

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
CENTRO INTEGRADO DE SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PPG – MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

RODRIGO FALCI SANTOS

**AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA DE ENXERTOS ÓSSEOS
FIXADOS PELO ETIL - CIANOACRILATO: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Juiz de Fora

2013

RODRIGO FALCI SANTOS

**AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA DE ENXERTOS ÓSSEOS
FIXADOS PELO ETIL - CIANOACRILATO: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao PPG –
Mestrado em Clínica Odontológica da
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre. Área de
concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Lopes Devito

Juiz de Fora
2013

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santos, Rodrigo Falci.

AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA DE ENXERTOS ÓSSEOS FIXADOS PELO ETIL - CIANOACRILATO: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS / Rodrigo Falci Santos. -- 2013.
72 f.

Orientadora: Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Coorientadora: Karina Lopes Devito

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2013.

1. Microtomografia Computadorizada. 2. Enxerto Ósseo. 3. Cianoacrilato. I. Assis, Neuza Maria Souza Picorelli, orient. II. Devito, Karina Lopes, coorient. III. Título.

Rodrigo Falci Santos

**AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA DE ENXERTOS ÓSSEOS
FIXADOS PELO ETIL - CIANOACRILATO: UM ESTUDO
EXPERIMENTAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao PPG –
Mestrado em Clínica Odontológica da
Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre. Área de
concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em ____ de _____ de 2013, pela Banca Examinadora composta
por:

Prof^a. Dr^a. Neuza Maria Souza Picorelli Assis (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Karina Lopes Devito (Co-orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Pietro Mainenti
Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC – JF)

Com muito carinho dedico este trabalho:

*À Deus, aos meus pais José Valter e Vânia e a minha
noiva e colega de trabalho Cláudia.*

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação marca o fim de mais uma importante etapa da minha vida. Então, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma decisiva para a sua concretização.

*À **Deus**, o que seria de mim sem a fé que eu tenho nele. Mostrou claramente pra mim o deveria fazer nas horas de incerteza.*

Agradeço a vida de todos os animais utilizados neste trabalho, e dizer que elas não foram tiradas em vão e sim para um bem maior.

***Aos meus pais José Valter e Vânia**, que com muito carinho e apoio, não mediram esforços e enfrentaram vários desafios para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.*

*À **minha noiva Cláudia**, pelo amor, carinho e compreensão dispensados a mim. Uma grande parceira nos momentos mais difíceis desta jornada. Te amo muito!*

***Aos meus irmãos Igor e Erick**, pelo apoio e companheirismo.*

*À **minha sogra e segunda mãe Dona Isabel**, pelo incentivo e dedicação.*

*À **minha orientadora e Mestra Professora Dra. Neuza Maria Souza Picorelli Assis**, pela paciência, confiança e sabedoria. Seus ensinamentos me mostraram o verdadeiro caminho para a ciência. Para mim, um exemplo profissional e de conduta. Amizade que certamente persistirá por muito tempo.*

*À **Professora Dra. Karina Lopes Devito**, por não medir esforços em querer me ajudar. Obrigado pela companhia e orientação para realização das imagens.*

***Ao Professor Dr. Pietro Mainenti**, por abrir as portas para a especialidade de Cirurgia Bucomaxilofacial. Ao longo de 9 anos construímos uma estreita relação de amizade e parceria profissional, que culmina neste momento com sua participação na minha banca de Mestrado.*

*À **Professora Dra. Nádia Raposo**, pelo conhecimento, sabedoria e por abrir as portas do seu biotério no momento de maior indefinição do meu trabalho. Ela foi realmente um “divisor de águas” para que pudéssemos dar continuidade a esta pesquisa.*

Às amigas e companheiras de mestrado Paula Chandretti e Thaís Bittencourt, pela amizade, apoio, incentivo e parceria profissional. Vocês foram, sem dúvida alguma, meu braço direito nesta jornada.

Aos alunos da Graduação e futuros colegas Thiago Duque, Priscila Ferreira e Carolina Picinini, pela ajuda e notável senso de equipe que tiveram com este trabalho. Podem contar comigo!

Aos colegas e amigos Gustavo Saggioro e Gladson Gurgel pela amizade, confiança e incentivo para desenvolver este trabalho.

Aos médicos veterinários Dr. Felipe e Dr. Leonardo, pela boa vontade e valiosas orientações para elaboração deste estudo.

Aos colegas e amigos do Curso de Mestrado, pelo convívio e troca de conhecimentos.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação – Mestrado em Clínica Odontológica, Prof^a. Dra. Maria das Graças Afonso de Miranda Chaves, pela oportunidade e conduta deste programa.

À secretária do Mestrado em Clínica Odontológica Wanessa Alonso, pela sua atenção e empenho com este programa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Martin Luther King)

RESUMO

Este ensaio pré-clínico se propôs avaliar e comparar o volume ósseo na interface enxerto/leito receptor, utilizando o etil-cianoacrilato (Super Bonder Flex Gel®) e parafusos de titânio como agentes de fixação na incorporação de enxertos ósseos, verificado por meio de microtomografia computadorizada. Para tal, utilizou-se 12 ratos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, (Wistar), machos adultos com aproximadamente três meses de idade. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos de seis, com um grupo controle (grupo Parafuso Titânio – PT), no qual foi utilizado um parafuso de fixação interna rígida para estabilização do enxerto, e um grupo experimental (grupo Super Bonder Flex Gel® - SB), no qual foi aplicado o adesivo para estabilizar o enxerto ósseo. O procedimento foi realizado sob anestesia geral, removendo-se um enxerto em bloco do osso parietal esquerdo e fixando-o no osso parietal direito na calvária dos animais. Após 30 dias de cirurgia os 12 animais foram submetidos à eutanásia e o material enxertado foi submetido à análise microtomográfica. O teste U de *Mann Whitney*, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros avaliados (volume total-TV, volume ósseo-BV, fração do volume-BV/TV, espessura trabecular-Tb.Th, distância intertrabecular-TB.Sp e número de trabéculas-Tb.N) em ambos os grupos, com exceção da distância entre as trabéculas (Tb.Sp). O grupo SB apresentou uma Tb.Sb significativamente maior ($p=0,015$). Desta forma pode-se concluir que o exame de microtomografia computadorizada foi capaz de detectar formações de tecido ósseo mineralizado na interface enxerto/leito receptor após 30 dias do experimento. Além disso, o etil-cianoacrilato foi tão eficiente quanto o parafuso de titânio na estabilização e incorporação do enxerto ósseo na calvária de ratos, tanto em relação aos parâmetros volumétricos, quanto em relação aos parâmetros de densidade óssea.

Palavras-chave: Microtomografia Computadorizada. Enxerto Ósseo. Cianoacrilato.

ABSTRACT

*This preclinical trial was developed with the aim of evaluating and comparing the bone volume in the interface bone / graft, using ethyl-cyanoacrylate (Super Bonder Flex Gel ®) and titanium screws as fixing agents in bone graft incorporation, evaluated by computed microtomography. To verify the efficiency of the tested product, 12 adult male rats of the species *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) of approximately three months of age were randomly divided into two groups of six rats each. In the control group (PT), a screw internal fixation was used to stabilize the graft. In the experimental group (SB) an adhesive of ethyl- cyanoacrylate was used. Under general anesthesia a block graft was removed from the left parietal bone and fixed on the right parietal bone, in the calvaria of the animal. Thirty days after the surgery, all animals were euthanized and the grafted material analyzed by computed microtomography. The Mann Whitney U test did not show any statistically significant difference between the proposed parameters (Total volume – TV, Bone volume – BV, Bone volume fraction – BV/TV, Trabecular thickness – Tb.Th, Trabecular separation – Tb.Sp and Trabecular number – Tb.N) in both groups, except for the Trabecular separation (Tb.Sp). The SB group presented a Tb.Sp higher than the PT group ($p = 0.015$) with statistical significance. Therefore, was possible to conclude that the computed microtomography test was able to detect mineralized bone tissue formations in the interface bone / graft after 30 days. Also the volumetric parameters and the parameters of bone density for ethyl-cyanoacrylate was as efficient as the titanium screw in bone graft incorporation in rat calvaria.*

Keywords: *Computed Microtomography. Bone Graft. Cyanoacrylate.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Anestesia do animal	33
Figura 2	Tricotomia na região da calota craniana	33
Figura 3	Posicionamento do animal na placa aquecida.....	34
Figura 4	Exposição cirúrgica da calota craniana.....	35
Figura 5	A) Osteotomia do enxerto na região parietal do grupo SB. B) Destacamento do enxerto.....	36
Figura 6	A) Osteotomia do enxerto no osso parietal no grupo PT, mostrando a perfuração para fixação do parafuso. B) Perfuração para fixação do parafuso no leito receptor.....	36
Figura 7	A) Parafuso de titânio com 10 mm de comprimento. B) Corte do parafuso com alicate.....	37
Figura 8	A) Fixação do enxerto. B) Enxerto fixado com parafuso de titânio.....	37
Figura 9	A) Osteotomia do enxerto do grupo SB. B) Fixação do enxerto com o adesivo aplicado nos bordos do bloco.....	38
Figura 10	Sutura com pontos simples	38
Figura 11	A) Osteotomia do bloco ósseo contendo o enxerto no grupo PT. B) Espécime a ser avaliado pela microCT.....	39
Figura 12	A) Osteotomia do bloco ósseo contendo o enxerto no grupo SB. B) Espécime a ser avaliado pela microCT.....	40
Figura 13	Aparelho de microCT (Skyscan – Bélgica – modelo 1172)	41
Figura 14	Espécime do grupo PT embalado em papel filme.....	41
Figura 15	Espécime do grupo SB embalado em papel filme.....	42

