UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO – FORP

EVANDRO CARNEIRO MARTINS NETO

**Estudo comparativo da fixação e integração de enxertos ósseos
“onlay” com o uso de N-butil-2-cianoacrilato, parafuso de
titânio ou lag screw. Estudo histológico, microtomográfico e
biomolecular em coelhos**

RIBEIRÃO PRETO
2014

EVANDRO CARNEIRO MARTINS NETO

**Estudo comparativo da fixação e integração de enxertos ósseos
“onlay” com o uso de N-butil-2-cianoacrilato, parafuso de
titânio ou lag screw. Estudo histológico, microtomográfico e
biomolecular em coelhos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia (Periodontia) – Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio Salata

**RIBEIRÃO PRETO
2014**

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.

Martins-Neto, Evandro Carneiro

Estudo comparativo da fixação e integração de enxertos ósseos “onaly” com o uso de N-butil-2-cianoacrilato, parafuso de titânio ou lag screw. Estudo histológico, microtomográfico e biomolecular em coelhos , 2014.

87 p. : il. 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Salata, Luiz Antonio.

1. Cianocrilato. 2. Enxerto Ósseo Onlay. 3. Reparo Ósseo. 4. Avaliação Tomográfica. 5. Avaliação Histológica. 7. Fixação de enxertos ósseos.

Nome: MARTINS-NETO, Evandro Carneiro
Título: Estudo comparativo da fixação e integração de enxertos ósseos “onaly” com o uso de N-butil-2-cianoacrilato, parafuso de titânio ou lag screw. Estudo histológico, microtomográfico e biomolecular em coelhos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências – Programa: Odontologia (Periodontia) – Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A você, que me deu a vida
e me ensinou a vivê-la com dignidade.
A você, que iluminou os caminhos
obscuros com afeto e dedicação
para que os trilhasse sem medo
e cheio de esperanças.
A você, que se doou por inteiro e renunciou
aos seus sonhos, para que, muitas vezes,
pudéssemos realizar os meus.
Pela longa espera e compreensão
durante minha ausência.
A você, mãe por natureza,
por opção e amor, não bastaria dizer,
que não tenho palavras para agradecer tudo isso.
Mas é o que me acontece agora,
quando procuro arduamente
uma forma escrita de exprimir uma emoção ímpar.
Uma emoção que jamais seria traduzida por palavras.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar-me o caminho nas horas incertas;

A minha querida mãe **Maria Tereza**, exemplo de mãe, de dedicação e amor verdadeiro, por todo apoio oferecido ao longo da minha vida e por sempre acreditar em mim, mesmo quando as circunstâncias mostraram o contrário;

Ao meu pai **Evandro Carneiro Martins Filho**, que mesmo em outro plano, torce por mim e vibra a cada vitória conquistada;

Ao meu irmão **Luís Otávio**, que entendeu minha ausência. Obrigado pelo prazer de ser seu irmão;

À minha **família**, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo;

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP)** pelo acolhimento e estrutura proporcionada durante a pós-graduação;

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Luiz Antonio Salata**, pela orientação competente, crítica e esclarecedora, por todos os ensinamentos, desafios e confiança em mim depositada.

Aos queridos amigos **Gileade, Helena, Marco, Eduardo, Felipe e Rafael** pela boa convivência por todos esses anos. Espero poder contar com vocês por muito tempo ainda;

Ao Dr. **Antônio Azoubel Antunes**, pelo acolhimento em minha chegada a Ribeirão Preto e por toda a experiência compartilhada;

À **Marjorie Omori**, pelo carinho, disponibilidade e paciência nas cirurgias. Sem sua colaboração, este trabalho não estaria finalizado.

Aos amigos **Aldo, Fábio, Sebastião e Edson** que excederam todas as suas funções, demonstrando antes de tudo, consideração, carinho e amizade;

À **Adriana** pela disponibilidade do Lab 3DBio, pela ajuda para sanar minhas dúvidas e pelo apoio para a realização dessa pesquisa;

Às secretárias do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia **Tatiana, Dulce e Daniela**, pela ajuda e disponibilidade;

Aos professores **Adalberto Luiz Rosa, Alexandre Elias Trivellato, Cássio Edvard Sverzut, Márcio Mateus Beloti, Paulo Tambasco de Oliveira, Samuel Porfírio Xavier** pelos conhecimentos e experiências transmitidas;

À **FAPESP**, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro que possibilitou a execução deste projeto;

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de mestrado, possibilitando minha manutenção durante a pós-graduação;

RESUMO

Martins-Neto, E. C. **Estudo comparativo da fixação e integração de enxertos ósseos “onlay” com o uso de N-butil-2-cianoacrilato, parafuso de titânio ou lag screw. Estudo histológico, microtomográfico e biomolecular em coelhos.** 2014. 86f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Alguns trabalhos sobre a resposta do tecido ósseo ao Cianocrilato podem ser encontrados na literatura, embora nenhum deles avalie a resposta histológica, micro-tomográfica e biomolecular na fixação de enxertos ósseos *onlay* com o N-Butil-2-Cianoacrilato (Indermil™). O objetivo do estudo proposto foi comparar o processo de incorporação, remodelação, revascularização e manutenção do volume de enxertos fixados com parafuso ou adesivo, além de mapear os eventos biomoleculares nos quais os enxertos ósseos *onlay* possam estar envolvidos. Oitenta e oito coelhos adultos foram envolvidos nesse estudo. Dois blocos ósseos provenientes da calvária dos coelhos foram transplantados para a mandíbula, em que de cada lado do leito receptor o osso autógeno foi fixado com parafuso de osteossíntese de forma aposicional, lag screw, cianoacrilato ou parafuso e cianoacrilato. O sacrifício dos animais ocorreu após 3, 7, 20 e 40 dias do procedimento cirúrgico inicial, quando então os animais foram submetidos às análises micro-tomográficas, histológicas e biomoleculares.

Cortes histológicos das áreas enxertadas foram preparados para se avaliar o reparo dos enxertos ósseos no sítio receptor. Os resultados biomoleculares mostraram que o método de fixação utilizando o composto N-Butil-2-Cianoacrilato (NB-Cn) apresentou um maior potencial anti-inflamatório, revascularizador e de formação óssea, bem como, uma menor reabsorção óssea. Na avaliação histológica, observou-se que embora o NB-Cn tenha impedido a formação de novo osso na área onde foi aplicado, a estabilidade promovida pela cola permitiu que a revascularização e incorporação do enxerto ocorresse de forma semelhante aos demais grupos. Esses resultados indicam que o NB-Cn se comportou de forma semelhante ao parafuso como material de osteossínte.

Palavras-chave: Cianocrilato, Enxerto Ósseo Onlay, Reparo Ósseo, Avaliação Tomográfica, Avaliação Histológica, Fixação de Enxertos Ósseos.

ABSTRACT

Martins-Neto, E. C. **Comparative study of the fixation and integration of "onlay" bone grafts with the use of n-Butyl-2-cyanoacrylate or titanium screw. Histological, Micro-Tomographic and Biomolecular study in rabbits.** 2014. 86f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Some experimental studies on the bone tissue responses to cyanoacrylate can be found in the literature, none of them evaluate the histological response, micro-tomographic and biomolecular on fixation of *onlay* bone grafts with N-butyl-2-cyanoacrylate (Indermil™). The aim of the proposed study was to compare the process of incorporation, remodeling, and volume maintenance of grafts set with screw or adhesive and map biomolecular events in which *onlay* bone grafts may be involved. Eighty-eight adult rabbits were submitted to calvaria *onlay* bone graft on both sides of the mandible. The grafts were fixated on each side of mandible by a fixation screw appositionally, lag screw, cyanoacrilate or both. The animals were sacrificed on 3rd, 7th, 20th and 40th day after the initial surgical procedure, then they were subjected to micro-computed tomography, histological and biomolecular analysis. Histological sections of the grafted areas were prepared to evaluate the healing of bone grafts in the receptor site. The biomolecular analysis showed that fixation method using N-butyl-2-cyanoacrylate (NB-Cn) presented a greater potential on anti-inflammatory, revascularization and bone formation properties, as well as reduced bone resorption. Histological evaluation observed that although the NB-Cn has prevented the formation of new bone in the area where it was applied, the stability achieved by Nb-Cn allowed revascularization and graft incorporation just like other groups. These results indicate that NB- Cn behaved similarly to the screw as osteosynthesys material.

