferidas e analisadas, por um avaliador cego, no *software* Imagelab[®]. Para cada animal foram analisadas três lâminas histológicas seriadas. Foi realizada mensuração da área da cartilagem articular em todos os períodos. Nos períodos de sete, 15 e 30 dias foi realizada mensuração da área de osso neoformado nas bordas dos cotos da fratura ou na formação do calo ósseo (Figura 4.10). Foi realizada mensuração da área de tecido cartilaginoso presente na formação do calo ósseo apenas no período de 15 dias, pois nos períodos de sete e 30 dias apenas alguns espécimes apresentavam este tecido.

Figura 4.10 - Imagem da tela do *software* Imagelab[®]. **A:** Imagem inicial. **B:** Imagem inicial. **C:** Após utilização de ferramenta para mensuração da área de neoformação óssea em mm². **D:** Após utilização de ferramenta para mensuração da área de cartilagem articular em mm²

4.12 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa BioEstat 5.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT – CNPq, Belém, Pará, Brasil).

Os dados quantitativos da taxa de ganho ou perda de peso dos animais (Peso final menos peso inicial) foram submetidos a Análise de variância, um critério, para verificação da significância da diferença entre os períodos de sacrifício dentro de um mesmo grupo, sendo estas identificadas pelo teste de Tukey. E a Análise de Variância, dois critérios para a verificação da significância da diferença entre os grupos, também identificadas pelo teste de Tukey.

Os dados quantitativos da análise bioquímica de proteínas totais e de fosfatase alcalina foram submetidos a Análise de variância, um critério, para verificação da significância da diferença entre os períodos de sacrifício dentro de um mesmo grupo, sendo estas identificadas pelo teste de Tukey. E a Análise de Variância, dois critérios para a verificação da significância da diferença entre os grupos, também identificadas pelo teste de Tukey.

Os dados quantitativos da análise cefalométrica para as distâncias no crânio BT-FI e FI-PI e na mandíbula PA-II e PA-PI' foram submetidos ao teste "t" de Student para verificação da significância da diferença entre os lados direito e esquerdo dentro de cada grupo, em cada período de sacrifício. Também foram realizados os testes Análise de variância, um critério, para verificação da significância da diferença entre os períodos de sacrifício dentro de um mesmo grupo, sendo estas identificadas pelo teste de Tukey. E a Análise de Variância, dois critérios para a verificação da significância da diferença entre os grupos, também identificadas pelo teste de Tukey.

Os dados quantitativos da análise histomorfométrica para área de cartilagem articular foram submetidos ao teste de Análise de Variância, um critério, para verificação da significância da diferença entre os períodos de sacrifício dentro de um mesmo grupo e a Análise de Variância, dois critérios, para verificação da

significância da diferença entre os grupos sendo estas identificadas pelo teste de Tukey. Para área de neoformação óssea nos períodos de sete, 15 e 30 dias foram submetidos ao teste de Análise de Variância, um critério, para verificação da significância da diferença entre os períodos de sacrifício dentro de um mesmo grupo e a Análise de Variância, dois critérios, para verificação da significância da diferença entre os grupos sendo estas identificadas pelo teste de Tukey. Para área de cartilagem presente na formação do calo ósseo no período de 15 dias foi realizado o teste de Análise de Variância, dois critérios, para verificação da significância da diferença entre os grupos.

5 RESULTADOS

5.1 Achados macroscópicos

Os animais continuaram se alimentando e consumindo água. No período de sete dias os animais apresentavam um desgaste oblíquo na face incisal dos incisivos superiores, mais acentuado do lado direito. Os animais do grupo MTX Alta dose apresentaram sinais clínicos de toxicidade como ereção dos pêlos, diarreia, letargia e mucosite, sendo que no período de 90 dias alguns animais não apresentaram desgaste incisal e o crescimento dental contínuo fez com que o dente tivesse uma grande projeção extra-oral.

5.2 Avaliação do peso dos animais

Os valores da média do peso em g dos animais no momento do procedimento cirúrgico e de sacrifício dos respectivos grupos e períodos experimentais são observados nos gráficos 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4.

Na média de peso dos animais do grupo Controle observou-se uma perda de peso nos períodos de um dia e sete dias e um aumento nos períodos de 15, 30 e 90 dias (Gráfico 5.1).

Gráfico 5.1 - Média de peso (g) dos animais do grupo controle no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais

Nos animais tratados com dexametasona foi possível observar uma perda na média de peso dos animais apenas no período de um dia (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.2 - Média de peso (g) dos animais do grupo tratado com dexametasona no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais

Nos animais tratados com metotrexato no regime de baixa dose houve uma perda de peso nos períodos de um dia e sete dias e aumento nos períodos de 15, 30 e 90 dias (Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3 - Média do peso (g) dos animais do grupo tratado com metotrexato baixa dose no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais

Nos animais tratados com metotrexato em alta dose houve perda de peso nos períodos de um dia, sete e 15 dias e aumento nos períodos de 30 e 90 dias (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 - Média do peso (g) dos animais do grupo tratado com metotrexato alta dose no momento da fratura e no sacrifício, segundo os períodos experimentais

Foram obtidas as taxas de ganho ou perda de peso dos animais, subtraindo o valor do peso inicial, pré-cirúrgico, do valor final, no momento do sacrifício. Destes dados foram obtidas as médias e desvios padrão segundo cada período experimental de cada grupo e estes dados foram submetidos à análise estatística, ao nível de significância de 5% (Tabela 5.1, gráfico 5.5).

A Análise de Variância, um critério, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício nos grupos Controle ($p<0,001$), Dexametasona ($p<0,001$) e MTX Baixa dose ($p<0,001$), não sendo significativa no grupo MTX Alta dose ($p=0,249$). Os períodos de sacrifício que se diferenciaram entre si, em cada grupo, foram identificados pelo teste de Tukey sendo representados por letras maiúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.1. Estes resultados demonstraram que houve uma recuperação de peso significativa dos animais dos grupos Controle, Dexametasona e MTX baixa dose e que essa recuperação de peso não foi significativa para os animais do grupo MTX Alta dose.

Tabela 5.1 - Médias e desvios padrão da taxa de ganho ou perda de peso dos animais (g). Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Período de sacrifício	Grupos							
	Controle		Dexametasona		Metotrexato Baixa dose		Metotrexato Alta dose	
	Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP	
Um dia	-11,4±11,0	B	-27,8±3,0	C	-8,4±10,2	B	-21,4±8,8	
Sete dias	-12±67,5	B	29,6±20,6	B	-8,8±15,9	B	-47,4±19,8	
15 dias	26,6±9,5	B	15±17,8	B	16±18,4	B	-33±70,7	
30 dias	27,8±40,8	B	33,6±32,2	B	23,6±98,1	B	40,2±46,2	
90 dias	139±73,4	A	174,8±20,0	A	161,6±40,9	A	37,4±144,7	

A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos nos períodos de um dia ($p=0,012$) e 90 dias ($p=0,027$) não sendo significativa nos períodos de sete dias ($p=0,082$), 15 dias ($p=0,074$) e 30 dias ($p=0,970$). Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, também foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados no gráfico 5.5. Os animais do grupo Dexametasona apresentaram a perda de peso mais acentuada no período de sacrifício de um dia e a recuperação de peso foi menor nos animais do grupo MTX Alta dose no período de sacrifício de 90 dias.

Gráfico 5.5 - Média da taxa de ganho ou perda de peso (em g) segundo os períodos experimentais. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

5.3 Testes bioquímicos de sangue

Foram obtidas as médias e os desvios padrão dos testes bioquímicos de sangue, para proteínas totais (em g/dL) e fosfatase alcalina (em U/L), dos animais segundo cada período experimental de cada grupo e estes dados foram submetidos à análise estatística, ao nível de significância de 5%.

5.3.1 Proteínas totais

Para os valores de proteínas totais a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística entre os períodos de sacrifício do grupo Controle ($p < 0,001$) e do grupo Dexametasona ($p < 0,001$) e que dos grupos MTX Baixa dose ($p = 0,548$) e MTX Alta dose ($p = 0,356$) a diferença entre os períodos não foi estatisticamente significativa. Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada

grupo, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras maiúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Valores da média e desvio padrão (DP) dos testes bioquímicos de sangue para proteínas totais (g/dL) dos animais, por grupo em cada período de sacrifício. Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Período de sacrifício	Grupos			
	Controle Média ± DP	Dexametasona Média ± DP	MTX Baixa dose Média ± DP	MTX Alta dose Média ± DP
Um dia	4,02±1,18 B	3,05±0,32 C	6,86±0,65	5,85±0,13
Sete dias	5,73±0,59 A	4,94±0,43 B	6,09±0,50	5,08±0,75
15 dias	5,97±0,78 A	5,82±0,31 A	5,64±1,15	4,96±0,80
30 dias	6,18±0,18 A	5,74±0,23 AB	5,80±1,20	5,37±0,27
90 dias	6,07±0,25 A	5,69±0,79 AB	5,70±1,76	5,56±1,22

A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos, nos períodos iniciais de um dia ($p<0,001$) e sete dias ($p=0,007$), não sendo significativa nos períodos de 15 dias ($p=0,290$), 30 dias ($p=0,282$) e 90 dias ($p=0,843$). Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados no gráfico 5.6.

Gráfico 5.6 - Valores da média de proteínas totais (g/dL) dos animais dos animais por grupo em cada período experimental. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

5.3.2 Fosfatase alcalina

Para os valores de fosfatase alcalina a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística entre os períodos de sacrifício dos grupos Controle ($p < 0,001$), Dexametasona ($p < 0,001$) e MTX Baixa dose ($p = 0,002$) e que no grupo MTX Alta dose ($p = 0,064$) a diferença entre os períodos não foi estatisticamente significativa. Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada grupo, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras maiúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Valores da média e desvio padrão (DP) dos testes bioquímicos de sangue para fosfatase alcalina (U/L) dos animais, por grupo em cada período de sacrifício. Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Período de sacrifício	Grupos			
	Controle Média ± DP	Dexametasona Média ± DP	MTX Baixa dose Média ± DP	MTX Alta dose Média ± DP
Um dia	14,50±5,29 C	28,68±13,73 B	39,09±13,61 AB	25,50±9,54
Sete dias	68,16±6,64 B	35,05±5,34 B	43,04±10,08 A	30,34±9,36
15 dias	28,51±5,85 C	84,27±14,45 A	21,18±5,12 B	34,90±8,93
30 dias	88,86±9,02 A	43,32±15,78 B	29,12±4,96 AB	18,16±4,24
90 dias	24,16±9,60 C	30,48±2,39 B	27,51±7,68 B	35,62±18,26

A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos nos períodos de sete dias ($p<0,001$), 15 dias ($p<0,001$) e 30 dias ($p<0,001$), não sendo significativa nos períodos de um dia ($p=0,090$) e 90 dias ($p=0,535$). Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados no gráfico 5.7.