Figura 16	Espécime estabilizado no porta-amostra para aquisição da imagem.....	42
Figura 17	Reposicionamento dos planos da imagem pelo <i>software Data Viewer</i> A) plano coronal, B) plano transaxial, C) plano sagital.....	43
Figura 18	Seleção da linha inicial do enxerto na imagem pelo <i>software CTanalyser (Bottom)</i>	45
Figura 19	Seleção da linha final do enxerto na imagem (<i>Top</i>).....	45
Figura 20	Seleção da linha base (intermediária).....	46
Figura 21	Imagem binarizada. Em branco o tecido mineralizado e em preto o tecido não mineralizado.....	47
Figura 22	A) Imagem original, B) Imagem binarizada com <i>threshold</i> correto C) Imagem binarizada com <i>threshold</i> elevado D) Imagem binarizada com <i>threshold</i> baixo.....	47
Figura 23	ROI em vermelho posicionada no lado direito da imagem.....	48
Figura 24	As dimensões da ROI foram baseadas a partir do grupo PT.....	49
Figura 25	Tamanho e posicionamento da ROI na imagem.....	50
Figura 26	Representação esquemática do método em 3D. Aplicação das esferas para calcular a Tb.Th e Tb.Sp.....	51
Gráfico 1	Variação da Tb.Sp nos grupos PT e SB.....	55
Gráfico 2	Correlação entre Tb.Th e Tb.N nos grupos PT e SB.....	56
Gráfico 3	Correlação entre Tb.Sb e Tb.Th no grupo PT.....	56
Gráfico 4	Correlação entre Tb.Sp e Tb.N no grupo PT.....	57
Gráfico 5	Correlação entre BV/TV e Tb.Th no grupo SB.....	57
Gráfico 6	Correlação entre o BV e a Tb.Th, no grupo SB.....	58
Gráfico 7	Correlação entre Tb.Th e Tb.N, quando feita nos dois grupos reunidos.....	58

Gráfico 8	Correlação entre a Tb.Sp e a BV/TV, quando feita nos dois grupos reunidos.....	59
Figura 27	Formação de tecido ósseo mineralizado na interface do enxerto fixado com etil-cianoacrilato.....	61
Figura 28	Região central da imagem do grupo SP, que não foi analisada pelo programa <i>CTanalyser</i>	62
Figura 29	Reabsorção óssea no espécime do grupo PT.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Análise descritiva dos parâmetros do grupo PT e SB..... 53

Tabela 2 Comparações das médias entre os grupos..... 54

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASBMR – *American Society Bone Mineral Research*

BMP₂ – Proteína Morfogenética do Osso

BV – volume ósseo

BV/TV – fração do volume ósseo

CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

cm – centímetro

°C – graus celsius

2D – duas dimensões

3D – três dimensões

FORP/USP – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Gb – gigabyte

g – grama

h – hora

= igual

Kv – Kilovolts

Kg - kilograma

® - marca registrada

> – maior que

< – menor que

mg – miligrama

MicroTC – microtomografia computadorizada

μm – micrômetro

μm^3 - micrômetro cúbico

mm – milímetro

mm^3 – milímetro cúbico

MIO – microimplantes ortodônticos

Mp – megapixel

1/mm – por milímetro

ηm – nanômetro

n° – número

PT – parafuso de titânio

% - percentual

r – coeficiente de correlação

rpm – rotações por minuto

ROI – região de interesse do objeto

SB – Super Bonder

TV – volume total

Tb.Th – espessura trabecular

Tb.Sp – distância entre as trabéculas

Tb.N – número de trabéculas

VOI – volume de interesse do objeto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS	19
2.1 Enxertos Ósseos Autógenos	19
2.2 Cianoacrilatos	20
2.3 Microtomografia Computadorizada	24
3 PROPOSIÇÃO	30
4 METODOLOGIA	31
4.1 Aspectos éticos	31
4.2 Amostra	31
4.3 Fixação dos enxertos.....	31
4.4 Grupos	32
4.5 Preparo pré-operatório	32
4.6 Anestesia dos animais	32
4.7 Técnica e materiais cirúrgicos	34
4.8 Pós-operatório	39
4.9 Obtenção dos espécimes	39
4.10 Aquisição das imagens	40

4.11	Processamento das imagens	43
4.12	Análise das imagens.....	44
4.12.1	<i>Seleção das linhas do enxerto na imagem.....</i>	44
4.12.2	<i>Binarização da imagem.....</i>	46
4.12.3	<i>Definição das ROIs.....</i>	48
4.12.4	<i>Análise em 3D.....</i>	50
4.13	Análise Estatística.....	52
5	RESULTADOS.....	53
5.1	Análise descritiva.....	53
5.2	Análise comparativa entre os grupos controle e experimental.....	54
5.3	Correlações entre os parâmetros volumétricos e de densidade óssea.....	55
5.3.1	<i>Correlações intra-grupos.....</i>	55
5.3.2	<i>Correlações intergrupos.....</i>	58
5.4	Modelo de Regressão.....	59
6	DISCUSSÃO.....	60
7	CONCLUSÃO.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
	APÊNDICE	72

1 INTRODUÇÃO

Um adequado volume ósseo associado à instalação do implante na posição protética ideal são critérios exigidos para que haja sucesso na osseointegração. A reabsorção óssea começa após a extração do dente, como um processo fisiológico, por diminuição de estímulo para proliferação de células ósseas ou por processos patológicos, como a doença periodontal e o trauma alvéolo-dentário. Pode ocorrer tanto no sentido vertical quanto horizontal (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009).

Existem situações em que não há espessura suficiente de osso para instalação de implantes e o cirurgião deverá aumentá-la, por meio da fixação de enxertos ósseos em bloco, retirados de áreas doadoras intra e extra bucais (BRUGNAMI; CAIAZZO; LEONE, 2009; CORINALDESI et al., 2009; ZUHR et al., 2009; MAIORANA et al., 2011).

Os enxertos ósseos autógenos são largamente utilizados para reconstrução de rebordos alveolares atróficos, a fim de ganhar altura e espessura óssea, quando devidamente fixados e incorporados ao leito receptor (CORINALDESI et al., 2009; NETO et al., 2010).

As áreas doadoras intra-bucais mais comuns para remoção de enxertos ósseos são: a região do ramo mandibular e a região do mento. As áreas doadoras extra bucais mais frequentemente utilizadas são a crista ilíaca, a fíbula e a calota craniana (ZERBO et al., 2003).

As duas funções principais dos enxertos ósseos são: ser fonte de células osteogênicas e promover um arcabouço estrutural. Os enxertos em bloco, desde que bem estabilizados ao leito receptor, têm como característica, desempenhar estas funções, bem como aumentar o volume ósseo nas regiões de atrofia (ZERBO et al., 2003; CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009).

A fixação dos fragmentos é feita, tradicionalmente, por meio de parafusos de titânio bicorticais, promovendo estabilidade, para que haja posterior incorporação do enxerto ao leito ósseo receptor (FERRÍN et al., 2009). Entretanto, a fixação de

pequenos fragmentos ósseos com parafusos de titânio pode ser dificultada pela pouca espessura, tanto do enxerto, quanto do leito receptor.

Descobertos em 1949, os cianoacrilatos têm sido usados como adesivos biológicos, sendo agentes de união entre a pele, cartilagens e para a fixação óssea desde 1970. Contudo, há somente quatro estudos (SASKA et al., 2009; NETO et al., 2010; ESTEVES et. al., 2011; BAS et al., 2012), avaliando o processo de neoformação óssea na interface entre o enxerto ósseo em bloco e o leito receptor, utilizando este tipo de fixação.

As técnicas histológicas eram o padrão ouro para analisar a arquitetura óssea trabecular e cortical. Embora, as análises histológicas forneçam informações exclusivas sobre a celularidade e índices dinâmicos da remodelação óssea, a perda de tecido ósseo durante o preparo da amostra e a análise em 2D do tecido ósseo trazem algumas limitações a estas técnicas (BOUXSEIN et al., 2010).

A utilização da Microtomografia (microTC) de alta resolução, para avaliar a morfologia óssea em modelo animal, tem crescido bastante. A microTC tornou-se então o padrão ouro para avaliação da morfologia e microarquitetura óssea em ratos e em outros modelos animais *ex vivo*. Através de raios X atenuados, a microTC é capaz de produzir imagens em 3D para mensuração de corticais e trabéculas de até 0,7 μm (BOUXSEIN et al., 2010). Na análise em 3D da interface enxerto/leito receptor, pode-se avaliar de uma só vez, toda neoformação óssea tanto nas bordas, quanto na região central do enxerto, trazendo uma maior fidelidade nos resultados.