Key Words: Cyanocrylate, Onlay Bone Graft, Healing Bone, Histologic evaluation, Tomographic evaluation, Bone Graft Fixation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cronologia de execução dos procedimentos e distribuição aleatória dos tipos de tratamento.	24
Figura 2	A) Exposição do leito doador (calota craniana) após anestesia; B,C) – Remoção dos enxertos com uso de broca trefina; D) Sutura do leito doador.	26
Figura 3	A) Incisão em região submandibular; B) Guia cirúrgico em posição; C) Leito receptor perfurado; D) Fixação do enxerto com cianoacrilato; E) Fixação do enxerto com parafuso. F) Sutura das feridas cirúrgicas.	28
Figura 4	Micro-tomógrafo SkyScan® 1172.	31
Figura 5	A) Grupo A – 3 dias ; B) Grupo A – 7 dias; C) Grupo A – 20 dias; D) Grupo A – 40 dias. EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 50 µm (2,5x) Azul de Toluidina.	38
Figura 6	A) Grupo B – 3 dias ; B) Grupo B – 7 dias; C) Grupo B – 20 dias; D) Grupo B – 40 dias. EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 50 µm (2,5x) Azul de Toluidina.	38
Figura 7	A) Grupo C – 3 dias ; B) Grupo C – 7 dias; C) Grupo C – 20 dias; D) Grupo C – 40 dias. *: NB-Cn; EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 50 µm (2,5x) Azul de Toluidina.	39
Figura 8	A) Grupo D – 3 dias ; B) Grupo D – 7 dias; C) Grupo D – 20 dias; D) Grupo D – 40 dias. *: NB-Cn; IT: Interface leito receptor/enxerto; EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 50 µm (2,5x) Azul de Toluidina.	39
Figura 9	A) Detalhe da formação óssea. Osteócitos (OO) em osso maduro (padrão lamelar), osteoblastos (OB) e matriz neoformada/osteóide (OD) ; B) Detalhe da reabsorção óssea. Osteoclastos degradando a matriz óssea na cortical externa (CE), formando as lacunas de Howship. Escala 50 µm (10x) Azul de Toluidina.	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Médias e desvios padrões dos valores de volume ósseo obtido no VOI delimitado nos tempos de 3, 7, 20, 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupo ($P = <0,001$).	40
Gráfico 2	Médias e desvios padrões dos valores de área de superfície de osso obtidas no VOI, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos. Análise de variância a dois critérios para medidas repetidas ($P = <0,001$).	41
Gráfico 3	Médias e desvios padrões dos valores da superfície óssea específica nos tempos de 3, 7, 20, 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais.	41
Gráfico 4	Médias e desvios padrões dos valores de área da espessura trabecular, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo ($P = 0,013$).	42
Gráfico 5	Médias e desvios padrões dos valores da separação trabecular, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais ($P>0,05$).	42
Gráfico 6	Médias e desvios padrões do número de trabéculas, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo ($P = <0,001$).	43
Gráfico 7	Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 3 dias.	44
Gráfico 8	Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 7 dias.	44
Gráfico 9	Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 20 dias.	45
Gráfico 10	Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 40 dias.	45
Gráfico 11	Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 3 dias.	46
Gráfico 12	Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 7 dias.	46
Gráfico 13	Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 20 dias.	47
Gráfico 14	Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 40 dias.	47
Gráfico 15	Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 3 dias.	48
Gráfico 16	Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 7 dias.	49
Gráfico 17	Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 20 dias.	49
Gráfico 18	Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 40 dias.	50
Gráfico 19	Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 3 dias.	50
Gráfico 20	Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 7 dias.	51
Gráfico 21	Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 20 dias.	51
Gráfico 22	Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 40 dias.	52
Gráfico 23	Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 3 dias.	53
Gráfico 24	Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 7 dias.	53

Gráfico 25	Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 20 dias.	54
Gráfico 26	Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 40 dias.	54
Gráfico 27	Expressão relativa Catepsina/ β Actina. Tempo: 3 dias.	55
Gráfico 28	Expressão relativa Catepsina/ β Actina. Tempo: 7 dias.	55
Gráfico 29	Expressão relativa Catepsina/ β Actina. Tempo: 20 dias.	56
Gráfico 30	Expressão relativa Catepsina/ β Actina. Tempo: 40 dias.	56
Gráfico 31	Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 3 dias.	57
Gráfico 32	Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 7 dias.	57
Gráfico 33	Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 20 dias.	58
Gráfico 34	Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 40 dias.	58
Gráfico 35	Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 3 dias.	59
Gráfico 36	Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 7 dias.	59
Gráfico 37	Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 20 dias.	60
Gráfico 38	Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 40 dias.	60
Gráfico 39	Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 3 dias.	61
Gráfico 40	Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 7 dias.	61
Gráfico 41	Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 20 dias.	62
Gráfico 42	Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 40 dias.	62
Gráfico 43	Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 3 dias.	63
Gráfico 44	Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 7 dias.	63
Gráfico 45	Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 20 dias.	64
Gráfico 46	Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 40 dias.	64
Gráfico 47	Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 3 dias.	65
Gráfico 48	Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 7 dias.	65
Gráfico 49	Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 20 dias.	66
Gráfico 50	Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 40 dias.	66
Gráfico 51	Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 3 dias.	67
Gráfico 52	Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 7 dias.	67
Gráfico 53	Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 20 dias.	68
Gráfico 54	Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 40 dias.	68
Gráfico 55	Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 3 dias.	69
Gráfico 56	Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 7 dias.	69
Gráfico 57	Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 20 dias.	70
Gráfico 58	Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 40 dias.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.	33
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
USP	Universidade de São Paulo
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
SP	São Paulo
MG	Minas Gerais
RJ	Rio de Janeiro
MS	Mato Grosso do Sul
Vol.	Volumes
VOI	Volume de interesse
ROI	Região de interesse
SPSS	Statistical Package for Social Science para Windows
3D	Três dimensões
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico
V.	Versão
ip	Intra-peritoneal

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcento
µm	Micrômetros
µL	Microlitro
kg	Kilograma
mm	Milímetro
ml	Mililitro
mg	Miligrama
ml/kg	Mililitro por kilograma
mg/kg	Miligrama por kilograma
>	Maior que
<	Menor que
pH	Potencial hidrogeniônico
°C	Graus Célsius
≤	Maior ou igual
mm ³	Milímetros cúbicos
mm ²	Milímetros quadrados
No	Número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2	PROPOSIÇÃO	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Animais	23
3.2	Grupos experimentais	23
3.3	Cirurgias	24
3.4	Obtenção dos enxertos autógenos	25
3.5	Preparo do leito receptor e fixação do enxeto	27
3.6	Eutanásia dos animais	29
3.7	Processamento histológico	29
3.8	Micro-TC	30
3.9	Análise Biomolecular	31
3.10	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS	36
4.1	Análise histológica	36
4.2	Análise Micro-tomográfica	40
4.3	Análise biomolecular	43
5	DISCUSSÃO	71
6	CONCLUSÕES	79
	REFERÊNCIAS	81

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a instalação de implantes osseointegráveis tem se mostrado um procedimento cirúrgico de alta previsibilidade para possibilitar a reposição de um ou mais dentes. Um dos requisitos para instalação dos mesmos é a necessidade de um volume adequado de osso nos locais desejados. Se o volume de osso é insuficiente, algumas técnicas cirúrgicas podem ser usadas para reconstruir o rebordo, visando a instalação do implante e assegurando a estética do paciente. O uso de enxertos ósseos autógenos com implantes osseointegráveis foi discutido originalmente por Branemark et al. (1975), sendo a reconstrução dos maxilares pelo método de enxertia óssea considerada o procedimento cirúrgico mais utilizado frente à perda fisiológica ou traumática a que esses ossos estão sujeitos (Mish, 1997).

Convencionalmente, placas e parafusos de titânio têm sido usados para obter a fixação óssea, seja em fraturas ou procedimentos de enxertia *onlay*. Apesar das vantagens da utilização dos parafusos de titânio, eles apresentam alguns potenciais problemas como: a necessidade de remoção antes da instalação dos implantes e risco de fratura do parafuso durante (de Oliveira Neto et al, 2010). Outros problemas associados com o uso dos parafusos de titânio são o desconforto causado pela palpação do material através da mucosa oral, produção de artefatos em exames de tomografia e ressonância magnética, a necessidade de perfuração do enxerto para fixação do mesmo, infecção, afrouxamento dos parafusos, sensibilidade ao frio e reabsorção do osso alveolar causada por *stress shielding*, além da experiência necessária para manipulação dos sistemas de fixação e seu custo relativamente elevado (Chacon et al., 2004; Faria et al., 2008; Pedrosa et al., 2009; Bas et al., 2011).

Todos esses inconvenientes têm estimulado o interesse por técnicas alternativas de fixação de enxertos, como o uso de adesivos. Estudos recentes têm analisado a eficiência de materiais adesivos utilizados para fixação de tecidos moles e duros, como o cianoacrilato (Amarante et al., 1995; Dadas et al., 2007; de Oliveira Neto et al, 2010; Bas et al., 2011). Enxertos requerem fixação adequada, porém o método utilizado não deve interferir com a incorporação do mesmo no leito receptor. Alguns autores relatam que fragmentos ósseos fixados

com adesivos baseados em cianoacrilato tem melhor resultado, estabilidade superior e melhores condições para nova formação óssea comparada à fixação por parafusos (Mehta et al 1987; Amarante et al., 1995; Ahn et al., 1997; Shermak et al., 1998).

Estudos experimentais recentes em modelo animal têm analisado a resposta do tecido ósseo e a estabilidade em sítios de fraturas fixados com adesivo à base de cianoacrilato, porém, a literatura é escassa em trabalhos que avaliaram o processo de remodelação de enxertos *onlay* na presença desse material e a fixação desses enxertos promovida pelo adesivo e seus homólogos (Saska et al 2008; de Oliveira Neto et al, 2010; Bas et al., 2011). Descoberto em 1949, o cianoacrilato foi proposto como um potencial adesivo cirúrgico. Várias marcas e formatos de adesivos à base de cianoacrilato estão disponíveis no mercado e são largamente utilizados numa série de procedimentos cirúrgicos, tais como: reparos de perfuração de córnea, lacerações em pele, reparo vascular e enxertos de pele e fechamento de perfurações no seio maxilar durante levantamento de seio (Van den Ende et al., 2004; Choi et al., 2006; Sundaram et al., 2010). O cianoacrilato líquido consiste em monômeros de cianoacrilato, que polimerizam em cadeias longas na presença de íons de hidroxila. A propriedade de ligação quase instantânea faz do cianoacrilato um adesivo para tecidos e agente hemostático eficaz. Quando utilizado como meio de fixação óssea, ele apresenta algumas vantagens potenciais sobre o uso dos dispositivos de fixação metálicos e absorvíveis, tornando-se uma possível alternativa aos meios de osteossíntese convencional. Estas incluem o baixo custo, facilidade de uso, rapidez de aplicação, possibilidade de modificação da posição de fixação do enxerto durante o procedimento cirúrgico sem danos à estrutura óssea e, como o adesivo é aplicado na interface enxerto-leito receptor, não há aumento do perfil da área a ser reconstruída como normalmente acontece com placas e parafusos, além de, em virtude de sua natureza não-metálica, não produzirem artefatos de imagem em exames de tomografia ou ressonância magnética, além de eliminar a necessidade de procedimentos secundários para a remoção de dispositivos de fixação pois são bioabsorvíveis (Raghoobar et al., 2006; Faria et al., 2008; Pedrosa et al., 2009; de Oliveira Neto et al., 2010; Bas et al., 2011).