Gráfico 5.7 - Valores da média de fosfatase alcalina (U/L) dos animais por grupo em cada período experimental. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

5.4 Avaliação cefalométrica

5.4.1 Crânio

Os valores da média das mensurações, no crânio, dos pontos BT-FI e FI-PI, dos lados direito e esquerdo, de cada grupo experimental, em cada período de sacrifício e os dados da análise estatística, ao nível de significância de 5%, estão apresentados na tabela 5.4 e 5.5.

Para as medidas da distância BT-FI o teste t de Student demonstrou diferença estatística significativa entre o lado direito e esquerdo apenas no grupo Dexametasona, no período de 30 dias ($p=0,042$), sendo representado por * na tabela 5.4.

Para avaliação dos resultados do lado esquerdo a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística entre os períodos de sacrifício em todos os grupos ($p<0,005$), já no lado direito houve diferença entre os períodos de sacrifício nos grupos Controle ($p<0,001$), MTX baixa dose ($p=0,015$) e MTX Alta dose ($p<0,001$), sendo que essa diferença não foi significativa no grupo Dexametasona ($p=0,355$). Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada grupo, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.4.

Para as medidas da distância FI-PI o teste t de Student demonstrou diferença estatística significativa entre o lado direito e esquerdo apenas no grupo Controle, no período de 90 dias ($p=0,025$), sendo representado por * na tabela 5.4.

Para avaliação dos resultados do lado esquerdo a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística entre os períodos de sacrifício no grupo Controle ($p=0,014$), não sendo significativa a diferença entre os períodos nos grupos Dexametasona ($p=0,190$), MTX Baixa dose ($p=0,337$) e MTX Alta dose ($p=0,371$). Já no lado direito houve diferença entre os períodos de sacrifício apenas

no grupo MTX Alta dose ($p=0,013$), sendo que essa diferença não foi significativa nos grupos Controle ($p=0,527$), Dexametasona ($p=0,129$) e MTX Baixa dose ($p=0,521$). Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada grupo foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Valores da média e desvio padrão (DP) das mensurações cefalométricas (mm) do crânio dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo. (*) Representa diferença estatística no teste de t de Student entre o lado direito e esquerdo, células em cinza. Nível de significância de 5%

Grupo		BT – FI		FI – PI	
Período de sacrifício		Lado esquerdo	Lado direito	Lado esquerdo	Lado direito
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
Controle					
Um dia		24,16±0,78 b	24,09±0,37 b	8,75±0,39 ab	8,78±0,29
Sete dias		24,02±0,54 b	24,05±0,67 b	8,45±0,84 b	8,47±0,80
15 dias		24,80±0,49 ab	24,68±0,47 b	9,52±0,32 a	8,96±0,52
30 dias		23,92±0,76 b	24,02±0,82 b	8,85±0,20 ab	8,31±0,60
90 dias		26,04±1,17 a	26,24±1,10 a	9,32±0,43 ab	8,52±0,70 *
Dexametasona					
1 dia		23,05±0,99 b	23,60±1,29	8,99±1,08	8,8±1,3
7 dias		24,52±0,76 ab	25,84±3,60	8,39±0,96	8,16±1,10
15 dias		24,67±0,84 ab	25,78±3,12	8,54±0,75	8,30±0,79
30 dias		24,37±1,46 ab	23,99±1,50 *	7,71±1,62	7,62±1,33
90 dias		25,96±0,81 a	25,89±0,68	9,77±1,83	9,55±1,13
MTX Baixa dose					
1 dia		24,19±0,62 b	24,29±0,85 b	8,62±0,37	8,59±0,31
7 dias		23,95±0,92 b	24,18±0,74 b	7,90±0,28	7,71±0,66
15 dias		24,53±0,48 b	24,38±0,25 ab	8,67±0,64	8,57±0,82
30 dias		24,84±0,83 ab	24,38±1,22 b	8,93±1,43	8,54±1,78
90 dias		25,91±0,31 a	25,91±0,66 a	8,48±0,60	8,14±0,24
MTX Alta dose					
1 dia		22,31±0,23 c	22,33±0,27 c	8,68±0,47	8,56±0,62 ab
7 dias		22,50±0,51 bc	22,56±0,62 bc	8,09±0,93	8,03±0,76 ab
15 dias		22,82±0,54 bc	22,91±0,50 bc	7,06±1,82	7,08±1,55 b
30 dias		25,33±3,05 ab	24,54±1,93 ab	7,97±0,63	8,39±0,83 ab
90 dias		26,47±1,15 a	26,43±1,22 a	8,99±2,74	9,56±0,87 a

Para as medidas da distância BT-FI a Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística, no lado esquerdo, significativa entre os grupos nos períodos de um dia, sete e 15 dias, não sendo significativa nos períodos de 30 e 90 dias, e no lado direito houve diferença significativa entre os grupos no período de um dia, e insignificante nos períodos de sete, 15, 30 e 90 dias. Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.5.

Para as medidas da distância FI-PI a Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos, no lado esquerdo, no período de 15 dias, não sendo significativa nos períodos de um dia, sete, 30 e 90 dias, e no lado direito essa diferença significativa ocorre nos períodos de 15 e 90 dias, sendo insignificante nos períodos de um dia, sete e 30 dias. Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Resultados da Análise de Variância, dois critérios, das mensurações cefalométricas do crânio dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício

Distância	Lado	Período de sacrifício	<i>p</i>	Grupo / Teste de Tukey			
				Controle	DEX	MTX Baixa dose	MTX Alta dose
BT-FI	Esquerdo	Um dia	0.005	a	ab	a	b
		Sete dias	0.004	a	a	a	b
		15 dias	0.001	a	a	a	b
		30 dias	0.559	-	-	-	-
		90 dias	0.714	-	-	-	-
BT-FI	Direito	Um dia	0.010	a	ab	a	b
		Sete dias	0.154	-	-	-	-
		15 dias	0.078	-	-	-	-
		30 dias	0.884	-	-	-	-
		90 dias	0.744	-	-	-	-
FI-PI	Esquerdo	Um dia	0.837	-	-	-	-
		Sete dias	0.512	-	-	-	-
		15 dias	0.021	a	ab	ab	b
		30 dias	0.320	-	-	-	-
		90 dias	0.653	-	-	-	-
FI-PI	Direito	Um dia	0.929	-	-	-	-
		Sete dias	0.513	-	-	-	-
		15 dias	0.041	a	ab	ab	b
		30 dias	0.636	-	-	-	-
		90 dias	0.489	-	-	-	-

5.4.2 Mandíbula

Os valores da média das mensurações, na mandíbula, dos pontos PA-II e PA-PI', dos lados direito e esquerdo, de cada grupo experimental, em cada período de sacrifício e os dados da análise estatística, ao nível de significância de 5%, estão apresentados na tabela 5.6 e 5.7.

Para as medidas da distância PA-II o teste t de Student não demonstrou diferença estatística significativa entre o lado direito e esquerdo.

Para avaliação dos resultados do lado esquerdo a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício nos grupos Controle e Dexametasona ($p<0,010$), não sendo significativa nos grupos MTX Baixa dose ($p=0,087$) e MTX Alta dose ($p=0,683$). No lado direito também houve diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício nos grupos Controle e Dexametasona ($p<0,013$), sendo que essa diferença não foi significativa nos grupos MTX Baixa dose ($p=0,508$) e MTX Alta dose ($p=0,285$). Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada grupo, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.6.

Para as medidas da distância PA-PI' o teste t de Student demonstrou diferença estatística significativa entre o lado direito e esquerdo no grupo Dexametasona, nos períodos de sete ($p=0,034$) e 15 dias ($p=0,015$) e no grupo MTX Alta dose no período de sete dias ($p=0,038$), sendo representado por * na tabela 5.6.

Para avaliação dos resultados do lado esquerdo a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística entre os períodos de sacrifício em todos os grupos ($p<0,010$), assim como no lado direito ($p<0,012$). Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada grupo foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Valores da média e desvio padrão (DP) das mensurações cefalométricas (mm) da mandíbula dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo. (*) Representa diferença estatística no teste de t de Student entre o lado direito e esquerdo, células em cinza. Nível de significância de 5%