Análises histológicas mostraram que a fixação de enxertos ósseos com o uso de cianoacrilatos e de parafusos de titânio, apresenta bons resultados. Porém, não foram encontrados estudos que avaliassem a fixação destes enxertos em bloco pela microTC. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a fixação de enxertos ósseos autógenos em ratos, com o uso de um cianoacrilato, por meio da análise de imagens produzidas por microTC.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO

O enxerto ósseo em bloco é o método preferido para ganho de espessura óssea, desde que tenha estabilidade suficiente, para haver proliferação de células osteogênicas e consequente incorporação do enxerto; pois este método preserva um melhor volume ósseo do que o enxerto com osso particulado (CORINALDESI et al., 2009; BAS et al., 2012).

O aumento de volume ocorre, porque o enxerto ósseo autógeno é capaz de estimular a regeneração óssea por meio da osteogênese, osteocondução e osteoindução. A osteogênese é a capacidade de formar um novo tecido ósseo, a partir de células osteoprodutoras contidas no enxerto, que podem diferenciar-se em osteoblastos e que na presença de uma matriz osteocondutiva e de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) secretam matriz óssea. A osteoindução refere-se somente à neoformação óssea estimulada por BMPs, que promovem a diferenciação de células mesênquimais indiferenciadas, em células formadoras de tecido ósseo. A osteocondução é propriedade que a maioria dos enxertos possui, tanto autógenos, quanto heterogêneos, de servirem como o arcabouço para guiar o crescimento de novas células (BEDINI et al., 2009).

Por convenção, os parafusos de titânio têm sido usados para fixação de enxerto em bloco. Apesar desta técnica de fixação ter sua eficiência comprovada, ela apresenta algumas desvantagens, como: risco de fratura do parafuso, palpabilidade através da mucosa, corrosão, reações alérgicas, geração de artefatos nos exames de tomografia computadorizada, hipersensibilidade ao frio e possibilidade de provocar restrições de crescimento craniofacial em pacientes pediátricos (NETO et al., 2010; BAS et al., 2012). Outra desvantagem seria a necessidade de remoção do parafuso para não interferir na instalação do implante de um implante na região de enxerto. Parafusos reabsorvíveis são produzidos a partir de polímeros biodegradáveis como: ácidos poliláctilos e poliglicólicos, para não precisarem ser removidos, contudo, o alto custo, a dificuldade de manuseio e a

ausência de previsibilidade na reabsorção estão estimulando o interesse em se encontrar novos métodos de fixação para enxertos em bloco (NETO et al., 2010).

Zerbo et al. (2003) avaliaram a incorporação de 19 enxertos ósseos autógenos em bloco, removidos do mento e fixados na região anterior de maxila. Como método de fixação, foi aplicado o parafuso de titânio bicortical. O tempo de acompanhamento para incorporação dos enxertos foi de cinco meses. Em 100% dos casos, os enxertos foram incorporados com sucesso, com uma taxa média de reabsorção de 41% do volume, proporcionando osso suficiente para a instalação de implantes.

Uma revisão sistemática se propôs a avaliar o índice de sucesso na incorporação de enxertos ósseos autógenos, medida pelo número de implantes instalados com osseointegração. Foi verificado que a taxa de sucesso da incorporação dos enxertos autógenos, fixados por meio de parafusos de titânio, provenientes das regiões mental e ramo mandibular foi muito elevada. A taxa de perda parcial dos enxertos devido a infecções ou a deiscências foi de 3,3% e a perda total foi de 1,4% dos casos (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009).

Segundo Cowan et al. (2007) e Anavi et al. (2011) a calvaria de ratos é um eficiente modelo para reconstrução do esqueleto craniofacial, pois um enxerto ósseo em bloco pode ser estabilizado e fixado facilmente ao leito receptor.

2.2 CIANOACRILATOS

O alquil-2-cianoacrilato foi descoberto em 1949, mas não foi utilizado até 1959, quando suas propriedades adesivas foram descritas. As substâncias mais estudadas da família dos cianoacrilatos são: metil, etil, butil, isobutil e octil. Apresentam-se na forma líquida permitindo sua penetração em superfícies irregulares com forte adesão. Nos últimos dez anos, os cianoacrilatos têm sido usados como adesivos para fixação de enxertos ósseos (SASKA et al., 2009).

Segundo Buckley , Beckman (2010) os adesivos biológicos devem possuir propriedades ideais para que possam ser utilizados nos tecidos. Um adesivo ideal deve ser biocompatível e biodegradável. Para ser efetivo ele deve ter significativa coesão e adesão a tecidos duros e moles. Para ser biocompatível, os adesivos teciduais devem apresentar baixa citotoxicidade. É necessário também, apresentar um tempo de trabalho adequado, requerendo pouco tempo para sua polimerização. Devem ser hidrofílicos, para serem aplicados a superfícies úmidas. Devem possuir resistência à tração e ao mesmo tempo, possuir uma flexibilidade semelhante aos tecidos envolvidos. Enfim, devem produzir uma mínima reação exotérmica, para que o aumento da temperatura não agrida os tecidos adjacentes.

O n-butil cianoacrilato foi aprovado para uso clínico em 1996, e a partir de então tem sido utilizado, principalmente, para fechamento de lacerações superficiais de pele com baixa tensão (INAL et al., 2006).

Os cianoacrilatos são monômeros líquidos de baixa viscosidade, incolores que apresentam a fórmula $CH_2=CH-COOR$, de forma que o R representa um radical metil, etil, butil, octil ou outros radicais livres (KIMAIID et al., 2000). Os adesivos de cadeia mais curta (metil e etil) possuem maiores adesividade e histotoxicidade quando comparados aos monômeros de cadeia longa. Entretanto, os monômeros de cadeia mais longa (butil, isobutil e octil) possuem menores adesividade e histotoxicidade. A polimerização dos cianoacrilatos provoca o endurecimento dos ésteres ciano-alquílicos, caracterizando a sua capacidade adesiva e sua pouca elasticidade (FERRIGNO et al., 2003; SANTOS et al., 2004; BUCKLEY; BECKMAN, 2010). Outros estudos relatam que o etil-cianoacrilato (Super Bonder® - São Paulo/SP - Brasil) possui o radical etil na cadeia lateral com baixa toxicidade, promovendo pouca reação inflamatória e é também biodegradável (SASKA et al., 2009; BUCKLEY; BECKMAN, 2010).

Em relação à toxicidade do monômero, não foi observada nenhuma alteração patológica renal ou hepática nos ratos. Contudo, uma alta incidência de toxicidade do n-butil cianoacrilato tem sido relatada, quando a inalação dos gases liberados pela polimerização do produto está associada à baixa umidade do ar, podendo deflagrar crises de asma e dermatites. A reação exotérmica em

decorrência da polimerização pode ser a causadora da toxicidade celular após a aplicação do adesivo (INAL et al., 2006).

Os adesivos biológicos à base de cianoacrilato possuem uma variedade de aplicações médicas e odontológicas (FERRIGNO et al., 2003; ALONSO; JORNET, 2005). Os derivados do cianoacrilato têm sido utilizados como adesivos teciduais para fechamento de acessos cirúrgicos com pouca tensão, como cimentos ósseos em osteossínteses de osteotomias experimentais e para fixação de tecidos e enxertos (KIMAID et al., 2000).

Em seu estudo Amarante et al. (1995) verificaram que as osteotomias craniofaciais fixadas com o n-butil cianoacrilato por seis semanas, apresentaram vitalidade dos osteoblastos e nenhuma evidência de reabsorção óssea.

De acordo com Ahn et al. (1997), fragmentos ósseos fixados com cianoacrilatos possuem maior estabilidade para promover a neoformação óssea, comparativamente a blocos de osso fixados com parafusos de titânio.

De acordo com Perez et al. (2000), os cianoacrilatos podem ser utilizados também para fechamento de tecidos moles, com mínima toxicidade local e sistêmica, mostrando-se capaz de manter os bordos da ferida coaptados, durante a fase inicial de cicatrização.

Segundo Santos et al. (2004), durante a avaliação histológica de seu estudo, observou-se que em todos os animais, nove coelhos da raça *Norfall*, ocorreu a estabilização da cunha ósteo-cartilaginosa em seu leito receptor, após ser fixada com o adesivo n-butil cianoacrilato.

Singer et al. (2004), verificaram, a capacidade do adesivo octil-cianoacrilato de promover hemostasia, epistaxe provocado na cavidade nasal de porcos heparinizados. Concluíram que o adesivo foi eficaz em promover hemostasia, com apenas três aplicações.

A aplicação do n-butil-2-cianoacrilato em lesões provocadas no dorso da língua de ratos albinos, diminuiu a hemorragia e acelerou o processo de reepitelização, quando comparado às lesões que foram suturadas com fio de seda convencional (ALONSO; JORNET, 2007).