No grupo dos cianoacrilatos, podemos encontrar diferentes formas, como: o Metil-cianocrilato, Etil-cianocrilato, Octil-cianocrilato, o N-Butil-2-Cianocrilato (NB-Cn), dentre outros. O NB-Cn foi aprovado para uso clínico em 1996 e está se tornando um método bastante popular para fechamento de ferimentos cutâneos (Inal et al., 2006). Devido sua cadeia longa, o NB-Cn é mais biocompatível do que aqueles usados inicialmente (Pelissier et al., 2001). Assim como os outros cianoacrilatos, apresenta todas as propriedades e vantagens citadas anteriormente quando utilizado como material de fixação de fragmentos ósseos, o que o torna uma opção atrativa para essa finalidade.

Conhecendo a escassa base científica sobre o processo de incorporação, remodelação, revascularização e manutenção de volume de enxertos ósseos *onlay*, quando fixados com cianoacrilato, este trabalho visa contribuir com informações fundamentais sobre o comportamento entre o enxerto e o leito receptor. Com esse objetivo, há a necessidade de mapear os eventos biomoleculares nos quais os enxertos *onlay* possam estar envolvidos na sua incorporação, tais como a avaliação da expressão de proteínas ósseas que caracterizam a deposição de matriz óssea (osteogênese), vascularização (angiogênese) e o processo de remodelação (osteoclastogênese), que somados às análises tomográficas e histológicas, possam contribuir na comparação da fixação por parafuso ou adesivo à base de cianoacrilato.

2 PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como objetivos:

1. Analisar histologicamente o processo de incorporação dos enxertos ósseos ao leitor receptor;
2. Avaliar as alterações de volume e densidade dos enxertos através de exames de imagem obtidos pelo Micro-CT;
3. Identificar a expressão de genes envolvidos no processo de remodelação pela técnica de PCR;
4. Avaliar se a fixação com NB-Cn poderia fornecer uma alternativa razoável ao parafuso de fixação em procedimentos de enxerto *onlay*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 48 coelhos adultos, machos, tipo *New Zealand White*, pesando 3,5 a 4,0 kg. Os animais foram divididos em 4 grupos com 3 animais por grupo, além de 24 animais para análise biomolecular, que ficaram alojados no Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP) nas seguintes condições: 1 animal/4500 cm², ar-condicionado *Split*, sem controle de umidade, 27,34 trocas de ar/hora, controle de iluminação automático 12/12h, ração à vontade e água filtrada também à vontade, com as seguintes barreiras sanitárias: autoclave, banheiros/sanitários/vestiário e tela para controle de insetos.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Dois blocos ósseos provenientes da calota craniana dos coelhos foram transplantados para a mandíbula, onde os blocos eram fixados de acordo com a seguinte divisão de grupos:

Grupo A: Um lado fixado com parafuso de titânio de 1,5mm diâmetro e 6 mm de comprimento;

Grupo B: Um lado fixado com parafuso de titânio de 1,5mm de diâmetro e 6 mm de comprimento pela técnica de *Lag Screw*;

Grupo C: Um lado fixado com NB-Cn;

Grupo D: Um lado fixado com NB-Cn e parafuso de titânio de 1,5mm de diâmetro e 6 mm de comprimento;

Cada grupo foi composto por 03 (três) animais, os quais foram sacrificados a fim de analisar os diferentes modos de tratamento nos períodos de 3, 7, 20 e 40 dias do pós-operatório, totalizando 48 animais para análises histológicas e micro-tomográficas. Para análise biomolecular, foram utilizadas

três amostras para cada tempo experimental, para cada grupo, totalizando 24 animais.

Figura 1: Cronologia de execução dos procedimentos e distribuição aleatória dos tipos de tratamento.

3.3 CIRURGIAS

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico, sendo pré-anestesiados com acepromazina (1mg/kg) subcutânea, quinze minutos antes da cirurgia e recebendo antibioticoterapia. A anestesia foi com xilazina (3,0mg/Kg) e quetamina 10% (60mg/Kg) por via intramuscular. Após a anestesia, os animais recebem oxitetraciclina (20mg/Kg) via *ip* e nos três dias após a cirurgia. Também receberam buprenorfina (0,02mg/Kg) e Profenid® (3,0mg/Kg).

Todas as cirurgias foram realizadas dentro de padrões assépticos e sempre pelo mesmo cirurgião. Todos os animais foram submetidos a cirurgias no crânio para obtenção dos enxertos autógenos, e cirurgias bilaterais na mandíbula, especificamente na região de corpo mandibular, logo abaixo da região de pré-molares e molares e posteriormente aos ápices dos incisivos, para fixação dos blocos ósseos obtidos. Foi dada atenção diária às funções biológicas básicas de alimentação e excreção, aos sinais de comportamento em relação à dor pós-operatória, monitorização de infecções pós-cirúrgicas e observação das incisões cirúrgicas quanto à deiscência da sutura ou sangramentos.

3.4 OBTENÇÃO DOS ENXERTOS AUTÓGENOS

Os procedimentos cirúrgicos de obtenção dos enxertos foram estes: com a sala cirúrgica mais limpa possível (apropriada para uma cirurgia limpa de alto risco), o coelho sob efeito da anestesia geral foi submetido à tricotomia craniana. A área recebeu aplicação tópica de solução de iodo polivinil-pirrolidona a 10% e posteriormente, coberta com campos cirúrgicos, deixando exposta apenas a área a ser operada. A área operada foi infiltrada com mepivacaína 2% e noradrenalina 1:200.000. Uma incisão linear, diretamente sobre a pele, medindo 3,0 cm, foi realizada ao longo da calota craniana ântero-posteriormente. A gálea e a fáscia foram incisadas e rebatidas, seguido de incisão periosteal para expor a cortical da calota craniana (Figura 2A). Dois blocos bicorticais de osso foram obtidos da calota craniana dos coelhos de forma padronizada, utilizando trefina de 08 mm de diâmetro, com auxílio de motor elétrico e peça de mão, para que todos os enxertos autógenos obtidos tivessem as mesmas medidas. As ostectomias foram realizadas sob irrigação abundante de solução fisiológica a 0,9% diretamente sobre a área (Figuras 2B,2C). O fechamento da ferida foi realizado com vicryl 4.0 no periósteo, fáscia e gálea aponeurótica, e nylon 4.0 na pele, com pontos simples (Figura 2D). Após a remoção dos dois blocos ósseos, os enxertos foram mantidos em gaze esterilizada umedecida em solução salina 0,9% até a preparação do leito ósseo receptor ter sido finalizada. Posteriormente, os dois blocos ósseos obtidos foram fixados cada um em um lado da mandíbula do coelho, obedecendo o tipo de fixação a ser empregada em cada enxerto.

Figura 2: **A)** Exposição do leito doador (calota craniana) após anestesia; **B,C)** – Remoção dos enxertos com uso de broca trefina; **D)** Sutura do leito doador.

3.5 PREPARO DO LEITO RECEPTOR E FIXAÇÃO DO ENXERTO

O acesso cirúrgico na mandíbula foi realizado por via submandibular, com uma incisão de 1,5cm bilateralmente (Figura 3A). Estas incisões transporam pele, fáscia, músculo e periósteo, até chegar à região de implantação dos enxertos localizada posteriormente à saída do nervo mental. Em ambos os lados mandibulares dos coelhos foram confeccionadas perfurações monocorticais dos leitos receptores, visando facilitar a comunicação entre a camada trabecular do leito receptor e a cortical do enxerto (Figura 3B). Tais perfurações foram realizadas sob irrigação abundante com soro fisiológico e a distribuição das mesmas foi padronizada utilizando guia confeccionado em aço cirúrgico (medindo 7x7mm), com nove perfurações de 1,0 mm de diâmetro, distribuídas de maneira equidistante (Figura 3C). Os enxertos foram então fixados de acordo com a distribuição aleatória dos grupos (Figuras 3D, 3E). O fechamento da ferida foi realizado com vicryl 4-0 no periósteo e plano muscular, e nylon 4-0 na pele, com pontos simples (Figura 3F).

Figura 3: A) Incisão em região submandibular; B) Guia cirúrgico em posição; C) Leito receptor perfurado; D) Fixação do enxerto com cianoacrilato; E) Fixação do enxerto com parafuso. F) Sutura das feridas cirúrgicas.

3.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Após 3, 7, 20 e 40 dias, os animais (3 coelhos para cada tempo experimental, para cada grupo) foram sacrificados por meio de sobredose de Tiopental (100mg/kg) administrado por via endovenosa, sendo extraída parte da mandíbula para as análises.

3.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Blocos ósseos contendo a área enxertada na mandíbula dos coelhos foram removidos, fixados em Formol tamponado 10% com pH 7,4 por 24 horas e transferidos para uma solução de etanol 70%, onde permaneceram por três dias. Os espécimes foram desidratados em uma série crescente de álcoois e incluídos em resina acrílica (LR White®). O processo de impregnação em resina se deu colocando-se as peças no vácuo e submetendo à agitação de 2 horas por dia, por 15 dias, efetuando-se a substituição por resina limpa a cada 2 dias. Após o processo de impregnação, as peças foram colocadas em estufa a 60°C por 12 horas para que ocorresse a polimerização dos blocos. Depois de polimerizados os blocos, os mesmos foram seccionados utilizando serra de precisão do sistema Exakt® (Exakt®, Apparatebau, Alemanha) e desgastadas com lixas do sistema Exakt® (Exakt®, Apparatebau, Alemanha) de granulações 320, 800, 2500 e 4000, até a obtenção de superfície lisa. Os blocos lixados e polidos foram colados a uma lâmina acrílica por meio do sistema Exakt® (Exakt®, Apparatebau, Alemanha). A superfície exposta da peça colada à lâmina foi novamente lixada e polida até a obtenção de espessura aproximada de 30 a 40 µm. Esta face foi então submetida à coloração utilizando azul de toluidina. A análise histológica teve como objetivo avaliar a incorporação dos enxertos ao leito receptor mandibular, mais especificamente na interface entre o osso enxertado e a mandíbula, fazendo uma análise comparativa entre os grupos das diferentes características teciduais encontradas nessa interface.