Grupo	Período de sacrifício	PA – II		PA – PI'	
		Lado esquerdo Média ± DP	Lado direito Média ± DP	Lado esquerdo Média ± DP	Lado direito Média ± DP
Controle					
	1 dia	24,92±1,07 b	25,75±0,40 b	33,87±0,90 c	34,83±1,01 b
	7 dias	25,66±1,17 ab	25,92±1,22 ab	34,25±1,37 bc	34,53±1,29 b
	15 dias	27,54±0,80 ab	26,82±0,90 ab	36,17±0,92 ab	35,86±0,67 ab
	30 dias	25,57±1,24 b	25,13±1,05 b	34,56±1,38 b	34,16±1,17 b
	90 dias	28,40±2,54 a	27,78±1,26 a	37,24±1,22 a	37,49±1,12 a
Dexametasona					
	1 dia	24,91±1,59 b	25,13±1,32 b	33,47±2,21 	34,29±1,76 b
	7 dias	27,10±1,48 ab	26,83±1,53 ab	35,78±1,38 ab	36,09±1,21 ab *
	15 dias	26,00±0,57 ab	25,94±0,91 	34,93±0,80 ab	35,36±0,93 ab *
	30 dias	24,89±1,38 b	24,83±1,72 b	33,40±2,27 b	33,29±2,21 b
	90 dias	27,77±1,55 a	27,63±0,43 a	37,33±0,96 a	37,45±0,82 a
MTX Baixa dose					
	1 dia	25,39±1,89	26,03±1,12	34,26±1,70 b	34,69±1,26 b
	7 dias	25,95±0,91	25,66±1,19	34,81±0,99 b	35,14±1,10 ab
	15 dias	26,06±0,88	26,21±0,78	35,07±0,69 ab	35,18±0,20 ab
	30 dias	25,90±0,69	25,81±1,45	35,35±0,69 ab	35,25±1,00 ab
	90 dias	27,38±0,41	26,81±0,63	36,93±0,57 a	36,85±0,53 a
MTX Alta dose					
	1 dia	25,58±2,44	24,95±1,15	32,10±1,10 b	32,66±0,59 b
	7 dias	24,62±0,71	25,00±0,68	33,30±0,43 b	33,60±0,23 ab *
	15 dias	26,10±4,53	26,25±3,98	31,93±3,75 b	31,93±3,99 b
	30 dias	25,71±1,68	25,57±1,71	35,12±1,83 ab	34,80±2,25 ab
	90 dias	27,02±1,74	27,62±1,43	37,44±1,17 a	37,33±2,07 a

Para as medidas da distância PA-II a Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística, no lado esquerdo, significativa entre os grupos no período de sete dias, não sendo significativa nos períodos de um dia, 15, 30 e 90 dias, e no lado direito não houve diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum período. Os grupos que se diferenciaram entre si, no período de sete dias, no lado esquerdo, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.7.

Para as medidas da distância PA-PI' a Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos, no lado esquerdo, no período de sete e 15 dias, não sendo significativa nos períodos de um dia, 30 e 90 dias, e no lado direito essa diferença significativa ocorre nos períodos de sete e 15 dias, sendo insignificante nos períodos de um dia, 30 e 90 dias. Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, foram identificados pelo teste de

Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Resultados da Análise de Variância, dois critérios, das mensurações cefalométricas da mandíbula dos animais, dos lados direito e esquerdo, por grupo em cada período de sacrifício. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício

Distância	Lado	Período de sacrifício	<i>p</i>	Grupo / Teste de Tukey			
				Controle	DEX	MTX Baixa dose	MTX Alta dose
PA – II	Esquerdo	Um dia	0.933	-	-	-	-
		Sete dias	0.026	ab	a	ab	b
		15 dias	0.700	-	-	-	-
		30 dias	0.519	-	-	-	-
		90 dias	0.650	-	-	-	-
PA – II	Direito	Um dia	0.338	-	-	-	-
		Sete dias	0.060	-	-	-	-
		15 dias	0.925	-	-	-	-
		30 dias	0.382	-	-	-	-
		90 dias	0.525	-	-	-	-
PA – PI'	Esquerdo	Um dia	0.208	-	-	-	-
		Sete dias	0.004	ab	a	ab	b
		15 dias	0.022	a	ab	ab	b
		30 dias	0.363	-	-	-	-
		90 dias	0.823	-	-	-	-
PA – PI'	Direito	Um dia	0.051	-	-	-	-
		Sete dias	0.001	bc	a	ab	c
		15 dias	0.035	a	ab	ab	b
		30 dias	0.380	-	-	-	-
		90 dias	0.831	-	-	-	-

5.4.3 Ângulos α e A

Os valores da média das mensurações dos ângulos α e A de cada grupo experimental, em cada período de sacrifício e os dados da análise estatística, ao nível de significância de 5%, estão apresentados na tabela 5.8.

Para as medidas do ângulo α a Análise de Variância, um critério, demonstrou que houve diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício no grupo MTX Alta dose ($p=0,010$), não sendo significativa nos grupos Controle ($p=0,560$), Dexametasona ($p=0,923$) e MTX Baixa dose ($p=0,654$). Os períodos que se diferenciaram entre si, no grupo MTX Alta dose foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados na

tabela 5.8. A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum período.

Para as medidas do ângulo A a Análise de Variância, um critério, demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício em nenhum grupo. A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos no período de um dia ($p=0,015$), não sendo significativa nos períodos de sete ($p=0,784$), 15 ($p=0,411$), 30 ($p=0,523$) e 90 ($p=0,313$) dias. Os grupos que se diferenciaram entre si, no período de um dia, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras maiúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Valores da média e desvio padrão (DP) das mensurações cefalométricas, em graus, dos ângulos α e A. Pelo teste de Tukey letras minúsculas diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício no mesmo grupo e letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício. Nível de significância de 5%

Grupo	Período de sacrifício	Ângulo α Média $\pm$ DP	Ângulo A Média $\pm$ DP
Controle			
	Um dia	89,38 $\pm$ 1,79	0,82 $\pm$ 0,64 AB
	Sete dias	89,66 $\pm$ 1,41	0,56 $\pm$ 0,39
	15 dias	87,92 $\pm$ 1,84	0,62 $\pm$ 0,39
	30 dias	88,21 $\pm$ 1,79	0,45 $\pm$ 0,19
	90 dias	88,57 $\pm$ 1,56	0,54 $\pm$ 0,52
Dexametasona			
	Um dia	89,22 $\pm$ 2,25	0,40 $\pm$ 0,23 B
	Sete dias	89,00 $\pm$ 1,32	0,83 $\pm$ 0,66
	15 dias	88,43 $\pm$ 1,59	0,56 $\pm$ 0,43
	30 dias	88,48 $\pm$ 1,01	1,34 $\pm$ 1,08
	90 dias	88,16 $\pm$ 3,38	0,52 $\pm$ 0,50
MTX Baixa dose			
	Um dia	89,34 $\pm$ 1,81	0,75 $\pm$ 0,40 AB
	Sete dias	88,35 $\pm$ 2,24	0,53 $\pm$ 0,44
	15 dias	88,01 $\pm$ 0,74	0,81 $\pm$ 0,84
	30 dias	88,49 $\pm$ 1,55	0,75 $\pm$ 0,64
	90 dias	87,59 $\pm$ 2,38	0,41 $\pm$ 0,45
MTX Alta dose			
	Um dia	91,50 $\pm$ 1,33 a	1,75 $\pm$ 0,84 A
	Sete dias	89,08 $\pm$ 0,97 ab	0,58 $\pm$ 0,41
	15 dias	87,18 $\pm$ 1,42 b	1,45 $\pm$ 1,49
	30 dias	87,93 $\pm$ 1,95 b	1,04 $\pm$ 1,45
	90 dias	87,68 $\pm$ 2,91 b	3,14 $\pm$ 5,22

5.5 Avaliação histológica

5.5.1 Grupo Controle

Período Um dia

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de exsudato fibrino hemorrágico entre os cotos da fratura que se apresentavam vitais, com osteócitos nas lacunas ósseas. Exsudato neutrofílico presente na região de inserção do disco articular, bem como entre as fibras musculares foi verificado (Figura 5.1). Além disso, em um espécime foi possível notar a presença de fratura telescópica com cavalgamento dos cotos fraturados.

Período Sete dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de pouco exsudato inflamatório, entretanto ainda era possível a visualização de células inflamatórias no tecido muscular. Células gigantes multinucleadas em lacunas de reabsorção óssea nos cotos da fratura, que se apresentavam desvitalizados, foram observadas, assim como neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. Havia presença de tecido cartilaginoso indicando início de formação de calo ósseo. Foi verificada presença de tecido de granulação exuberante num misto de fibras e células da inflamação crônica na região da fratura. Foi possível observar aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular e a membrana sinovial apresentava vilosidades. (Figura 5.2). Presença de fragmento ósseo, desvitalizado, envolvido por tecido de granulação foi observado em um espécime.

Período 15 dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de tecido de granulação na região da fratura, sem invasão do tecido muscular. Os cotos da fratura apresentavam tecido ósseo desvitalizado com áreas de neoformação óssea e intensa atividade osteoblástica, bem como apresentavam lacunas de reabsorção óssea com presença de células gigantes multinucleadas. Havia presença de tecido cartilaginoso no traço da fratura indicando a organização de calo ósseo (Figura 5.3).

Período 30 dias

Disco articular acompanhava o côndilo que se apresentava novamente em sua posição normal, centralizado na cavidade articular. Havia presença de calo ósseo consolidado com poucos remanescentes de tecido cartilaginoso em seu interior, bem como início de remodelação óssea. Foi possível observar formação de medula hematopoiética na região da fratura (Figura 5.4).

Período 90 dias

Foi possível visualizar o côndilo bem posicionado com disco articular interposto e camadas da fibrocartilagem organizadas. Notou-se ausência de sinal de calo ósseo, apenas um espessamento na região onde se encontrava a fratura. A continuidade da medula hematopoiética foi recuperada. As fibras musculares estavam novamente inseridas e organizadas (Figura 5.5).

Figura 5.1 - Grupo Controle. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Exsudato fibrino hemorrágico e coto da fratura viável, com exsudato inflamatório no tecido muscular. 100x. **C:** Disco articular preservado acompanha o côndilo 100x. H&E

Figura 5.2 - Grupo Controle. Sete dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. 100x. **C:** Maior espessura da zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. H&E

Figura 5.3 - Grupo Controle. 15 dias. **A:** Local da fratura com organização do calo ósseo. 25x. **B:** Coto da fratura desvitalizado, tecido cartilaginoso entre os cotos. 100x. H&E

Figura 5.4 - Grupo Controle. 30 dias. **A:** Côndilo reposicionado na cavidade articular. 25x. **B:** Calo ósseo maduro, presença de medula hematopoiética na região da fratura. 100x. **C:** Disco articular interposto junto ao côndilo. 100x. H&E

Figura 5.5 - Grupo Controle. 90 dias. **A:** Região subcondilar, com sinais de remodelação óssea, reorganização das fibras musculares. 100x. **B:** Côndilo bem posicionado, camadas da fibrocartilagem organizadas, disco articular interposto. 100x. H&E

5.5.2 Grupo Dexametasona

Período Um dia

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de intenso exsudato inflamatório e vasos congestionados na região da fratura. Exsudato neutrofílico presente na região de inserção do disco articular, bem como entre as fibras musculares foi verificado. Os cotos da fratura apresentavam-se vitais com osteócitos nas lacunas ósseas (Figura 5.6). Além disso, em um espécime foi possível notar a presença de fragmento ósseo parcialmente vital entre os cotos da fratura. Em um espécime a fratura foi telescópica com cavalgamento dos cotos fraturados.