Choi et al. (2006) verificaram que o n-butil-2-cianoacrilato foi eficiente no fechamento de grandes perfurações da membrana, durante a cirurgia de levantamento do assoalho do seio maxilar. Utilizaram seis coelhos para a cirurgia. Fizeram levantamento de seio maxilar bilateral e no lado experimental, realizaram uma grande perfuração na membrana de seio. Após a perfuração aplicaram o adesivo para coaptação da mesma e a seguir inseriram o osso para enxertia. Não houve escape do osso liofilizado em nenhum dos seis animais operados. Portanto, os autores recomendaram o uso do cianoacrilato para reparo de perfurações na membrana do seio maxilar.

Os adesivos biológicos, como os cianoacrilatos, quando comparados aos materiais de titânio usados na fixação óssea, demonstraram vantagens: facilidade de aplicação, menor preço e regeneração óssea mais rápida. Sua forma líquida penetra nas superfícies irregulares, na interface entre o enxerto e leito receptor proporcionando grande adesão. Os cianoacrilatos não só fornecem adesão ao fragmento ósseo, como também incentivam a produção de novas células osteoprogenitoras (SASKA et al., 2004).

Em sua pesquisa, Saska et al. (2009), observaram que o etil-cianoacrilato não promoveu qualquer reação inflamatória ao redor do tecido ósseo da calota craniana de coelhos, tanto na medular, quanto na cortical. Também observaram que os enxertos fixados com adesivos mantiveram sua área original mais do que aqueles fixados com parafusos. Portanto o adesivo utilizado no estudo mostrou-se biocompatível e biodegradável, mesmo não sendo originalmente produzido para uso biológico.

Segundo Neto et al. (2010), o n-butil-cianoacrilato foi utilizado para fixar na mandíbula enxertos ósseos em bloco, removidos da calota craniana de coelhos, e compara-los com a fixação feita com parafusos de titânio. Verificaram, por meio de exames histopatológicos e imunohistoquímicos, que o adesivo trouxe boa estabilidade ao bloco ósseo, promovendo neoformação na interface entre o enxerto e o leito receptor. A análise histológica revelou que, em ambos os grupos, o processo de incorporação do enxerto ao leito receptor iniciou-se já na primeira semana e foi praticamente concluído na sexta semana, com a presença de osso lamelar na interface. Por meio da tomografia computadorizada, constataram que a

perda volumétrica do enxerto quando fixado com parafuso foi maior do que no grupo fixado com o adesivo.

Quando utilizados para fixação óssea, os cianoacrilatos têm algumas vantagens em potencial sobre os parafusos de titânio tais como: baixo custo, fácil manuseio, rapidez na fixação, ausência de artefatos nas imagens de tomografia computadorizada e não há necessidade de remoção, pois são reabsorvíveis. Os cianoacrilatos, também produzem uma forte união ao osso e polimerizam rapidamente mesmo na presença de água e sangue (NETO et al. 2010; ESTEVES et al., 2011; BAS et al., 2012). Outra vantagem é seu efeito bactericida sobre *Streptococcus* e outros microorganismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (UEDA et al., 2004).

2.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

O exame de tecidos por meio da microTC tem sido utilizado para análise da estrutura óssea e dentária em seres humanos. Porém, como a dose de radiação é bastante elevada, esta técnica é limitada apenas para amostras de tecidos. Entretanto, em ratos de laboratório este exame pode ser utilizado tanto *ex vivo* quanto *in vivo*, sem causar alterações significativas na sobrevivência do animal. No modelo animal, o exame de microTC tem várias aplicações, como: estudos em ratos osteoporóticos, estudo das mudanças na densidade óssea pela ação do paratormônio e medições da microarquitetura óssea (STOCK et al., 2003; UMOH et al., 2009).

Maréchal et al. (2005) compararam o volume ósseo, sob uma membrana rígida de titânio por meio de cortes histológicos e microTC, utilizando 30-33 seções histológicas seriadas e cerca de 300 cortes de microTC. O *Threshold* foi utilizado para determinar a mineralização do osteóide e a diferença entre o osso original e o recém-formado. Ao analisar as imagens a histomorfometria sistematicamente revelou mais osso do que o microTC. Durante o processo de reparação óssea, o crescimento inicia-se com uma camada de osteóide. Em todas as seções

histológicas, o osteóide foi encontrado. Entretanto, nos cortes das imagens de microTC o osso pouco ou não calcificado permaneceu não detectado. Em suma, a imagem microtomográfica de osso mineralizado recém-formado, pode ser realizada mesmo em uma membrana de titânio. Os resultados da análise quantitativa de tais imagens estão de acordo com aqueles da histomorfometria convencional, com exceção da não detecção do osteóide. As limitações da técnica de microTC são: a não detecção de osteóide (baixo conteúdo mineral) ou osso em contato com a membrana de titânio. O presente experimento oferece perspectivas promissoras para a avaliação *in vivo* do crescimento ósseo, mesmo sob uma membrana de titânio.

Como o osso alveolar é uma estrutura porosa e não uniforme, de difícil medição e quantificação, várias técnicas para medição desta estrutura foram utilizadas como: radiografias, histomorfometria e mais recentemente a microtomografia (microTC). A histomorfometria é uma excelente técnica de avaliação da estrutura óssea, tanto da parte orgânica, como da inorgânica, mas possui algumas limitações, que podem levar a alteração de resultados, como: avaliação apenas em 2D, destruição da matriz óssea e distorção do volume da peça, durante a fase de preparo para ser emblocada e cortada. O exame radiográfico é uma técnica não destrutiva de avaliação em 2D da estrutura óssea, na qual a dificuldade de manutenção de um correto alinhamento das estruturas, mesmo com o uso de *softwares* apropriados, apresenta resultados distorcidos. O exame de microTC é um método não destrutivo que pode ser usado em 3D, para produzir imagens de altíssima resolução do tecido ósseo, facilitando a medição de micro-estruturas sem nenhuma distorção (PARK et al., 2007; COWAN et al., 2007; EMAM et al., 2011).

Segundo Park et al. (2007), métodos convencionais de medição óssea não são capazes de avaliar pequenas quantidades de ganho ou perda óssea, na doença periodontal ou nas terapias reconstrutivas. Assim, realizaram um estudo em ratos com o objetivo de desenvolver um método de quantificação óssea por imagem gerada por microTC, para analisar de forma pré-clínica a perda óssea periodontal e enxertos ósseos. Os resultados deste trabalho mostraram que o exame de microTC foi capaz reproduzir de forma volumétrica o tecido ósseo com um índice de 95% de confiança.

Outro estudo mostrou o uso da microTC e da histomorfometria para avaliação do crescimento ósseo na calvária de ratos. Para tal, foram realizados defeitos críticos (são danos provocados ao tecido ósseo, pelos quais o organismo não consegue reparar totalmente) em ambos os lados da calota do animal. De um lado foi colocado hidroxiapatita (grupo experimental) e do lado oposto não foi inserido nenhum material de preenchimento. A regeneração óssea ocorreu em ambos os grupos aumentando o volume ósseo na região. As imagens foram reconstruídas, utilizando o *software I-VIEW*. O volume ósseo do grupo experimental foi medido usando o *software BV-measuring* com *Threshold* da hidroxiapatita variando para tecido ósseo recém-formado e osso mineralizado. Concluiu-se que a análise microtomográfica permite medições altamente quantitativas de tecido mineralizado; no entanto, ela não pode ser usada para avaliar a maturação de tecidos ainda não mineralizados ou para monitorar as alterações a níveis celulares (KOCHI et al., 2010).

Anavi et al., (2011) verificaram a eficiência da microTC na detecção da remodelação óssea trabecular de enxertos onlay, fixados com parafusos de titânio na calvária de ratos. A proposta do estudo foi comparar a remodelação óssea de enxertos onlay com beta-fosfato tricálcico e carbonato de cálcio extraído de coral. As imagens geradas foram avaliadas pelo *software* de análise (*Scion Image for Windows, versão 4.0.3.2; Scion Corp, Frederick, Md*). Os resultados mostraram uma nova formação óssea após três meses. Do tamanho total do bloco, em torno de 32% a 38%, foi substituído por osso neoformado. Não foram observadas diferenças, estatisticamente significativas, entre os dois materiais de enxerto. O exame de microTC é um método viável para a análise e quantificação da estrutura óssea em 3D, do enxerto *onlay*. Portanto, é uma técnica fidedigna, precisa e não destrutiva para o espécime.