3.8. MICRO-TOMOGRAFIA

Nos tempos experimentais citados acima, os animais foram sacrificados e os espécimes obtidos, os quais foram reduzidos individualmente para ser submetidos à aquisição de imagens pelo exame micro-tomográfico. Para aquisição das imagens, foi adotada uma resolução espacial de 12 μm com o microtomógrafo SkyScan® 1172 (SkyScan Ltda., Antuérpia, Bélgica), com ajuste de 50kV de voltagem (Figura 4).

Foram realizadas análises microtomográficas da microarquitetura tridimensional do osso trabecular dos seguintes indicadores, de acordo com Buxsein et al. (2010):

- a) Volume ósseo;
- b) Superfície óssea;
- c) Superfície óssea específica;
- d) Espessura trabecular;
- e) Separação trabecular;
- f) Número de trabéculas;

O processamento das imagens foi realizado com o auxílio do SkyScan 1172 Software v. 1.5.0. Os exames micro-tomográficos foram realizados logo após os sacrifícios dos animais, com os espécimes fixados em formaldeído a 4% tamponado (pH=7).

Figura 4: Micro-tomógrafo SkyScan® 1172.

3.9 ANÁLISE BIOMOLECULAR

Quarenta e oito blocos ósseos (24 animais, sendo três amostras por grupo por tempo experimental) mais 12 blocos ósseos controle (obtidos no momento da eutanásia, e utilizados como controle de expressão basal), foram processados em laboratório para realização testes de PCR para determinar a atividade dos genes relacionados ao remodelamento dos enxertos submetidos aos diferentes procedimentos de fixação, bem como ao processo inflamatório existente nesta região.

3.9.1 PURIFICAÇÃO DO RNA

Os blocos ósseos foram macerados com pistilo e cadinho, contendo nitrogênio líquido. Após a maceração foi adicionado 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies USA) seguindo protocolo do fabricante. À mistura foi adicionado 250 μ L de Cloroformo, e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos. Após centrifugação por 15 minutos a 10.200 RPM, o sobrenadante foi retirado, sendo adicionado 250 μ L de etanol. Esta mistura foi submetida à extração de RNA, utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, USA), seguindo protocolo descrito pelo fabricante.

3.9.2 Real Time RT-PCR

Um micrograma (μg) do RNA total isolado dos grupos de enxertos ósseos foi transcrito reversamente para cDNA a 37°C por 120 min com o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA) que contém random hexameros, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Cada cDNA produzido foi diluído 1/10 e as alíquotas foram armazenadas a -20°C até as reações de PCR serem realizadas.

A quantificação do RNAm dos genes IL-6, IL-10, VEGF, RANKL, OPG, TNF- α , Catepsina K, TRAP, BMP-2, ALP, Osteocalcina, SP7 osterix e Runx2 (tabela 1) foram realizadas através de Real-time RT-PCR utilizando a detecção por SYBR green. Para isto, cada cDNA foi amplificado utilizando o gene constitutivo β -actina como controle endógeno para a normalização. A reação continha 5 μL de cDNA, 0,5 μm dos primers sense e antisense específicos, 7 μL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with Rox (Invitrogen, USA) em um volume final de 13 μL . Cada amostra foi corrida em triplicata e a amplificação foi realizada no termociclador CFX 96 (BioRad, USA) por 40 ciclos conforme protocolo do fabricante, sendo um passo de pré-incubação para desnaturação da fita de cDNA (3 min, 95°C), seguido de 40 ciclos consistindo de um passo de desnaturação (15 seg, 95°C), um passo de anelamento dos primers (15 seg, 60°C) e um passo de extensão (30 seg, 72°C). Após cada ciclo a fluorescência foi medida a 72°C . A fluorescência foi coletada para cada ciclo de amplificação e os dados analisados pelo método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ para quantificação da expressão relativa (Livak e Schmittgen, 2001). A validação dos ensaios e eficiência da amplificação de cada primer foi calculada conforme User Bulletin (Applied Biosystems, USA) e os valores obtidos do *slope* ficaram entre 95 e 100%.

Primer	Sequência
B-Actina	For – 3' GCGACCTCACCGACTACCT 5' Rev – 3'GCCATCTCGTTCTCGAAGTC 5'
IL-6	For – 3' TAATGAGACCTGCCTGCTGA 5' Rev – 3' GCTTGAGGGTGGCTTCTTC 5'
IL-10	For – 3' CCTTTGGCAGGGTGAAGACT 5' Rev – 3'ATGGCTGGACTGTGGTTCTC 5'
VEGF	For – 3'ATATTCAAGCCTTCCTGCGTGC 5' Rev – 3'TGGCCCTGGTGAGGTTTGAT 5'
RANKL	For – 3' TTCCTCTACTTCCGAGCGCA 5' Rev – 3' ACTCTCCAGAGCTGCGTCTT 5'
OPG	For – 3' GTGGTGCAAGCTGGAACCCAG 5' Rev – 3' AGGCCCTTCAGCAAAGGTAG 5'
TNF-α	For – 3' TCCGTGAAACAGAGCAGAA 5' Rev – 3' GAGCAGAGGTTCCGGTGATGT 5'
Cathepsina K	For – 3' GCCTCAAAGTACCCCGTCT 5' Rev – 3' GCCCAACAGGAACCACACTG 5'
TRAP	For – 3' CTGGAGTGCACGATGCCAGCGACA 5' Rev – 3' TCCGTGCTCGGCGATGGACCAGA 5'
BMP-2	For – 3' CGCCTCAAATCCAGCTGTAAG 5' Rev – 3' GGGCCACAATCCAGTCGTT 5'
ALP	For – 3' CATCCTCAAGGGTCAGCTCCAC 5' Rev – 3' TGC GCGTTGGTGTTGTAGGT 5'
Osteocalcina	For – 3' GCCAACTGATCGACGGGCA 5' Rev – 3' GTAGAAGCGCTGGTAGGCGT 5'
SP7 Osterix	For – 3' TGAGGAAGAAGCCCATTAC 5' Rev – 3' ACTTCTTCTCCCGGGTGTG 5'
RUNX-2	For – 3' CCGTGGCCTTCAAGGTTGT 5' Rev – 3' TTCATAACAGCGGAGGCATTT 5'

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um banco de dados com os resultados foi criado para análise estatística com o auxílio do software estatístico Statistical Package for Social Science para Windows (SPSS[®], versão 15,0, IBM[®], Nova Iorque, EUA).

Os resultados foram submetidos a teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para identificação do tipo de distribuição da amostra de acordo com cada análise utilizada no modelo experimental do presente estudo. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) a dois critérios para medidas repetidas nas comparações inter e intragrupos. Já para os dados não paramétricos, foi utilizada a análise de variância de Kruskal-Wallis e teste *post hoc* de Tukey.

Os dados foram descritos em gráficos com os parâmetros de médias e desvios padrões. Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

As intervenções cirúrgicas foram realizadas sem intercorrências. No período experimental, seis animais foram excluídos da amostra e sacrificados, devido doença que impossibilitava que permanecessem no protocolo de pesquisa. Novos animais foram adicionados e os espécimes obtidos foram devidamente incluídos na amostra final depois de terminados os tempos experimentais e respectivas análises. No total, a amostra constituiu-se de 144 hemi-mandíbulas enxertadas utilizando as técnicas propostas.

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

GRUPO A: Aos 3 e 7 dias, o enxerto encontrava-se preservado, sem imagens sugestivas de remodelação. Aos 20 dias, pôde-se observar na interface enxerto/leito receptor, clara deposição de osso novo imaturo em uma matriz extracelular de fibras colágenas frouxamente organizada unindo o enxerto ao leito ósseo receptor, assim como também nas margens laterais do sítio enxertado logo abaixo do perióstio. Aos 40 dias, observou-se incorporação do enxerto em forma avançada com tecido ósseo neoformado mais organizado em continuidade entre o enxerto e o leito receptor. No interior do enxerto, foi observada presença de células adiposas. Há neoformação óssea intensa advinda das perfurações, aumentando ainda mais a interface enxerto e o leito. Na região periférica, abaixo do perióstio, encontramos uma grande formação do tecido ósseo, caracterizando a intensa reação do perióstio (Figura 5).

GRUPO B: Aos 3 e 7 dias, o enxerto encontrava-se preservado, sem imagens sugestivas de remodelação, semelhante ao grupo A. Aos 20 dias, na interface enxerto/leito receptor, foi observada em algumas situações, uma nítida deposição de novo osso imaturo, em uma matriz extracelular de fibras colágenas, geralmente localizado próximo a uma área de perfuração do osso residente e nas margens laterais do enxerto. Aos 40 dias, observa-se incorporação do enxerto com o leito receptor através de pontes de tecido ósseo neoformado. Foi observado ainda, neoformação óssea intensa proveniente das

perfurações, aumentando o contato entre o enxerto e o leito receptor. Na região periférica, abaixo do periósteo, também foi encontrada uma grande formação de tecido ósseo (Figura 6).

GRUPO C: Neste grupo, foi possível perceber na periferia do enxerto, a presença do adesivo em todos os tempos estudados. Aos 3 e 7 dias, observou-se o enxerto íntegro, sem a presença de infiltrado inflamatório. Aos 20 dias, não notou-se a presença de infiltrado inflamatório em proximidade com o adesivo. Percebe-se formação de novo osso imaturo advindo das perfurações do leito receptor, além de áreas de reabsorção na cortical externa do enxerto. Notou-se ainda nesse período que a presença de adesivo na periferia do enxerto diminuiu a área de contato com o leito receptor. Aos 40 dias, ainda observou-se a presença do adesivo na região periférica, limitando o contato direto entre o enxerto/leito receptor nessa região. Na porção central dessa interface, percebe-se a presença de tecido ósseo neoformado semelhante aos outros grupos (Figura 7).

GRUPO D: Aos 3 e 7 dias não percebeu-se infiltrado inflamatório próximo ao adesivo. O enxerto encontrava-se preservado, sem sinais de reabsorção. Aos 20 dias, a atividade osteoclástica estava presente, evidenciando o processo de remodelação na cortical externa do enxerto. Assim como no Grupo C, a neoformação óssea foi evidente na porção central da interface enxerto/leito receptor. Aos 40 dias, o enxerto apresentou remodelação óssea em sua cortical externa e osso neoformado em vários estágios de maturação (Figura 8).