Período Sete dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença moderada de infiltrado inflamatório entre os cotos da fratura, e pouca quantidade de células inflamatórias no tecido muscular. Células gigantes multinucleadas em lacunas de reabsorção óssea nos cotos da fratura, que se apresentavam desvitalizados, foram observadas, assim como neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. Foi verificada presença de tecido de granulação exuberante num misto de fibras e células da inflamação crônica na região da fratura. Foi possível observar aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular, bem como hipertrofia na membrana sinovial (Figura 5.7). Presença de fragmento ósseo, desvitalizado, envolvido por tecido de granulação foi observado em um espécime.

Período 15 dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de tecido de granulação na região da fratura sem invasão do tecido muscular. Os cotos da fratura apresentavam tecido ósseo desvitalizado com áreas de neoformação óssea, intensa atividade osteoblástica e lacunas de reabsorção óssea com presença de células gigantes multinucleadas. Havia presença de tecido cartilaginoso no traço da fratura indicando organização do calo ósseo (Figura 5.8). Em um espécime foi possível visualizar presença de fragmento ósseo desvitalizado envolvido por grande quantidade de tecido de granulação. Em um espécime a fratura foi telescópica com cavalgamento dos cotos da fratura, sendo que estes cotos foram unidos por neoformação óssea.

Período 30 dias

O disco articular acompanhava o côndilo que se apresentava novamente em sua posição normal, centralizado na cavidade articular. Havia presença de calo ósseo consolidado com poucos remanescentes de tecido cartilaginoso em seu interior. Foi possível observar sinais de medula hematopoiética na região da fratura (Figura 5.9).

Período 90 dias

Foi possível visualizar o côndilo bem posicionado com disco articular interposto, bem como um aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular. Havia apenas espessamento ósseo remodelado na região onde se encontrava a fratura (Figura 5.10). Em apenas um espécime foi possível visualizar presença de necrose com reabsorção condilar e fibrose na articulação temporomandibular.

Figura 5.6 - Grupo Dexametasona. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Coto da fratura vitalizado e intenso exsudato fibrino hemorrágico. 100x. **C:** Disco articular preservado acompanha o côndilo. 100x. H&E

Figura 5.7 - Grupo Dexametasona. Sete dias. **A:** Disco articular acompanha o côndilo. Aumento da zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. **B:** Coto da fratura com presença de células gigantes multinucleadas em lacunas de reabsorção e tecido de granulação. 100x. **C:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. 100x. H&E

Figura 5.8 - Grupo Dexametasona. 15 dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 15 dias. 25x. **B:** Áreas focais de tecido cartilaginoso, início da formação do calo ósseo. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. Aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. H&E

Figura 5.9 - Grupo Dexametasona. 30 dias. **A:** Côndilo reposicionado na fossa articular com disco articular interposto. 25x. **B:** Calo ósseo maduro com remanescentes de tecido cartilaginoso em seu interior e sinais de medula hematopoiética. 100x. H&E

Figura 5.10 - Grupo Dexametasona. 90 dias. **A:** Côndilo reposicionado na fossa articular e ausência de sinais de calo ósseo. 25x. **B:** Disco articular interposto entre o côndilo e cavidade articular, aumento da zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. H&E

5.5.3 Grupo MTX Baixa dose

Período Um dia

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. A fibrocartilagem articular condilar apresentava-se atrofiada. Havia presença de exsudato fibrino hemorrágico entre os cotos da fratura que se apresentavam vitais com osteócitos nas lacunas ósseas. Exsudato neutrofílico presente na região de inserção do disco articular, bem como entre as fibras musculares foi verificado. Os espaços infra e supra discal apresentavam-se livres de exsudato ou células inflamatórias (Figura 5.11).

Período Sete dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. A membrana sinovial apresentava vilosidades e áreas de espessamento. A fibrocartilagem articular condilar apresentava-se atrofiada. Havia presença de moderado infiltrado inflamatório, sem invasão do tecido muscular. Foi verificada presença de tecido de granulação exuberante num misto de fibras e células da inflamação crônica na região da fratura. Células gigantes multinucleadas em lacunas de reabsorção óssea nos cotos da fratura, que se apresentavam desvitalizados, foram observadas, assim como neoformação óssea. Foi possível observar início de formação de tecido cartilaginoso indicando a formação de calo ósseo (Figura 5.12).

Período 15 dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. A membrana sinovial apresentava vilosidades. Havia tecido de granulação próximo à região da fratura. Havia presença de calo ósseo consolidado com extensa área de tecido cartilaginoso em seu interior, bem como início de remodelação óssea. Os cotos da fratura apresentavam tecido ósseo desvitalizado com áreas de neoformação óssea e intensa atividade osteoblástica, bem como apresentavam lacunas de reabsorção óssea com presença de células gigantes multinucleadas (Figura 5.13).

Período 30 dias

Foi possível visualizar o côndilo bem posicionado com disco articular interposto e camadas da fibrocartilagem organizadas. Havia presença de calo ósseo consolidado com remanescentes de tecido cartilaginoso em seu interior e tecido ósseo neoformado a partir dos cotos da fratura (Figura 5.14). Em um espécime foi possível visualizar fragmento ósseo, no traço de fratura, envolvido por tecido de granulação e presença de células gigantes multinucleadas em seu interior.

Período 90 dias

Foi possível visualizar o côndilo bem posicionado com disco articular interposto e camadas da fibrocartilagem organizadas. Notou-se ausência de sinal de calo ósseo, apenas um espessamento na região onde se encontrava a fratura. Foi possível observar aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular e a membrana sinovial apresentava vilosidades (Figura 5.15).

Figura 5.11 - Grupo MTX Baixa dose. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Coto da fratura viável, exsudato inflamatório no tecido muscular. 100x. **C:** Côndilo, atrofia da fibrocartilagem articular. Disco articular acompanha o côndilo. 100x. H&E

Figura 5.12 - Grupo MTX Baixa dose. Sete dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Disco articular acompanha o côndilo. Atrofia da fibrocartilagem articular. 100x. **C:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. Presença de tecido cartilaginoso indicando formação do calo ósseo. 100x. H&E

Figura 5.13 - Grupo MTX Baixa dose. 15 dias. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Neoformação óssea com intensa atividade osteoblástica. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. 100x. H&E

Figura 5.14 - Grupo MTX Baixa dose. 30 dias. **A:** Côndilo centralizado na cavidade articular e calo ósseo na região de fratura. 25x. **B:** Presença de tecido cartilaginoso e neoformação óssea compondo o calo ósseo. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. 100x. H&E

Figura 5.15 - Grupo MTX Baixa dose. 90 dias. **A:** Côndilo reposicionado na cavidade articular. 25x. **B:** Disco articular acompanha o côndilo, havendo maior espessura da fibrocartilagem articular. 100x. H&E

5.5.4 Grupo MTX Alta dose

Período Um dia

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de exsudato fibrino hemorrágico entre os cotos da fratura que se apresentavam desvitalizados, sem osteócitos nas lacunas ósseas. Exsudato neutrofílico presente na região de inserção do disco articular, bem como entre as fibras musculares foi verificado. Além disso, em dois espécimes foi possível notar presença de fratura em dois lugares, sendo que os cotos do fragmento ósseo no traço da fratura apresentavam-se desvitalizados (Figura 5.16).

Período Sete dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Havia presença de pouco exsudato inflamatório, entretanto ainda era possível a visualização de células inflamatórias no tecido muscular. Células gigantes multinucleadas em lacunas de reabsorção óssea nos cotos da fratura, que apresentava extensa área desvitalizada, foram observadas, assim como pouca neoformação óssea e baixa atividade osteoblástica. Foi verificada a presença de tecido de granulação exuberante num misto de fibras e células da inflamação crônica na região da fratura (Figura 5.17). Foi observada a presença de fragmento ósseo, desvitalizado, envolvido por intenso tecido de granulação em um espécime.

Período 15 dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Foi verificada a presença de tecido de granulação exuberante. Os cotos da fratura apresentavam extensa área de tecido ósseo desvitalizado com áreas de neoformação óssea, bem como apresentavam lacunas de reabsorção óssea com presença de células gigantes multinucleadas. Havia sinais de formação de tecido cartilaginoso no traço da fratura indicando o início da organização do calo ósseo (Figura 5.18). Em um espécime o côndilo apresentava-se de volta a posição normal com calo ósseo estruturado. Outro espécime apresentava muita cartilagem e pouca neoformação óssea.

Período 30 dias

Fratura de côndilo com desvio medial foi observada. O disco articular acompanhava o côndilo. Foi verificada a presença de tecido de granulação exuberante num misto de fibras e células da inflamação crônica sem invasão do tecido muscular. Havia presença de calo ósseo consolidado, mesmo com desvio de côndilo para medial (Figura 5.19).

Período 90 dias

O côndilo apresentava ligeiro desvio, com disco articular interposto e sinais de atrofia da fibrocartilagem articular. Foi verificada a ausência de sinal de calo ósseo, apenas um espessamento e remodelamento ósseo na região onde se encontrava a fratura. As fibras musculares apresentavam-se novamente inseridas e organizadas (Figura 5.20). Em um espécime foi possível visualizar rompimento do disco articular e grande área de tecido conjuntivo fibroso no interior do espaço articular sugerindo anquilose fibrosa da articulação temporomandibular.