Todos os tecidos, incluindo o osso, possuem uma matriz extra-celular com uma configuração tridimensional. A bioarquitetura óssea é definida como um arranjo molecular da matriz mineralizada em três dimensões. A análise por microTC da bioarquitetura óssea é realizada por uma técnica não destrutiva do tecido e com uma resolução que varia entre 40 μm e 50 nm dependendo do aparelho. A aplicação de algoritmos matemáticos permite a avaliação de vários parâmetros nomeados de parâmetros primários, utilizando o *software* para reconstrução, depois de

selecionada a região de interesse na amostra (ROI). Esta região de interesse (ROI) é formada por um arranjo de vários pixels em uma imagem 2D. Na imagem em três dimensões (3D), todos os ROI em 2D são agrupados pelo programa formando um volume de interesse (VOI) que é composto por vários voxels. Estes parâmetros primários são:

TV – (*tissue volume* expresso em mm^3): volume de interesse total representado pela soma de todos os voxels;

BV – (*bone volume* expresso em mm^3): soma de todos os voxels marcados no osso dentro do volume de interesse;

BV/TV – (*bone volume fraction* expresso em %): representa o percentual de osso dentro do volume de interesse (BEDINI et al., 2009; BOUXSEIN et al., 2010).

Hildebrand et al. (1999) realizaram um estudo com o objetivo de relatar os resultados de 260 biópsias ósseas humanas, de cinco diferentes locais do esqueleto em 52 indivíduos que foram analisadas com microTC e com os procedimentos padrões de histomorfometria 3D. Foram avaliados os índices primários: BS que corresponde à superfície óssea mineralizada; BV que é o volume de osso e TV que é o volume total da peça. Para comparar peças de tamanhos diferentes foram utilizadas as relações BV/TV e BS/TV, que correspondem respectivamente à relação de volume ósseo com o volume total e a superfície óssea com o volume total. A relação entre volume e superfície óssea é dada por BS/BV. Os índices derivados foram calculados pela relação: $\text{Tb.Th} = 2 \text{BV/BS}$, onde Tb.Th mede a espessura trabecular, Tb.Sp mede a distância entre uma trabécula e $\text{Tb.N} = 0.5 \text{BS/TV}$ onde Tb.N corresponde ao número de trabéculas. Estes índices são derivados a partir dos índices primários, assumindo um modelo de estrutura constante (modelo de placa) e aplicando técnicas estereológicas. Os índices avaliados diretamente, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N também foram mensurados. O advento das medições 3D em alta resolução proporcionaram uma nova visão da arquitetura trabecular óssea.

Bedini et al. (2009) demonstraram que a microTC é um eficiente método não destrutivo e não invasivo, para visualização em 3D e mensuração da morfometria da amostra de tecido ósseo. O estudo consistiu na análise em 3D de

quatro tipos de biomateriais utilizados como substitutos ósseos por meio da microTC. Verificaram através da mensuração das imagens, que o osso bovino liofilizado é o que apresenta uma maior porosidade e superfície, permitindo uma maior penetração e adesão de células osteogênicas ao biomaterial.

O exame de microTC está bem indicado para o estudo de tecidos duros, pois possui uma reprodutibilidade volumétrica deste tecido, muito próximo do tamanho real e sem distorções da amostra. Esta técnica pode ser utilizada também para estudos em pacientes com perda óssea pela osteoporose, tumores ósseos e avaliações de biomateriais usados como substitutos ósseos (CHAPPARD et al., 2010).

Stephan et al. (2010) avaliaram a reparação óssea, por meio da aplicação de BMP₂ e citosan (biopolímero derivado do exoesqueleto de crustáceos) em um defeito crítico produzido na calvária de ratos. Após a análise por microTC com quatro semanas *in vivo* e oito semanas *ex vivo* os autores verificaram que já havia tecido ósseo maduro neoformado com quatro semanas e que a densidade e o volume ósseo dobraram na avaliação com oito semanas em relação ao primeiro ponto de aferição. Em suma, o exame de microTC foi bastante sensível para medir a neoformação óssea, mesmo em pequenos defeitos.

Park et al. (2011) avaliaram por meio da microTC e histomorfometria, a regeneração óssea, após a aplicação de BMP₂ em defeito crítico provocado na calvária de ratos. Quatro animais de cada grupo foram eutanasiados com duas e quatro semanas após a cirurgia. Os tecidos, incluindo os locais cirúrgicos foram colhidos e fixados em formalina a 10% e depois escaneados pelo aparelho de microCT SkyScan 1172 (*SkyScan, Kontich, Bélgica*). O programa *CTanalyzer* foi utilizado para calcular o volume de osso neoformado na região do defeito. A análise foi repetida em diferentes escalas de cinza (50, 60, 65, 70, e 80) para determinação de um *threshold* ótimo. O *threshold* de 65 foi definido automaticamente pelo programa. Verificaram então, que os resultados obtidos pela microTC com baixos *thresholds* estavam altamente correlacionados com a histomorfometria.

A análise da microarquitetura óssea em 3D é uma técnica promissora, para identificação de novos aspectos histopatológicos das doenças do osso. Foram

descritas lesões osteoporóticas induzidas por glicocorticóides, consideravelmente diferentes de outros tipos de perda de massa óssea, através da imagem em 3D.

Há possibilidade por meio de uma avaliação por imagem, identificar o aumento da atividade osteoblástica em amostras de osso com mieloma múltiplo. A microTC é uma técnica rápida e eficaz para análise das mudanças do tecido ósseo associadas aos tumores benignos e malignos (CHAPPARD et al., 2010; JOHNSON et al., 2011).

Johnson et al. (2011) analisaram, por meio da microTC, as modificações no tecido ósseo de ratos vivos, induzidas por tumores e verificaram que as imagens em 3D eram capazes de mostrar, até mesmo, pequenas alterações ósseas. Os dados indicaram que a microTC *in vivo* é um efetivo método para monitorar longitudinalmente a destruição óssea provocada por tumores em modelo animal.

Rebaudi et al. (2011) avaliaram os efeitos da força de inserção de microimplantes ortodônticos (MIO) com 1,6 mm de diâmetro, no osso mandibular de ovelhas, previamente perfurados por brocas de 1 mm e 1,2 mm de diâmetro. Utilizaram imagens produzidas por microTC, para mensurar a quantidade de osso aderido ao MIO oito semanas depois da inserção. Na perfuração com broca de 1 mm houve uma diminuição de 43,25% no torque de remoção do MIO, em relação ao torque de inserção. Na perfuração com broca de 1,2 mm a diminuição do torque de remoção em relação ao de inserção foi de 18,2%, mostrando que brocas com diâmetro muito menores do que o diâmetro do MIO, podem levar a uma maior perda óssea na superfície do MIO. Em suma, o exame de microTC foi capaz de produzir imagens com resolução de 20 μm , sensíveis o bastante para se perceber, uma grande perda de contato ósseo. Esta perda foi diferente em relação ao diâmetro da broca utilizada na perfuração inicial.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo pré-clínico se propôs avaliar a fixação de enxertos ósseos autógenos em calota de ratos por meio de imagens produzidas por microtomografia computadorizada.

Especificamente, foi feita uma avaliação e comparação do volume ósseo na interface enxerto/leito receptor, utilizando o etil-cianoacrilato (Super Bonder Flex Gel®) e parafusos de titânio como agentes de fixação para a incorporação do enxerto.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Todos os ratos foram tratados de acordo com os princípios éticos para pesquisas com animais, segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEEA/UFJF), com o protocolo nº 15/2011.

4.2 Amostra

A amostra deste estudo foi composta por 12 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), machos adultos, com aproximadamente três meses de idade e pesando entre 220 a 310 g. Todos os animais foram mantidos individualmente em gaiolas sob luz e temperatura controladas e alimentados com água e ração comercial *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como nas orientações propostas por Wolfensohn, Loyd (2003).

4.3 Fixação dos enxertos

O adesivo biológico utilizado foi o etil-cianoacrilato (Super Bonder Flex Gel®, Loctite, São Paulo/SP, Brasil).

O parafuso utilizado foi de titânio com 1,4 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento (S.I.N., São Paulo/SP, Brasil).

4.4 Grupos

A amostra foi dividida aleatoriamente em dois grupos de seis ratos: um grupo controle (grupo Parafuso Titânio – PT), no qual foi utilizado um parafuso de fixação interna rígida, para estabilização do enxerto, e um grupo experimental (grupo Super Bonder Flex Gel® - SB) com a aplicação do adesivo para estabilizar o enxerto ósseo. As cirurgias foram realizadas por um cirurgião principal e um auxiliar, que realizaram todos os procedimentos cirúrgicos, para uma maior padronização.

4.5 Preparo pré-operatório

Em todas as etapas cirúrgicas foram utilizados equipamentos de proteção individual como óculos, gorro, máscara, jaleco e luvas estéreis. A antissepsia das mãos e antebraços foi feita com PVPI degermante (Polivinil Pirrolidona Iodo a 1%, Ind. Química Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto/SP, Brasil.). Os animais foram submetidos a um jejum líquido e sólido por 10h antes do procedimento cirúrgico.

4.6 Anestesia dos animais

Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, imobilizados pela mão de um dos operadores e submetidos à anestesia. O correto posicionamento e imobilização do animal são de suma importância, para que não haja perda do volume anestésico, necessário para sedação (Figura 1).