Figura 5: **A)** Grupo A – 3 dias ; **B)** Grupo A – 7 dias; **C)** Grupo A – 20 dias; **D)** Grupo A – 40 dias. EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 500 µm (2,5x) Azul de Toluidina.

Figura 6: **A)** Grupo B – 3 dias ; **B)** Grupo B – 7 dias; **C)** Grupo B – 20 dias; **D)** Grupo B – 40 dias. EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 500 µm (2,5x) Azul de Toluidina.

Figura 7: **A)** Grupo C – 3 dias ; **B)** Grupo C – 7 dias; **C)** Grupo C – 20 dias; **D)** Grupo C – 40 dias. *: NB-Cn; EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 500 μ m (2,5x) Azul de Toluidina.

Figura 8: **A)** Grupo D – 3 dias ; **B)** Grupo D – 7 dias; **C)** Grupo D – 20 dias; **D)** Grupo D – 40 dias. *: NB-Cn; IT: Interface leito receptor/enxerto; EO: Enxerto ; LR: Leito receptor; OI: Osso imaturo; OM: Osso maduro. Escala 500 μ m (2,5x) Azul de Toluidina.

Figura 9: **A)** Detalhe da formação óssea. Osteócitos (OO) em osso maduro (padrão lamelar), osteoblastos (OB) e matriz neoformada/osteóide (OD) ; **B)** Detalhe da reabsorção óssea. Osteoclastos degradando a matriz óssea na cortical externa do enxerto (CE), formando as lacunas de Howship. Escala 50 µm (10x) Azul de Toluidina.

4.2 ANÁLISE MICRO-TOMOGRÁFICA

Um total de 48 espécimes foram escaneados e analisados, correspondente a 3 amostras para cada tipo de tratamento em cada um dos tempos experimentais.

No que diz respeito ao volume ósseo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$). Houve somente diferença em relação ao tempo, 7 e 20 dias do grupo B ($p = 0,001$), sendo maior em 7, comparado à 20 dias.

Gráfico 1: Médias e desvios padrões dos valores de volume ósseo obtido no VOI delimitado nos tempos de 3, 7, 20, 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. * = diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupo ($p = 0,001$).

Em relação à superfície óssea, houve somente diferença entre o grupo A e C no período de 20 dias, sendo o grupo A maior que o grupo C ($p=0,001$).

Gráfico 2: Médias e desvios padrões dos valores de área de superfície de osso obtidas no VOI, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *=diferença estatisticamente significativa na comparação intragrupos ($P = 0,001$).

Em relação à superfície óssea específica, não houve diferença entre os grupos e entre os tempos ($p>0,05$).

Gráfico 3: Médias e desvios padrões dos valores da superfície óssea específica nos tempos de 3, 7, 20, 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais ($p>0,05$).

A espessura trabecular não apresentou diferença em relação ao tempo. Houve diferença entre os grupos B e C no período de 7 dias, sendo o grupo B menor que C ($p=0,013$).

Gráfico 4: Médias e desvios padrões dos valores de área da espessura trabecular, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo ($P = 0,013$).

A separação trabecular não apresentou diferença entre os grupos e entre os tempos ($p>0,05$).

Gráfico 5: Médias e desvios padrões dos valores da separação trabecular, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais ($p>0,05$).

Em relação ao número de trabéculas, houve diferença entre o grupo A e B e entre o grupo A e C no período de 20 dias, sendo o grupo A maior que o grupo B e C ($p=0,001$).

Gráfico 6 - Médias e desvios padrões do número de trabéculas, nos tempos de 3, 7, 20, e 40 dias de acordo com a distribuição dos grupos experimentais. *= diferença estatisticamente significativa na comparação intergrupo ($P = <0,001$).

4.3 ANÁLISE BIOMOLECULAR

Foi avaliada a expressão de genes relacionados à inflamação (IL-6, IL-10); revascularização (VEGF); reabsorção óssea (RANKL, OPG, TNF- α , Cathepsina K e TRAP) e de formação óssea (BMP-2, ALP, Osteoclastina, SP7 Osterix e RUNX2), comparando-os a calotas cranianas não enxertadas.

Inicialmente, os genes anti-inflamatórios IL-6 e IL-10 foram analisados. O gene anti-inflamatório IL-6 foi "*down*" regulado em todos os grupos e períodos, em relação ao controle (Gráficos 7,8,9,10).

Gráfico 7: Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 3 dias.

Gráfico 8: Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 7 dias.

Gráfico 9: Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 20 dias.

Gráfico 10: Expressão relativa IL-6/ β Actina. Tempo: 40 dias.

Não observamos diferença significativa na expressão de IL-6 entre os grupos ($p \geq 0,05$), evidenciando que todos produzem níveis mais baixos do anti-inflamatório IL-6 comparados ao controle. Estes níveis baixos estão diretamente relacionados à menor reabsorção óssea observada, nos marcadores de reabsorção descritos abaixo.

Diferentemente da expressão de IL-6, a expressão do gene IL-10 variou em relação ao controle. No período de 3 dias, todos os grupos mostraram uma

expressão maior ou igual do gene IL-10 em relação ao controle (Gráfico 11). Somente foi observada diferença significativa entre o grupo B e cada um dos outros grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os outros grupos ($p > 0,05$).

Gráfico 11: Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 3 dias.

Entretanto, no período de 7 dias, houve uma queda significativa ($p < 0,05$) na expressão do gene IL-10 em todos os grupos, em relação ao controle (Gráfico 12).

Gráfico 12: Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 7 dias

No período de 20 dias, houve novamente um aumento na expressão do gene da IL-10 frente ao controle. Observamos uma maior expressão dos grupos

A e B em relação ao grupo C. O grupo D mostrou uma grande variabilidade, a qual pode ser observada pelo grande desvio padrão apresentado (Gráfico 13).

Gráfico 13: Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 20 dias

Já no período de 40 dias, houve uma significativa diminuição na expressão de IL-10 nos grupos A, B e D ($p < 0,05$), quando comparados ao controle, porém o grupo C, apresentou expressão semelhante ao controle (Gráfico 14).

Gráfico 14: Expressão relativa IL-10/ β Actina. Tempo: 40 dias

Após análises dos genes relacionados à inflamação, o gene relacionado

a revascularização, VEGF foi analisado. Foi observado que no período de 3 dias, todos os grupos apresentam uma “up” regulação deste gene, frente ao gene controle. O grupo A, mostrou níveis maiores de expressão comparados aos outros grupos, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os outros grupos (Gráfico 15).

Gráfico 15: Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 3 dias

Já nos períodos de 7 e 20 dias, os grupos A, B e D, apresentaram uma diminuição na expressão de VEGF (Gráfico 16 e 17). Por outro lado, o grupo C, ainda que também apresentou uma diminuição da expressão de VEGF, manteve-se ligeiramente maior que o controle, no período de 7 dias (Gráfico 16). Ainda, no período de 20 dias, o nível de expressão de VEGF, no grupo C, mostrou-se significativamente maior ($p < 0,05$) tanto comparado ao controle como frente aos outros grupos (Gráfico 17).

Gráfico 16: Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 17: Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 20 dias

No período de 40 dias, houve uma diminuição na expressão de VEGF no grupo C, porém ainda levemente maior que o controle. Níveis semelhantes também foram observados nos grupos A e B. Já os níveis de expressão de VEGF no grupo D, mantiveram-se baixos, comparados ao controle e aos outros grupos (Gráfico 18).

Gráfico 18: Expressão relativa VEGF/ β Actina. Tempo: 40 dias

Após análise do marcador de revascularização, iniciamos a análises dos genes responsáveis pela reabsorção óssea. A expressão do gene RANKL manteve-se “*down*” regulada comparado ao controle nos períodos de 3 e 7 dias (Gráfico 19 e 20). O grupo C apresentou menores níveis de expressão do gene, no período de 3 dias, comparado aos outros grupos ($p < 0,05$). No período de 7 dias, os grupos C e D apresentaram menores níveis de expressão, comparados aos outros grupos porém sem significância estatística ($p > 0,05$), (Gráficos 19 e 20).

Gráfico 19: Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 20: Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 7 dias

Diferentemente, dos períodos anteriores, no período de 20 dias, todos os grupos apresentaram “*up*” regulação comparados ao gene controle. Não houve diferença significativa entre os grupos, entretanto, o grupo C apresentou uma ligeira menor expressão (Gráfico 21).

Gráfico 21: Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 20 dias

No período de 40 dias, observamos uma significativa diminuição na expressão de RANKL nos grupo C e D, comparados ao controle e aos níveis de expressão do período anterior. Os grupos A e B mantiveram altos níveis de

expressão de RANKL, comparados ao controle (Gráfico 22).

Gráfico 22: Expressão relativa RANK-L/ β Actina. Tempo: 40 dias

Outro gene relacionado à reabsorção óssea estudado foi a Osteoprotegerina (OPG). A expressão do gene OPG mostra inicialmente uma “down” regulação deste gene no primeiro período (3 dias), sendo repetido no período de 20 e 40 dias. Não há diferença significativa entre os grupos estudados (Gráficos 23, 25 e 26). Entretanto, no período de 7 dias, os grupos A, B e D mostram-se com uma significativa maior expressão comparado ao controle ($p < 0,05$). Porém, o grupo C, mantém uma expressão igual ao controle, e menor que todos os outros grupos ($p < 0,05$) (Gráfico 24).

Gráfico 23: Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 24: Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 25: Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 26: Expressão relativa OPG/ β Actina. Tempo: 40 dias

Outro gene estudado foi a catepsina K. A expressão do gene da Catepsina K, apresenta-se “*up*” regulado nos grupos A,B e D nos períodos de 3, 20 e 40 dias, apresentando-se “*down*” regulado somente no período de 7 dias (Gráfico 27, 28, 29 e 30). Observamos que o grupo C apresenta-se “*down*” regulado nos períodos de 3, 7 e 20 dias, e no período de 40 dias levemente “*up*” regulado. A baixa expressão de Catepsina K no grupo C é significativamente menor que a expressão nos grupos A e B, no período de 3, 7 e 40 dias (Gráficos 27, 28, 29 e 30).