Figura 5.16 - Grupo MTX Alta dose. Um dia. **A:** Fratura de côndilo com desvio medial. 25x. **B:** Presença de exsudato fibrino hemorrágico. Inflamação muscular. 100x. **C:** Disco articular acompanha o côndilo. Aumento na zona proliferativa da fibrocartilagem articular. 100x. **D:** Presença de fratura óssea em duas regiões. 25x. **E:** Cotos da fratura desvitalizados. 100x. H&E

Figura 5.17 - Grupo MTX Alta dose. Sete dias. **A:** Disco articular acompanha o c ôndilo. 25x. **B:** Fratura com presença de fragmentos ósseos e tecido de granulação. 25x. **C:** Coto da fratura com extensa área desvitalizada e sinais de neof ormação óssea. 100x. H&E

Figura 5.18 - Grupo MTX Alta dose. 15 dias. **A:** Fratura de c ôndilo com desvio medial. 25x. **B:** Tecido de granulação. Coto da fratura parcialmente desvitalizado. 100x. **C:** Tecido cartilaginoso indicando sinais de formação do calo ósseo. 100x. H&E

Figura 5.19 - Grupo MTX Alta dose. 30 dias. **A:** Desvio para medial persistente. 25x. **B:** Calo ósseo maduro. 100x. H&E

Figura 5.20 - Grupo MTX Alta dose. 90 dias. **A:** Côndilo com ligeiro desvio medial. 25x. **B:** Disco articular interposto entre o côndilo e a cavidade articular. Sinais de atrofia da fibrocartilagem articular. 100x. **C:** Disco articular rompido. Presença de tecido conjuntivo fibroso no espaço da cavidade articular sugerindo anquilose fibrosa da ATM. 25x. H&E

5.6 Avaliação histomorfométrica

Foram obtidas as médias e os desvios padrão das áreas, em mm^2 , de cartilagem articular em todos os períodos, de neoformação óssea nos períodos de sete, 15 e 30 dias e de cartilagem presente na formação do calo ósseo no período de 15 dias e estes dados foram submetidos à análise estatística, ao nível de significância de 5%.

5.6.1 Cartilagem articular

Para os valores da média das mensurações das áreas de cartilagem articular a Análise de Variância, um critério, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício no grupo MTX Baixa dose ($p=0,015$), sendo que essa diferença não foi significativa nos grupos Controle ($p=0,414$), Dexametasona ($p=0,326$) e MTX Alta dose ($p=0,055$). Os períodos que se diferenciaram entre si foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras maiúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.9.

Tabela 5.9 - Valores da média e desvio padrão (DP) das áreas de cartilagem articular (mm^2). Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Período de sacrifício	Grupos			
	Controle Média $\pm$ DP	Dexametasona Média $\pm$ DP	MTX Baixa dose Média $\pm$ DP	MTX Alta dose Média $\pm$ DP
Um dia	0,71 $\pm$ 0,30	0,87 $\pm$ 0,57	0,77 $\pm$ 0,29 AB	0,88 $\pm$ 0,34
Sete dias	0,69 $\pm$ 0,29	1,07 $\pm$ 0,66	0,39 $\pm$ 0,20 B	0,36 $\pm$ 0,25
15 dias	0,61 $\pm$ 0,45	0,74 $\pm$ 0,23	0,74 $\pm$ 0,32 AB	0,36 $\pm$ 0,16
30 dias	0,43 $\pm$ 0,15	1,45 $\pm$ 0,80	1,24 $\pm$ 0,73 A	0,58 $\pm$ 0,25
90 dias	0,43 $\pm$ 0,21	0,90 $\pm$ 0,21	1,24 $\pm$ 0,25 A	0,61 $\pm$ 0,37

A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos, no período de 90 dias ($p=0,004$), não sendo significativa nos períodos um dia ($p=0,916$), sete ($p=0,088$), 15 ($p=0,063$) e 30 dias ($p=0,072$). Os grupos que se diferenciaram entre si foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados no gráfico 5.8.

Gráfico 5.8 - Valores da média de área da cartilagem articular (mm^2) dos animais por grupo em cada período experimental. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

5.6.2 Neoformação óssea

Para os valores da média das mensurações das áreas de neoformação óssea a Análise de Variância, um critério, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os períodos de sacrifício nos grupos Controle ($p<0,001$), Dexametasona ($p<0,001$) e MTX Alta dose ($p=0,002$), sendo que essa diferença não foi significativa no grupo MTX Baixa Dose ($p=0,052$). Os períodos que se diferenciaram entre si, em cada grupo, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras maiúsculas diferentes e apresentados na tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Médias e desvios padrão (DP) das áreas de neoformação óssea (mm^2). Letras diferentes representam diferença estatística entre os períodos no mesmo grupo, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

Período de sacrifício	Grupos			
	Controle	Dexametasona	Metotrexato Baixa dose	Metotrexato Alta dose
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
Sete dias	1,50 $\pm$ 0,17 B	1,08 $\pm$ 0,46 B	1,56 $\pm$ 0,52	0,84 $\pm$ 0,34 B
15 dias	2,22 $\pm$ 0,68 B	1,54 $\pm$ 0,27 B	2,34 $\pm$ 0,59	1,34 $\pm$ 0,82 B
30 dias	4,67 $\pm$ 0,71 A	4,56 $\pm$ 1,63 A	3,38 $\pm$ 1,63	2,44 $\pm$ 0,33 A

A Análise de Variância, dois critérios, demonstrou que existe diferença estatística significativa entre os grupos, nos períodos de sete ($p=0,030$) e 30 dias ($p=0,031$), não sendo significativa no período de 15 dias ($p=0,063$). Os grupos que se diferenciaram entre si, em cada período, foram identificados pelo teste de Tukey, sendo representados por letras minúsculas diferentes e apresentados no gráfico 5.9.

Gráfico 5.9 - Valores da média de área de neoformação óssea (mm²) por grupo nos períodos de sete, 15 e 30 dias. Letras diferentes representam diferença estatística entre grupos, no mesmo período de sacrifício, pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%

5.6.3 Tecido cartilaginoso

Os valores da média das mensurações das áreas de tecido cartilaginoso, presente na formação do calo ósseo, no período de 15 dias foram de 0,93 mm² no grupo Controle, 1,27 mm² no grupo Dexametasona, 1,06 mm² no grupo MTX Baixa dose e 1,83 mm² no grupo MTX Alta dose e quando submetidos à Análise de Variância, dois critérios, o resultado demonstrou que não existe diferença estatística significativa entre os grupos ao nível de significância de 5%.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi realizada fratura do processo condilar com desvio medial de ratos Wistar, adultos jovens, tratados com dexametasona e MTX em baixa e alta dose. Alterações nos níveis séricos de proteínas totais nos períodos iniciais e da fosfatase alcalina no período de formação do calo ósseo foram observadas com piores resultados para os animais tratados com MTX, principalmente em alta dose. Com avaliações cefalométricas foi verificado que o MTX em alta dose levou a assimetria mandibular com conseqüências para a maxila. Foi verificado que no grupo MTX em alta dose houve retardo no processo de reparo, permanecendo o desvio do côndilo, exceto em um espécime onde houve anquilose fibrosa da ATM. Houve uma neoformação óssea em todos os grupos, sendo menor no grupo tratado com MTX em alta dose.

Pela alta frequência de fraturas de côndilo entre os casos de fraturas mandibulares (Ellis et al., 1985; Silvennoinen et al., 1992; Thorén et al., 1997; Maladière et al., 2001; Iida et al., 2003; Eckelt et al., 2006) é importante a utilização de um modelo experimental de fratura de côndilo, com desvio medial, em ratos, que permita o estudo e a avaliação do reparo ósseo e das estruturas da articulação temporomandibular (Teixeira et al., 1998). Para este estudo foi escolhido o modelo de fratura de côndilo experimental com desvio. Neste modelo experimental é possível realizar avaliações histológicas e cefalométricas, sendo que o reparo da fratura experimental é pela formação de calo ósseo com reposicionamento do côndilo centralizado na cavidade articular (Teixeira et al., 1998; Luz; Araújo, 2001; Teixeira et al., 2006; Li et al., 2010). Também, a realização de cortes coronais permite a análise histomorfométrica das estruturas articulares e do ramo mandibular (Carvalho et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo ósseo e articular da fratura de côndilo mandibular em ratos que receberam diferentes doses de MTX e não especificamente o tratamento da fratura com este medicamento. Existe uma grande variedade de estudos na literatura com diferentes doses de MTX utilizadas em modelos experimentais com animais (May et al., 1994; Le Bricon et al., 1995; May et

al., 1996; Novaes et al., 1996; Vergne et al., 1998; Mello et al., 2000; Fuskevåg et al., 2000; Davies et al., 2002; Laurindo et al., 2003; Silva et al., 2006; Alves et al., 2007; Carvas et al., 2010; Aguiar et al., 2010). A via de administração também é diversa na literatura, sendo a via intraperitoneal utilizada frequentemente (May et al., 1994; Le Bricon et al., 1995; Novaes et al., 1996; Fuskevåg et al., 2000; Laurindo et al., 2003; Silva et al., 2006; Alves et al., 2007; Carvas et al., 2010; Aguiar et al., 2010).

Para o grupo MTX baixa dose foi utilizada a dose semanal de MTX de 3 mg/Kg de peso corpóreo, aplicada via intraperitoneal. Um estudo comparativo avaliou o nível sérico de metotrexato em seis doses diferentes, semanais, em ratos e observou que a dose que apresentava o nível sérico mais próximo que o de pacientes sob o tratamento com o medicamento, em baixa dose, foi a de 3 mg/Kg (May et al., 1996).

Para o grupo MTX alta dose foi utilizada a dose única de MTX de 30 mg/Kg de peso corpóreo, aplicada via intraperitoneal. Um estudo de toxicidade aguda mostrou que a dose máxima tolerada de MTX em ratos estava entre 3 a 5 g/Kg (Fuskevåg et al., 2000). Outro estudo utilizou a dose semanal de 25 mg/m² de MTX para o tratamento de ratos portadores de carcinossarcoma, tendo sido observada a eficácia, pois houve uma redução do volume do tumor (Alves et al., 2007). Um estudo comparativo utilizou a dose única de 30 mg/Kg de MTX para tratamento de ratos portadores de hepatoma e o mesmo tratamento foi utilizado em ratos saudáveis, tendo sido observada uma redução no volume do tumor, bem como os ratos saudáveis sobreviveram (Le Bricon et al., 1995), sendo então considerada uma dose confiável e, portanto, utilizada em nosso estudo.