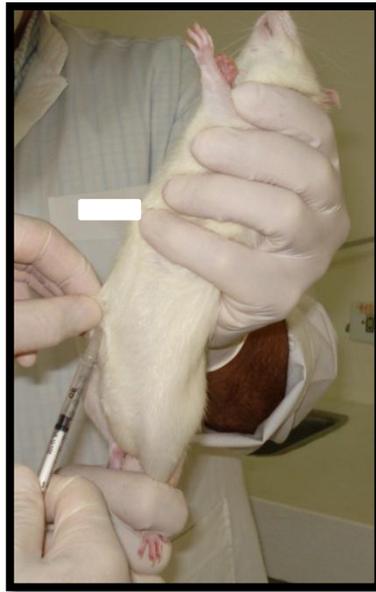


Figura 1 Anestesia do animal.

As drogas anestésicas foram injetadas por via intra-peritoneal na região abdominal. A medicação anestésica consistiu de uma associação de Cloridrato de Quetamina a 5% (VETANARCOL[®], König S.A., Avellaneda, Argentina), na dosagem de 60mg/kg e Cloridrato de Xilasina a 2% (KENSOL[®], Bayer S.A., São Paulo/SP, Brasil) na dosagem de 5mg/kg. Após a avaliação afirmativa de que o animal estava anestesiado, a tricotomia da região da calota craniana foi realizada com uma máquina de barbear (Figura 2).

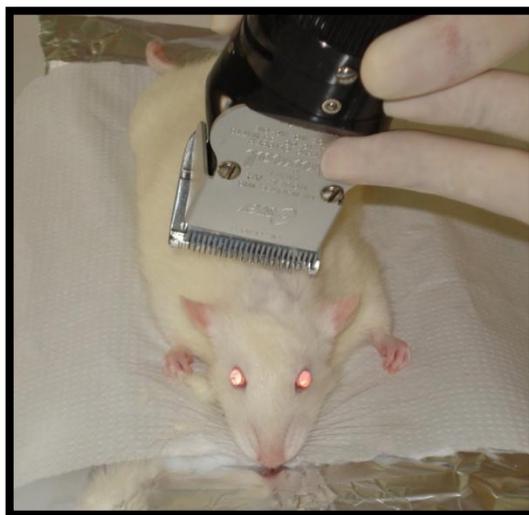


Figura 2 Tricotomia na região da calota craniana.

A antisepsia pré-operatória do rato foi realizada com PVPI tópico (Polivinil Pirrolidona Iodo a 1%, Ind Química Rioquímica Ltda., São José do Rio Preto/SP, Brasil.).

4.7 Técnica e materiais cirúrgicos

Após o preparo pré-operatório, o animal foi posicionado em decúbito ventral sobre uma placa aquecida a 37 °C graus, para manutenção da temperatura corporal durante o procedimento (Figura 3).



Figura 3 Posicionamento do animal na placa aquecida.

Após a infiltração de 0,6 ml de lidocaína a 2% com adrenalina 1:100.000 (ALPHACAÍNA, DFL, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) na região subcutânea, com a finalidade de vasoconstrição, realizou-se uma incisão do tipo bicoronal na calota craniana dos animais com cabo de bisturi nº 3 (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Caetano do Sul/SP, Brasil.) e lâmina 15C (Solidor, Suzhou Kyuan Medical Apparatus Co Ltda., China). Em seguida, a divulsão subperiosteal foi realizada com descolador de Molt (TRINITY Periodontia, São Paulo/SP, Brasil), para exposição dos ossos parietais do animal (Figura 4). Os tecidos foram afastados com auxílio de uma pinça de Adson (RHOSSE, Instrumentos cirúrgicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil).



Figura 4 Exposição cirúrgica da calota craniana.

Em seguida, realizou-se uma osteotomia retangular para remoção do bloco ósseo, mantendo a integridade da dura-máter e do cérebro, tendo como referências ântero-posterior a sutura coronal e lambdóide e látero-lateral a sutura interparietal e a linha temporal. As dimensões do bloco ósseo foram de aproximadamente 0,5 por 0,7mm. O mesmo foi removido do osso parietal esquerdo dos animais com a broca tronco-cônica 699 (KOMET, São Paulo/SP, Brasil) adaptada a uma peça reta (KAVO, Joinville/SC, Brasil), conectada a um motor elétrico (BLM 600, Driller, Jaguaré/SP, Brasil) a 1200 rpm, sob irrigação constante com soro fisiológico (Darrow Laboratório Ltda, Areal/RJ, Brasil). Após a osteotomia, o enxerto ósseo foi removido do osso parietal esquerdo com ajuda de um descolador de Molt (TRINITY Periodontia, São Paulo /SP, Brasil) (Figura 5) e imediatamente imerso em uma cuba com soro fisiológico.

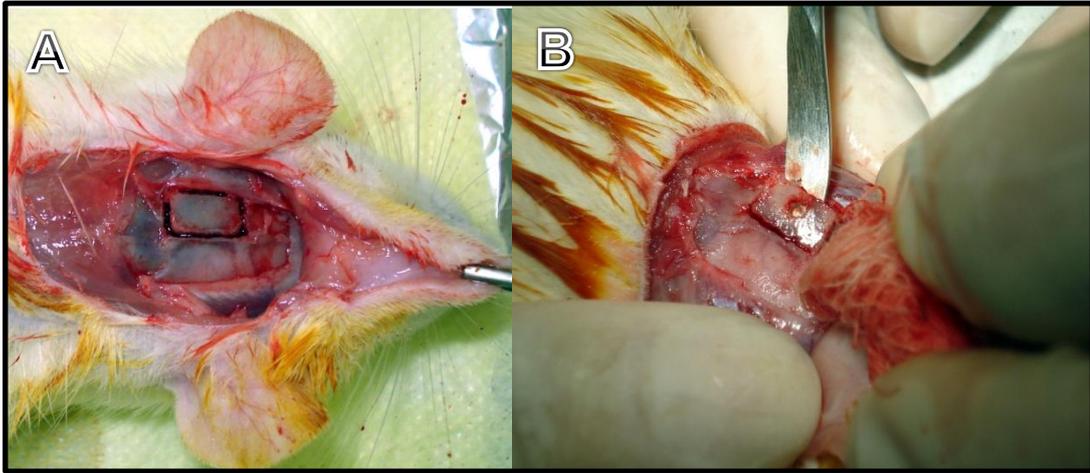


Figura 5 A) Osteotomia do enxerto na região parietal do grupo SB. B) Destacamento do enxerto.

No grupo PT, o enxerto foi perfurado na região central para passagem do parafuso, antes de ser totalmente removido da região doadora. Para devida fixação do enxerto no leito receptor foi realizada uma perfuração com uma broca tronco-cônica 702 para a adaptação e estabilização do parafuso (Figura 6).

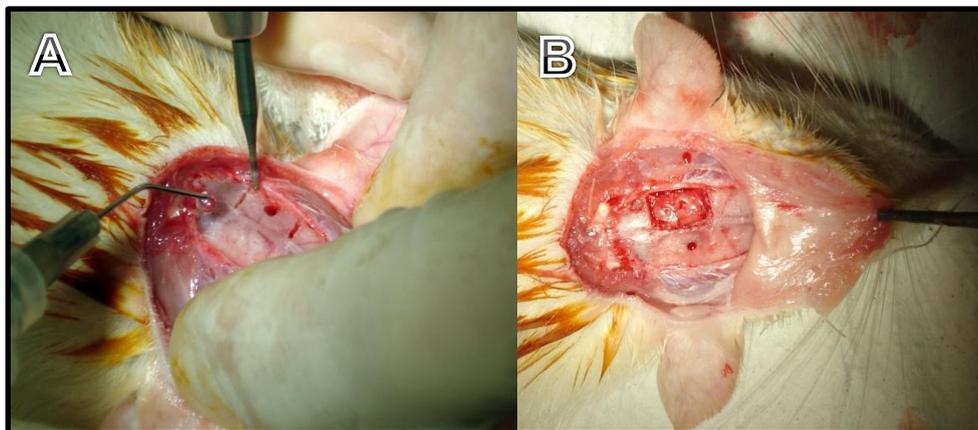


Figura 6 A) Osteotomia do enxerto no osso parietal no grupo PT, mostrando a perfuração para fixação do parafuso. B) Perfuração para fixação do parafuso no leito receptor.

Em seguida, o enxerto foi fixado no osso parietal direito, com parafuso bicortical de 1,4 mm de espessura por 2 mm de comprimento (S.I.N., São Paulo/SP, Brasil), com auxílio de uma chave fornecida pelo fabricante. Como o fabricante não

possui parafuso com comprimento de 2 mm, um parafuso de 10 mm foi cortado com o auxílio de um alicate estéril, até a segunda espira, para ficar com a medida adequada (Figuras 7 e 8).