Gráfico 27: Expressão relativa Cathepsina/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 28: Expressão relativa Cathepsina/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 29: Expressão relativa Cathepsina/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 30: Expressão relativa Cathepsina/ β Actina. Tempo: 40 dias

Outro gene estudado, que tem relação com a reabsorção óssea, foi o TRAP. Curiosamente, a expressão do gene TRAP apresenta-se "up" regulado em todos os grupos e em todos os períodos. Não há diferença significativa entre os grupos, nos seus períodos correspondentes (Gráficos 31, 32, 33 e 34).

Gráfico 31: Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 32: Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 33: Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 34: Expressão relativa TRAP/ β Actina. Tempo: 40 dias

Semelhante ao gene TRAP, a expressão do gene TNF ficou “*up*” regulada em relação ao controle, em todos os grupos nos períodos de 3 e 7 dias. Não houve diferença significativa entre os grupos nestes períodos. Nos períodos de 20 e 40 dias, houve uma mudança no padrão, onde todos os grupos ficaram “*down*” reguladas em relação ao controle (Gráficos 35, 36, 37 e 38).

Gráfico 35: Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 36: Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 37: Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 38: Expressão relativa TNF/ β Actina. Tempo: 40 dias

Após análise do marcador de reabsorção óssea, iniciamos a análises dos genes responsáveis pela formação óssea. Iniciamos a análise pelo gene BMP2.

A expressão do gene BMP2 manteve-se “*up*” regulada comparado ao controle nos períodos de 3 e 7 dias (Gráficos 39 e 40). Nos períodos, 20 e 40 dias, houve uma “*down*” regulação do gene em todos os grupos. Entretanto, no período de 20 dias, semelhante ao período de 3, o grupo C apresentou uma significativa expressão de BMP2 em relação aos outros grupos ($p < 0,05$) (Gráficos 41 e 42).

Gráfico 39: Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 40: Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 41: Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 42: Expressão relativa BMP2/ β Actina. Tempo: 40 dias

Observamos, novamente que comparado aos outros grupos, o grupo C comporta-se de forma diferente, mantendo a expressão do gene BMP2 aumentado, após 7 dias, quando os outros grupos tem uma queda após este período. No grupo C, a diminuição da expressão de BMP2 só ocorre no período de 40 dias.

Outro gene estudado, que tem relação com a formação óssea, foi o gene da Osteocalcina. O gene da Osteocalcina, se apresentou “down” regulado nos períodos 3 e 7 dias, comparado ao controle (Gráficos 43 e 44). Nos períodos 20

e 40 dias, o grupo C - D e B - C respectivamente, apresentaram níveis significativamente maiores que os outros grupos ($p < 0,05$) (Gráficos 45 e 46).

Gráfico 43: Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 44: Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 45: Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 46: Expressão relativa Osteocalcina/ β Actina. Tempo: 40 dias

Novamente, o Grupo C possui altos níveis de expressão de gene relacionado a formação óssea, sendo a osteocalcina encontrada em alta expressão, principalmente nos períodos 20 e 40 dias. Interessantemente, o grupo D, apresentou altos níveis de osteocalcina no período de 20 dias, o qual não é mantido no período de 40 dias. Já neste período, observamos o aumento da expressão de osteocalcina também no grupo B, semelhante ao encontrado no Grupo C.

Outro gene estudado que possui relação com a formação óssea, foi o gene Runx2. Semelhante ao anterior o gene RUNX-2 também apresentou uma

“down” regulação, em todos os grupos, nos períodos de 3 e 7 dias, quando comparado ao controle, condizendo com a regulação dos genes Rankl e OPG nestes mesmos períodos. Entretanto, nos períodos de 20 e 40 dias, este gene apresentou-se “up” regulado nos grupos A/B/D e A/B respectivamente (Gráficos 47, 48, 49 e 50). Esta “up” regulação, condiz com a diminuição da expressão dos gene OPG, neste mesmo período de tempo.

Gráfico 47: Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 48: Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 49: Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 50: Expressão relativa Runx2/ β Actina. Tempo: 40 dias

Semelhante ao gene da Osteocalcina e RUNX-2, o gene ALP também apresentou uma “*down*” regulação, em todos os grupos, nos períodos de 3 e 7 dias, quando comparado ao controle. Entretanto, nos períodos de 20 e 40 dias, este gene apresentou-se “*up*” regulado em todos os grupos. (Gráficos 51, 52, 53 e 54).

Gráfico 51: Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 52: Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 53: Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 54: Expressão relativa ALP/ β Actina. Tempo: 40 dias

Diferente dos outros genes responsáveis pela formação óssea, o gene SP7 apresentou uma “*up*” regulação, em todos os grupos, nos períodos de 3 e 7 dias, quando comparado ao controle. Entretanto, nos períodos de 20 e 40 dias, este gene apresentou-se “*down*” regulado nos grupos A, B e D. Entretanto o grupo C manteve uma maior expressão, quando comparados ao controle e aos outros grupos. (Gráficos 55, 56, 57 e 58).

Gráfico 55: Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 3 dias

Gráfico 56: Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 7 dias

Gráfico 57: Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 20 dias

Gráfico 58: Expressão relativa SP7/ β Actina. Tempo: 40 dias

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A reconstrução dos maxilares pelo método de enxertia óssea é considerada o procedimento cirúrgico mais utilizado frente à perda fisiológica ou traumática a que esses ossos estão sujeitos. Entre os fatores que influenciam no sucesso dos procedimentos de enxertia óssea, podemos citar: origem do enxerto, posição, microarquitetura, carga e tensão, a orientação, a presença de periósteo, leito receptor, a taxa de revascularização e método de fixação (Tong, 2000). A perda de volume variável causada por reabsorção está intimamente relacionada com o tipo de fixação utilizada. Vários estudos demonstram que a fixação com parafusos aumenta a sobrevivência dos enxertos *onlay* em comparação com fios ou sem fixação, especialmente em áreas móveis (Lin et al., 1990; Phillips et al., 1988).

Atualmente, o uso de placas e parafusos de titânio é o método mais utilizado na fixação de enxertos ósseos, por promover uma maior estabilidade dos mesmos. Porém, o uso desses materiais traz uma série de desvantagens como: a produção de artefatos em exames de imagem; alto custo; risco de exposição do material levando à infecção, além de outras citadas anteriormente. Surge daí, a necessidade de se pesquisar técnicas de fixação alternativas capazes de fornecer um nível de estabilidade semelhante ao proporcionado por meio de parafusos, sem as desvantagens dos mesmos.

Os adesivos à base de cianoacrilato se apresentam como uma possível alternativa aos métodos de fixação dos blocos ósseos, ao promover uma fixação menos rígida sem prejudicar a incorporação e manutenção volumétrica dos enxertos. O N-Butil-2-Cianocrilato (NB-Cn) foi utilizado pela primeira vez em fixação óssea por Mehta et al. em 1987. Os autores utilizaram NB-Cn para osteossíntese em 10 casos com fixação maxilomandibular por apenas 48-72 h. Eles não relataram nenhuma mobilidade dos segmentos fraturados, quando testado com força manual moderada. Estudos têm demonstrado que cadeias de ésteres mais curtos resultam numa maior força de adesão e maior histotoxicidade (Weber et al., 1984; Shermak et al., 1998). Já os compostos de cadeia mais longa degradam-se mais lentamente e provocam menos resposta

inflamatória mas resultam em maior atraso no reparo e sua força diminui (Tseng et al., 1990).

Vários são os relatos sobre a eficácia da NB-Cn na fixação de fragmentos ósseos na região maxilo-facial. Em 1995, Amarante et al. compararam o método de fixação de fragmentos osteotomizados criados no esqueleto facial de mini-porcos, mostrando que o NB-Cn era tão efetivo quanto as placas e parafusos. Eles observaram a ocorrência de união óssea entre os fragmentos e o sítio receptor para ambos os tipos de fixação e encontraram que a resistência biomecânica da união óssea também foi semelhante. Em 1997, Kim usou NB-Cn na fixação de fraturas dos ossos da face, com múltiplos pequenos fragmentos em 10 pacientes. Ele avaliou os resultados com tomografia computadorizada 3D e demonstrou excelente reconstrução. Em 1998, Shermak et al. avaliaram o reparo de segmentos de osso da calvária de coelho fixados com microplacas ou adesivo à base de cianoacrilato. Após 8 semanas de fixação, os autores observaram que a estabilidade dos segmentos promovida pelo adesivo resultou em um reparo ósseo comparável ao dos segmentos fixados com placa e parafuso. Eles também investigaram as respostas inflamatórias dos tecidos moles adjacentes e não encontraram nenhuma toxicidade. Da mesma forma, no presente estudo, não percebeu-se reação inflamatória do adesivo relacionada ao enxerto ou espaços medulares. Foi encontrada somente uma discreta reação inflamatória aguda no tecido conjuntivo circundante de todos os grupos no período de 3 dias, possivelmente devido ao trauma cirúrgico. De Oliveira Neto et al. utilizaram NB-Cn na fixação de blocos ósseos bloco bicorticais da calota craniana na mandíbula de coelhos e compararam com fixação com um parafuso. Eles realizaram avaliações histológicas, imuno-histoquímicas tomográficas da fixação do enxerto com o NB-Cn na primeira e sexta semana de pós-operatório. Além do exame histológico da interface enxerto/leito receptor, eles também analisaram a manutenção do volume de enxerto ósseo via imagens tomográficas e as diferenças no nível de proteína fosfatase ácida resistente ao tartarato envolvido na reabsorção óssea através de análises imuno-histoquímicas. Eles relataram que, embora a fixação concedida pelo NB-Cn fosse menos rígida em relação ao parafuso, o adesivo permitiu estabilidade suficiente para o enxerto,

proporcionando a neoformação óssea na interface e nas margens do bloco ósseo, corroborando com nossos resultados.