Por outro lado, a dose de dexametasona utilizada foi de 0,15 mg/Kg de peso corpóreo. A dose de dexametasona em animais que se assemelha à utilizada no tratamento como antiinflamatório em humanos é a de 0,15 mg/Kg (Novaes et al., 1996; Aguiar et al., 2010). Vale ressaltar que é difícil comparar diretamente as doses destas drogas com aquelas usadas clinicamente, por causa do metabolismo relativamente elevado de ratos. Porém, neste trabalho, elas apresentaram, comparativamente ao grupo controle, resultados significantes e estatisticamente

diferentes.

Os achados macroscópicos revelaram que os animais sobreviveram ao tratamento realizado, continuaram se alimentando e consumindo água e o tratamento com MTX em alta dose revelou sinais de toxicidade nos animais como apresentado num estudo que avaliou os efeitos da alta dose de MTX no metabolismo protéico (Le Bricon et al., 1995). No presente estudo foram observados sinais como ereção dos pelos, diarreia, letargia, mucosite, bem como no final do experimento alguns animais não apresentaram desgaste incisal e o crescimento dental contínuo fez com que os incisivos tivessem uma grande projeção extra-oral.

Os animais recuperaram peso ao longo do tempo, porém esta recuperação não foi estatisticamente significativa no grupo MTX alta dose. Os valores da taxa de perda ou ganho de peso dos animais no grupo controle foi similar aos resultados obtidos noutro estudo em ratos saudáveis submetidos à fratura do processo condilar (Rodrigues et al., 2011). No estudo de Le Bricon et al. (1995) os animais saudáveis tratados com MTX em alta dose apresentaram uma recuperação de peso significativa, porém o período máximo de comparação foi de seis dias após o tratamento quimioterápico e os animais não foram submetidos a fratura do processo condilar, o que também interfere no processo de recuperação dos animais. Quando comparados os grupos entre si no período inicial aquele que teve a maior perda de peso no período de um dia foi o tratado com dexametasona e no período de 90 dias o grupo que teve a recuperação de peso prejudicada foi o grupo tratado com MTX em alta dose. Isto mostra que em relação ao grupo controle esses tratamentos foram prejudiciais aos animais quanto à recuperação de peso corpóreo.

Os testes bioquímicos de sangue foram realizados como parâmetros das condições sistêmicas associadas ao processo de reparação de fratura de côndilo. O sangue utilizado para avaliação bioquímica foi obtido por punção intracardíaca, como em estudos anteriores (May et al. 1994; Moraes et al., 2010; Rodrigues et al., 2010). A coleta de 3 mL sangue foi realizada no momento do sacrifício para não haver risco de morte acidental dos animais durante o procedimento. Foram realizados os testes de proteínas totais, pois a consolidação óssea consiste de uma série complexa de eventos celulares que demanda alta taxa de síntese protéica (Le

Bricon et al., 1995; Rodrigues, 2008) e de fosfatase alcalina, que é liberada pelos osteoblastos quando estão em função (May et al., 1994; May et al., 1996; Moraes et al., 2010).

Os valores de proteínas totais encontrados neste estudo estão de acordo com os valores de referência de controle negativo de Mitruka e Rawnsley (1977). A dexametasona causou um resultado dos testes de proteínas totais similar ao encontrado no grupo controle, onde houve uma queda nos períodos iniciais nesses valores, sendo uma fase crítica para os animais fraturados, alterando o metabolismo protéico, devido ao catabolismo protéico da fase aguda de resposta endócrino-metabólica ao trauma, que causa uma diminuição na produção de anticorpos e leva a uma imunossupressão, também relacionada à perda de peso (Rodrigues, 2008). Já o tratamento com MTX em baixa e alta dose causou um aumento no valor de proteínas totais nos períodos iniciais. Considerando a perda de peso observada, em especial diante de MTX em alta dose, é possível inferir uma associação ao metabolismo negativo de nitrogênio, conforme observado em outro estudo (Le Bricon, 1995). A partir de 15 dias os valores de proteínas totais nos grupos estudados se estabilizaram e permaneceram de acordo com os valores de referência do controle negativo de Mitruka e Rawnsley (1977).

Os resultados das variações nos níveis de fosfatase alcalina no grupo controle, foram similares aos encontrados diante de lesões ósseas experimentais por Moraes et al. (2010) e Rodrigues (2008). No presente trabalho, no tratamento com dexametasona, o nível de fosfatase alcalina foi elevado no período de 15 dias. Davies et al. (2002) afirmou que esse medicamento, assim como o MTX, diminuiu o número de células osteoblásticas humanas em cultura, porém não afetou o valor de atividade da fosfatase alcalina, que aumentou após o contato com o medicamento. Por outro lado o tratamento com MTX, independentemente da dose aplicada, diminuiu significativamente os níveis de fosfatase alcalina nos períodos de sete, 15 e 30 dias, nos quais ocorre a formação do calo ósseo para reparo da fratura, corroborando para afirmação de que o medicamento prejudica a atividade osteoblástica (May et al., 1994; May et al., 1996; Laurindo et al., 2003; Aguiar et al., 2010).

Neste estudo, como parte da avaliação cefalométrica, além da mensuração de distâncias lineares que mostraram resultados significantes, foi possível mensurar também o desvio mandibular, pela mensuração dos ângulos α e A (Yamamoto et al., 1997; Luz; Araújo, 2001; Teixeira et al., 2006; Li et al., 2010; Rodrigues et al., 2011).

Das mensurações de distâncias lineares foi possível verificar que apesar dos animais serem adultos jovens eles apresentaram um crescimento progressivo significativo, independente dos tratamentos medicamentosos estabelecidos, quando não comparados entre si. Quando comparados os grupos, o que teve os piores resultados foi o grupo MTX Alta dose onde houve redução significativa no comprimento mandibular nos períodos de sete e 15 dias, com alterações também na maxila nos períodos de um, sete e 15 dias, bem como desvio progressivo da mandíbula em relação à base do crânio, para o lado fraturado. Noutro estudo este modelo foi utilizado para avaliar alterações esqueléticas em ratos em fase de crescimento, tendo sido concluído que a fratura experimental de côndilo induz mudanças degenerativas no côndilo e causa assimetria mandibular com conseqüências na maxila (Teixeira et al., 2006).

Na avaliação cefalométrica da radiografia axial das cabeças dos animais não foi realizada a mensuração da distância da bula timpânica até o ápice da raiz mesial do primeiro molar, como realizado em outros estudos, pois como a mandíbula não foi desarticulada, com vistas à avaliação histológica da fratura experimental de côndilo, a sobreposição dos dentes inferiores e superiores impossibilitou a visualização adequada do ponto cefalométrico na raiz do primeiro molar (Teixeira et al., 2006).

As mensurações cefalométricas a partir das radiografias das cabeças dos animais mostraram que o grupo Controle apresentou assimetria facial no período de 90 dias, à semelhança dos resultados observados no grupo fraturado noutro trabalho (Teixeira et al., 2006), constituindo um bom controle para o estudo realizado. Também foi possível observar diferença estatística significativa entre os lados nos grupos Dexametasona e MTX alta dose, pois possivelmente estes medicamentos prejudicaram o reparo da fratura causando assimetria facial.

Com o ângulo α é possível mensurar o desvio mandibular em relação à base do crânio e com o ângulo A é possível mensurar este desvio em relação à linha média maxilar. Houve desvio mandibular em relação à base do crânio em todos os grupos e períodos, se assemelhando a outro estudo de fratura de côndilo experimental (Luz e Araújo, 2001), sendo este progressivo no grupo tratado com MTX em alta dose, indicando o efeito deletério dessa dosagem do medicamento. Também houve desvio mandibular em relação à linha média maxilar para o lado fraturado em todos os grupos e períodos, o que também foi observado noutro estudo de fratura de côndilo experimental (Rodrigues et al., 2011). Porém, este desvio não foi progressivo em nenhum dos grupos, podendo ser este fato explicado pelo desvio da maxila que acompanhou o desvio mandibular. Um dos animais do grupo MTX Alta dose sacrificado no período de 90 dias teve um desvio mandibular muito acentuado, inclusive não havendo desgaste incisal, o que explica o valor alto do desvio padrão neste resultado.

O tratamento da fratura de côndilo pode ser conservador ou cirúrgico (Palmieri et al., 1999; Eckelt et al., 2006), sendo que o conservador tem um prognóstico favorável para crianças e adolescentes, com vistas à reparação (Joos; Kleinheinz, 1998; Luz; Araújo, 2001; Yücel et al., 2002). Este estudo utilizou animais adultos jovens e houve reparo da fratura de côndilo mandibular, com desvio medial, pela formação de calo ósseo e côndilo reposicionado na cavidade articular com disco articular interposto conforme observado em estudos prévios (Luz et al., 1991; Teixeira et al., 1998; Luz; Araújo, 2001; Teixeira et al., 2006; Rodrigues, 2008; Rodrigues et al., 2010), corroborando para que o tratamento conservador possa ser utilizado com discrição (Li et al., 2010). Porém, no período de 90 dias o grupo MTX alta dose ainda apresentava desvio do côndilo, possivelmente pela diminuição da neoformação óssea, que comprometeu a formação do calo ósseo.

Este estudo contribuiu não somente para avaliação do reparo ósseo assim como avaliação do reparo de articulações sinoviais diante do trauma e dos efeitos do tratamento com MTX em diferentes dosagens neste processo. Foram realizadas análises histológicas e histomorfométricas. A avaliação histológica em microscopia óptica revelou que no período de um dia os cotos da fratura se apresentavam vitais, com osteócitos nas lacunas ósseas, no grupo controle e nos tratamentos com

dexametasona e MTX em baixa dose o que era esperado (Luz e Araújo, 2001; Rodrigues et al., 2011). Porém no grupo MTX alta dose, já neste período, foi possível observar que os cotos da fratura apresentavam grande região desvitalizada. Em alguns espécimes foi possível identificar fragmento ósseo entre os cotos da fratura, o que não constitui um padrão de achado histológico neste estudo, nem para o modelo utilizado, embora possa ser observado em pacientes que sofreram fratura de côndilo. No grupo MTX alta dose, notadamente no período de um dia, a frequência de fragmentos ósseos entre os cotos da fratura foi maior e estes fragmentos apresentavam-se parcialmente desvitalizados, o que sugere uma influência desta droga. Uma provável causa seria que a administração de altas doses de MTX levaria a osteopenia, dor e fratura nos ossos, sendo relacionada com um aumento da reabsorção óssea (Ragab et al., 1970; Stanisavljevic; Babcock, 1977; Holzer et al., 2003).