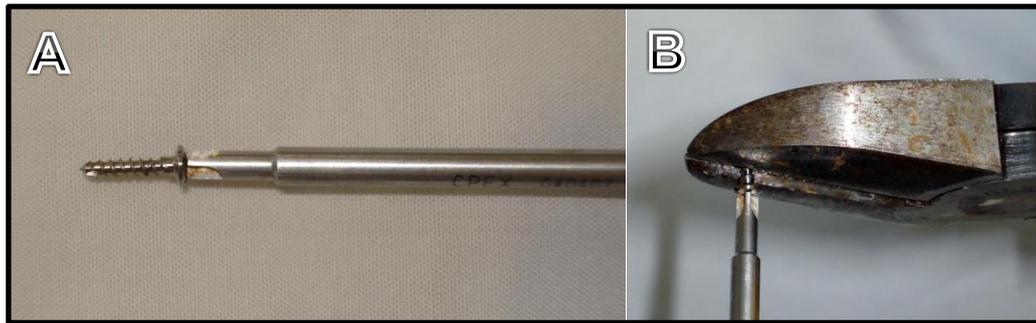


Figura 7 A) Parafuso de titânio com 10 mm de comprimento. B) Corte do parafuso com alicate.

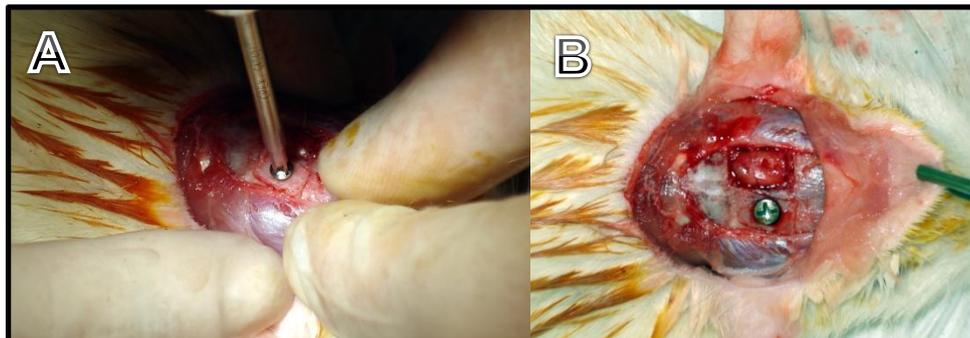


Figura 8 A) Fixação do enxerto. B) Enxerto fixado com parafuso de titânio.

No grupo SB o fragmento ósseo foi removido do osso parietal esquerdo e fixado no osso parietal direito, com o adesivo etil-cianoacrilato (SUPER BONDER Flex Gel®, Loctite, São Paulo/SP, Brasil). A aplicação do adesivo foi realizada por meio de uma seringa e agulha de insulina (Becton Dickinson, São Paulo/SP, Brasil), na quantidade de uma gota por bordo equivalente a 0,01ml, nas quatro margens do bloco, aguardando a tomada de presa do adesivo. Uma pressão no sentido perpendicular ao enxerto foi realizada para evitar que o adesivo penetrasse na interface enxerto/leito receptor (Figura 9).

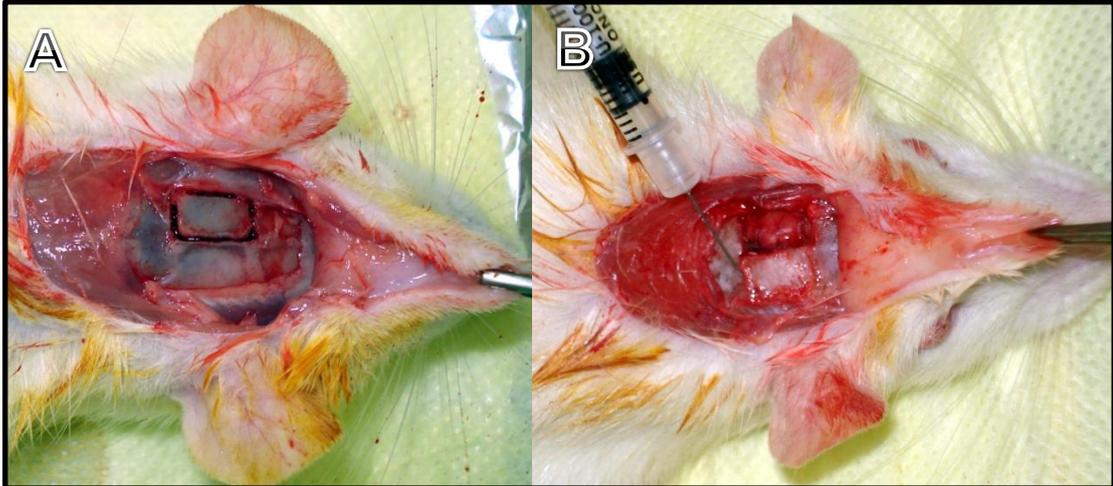


Figura 9 A) Osteotomia do enxerto do grupo SB. B) Fixação do enxerto com o adesivo aplicado nos bordos do bloco.

A síntese da ferida foi realizada com um porta-agulha tipo Mayo-Hegar (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Caetano do Sul/SP, Brasil); pinça Adison (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Caetano do Sul/SP, Brasil); tesoura para Íris (Golgran Ind. e Com. de Instrumental Odontológico Ltda., São Caetano do Sul/SP, Brasil) e fio de sutura de nylon 4,Ø (Technofio, ACE, Indústria Comércio Ltda., Goiânia/GO, Brasil), com pontos simples interrompidos (Figura 10).



Figura 10 Sutura com pontos simples.

4.8 Pós-operatório

Após o procedimento cirúrgico foi administrada, em cada animal, uma dose de 5mg/kg de morfina intra-muscular na região medial da coxa, de 8 em 8h por dois dias, sendo a primeira dose aplicada logo após o término da cirurgia. (WOLFENSOHN; LOYD, 2003).

4.9 Obtenção dos Espécimes

Após 30 dias do procedimento cirúrgico, os 12 animais foram eutanasiados com dose letal de Quetamina 180mg/kg (ESTEVES et al., 2011). Depois da eutanásia dos animais foi colhido o material enxertado para análise microtomográfica, em ambos os grupos. O osso parietal foi osteotomizado na região enxertada, com broca tronco-cônica 701, com margem de 3 mm das bordas do enxerto, excetuando-se a borda medial o enxerto que coincide com a região doadora (Figuras 11 e 12).

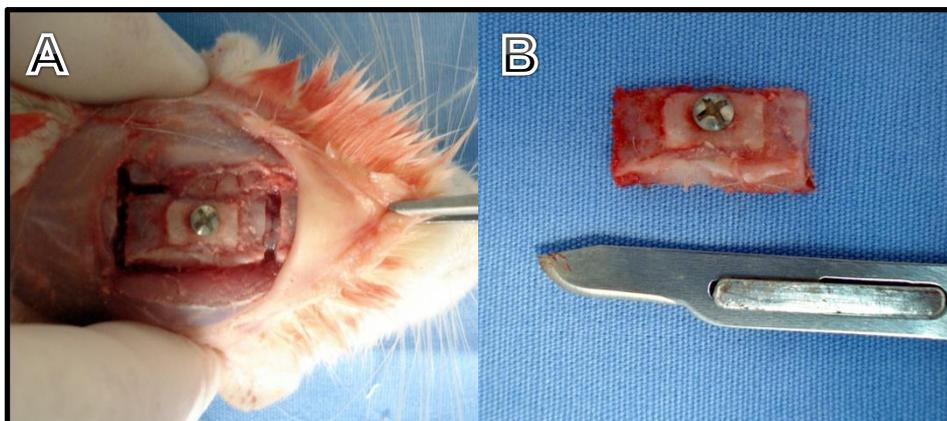


Figura 11 A) Osteotomia do bloco ósseo contendo o enxerto no grupo PT. B) Espécime a ser avaliado pela microTC.

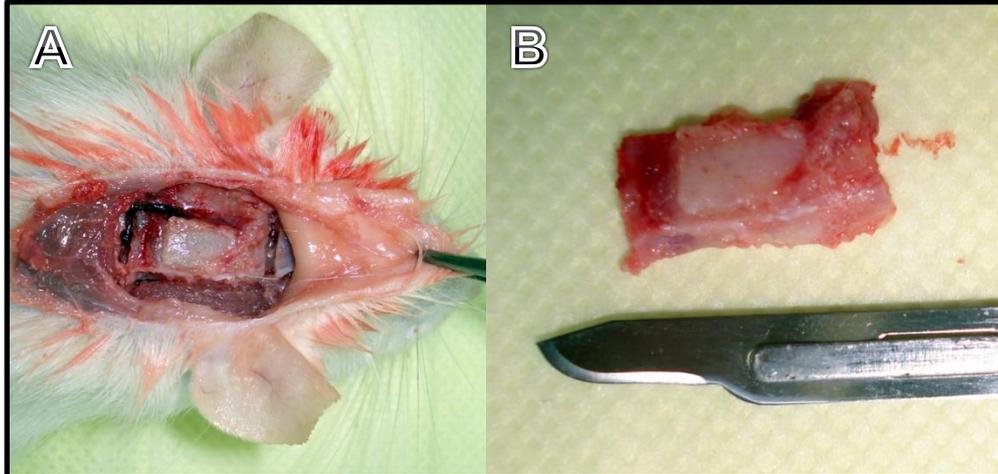


Figura 12 A) Osteotomia do bloco ósseo contendo o enxerto no grupo SB. B) Espécime a ser avaliado pela microTC.