Neste estudo, não foi possível identificar diferenças histológicas entre os grupos nos períodos de 3 e 7 dias. Os enxertos encontravam-se praticamente preservados, sem sinais de reabsorção. Saska et al. (2009) em estudo histométrico em calvária de coelhos, encontraram uma maior preservação do volume dos enxertos fixados com etil-cianocrilato comparados com parafusos de titânio. Os blocos fixados com parafuso sofreram maior perda de volume ósseo. Os autores atribuíram esse efeito à pressão exercida pela compressão do parafuso sobre o enxerto. Entretanto, no grupo etil-cianocrilato, os enxertos não haviam sido completamente incorporados ao leito ósseo receptor mesmo após 120 dias de experimentação. Além disso, a falta de perfurações no leito receptor e a presença do adesivo mesmo após 120 dias no estudo de Saska e colaboradores pode ter interferido na revascularização e incorporação dos enxertos, já que é conhecido que a degradação do etil-cianocrilato ocorre somente após 12 meses (Toriumi et al., 1990), o que pode explicar em parte o resultado obtido pelos autores. No nosso estudo foram feitas perfurações no leito receptor visando uma revascularização precoce. Bas et al. (2012) não encontraram evidência de formação óssea entre o enxerto e o osso receptor em 4 ou 12 semanas. Em apenas 45% dos enxertos fixados com cianoacrilato, os autores observaram a formação de osso sob o perióstio nas margens periféricas do enxerto, o que poderia explicar a vitalidade do enxerto dessas amostras. O nível de necrose do enxerto foi significativamente mais elevada no lado do cianoacrilato do que no lado do parafuso tanto em 4 como em 12 semanas. Neste estudo, o adesivo foi aplicado somente na periferia do bloco ósseo, permitindo revascularização e integração de todos os blocos enxertados. Já nos estudos de Saska et al. (2009) e Bas B. et al. (2012), o adesivo foi aplicado em toda a extensão da interface entre o enxerto e o leito receptor. A presença do material adesivo nessa área atuou como uma barreira que inibiu a migração das células mesenquimais de tecidos circundantes que se transformaram em osteoblastos por meio de um processo de indução. Shermak et al. (1998) sugeriram que o adesivo em degeneração parecia proporcionar um *scaffold* para a formação de osso novo, o que não foi observado em nosso estudo. É importante que a

camada de cola seja fina de modo que o enxerto não seja isolada do periósteo ou do leito receptor, levando à possibilidade de necrose causada pela revascularização tardia (Amarante et al., 1995; Shermak et al., 1998; Tong, 2000). Aos 40 dias, percebeu-se formação de osso em diferente graus de maturação em todos os grupos, porém, no grupo fixado somente com adesivo, nas áreas onde havia restos de adesivo, o enxerto não foi incorporado totalmente ao leito receptor. O mesmo ocorreu nos relatos de Saska et al. (2009) e Bas et al., (2012) onde, apesar da integração do enxerto, o adesivo atuou isolando o contato entre leito receptor e enxerto na área aplicada. Esse resultado sugere que um fator importante relacionado ao uso dos adesivos é sua aplicação somente na periferia do enxerto, evitando assim, o isolamento entre as superfícies do enxerto e leito receptor, evitando um possível atraso na revascularização desse enxerto.

A análise histológica do tecido ósseo apresenta uma ferramenta valiosa para observar e descrever características morfológicas desse tecido, no entanto, ela não permite a reconstrução tridimensional a partir de cortes em série, uma vez que cerca de 50µm de espessura são perdidos durante o processo de confecção da lâmina (Stiller et al., 2009).

A micro-tomografia é um método não destrutivo, rápido e preciso que permite medidas do osso trabecular e cortical. Fornece representação espacial da formação óssea na interface enxerto/leito receptor em poucos micrômetros e é capaz de avaliar morfometria qualitativa e quantitativa da integração óssea nos mesmos (Swain e Xue, 2009).

O volume ósseo, número de trabéculas e espessura trabecular, são variáveis que indicam a densidade óssea em diferentes expressões, enquanto a separação trabecular pode ser interpretada como a espessura das cavidades do osso esponjoso, as distribuições as quais correspondem às características observadas em 3 dimensões (Lu & Rabie, 2003).

A despeito das diferenças estatisticamente significantes para alguns dos parâmetros utilizados na análise microtomográfica, de maneira geral, essas diferenças não são biologicamente importantes para que pudessem ser atribuídas ao tipo de fixação.

Em relação à análise biomolecular, foi observado que as interleucinas 6 e

10 estão “*down*” reguladas, propiciando uma manutenção do processo inflamatório, porém com diminuição da possibilidade de reabsorção óssea, a qual é diretamente estimulada por estes genes (Steeve et al., 2004; Sasaki et al., 2000).

Observamos que o grupo C manteve uma alta expressão do gene VEGF, mostrando que a fixação do enxerto por NB-Cn pode promover a angiogênese, o que é crucial para a manutenção e remodelação do enxerto. O fator de crescimento endotelial vascular é uma proteína produzida que estimula a angiogênese e vasculogênese. Faz parte do sistema que restaura o fornecimento de oxigênio aos tecidos, quando a circulação sanguínea é inadequada (Cooper et al., 2013).

O RANKL é um ligante do receptor de ativação do fator nuclear kappa B-ligando, também conhecido como membro do fator de necrose tumoral-superfamília 11 (TNFSF11), induzida pela ativação de citocinas relacionadas com TNF (TRANCE), ligante de osteoprotegerina (OPGL), e fator de diferenciação de osteoclastos (ODF) (Burcklay et al., 2003). Este marcador é crítico para o metabolismo ósseo adequado. Esta molécula ligada à superfície (também conhecido como CD254) encontrada em osteoblastos serve para ativar os osteoclastos, que são as células envolvidas na reabsorção óssea. Atividade osteoclástica é acionada pela ligação à superfície celular do RANKL, ativando os osteoclastos (Burcklay et al., 2003).

Os níveis de expressão de RANKL mantiveram-se baixos no grupo C, nos períodos 3, 7 e 40 dias, sendo visto menores níveis de expressão, quando comparados com os outros grupos. Estes dados sugerem que a fixação do enxerto utilizando a cola, pode promover uma menor expressão do gene RANKL, levando a uma menor reabsorção óssea neste grupo.

A osteoprotegerina é um receptor de citocina, e um membro do fator de necrose tumoral (TNF). Osteoprotegerina é um receptor chamariz para o ativador do receptor do fator nuclear kappa B ligante (RANKL). Após ligação do RANKL, OPG inibe nuclear kappa B (NF-kB), que é um fator central e rápido de transcrição para genes relacionados ao sistema imunológico, e um regulador chave da inflamação, imunidade inata, sobrevivência e diferenciação celular. (Hofbauer et al., 2001; Barcklay et al., 2003). OPG pode reduzir a produção de

osteoclastos, inibindo a diferenciação de precursores de osteoclastos e também regulando a reabsorção de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*. O aumento da expressão do RANKL é fundamental para a reabsorção óssea. Muitas vezes, OPG é diminuída e a expressão do RANKL é aumentada. O aumento da expressão RANKL promove a perda de osso, enquanto a expressão diminuída RANKL reduz a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea (Boyle et al., 2003; Hofbauer et al., 2004).

O TRAP é uma metaloenzima monomérica glicosilada expressa em mamíferos e sintetizada como proenzima latente e ativada por clivagem proteolítica e redução (Baumbach et al., 1991; Ljusberg et al., 2005). Em estudos de ratos knockout, Trap ^{-/-} exibem osteoporose leve, associada à atividade reduzida dos osteoclastos (Angel et al., 2000). Os genes relacionados à reabsorção óssea estão relativamente menos expressos no grupo C.

O gene BMP-2, assim como outras proteínas morfogenéticas do osso, desempenha um papel importante no desenvolvimento de osso e cartilagem, tendo sido demonstrado grande benefício do seu uso, após cirurgias orais, maxilofaciais e de implantodontia (Allegrini et al., 2004; Cancela et al., 1990).

Observamos, novamente que comparado aos outros grupos, o grupo C comporta-se de forma diferente. Ele mantém a expressão do gene BMP2 aumentado, após 7 dias, quando os outros grupos tem uma queda após este período. No grupo C, a diminuição da expressão de BMP2 só ocorre no período de 40 dias.

A proteína Runx2 está diretamente relacionada à formação óssea e é necessária tanto para o desenvolvimento dos ossos intramembranosa e endocondral, bem como morfogênese dentária (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; D' Souza et al., 1999). Vários estudos *in vitro* demonstram que Runx2 podem afetar a formação de osteoclastos. Os osteoblastos de calvária derivados de roedores Runx2 ^{-/-} produzem mais osteoprotegerina (OPG) e menos RANKL do que aqueles a partir de roedores do tipo selvagem (Enomoto et al., 2003). Runx2 também foi demonstrada que regulam a transcrição do gene RANKL (Mori et al., 2006). Além disso, recentemente foi demonstrado que Runx2 media a produção de RANKL induzido pela BMP-2 por condrócitos e, assim, influencia a osteoclastogênese (Usui et al., 2008). Assim, em adição ao seu papel essencial

no desenvolvimento de osteoblastos e hipertrofia de condrócitos, Runx2 pode também regular a função dos osteoclastos indiretamente, através de RANKL e OPG.