Efeitos diferentes do MTX sobre lesões articulares ou ósseas tem sido descritos. A possibilidade de critérios diferentes terem sido utilizados na análise dos resultados deve ser considerada. Em estudo realizado por Silva et al., em 2006, não houve interferência do MTX no reparo de condilectomia unilateral de camundongos, sendo a dose utilizada neste estudo de 15 mg/Kg e os animais eram de ambos os gêneros. Já em estudo realizado por Aguiar et al., em 2010, sobre o reparo de fratura óssea mandibular, a dose de 0,25 mg/Kg de MTX diminuiu a área de neoformação óssea quando comparada ao controle, com soro fisiológico, no período de 30 dias pós-operatório.

Com o mesmo modelo experimental Rodrigues (2008) e Rodrigues et al. (2011) avaliaram a reparação da fratura de côndilo em ratos submetidos à desnutrição protéica e concluíram que a formação do calo ósseo em ratos desnutridos foi prejudicada e bem como houve a ocorrência de anquilose fibrosa na articulação temporomandibular. Um espécime tratado com MTX em alta dose apresentou anquilose fibrosa da articulação temporomandibular no período de 90 dias, o que indica o efeito nocivo no reparo articular desta droga nesta dosagem. Porém, no espécime que apresentou anquilose fibrosa o disco articular apresentou-se lesado o que pode ter induzido este tipo de complicação. Li et al. (2010) relataram

que a lesão do disco articular prejudica a reparação da fratura de côndilo mandibular.

A análise histológica dos espécimes revelou ora sinais de hipertrofia ora de atrofia da cartilagem articular independentemente do tratamento realizado. Porém, histomorfometricamente o grupo MTX Baixa dose apresentou um maior valor na área de fibrocartilagem articular, quando comparado aos outros grupos. Um aumento temporário da fibrocartilagem articular é descrito durante o processo de remodelamento diante de lesões traumáticas (Luz et al., 1991). Atrofia da fibrocartilagem articular do côndilo tem sido descrita diante da desnutrição protéica (Rodrigues et al., 2011). Mais estudos são necessários para a afirmação de uma influência dos medicamentos utilizados neste estudo, na espessura da fibrocartilagem articular durante o processo de reparo da fratura de côndilo mandibular.

A área de neoformação óssea foi mensurada nos períodos de sete, 15 e 30 dias, referente à formação do calo ósseo. Estes foram os períodos que apresentaram diferença significativa nos resultados de análise bioquímica de sangue para fosfatase alcalina, significando função osteoblástica ativa (Moraes et al., 2010). A neoformação óssea aumentou com o tempo, sendo que este aumento não foi significativo no tratamento com MTX em baixa dose. Um estudo demonstrou a ação deletéria no metabolismo ósseo do MTX em baixa dose que levou a uma menor densidade mineral óssea na fase de crescimento (Laurindo et al., 2003). Outros estudos têm relatado a influência do MTX, mesmo em baixa dose, em células envolvidas no processo de reparo ósseo, pela supressão da atividade osteoblástica de síntese e calcificação da matriz óssea (May et al., 1994; May et al., 1996).

Na comparação de área de neoformação óssea entre os grupos o MTX em alta dose apresentou um valor menor de área de neoformação óssea significativo nos períodos de sete e 30 dias, não sendo significativo no período de 15 dias. A administração de altas doses de MTX pode causar osteopenia, dor e fratura nos ossos, associados a maior reabsorção óssea (Ragab et al., 1970; Stanisavljevic e Babcock, 1977; Holzer et al., 2003).

No período de 15 dias havia presença de calo ósseo com presença de tecido cartilaginoso em seu interior em todos os tratamentos realizados, o que é próprio do modelo experimental utilizado (Teixeira et al., 1998; Luz e Araújo, 2001; Rodrigues et al., 2011). O tecido cartilaginoso presente no grupo tratado com MTX em alta dose era intenso, mostrando atraso no processo de reparo. Foi realizada análise histomorfométrica do tecido cartilaginoso presente no interior do calo ósseo, que apesar de apresentar um valor maior no grupo MTX alta dose não apresentou diferença significativa na comparação entre os grupos. No período de 30 dias, os animais tratados com metotrexato apresentavam calo ósseo maduro, porém com desvio condilar medial persistente, mostrando novamente o efeito deletério desta droga no reparo destas lesões traumáticas.

Outros estudos têm avaliado a possibilidade de tratar os efeitos nocivos do MTX e novos estudos nesse sentido são válidos para avaliar a possível reversão dos efeitos negativos observados neste estudo. A associação de ácido folínico previne a ação deletéria do MTX em baixa dose no metabolismo ósseo (Laurindo et al., 2003). A associação de bifosfonato alendronato ao MTX em alta dose obtém resultados satisfatórios pela diminuição do envolvimento ósseo e formação de osteóide (Alves et al., 2007). A associação de ácido zoledrônico ou ácido folínico ao MTX baixa dose não altera os resultados de densitometria mineral óssea e de histomorfometria óssea quando comparados ao controle sem associação (Carvas et al., 2007), porém uma única dose de ácido zoledrônico é capaz de reverter os efeitos negativos dos corticosteróides na osseointegração de implantes de titânio, por avaliação histomorfométrica e de densitometria mineral óssea (Carvas et al., 2010).

A partir de um modelo experimental devemos ser cautelosos aos tirar conclusões que envolvam seres humanos. É importante lembrar que existem diferenças na forma da ATM e do sistema muscular entre roedores e onívoros. Enquanto o côndilo é alongado na direção ântero-posterior, com uma fossa estreita, e executa os movimentos apenas em uma direção em roedores, em seres humanos o côndilo possui forma elíptica, com uma profunda e larga fossa mandibular, realizando movimentos de lateralidade e ântero-posteriores (Teixeira et al., 2006). Porém a resposta tecidual observada pela análise histológica e histomorfométrica,

pode ser a mesma entre estas espécies, contribuindo para o conhecimento do comportamento destas lesões.

Desta forma, este trabalho que visou a avaliação da reparação da fratura de côndilo e da simetria facial em ratos tratados com MTX, permitiu demonstrar efeitos significantes deste medicamento em diferentes dosagens. Foram constituídos os grupos Controle, Dexametasona, MTX Baixa dose e MTX Alta dose e realizadas avaliações macroscópicas, bioquímicas do sangue, cefalométricas, histológicas e histomorfométricas que permitiram avaliar os efeitos desta droga no reparo ósseo e articular e na simetria facial. A fratura unilateral de côndilo mandibular em ratos tratados com MTX, especialmente em alta dose, promoveu efeitos deletérios na simetria facial e prejudicou a formação do calo ósseo e a reparação articular.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo em que foi avaliada a reparação da fratura de côndilo mandibular e a simetria facial em ratos tratados com metotrexato foi concluído que:

- Os animais recuperaram peso ao longo do tempo, exceto no grupo MTX Alta dose;
- Os níveis séricos de proteínas totais mostraram aumento nos períodos iniciais e os níveis séricos de fosfatase alcalina queda nos períodos de formação do calo ósseo no tratamento com MTX;
- O tratamento com MTX em alta dose teve efeito deletério na simetria facial, com assimetria de maxila e mandíbula;
- Ocorreu reparo das estruturas da articulação, tendo o côndilo retornado à sua posição original, sendo que no grupo tratado com MTX Alta dose houve retardo neste processo, havendo desvio do côndilo, e um caso de anquilose fibrosa da ATM;
- O reparo da fratura ocorreu pela formação de calo ósseo em todos os tratamentos, sendo que a neoformação óssea foi prejudicada pelo tratamento com MTX em alta dose.

REFERÊNCIAS¹

Aguiar LT, Mello SBV, Luz JGC. The effect of methotrexate on bone healing of a simulated fracture defect in rat mandible. *J Implant Advanced Clin Dent*. 2010;2(5):91-9.

Alves AP, Pessoa CDOO, Costa-Lotufo I, Moraes Filho MO. Radiographic and histological evaluation of bisphosphonate alendronate and methotrexate effects on rat mandibles inoculated with Walker 256 carcinosarcoma. *Acta Cir Bras*. 2007;22(6):457-64.

Bleyer WA. The clinical pharmacology of methotrexate: new applications of an old drug. *Cancer*. 1978;41(1):36-51.

Bochlogyros PN. A retrospective study of 1,521 mandibular fractures. *J Oral Maxillofac Surg*. 1985;43(8):597-9.

Carvalho CM, Lacerda JA, Santos Neto FP, Castro ICV, Ramos TA, Lima FO, Luz JGC, Ramalho MJP, Santos JN, Pinheiro ALB. Evaluation of laser phototherapy in the inflammatory process of the rat's TMJ induced by carageenan. *Photomed Laser Surg*. 2011;29(4):245-54.

Carvas JSB. Efeito do metotrexato, do corticosteróide e do ácido zoleidrônico na osseointegração de implantes de titânio em um modelo de tíbias de coelhos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2007.

Carvas JSB, Pereira RMR, Caparbo VF, Fuller P, Silveira CA, Lima LAP, Bonfa E, Mello SBV. A single dose of zoledronic acid reverses the deleterious effects of glucocorticoids on titanium implant osseointegration. *Osteopros Int*. 2010;21(10):1723-9.

Chan ESL, Cronstein BN. Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. *Arthritis Res*. 2002;4(4):266-73.

Cronstein BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. *Arthritis Rheum*. 1996;39(12):1951-60. Review.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Davies JH, Evans BAJ, Jenney MEM, Gregory JW. In Vitro effects of chemotherapeutic agents on human osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int.* 2002;70:408-15.

De Riu G, Gamba U, Anghinoni M, Sesenna E. A comparison of open and closed treatment of condylar fractures: a change in philosophy. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30(5):384-9.