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo e revisão da literatura, a utilização do N-butil-2-cianoacrilato se mostra um procedimento mais simples, rápido e confiável com resultados satisfatórios para reconstruções ósseas com enxertos *onlay*.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir:

1. A análise histológica mostrou que a integração do enxerto fixado utilizando o composto N-Butil-2-Cianocrilato foram semelhantes aos grupos com parafuso;
2. A análise através de micro CT, apesar das diferenças estatisticamente significantes para alguns dos parâmetros utilizados, de maneira geral, essas diferenças não foram biologicamente importantes para que pudessem ser atribuídas ao tipo de fixação.
3. Após avaliar a expressão de diferentes genes (anti-inflamatórios, de revascularização, de reabsorção óssea e de formação óssea), o composto N-Butil-2-Cianocrilato mostrou-se promissor como método de fixação do enxerto;
4. O método de fixação utilizando o composto N-Butil-2-Cianocrilato, mostrou um alto potencial como método de fixação do enxerto, apresentando um maior potencial anti-inflamatório, revascularizador e de formação óssea, bem como, uma menor reabsorção óssea, permitindo um melhor aproveitamento do enxerto, necessário quando o aumento de volume ósseo é requerido para a reabilitação com implantes dentais;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Ahn DK, Sims CD, Randolph MA, O'Connor D, Butler PEM, Amarante MJT, Yaremchuk MJ. Craniofacial skeletal fixation using biodegradable plates and cyanoacrylate glue. *Plast Reconstr Surg* v. 99 p. 1508-1517, 1997.
- Allegrini, S.; Yoshimoto, M.; Salles, M.B.; König, B. Bone regeneration in rabbit sinus lifting associated with bovine BMP. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, v. 68, p. 127-31, 2004.
- Amarante MT, Constantinescu MA, O'connor D, Yaremchuk MJ. Cyanoacrylate fixation of the craniofacial skeleton: an experimental study. *Plast Reconstr Surg* v.95, p.639-46, 1995.
- Angel, N.Z.; Walsh, N.; Forwood, M.R.; Ostrowski, M.C.; Cassady, Al.; Hume, D. A. Transgenic mice overexpressing tartrate-resistant acid phosphatase exhibit an increased rate of bone turnover. *J. Bone Miner. Res.*, v. 15, p. 103–10, 2000.
- Bas B., B. O zden, B. Bekcioglu, K.O. Sanal, M.Y. Gulbahar, Y.B. Kabak: Screw fixation is superior to N-butyl-2-cyanoacrylate in onlay grafting procedure: a histomorphologic study. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* v. 41, p.537–543, 2012.
- Baumbach, G.A.; Saunders, P.T.; Ketcham, C.M.; Bazer, F.W.; Roberts, R.M.; Uteroferrin contains complex and high mannose-type oligosaccharides when synthesized in vitro. *Mol. Cell. Biochem.* v. 105, p. 107-17, 1991.
- Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* V. 25, n. 7, p. 1468-86, 2010.
- Boyle, W.J.; Simonet, W.S.; Lacey, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v. 423, p. 337-342, 2003.
- Brånemark PI, Lindström J, Hallén O, Breine U, Jeppson PH, Ohman A. Reconstruction of the defective mandible. *Scand J Plast Reconstr Surg.* v. 9, n. 7, p. 116-128, 1975.
- Bucklay, K.A.; Fraser, W.D. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann. Clin. Biochem*, v. 39, p.551-6, 2003.
- Cancela L, Hsieh CL, Francke U, Price PA. Molecular structure, chromosome assignment, and promoter organization of the human matrix Gla protein gene. *J. Biol. Chem.* v. 265, p.15040–8., 1990.

Chacon, G.E.; Ellis, J.P.; Kalmar, J.R.; McGlumphy, E.A. Usin Resorbable Screws for Fixation of Cortical Onlay Bone Grafts: An in Vivo Study in Rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 62, p. 1396 - 1402. 2004.

Choi, B.; Kim, K.; Huh, J. Cyanoacrilate adhesive for closing sinus membrane perforations during sinus lifts. *J. Craniomaxillofac Surg.* V. 34. p. 505-509. 2006.

Cooper, M.; Dimitria, V.; Sherif, Y.; Steven, A.S.; Alison, J.C.; Bishoy R. Increased renal expression. Of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in Experimental Diabetes. *Diabetes*, v. 48, p. 34-54, 2013.

Coover HN, Joyner FB, Shearer NH. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives. *Soc Plast Eng.* V. 15, p.413-7, 1959.

Dadas B, Aklan S, Ciftci M, Basak T. Treatment of tripod fracture of zygomatic bone by N-2-buty cyanoacrylate glue fixation, and its effects on the tissues. *Eur Arch Otorhinolaryngol* v. 264, p.539-44, 2007.

de Oliveira Neto PJ, Cricchio G, Hawthorne AC, Okamoto R, Sennerby L, Lungren S, Salata LA. Tomographic, histological, and immunohistochemical evidences on the use of N-butyl-2-cyanoacrylate for onlay graft fixation in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res* v. p. 2010.

D'Souza RN, Aberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G, et al. Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development*, v. 126, p. 2911-2920, 1999.

Enomoto H, Shiojiri S, Hoshi K, Furuichi T, Fukuyama R, Yoshida CA, et al. Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. *J Biol Chem*, v. 278, p. 23971-23977, 2003.

Faria, P.E.P.; Okamoto, R.; Bonnilha-Neto, R.M.; Xavier, S.P.; Santos, A.C.; Salata, LA Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res.* V. 19, p. 393 – 401. 2008.

Hofbauer L.C.; Schoppet, M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA*, v. 292, p. 490-495, 2004.

Hofbauer, L.C; Neubauer, A.; Heufelder, A.E. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer*, v. 92 p. 460-70, 2001.

Inal, S.; Yilmaz, N.; Nisbet, C.; Güvenç, T.; Samsun, T. Biochemical and Histopathological Findings of N-Butyl-2-Cyanocrylate in Oral Surgery - an

experimental study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Oral Endodontics*, v. 102, p. 14-17, 2006.

Mehta MJ, Shah KH, Bhatt RG. Osteosynthesis of mandibular fractures with N-butyl cyanoacrylate: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* v.45, p. 393-6, 1987.

Kim YO. Use of cyanoacrylate in facial bone fractures. *J Craniofac Surg*. v.8, p. 229-34, 1997.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, v. 89, p. 755-764, 1997.

Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MD, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone graft. An experimental study. *Plast Reconstr Surg*: v. 86, p. 449-456, 1990.

Ljusberg, J.; Wang, Y.; Lång, P.; Norgård, M.; Dodds, R.; Hultenby, K.; Ek-Rylander, B.; Andersson, G. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *J. Biol. Chem.*, v. 280, p. 28370-81, 2006.

Lu M., Rabie A. B. M. Microarchitecture of rabbit mandibular defects grafted with intramembranous or endochondral bone shown by micro-computed tomography. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* v. 41, p. 385-391, 2003.

Mehta MJ, Shah KH, Bhatt RG. Osteosynthesis of mandibular fractures with n-butyl cyanoacrylate: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*: v.45, p. 393-396, 1987.

Mish, C.M. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 12, p. 767-76, 1997.

Mori K, Kitazawa R, Kondo T, Maeda S, Yamaguchi A, Kitazawa S. Modulation of mouse RANKL gene expression by Runx2 and PKA pathway. *J Cell Biochem*, v. 98, p. 1629-1644, 2006.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, v. 89, p. 765-771, 1997.

Pedrosa Jr, W.F.; Okamoto, R.; Faria, P.E.P.; Arnez, M.F.; Xavier, SP.; Salata, LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone grafts remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res*. V. 20 p. 1254-64, 2009.

Pelissier, P.; Casoli, V.; Le Bail, B.; Martin, D.; Baudet, J. Internal Use of n- Butyl 2-Cyanoacrylate (Indermil) for Wound Closure: An Experimental Study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 108, p. 1661-66, 2001.

Phillips JH, Rahn BA. Fixation effects on membranous and endochondral onlay bone-graft resorption. *Plast Reconst Surg*: v. 82 p.872–77, 1988.

Raghoobar, G.M.; Liem, R.S.B.; Bos, R.R.M.; Van der Wal, J.E.; Vissink, A. Resorbable screws for fixation of autologous bone grafts. *Clinical Oral Implants Research*, v.17, p. 288-293. 2006.

Sasaki, H.; Hou, L.; et al. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J. Immunol*, v. 165, p. 3626-30, 2000.

Saska S., E. Hochuli-Vieira, A. M. Minarelli-Gaspar, M. F. R. Gabrielli, M. V. Capela, M. A. C. Gabrielli: Fixation of autogenous bone grafts with ethylcyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. v. 38, p. 180-86, 2009.

Shermak MA, Wong L, Inoue N, Crain BJ, Im MJ, Chao EYS, Manson PN. Fixation of the craniofacial skeleton with butyl-2-cyanoacrylate and its effect on histotoxicity and healing. *Plast Reconst Surg*. v. 102, p. 309-18, 1998.

Steeve K. T., Marc P., Sandrine T., Dominique H., Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. V. 15, n.1, p. 49-60, 2004.

Stiller, M., Rack A, Zabler S, Goebbels J, Dalügge O, Jonscher S, Knabe C. Quantification of bone tissue regeneration employing beta-tricalcium phosphate by three-dimensional non-invasive synchrotron micro-tomography-a comparative examination with histomorphometry. *Bone*, v. 44, n.4, p. 619-28, 2009.

Sundaram CP, Keenan AC. Evolution of hemostatic agents in surgical practice. *Indian J Urol*, v. 26, p. 374-8, 2010.

Swain MV, Xue J. State of the art of Micro-CT applications in dental research. *International Journal of Oral Science*; v. 1, n.4, p. 177-88, 2009.

Tong L, Buchman SR. Facial bone grafts: contemporary science and thought. *J Cranio-maxillo Trauma*. v. 6, p. 31-41, 2000.

Toriumi, D.M.; Raslan, W.F.; Friedman, M.; Tardy, E. Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Archives Otolaryngology Head Neck Surgery*, v.116, p.546-550, 1990.

Tseng YC, Tabata Y, Hyon SH, Ikada Y. In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method. *J Biomed Mater Res*; v.24 1355–67, 1990.

Usui M, Xing L, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe R, Chen D, et al. Murine and chicken chondrocytes regulate osteoclastogenesis by producing RANKL in response to BMP2. *J Bone Miner Res*, v. 23, p. 314-325, 2008.

Van den Ende, E.D.; Vriens, P.W.H.E; Allema, J.H.; Breslau, P.J.; Adhesive bonds or percutaneous absorbable suture for closure of surgical wounds in children. Results of a prospective randomized trial. J Pediatr Surg. v. 39. p. 1249-51, 2004.

Weber SC, Chapman MW. Adhesives in orthopaedic surgery a review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. Clin Orthop R Res: v. 191, p. 249-256, 1984.