Delepine N, Delepine G, Bacci G, Rosen G, Desbois JC. Influence of methotrexate dose intensity on outcome of patients with high grade osteogenic osteosarcoma. *Cancer.* 1996;78(10):2127-35.

Eckelt U, Schneider M, Erasmus F, Gerlach KL, Kuhlisch E, Loukota R, Rasse M, Schubert J, Terheyden H. Open versus closed treatment of fractures of the mandibular condilar process – a prospective randomized multi-centre study. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(5):306-14.

Ellis E3rd, Moos KF, El-Attar A. Ten years of mandibular fractures: an analysis of 2.137 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;59(2):120-9.

Fuskevåg OM, Kristiansen C, Lindal S, Aarbakke J. Maximum tolerated doses of methotrexate and 7-hidroxy-methotrexate in a model of acute toxicity in rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46:69-73.

Holzer G, Krepler P, Koschat MA, Grampp S, Dominkus M, Kotz R. Bone mineral density in long-term survivors of highly malignant osteosarcoma. *J Bone Joint Surg Br.* 2003;85(2):231-7.

Iida S, Hassfeld S, Reuther T, Schweigert HG, Haag C, Klein J, Mühling J. Maxillofacial fractures resulting from falls. *J Craniomaxillofac Surg.* 2003;31(5):278-83.

Jaffe N, Gorlick R. High-dose methotrexate in osteosarcoma let the questions surcease - Time for final acceptance. *J Clin Oncol.* 2008;26(27):4365-6.

Joos U, Kleinheinz J. Therapy of condilar neck fractures. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998;27(4):247-54.

Koski KL. Cranial growth centers: facts or fallacies? *Am J Orthod.* 1968;54:566-83.

Laurindo IMM, Mendes FL, Novaes GS, Mello SBV, Falco V, Jorgetti V. Methotrexate inhibition of bone mineral density increase in growing rabbits: Prevention by folinic acid. *Clin Exp Rheumatol*. 2003;21(5):581-6.

Le Bricon T, Gugins S, Cynober L, Baracos VE. Negative Impact of Cancer Chemotherapy on Protein Metabolism in Healthy and Tumor-Bearing Rats. *Metabolism*. 1995;44(10):1340-8.

Li Z, Zhang W, Li Z-B. The role of the disc in the healing of displaced subcondylar fracture in the growing period: an experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39:388-93.

Lovecchio F, Katz K, Watts D, Wood I. Four-year experience with methotrexate exposures. *J Med Toxicol*. 2008;4(3):149-50.

Luz JGC, de Araújo VC. Rotated subcondylar process fracture in the growing animal: An experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30(6):545-9.

Luz JGC, Jaeger RG, de Araújo VC, de Rezende JR. The effect of indirect trauma on the rat temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1991;20(1):48-52.

Maladière E, Bado F, Meningaud JP, Guilbert F, Bertrand JC. Aetiology and incidence of facial fractures sustained during sports: a prospective study of 140 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30(4):291-5.

Marker P, Nielsen A, Bastian HL. Fractures of the mandibular condyle. Part 1: patterns of distribution of types and causes of fractures in 348 patients. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000;38(5):417-21.

Martins GA, Arruda L. Tratamento sistêmico da psoríase – Parte I: Metotrexato e acitretina. *An bras dermatol*. 2004;79(3):263-78.

May KP, Mercill D, Mcdermott MT, West SG. The effect of methotrexate on mouse cells in culture. *Arthritis Rheum*. 1996;39(3):489-94.

May KP, West GS, Mcdermott MT, Huffer WE. The effect of low-dose methotrexate on bone metabolism and histomorphometry in rats. *Arthritis Rheum*. 1994;37(2):201-6.

McDonough AK, Curtis JR, Saag KG. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol*. 2008;20(2):131-7.

Mello SBV, Barros DM, Silva ASF, Laurindo IMM, Novaes GS. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol*. 2000;39(5):533-6.

Migliaccio S, Brama M, Fornari R, Greco EA, Spera G, Malavolta N. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an osteoblastic disease. *Aging Clin Exp Res*. 2007;19(3):5-10.

Mitruka BM, Rawnsley HM. Clinical biochemical and hematologic reference values in normal experimental animals. New York: Masson; 1977.

Moraes RB, Corrêa L, Luz JGC. Adverse effects of the amlodipine on bone healing of the mandibular fracture: an experimental study in rats. *Oral Maxillofac Surg*. DOI 10.1007/s10006-010-0237-6 [Epub ahead of print]. Jul. 2010.

Newman L. A clinical evaluation of the long-term outcome of patients treated for bilateral fracture of the mandibular condyles. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998;36(3):176-9.

Novaes GS, Mello SBV, Laurindo IMM, Cossermelli W. Low dose methotrexate decreases intraarticular prostaglandin and interleukin 1 levels in antigen induced arthritis in rabbits. *J Rheumatol*. 1996;23(12):2092-7.

Olsen EA. The pharmacology of methotrexate. *J Am Acad Dermatol*. 1991;25(2):306-18.

Palmieri C, Ellis E 3rd, Throckmorton G. Mandibular motion after closed and open treatment of unilateral mandibular condylar process fractures. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999;57(7):764-76.

Pochapski MT, Santos FA, de Andrade ED, Sydney GB. Effect of pretreatment dexamethasone on postendodontic pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(5):790-5.

Ragab AH, Frech RS, Vietti TJ. Osteoporotic fractures secondary to methotrexate therapy of acute leukemia in remission. *Cancer*. 1970;25(3):580-5.

Rodrigues L. Avaliação da reparação e indicadores de desnutrição de ratos submetidos à fratura de côndilo mandibular e com desnutrição protéica. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2008.

Rodrigues L, Corrêa L, Luz JGC. Effects of the condylar process fracture on facial symmetry in rats submitted to protein undernutrition. *Acta Cir Bras*. 2011;26(2):88-93.

Rodrigues L, Corrêa L, Luz JGC. Healing of displaced condylar process fracture in rats submitted to protein undernutrition. *J Craniomaxillofac Surg*. 2011;39(1):73-8.

Sawazaki R, Lima Júnior SM, Asprino L, Moreira RW, de Moraes M. Incidence and patterns of mandibular condyle fractures. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(6):1252-9.

Silva LA, Hetem S, Denardin OVP. Effect of the methotrexate on bone repair after unilateral condlectomy in mice (*Mus musculus*). *Rev Odontol UNESP*. 2006;35(1):p.89-96.

Silvennoinen U, Iizuka T, Lindqvist C, Oikarinen K. Different patterns of condylar fractures: an analysis of 382 patients in a 3-year period. *J Oral Maxillofac Surg*. 1992;50(10):1032-7.

Sinigaglia L, Mazzocchi D, Varenna M. Bone involvement in exogenous hypercortisolism. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(4):364-70.

Stanisavljevic S, Babcock A. Fractures in children treated with methotrexate for leukemia. *Clin Orthop*. 1977;125:139-44.

Stylogianni L, Arsenopoulos A, Patrikiou A. Fractures of the facial skeleton in children. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1991; 29(1):9-11.

Teixeira ACB, Luz JGC, Araújo VC, Araújo NS. Healing of the displaced condylar process fracture: an experimental study. *J Craniomaxillofac Surg*. 1998;26(5):326-30.

Teixeira VCB, Teixeira ACB, Luz JGC. Skeletal changes after experimentally displaced condylar process fracture in growing rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2006;34(4):220-5.

Thorén H, Iizuka T, Hallikainen D, Nurminen M, Lindqvist C. An epidemiological study of patterns of condylar fractures in children. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1997;35(5):306-11.

Vergne P, Liagre B, Bertin P, Cook-Moreau J, Treves R, Beneytout JL, Rigaud M. Methotrexate and cyclooxygenase metabolism in cultured human rheumatoid synoviocytes. *J Rheumatol.* 1998;25(3):433-40.

Villarreal PM, Monje F, Junquera LM, Mateo J, Morillo AJ, González C. Mandibular condyle fractures: determinants of treatment and outcome. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(2):155-63.

Warren RB, Chalmers RJ, Griffiths CE, Menter A. Methotrexate for psoriasis in the era of biological therapy. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33(5):551-4.

Yamamoto MK, Novelli MD, Luz JG. Effects of unilateral upper incisor extraction on facial growth of young rats. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1997;39(4):191-5.

Yücel E, Börkan U, Mollaoglu N, Erkmen E, Günhan O. Histological evaluation of changes in the temporomandibular joint after direct and indirect trauma: an experimental study. *Dent Traumatol.* 2002;18(4):212-6.

Zachariades N, Mezitis M, Mourouzis C, Papadakis D, Spanou A. Fractures of the mandibular condyle: a review of 466 cases. Literature review, reflections on treatment and proposals. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(7):421-32.

Zachariades N, Papavassiliou D. The pattern and aetiology of maxillofacial injuries in Greece. A retrospective study of 25 years and a comparison with other countries. *J Craniomaxillofac Surg.* 1990;18(6):251-4.

Zachariades N, Papavassiliou D, Papademetriou J, Koundouris J. Fractures of the facial skeleton in Greece. *J Maxillofac Surg.* 1983;11(3):142-4.

Anexo A - Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 09/2009

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOUSP, APROVOU o protocolo da pesquisa: "AVALIAÇÃO DO EFEITO DO METOTREXATO NA REPARAÇÃO ÓSSEA APÓS FRATURA EXPERIMENTAL DO PROCESSO CONDILAR EM RATOS", de responsabilidade da Pesquisadora: Samantha Cristine Xisto Braga Cavalcanti, sob orientação do Professor Doutor João Gualberto de Cerqueira Luz.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 6 de abril de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOUSP

Anexo B - Valores dos testes bioquímicos efetuados para os animais do grupo controle negativo (Sem fratura, sem aplicação de medicamentos), no biotério do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Buco Maxilo Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e valores de referência de Mitruka e Rawnsley (1977)

	Controle Negativo	Valores de referência
Proteínas totais (g/dL)	5.55±0.44	4.7 - 8.15
Fosfatase Alcalina (U/L)	45.98±14,21	56.8 – 128