A seguir, os espécimes de ambos os grupos foram fixados em formalina a 10% por no mínimo 24h. Após este período foi realizada a quantificação estrutural por imagem de microtomografia computadorizada.

4.10 Aquisição das Imagens

O sistema de microtomografia de raios X é composto por um tubo de raios X de micro foco, com fonte de alta tensão (100 kv), um porta-amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmera CCD de 10Mp (4000 x 2300 pixels), conectados a um computador de controle e aquisição de dados (host), interligado em rede a um *cluster* de computadores utilizados na reconstrução das imagens microtomográficas.

As imagens foram adquiridas por meio do aparelho de microtomografia (*SkyScan, Kontich, Bélgica* modelo 1172) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP) e manipulado por apenas um operador, para padronização das imagens (Figura 13).



Figura 13 Aparelho de microTC (*Skyscan* modelo 1172, *Kontich*, *Bélgica*).

Os espécimes foram embalados em papel filme para evitar sua desidratação, quando expostos ao calor interno do aparelho, no momento da captura das imagens (Figuras 14 e 15).



Figura 14 Espécime do grupo PT embalado em papel filme.



Figura 15 Espécime do grupo SB embalado em papel filme.

A seguir, cada um dos espécimes obtidos foi estabilizado no porta-amostra, a fim de se obter um alinhamento vertical, evitar deslocamentos durante a movimentação angular e manutenção do campo visual do detector de radiação (câmera CCD). As imagens foram produzidas com uma resolução de 14 μ m em formato TIFF, com os arquivos variando entre 6,4 a 7.2 Gb (Figura 16).

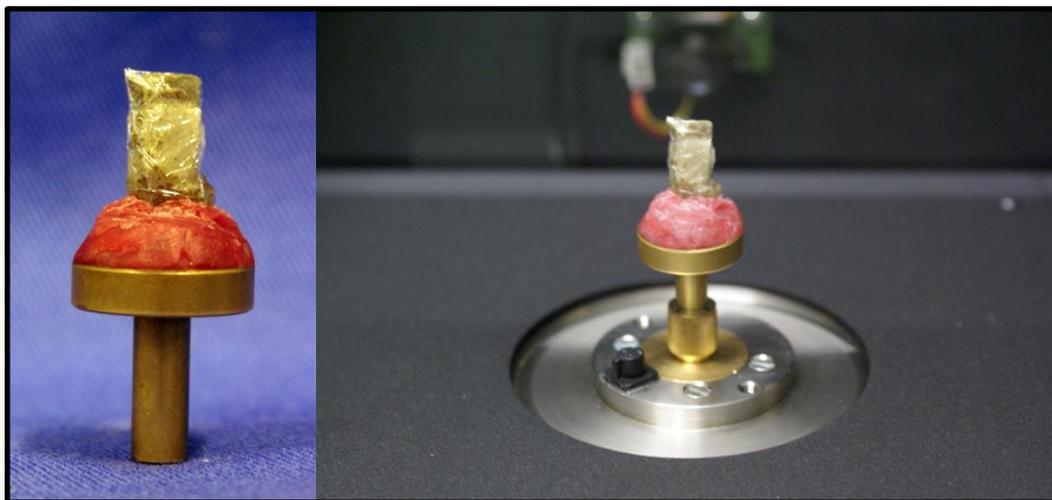


Figura 16 Espécime estabilizado no porta-amostra para aquisição da imagem.

Após a captura, as imagens foram processadas pelo *software Data Viewer* versão 1.4 (SkyScan, Kontich, Bélgica) e analisadas pelo programa *CT analyzer* versão 1.10.11.0 (SkyScan, Kontich, Bélgica) para quantificação estrutural,

pelo mesmo operador. Para esta aferição foi utilizado o computador modelo Ultrabook core i5 (Samsung, Coréia do Sul).

4.11 Processamento das imagens

Após a captura, as imagens foram processadas pelo programa *Data Viewer* (Figura 17) para correção e posicionamento dos planos transaxial, sagital e coronal. O plano transaxial foi selecionado para análise das imagens, pois mostra toda a interface enxerto/leito receptor no bordo maior do enxerto. A seguir as imagens reposicionadas foram salvas, para posterior análise microestrutural pelo *software CTanalyzer*.

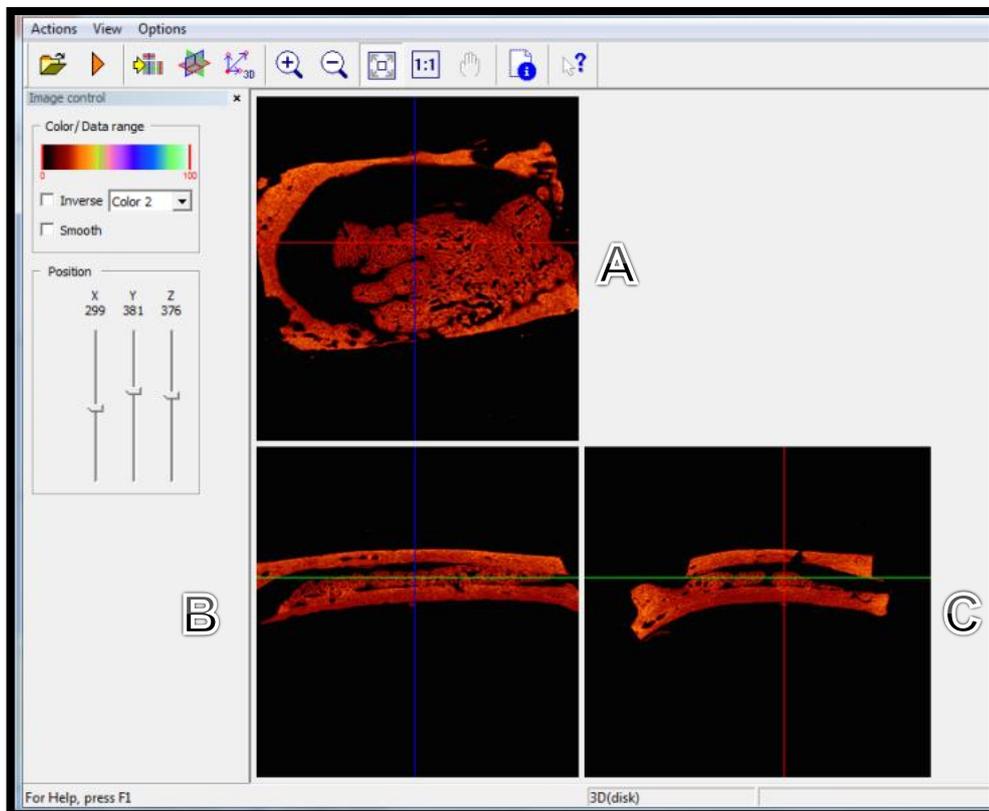


Figura 17 Reposicionamento dos planos da imagem pelo *software Data Viewer*. A) plano coronal, B) plano transaxial, C) plano sagital.

4.12 Análise das imagens

Na sequência, após o reposicionamento das imagens foi realizada a análise das mesmas pelo programa *CTAnalyzer*. Este *software* é usado para quantificar estruturalmente o tecido ósseo mineralizado, escaneado pelo microtomógrafo e gerar parâmetros de área, distância, percentual e volume das estruturas. Estes parâmetros foram propostos pela nomenclatura de histomorfometria óssea descrito por Parfitt et al. (1987) e adotados pela Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral (ASBMR). Inicialmente, quando o microtomógrafo faz o escaneamento do espécime ósseo, gera apenas imagens bidimensionais (2D), por meio de um agrupamento de pixels na forma de linhas com espessura de 14 μm cada. Após a seleção das linhas, a binarização e a determinação do tamanho da região de interesse do objeto (ROI), o *software* une as linhas e as transforma em uma imagem tridimensional (3D), por meio de um agrupamento de voxels.

4.12.1 Seleção das linhas do enxerto na imagem

As linhas para binarização e aplicação da região de interesse do objeto (ROI) foram selecionadas e agrupadas em cada imagem em ambos os grupos. Apenas as linhas relacionadas à área de interface enxerto/leito receptor foram analisadas pelo programa após a seleção. Esta seleção foi feita pela marcação da linha, onde o enxerto se inicia (*Bottom*) (Figura 18), até a linha onde o enxerto termina na imagem (*Top*) (Figura 19). Para padronização do tamanho da área de interesse a ser analisada, todas as imagens tiveram o mesmo número de linhas. Este número foi adquirido pela média da soma de todas as linhas. O número de 414 linhas estabelecido pela média de linhas de todas as imagens foi utilizado para a leitura do programa. Para facilitar a binarização e o posicionamento da ROI nas imagens, uma linha base, intermediária as 414 linhas, foi escolhida (Figura 20). Esta linha localizou-se na metade da sequência de cortes selecionados previamente e foi estabelecida pelas 414 linhas divididas por dois, acrescentando-se a esta divisão ao número da linha *bottom*.

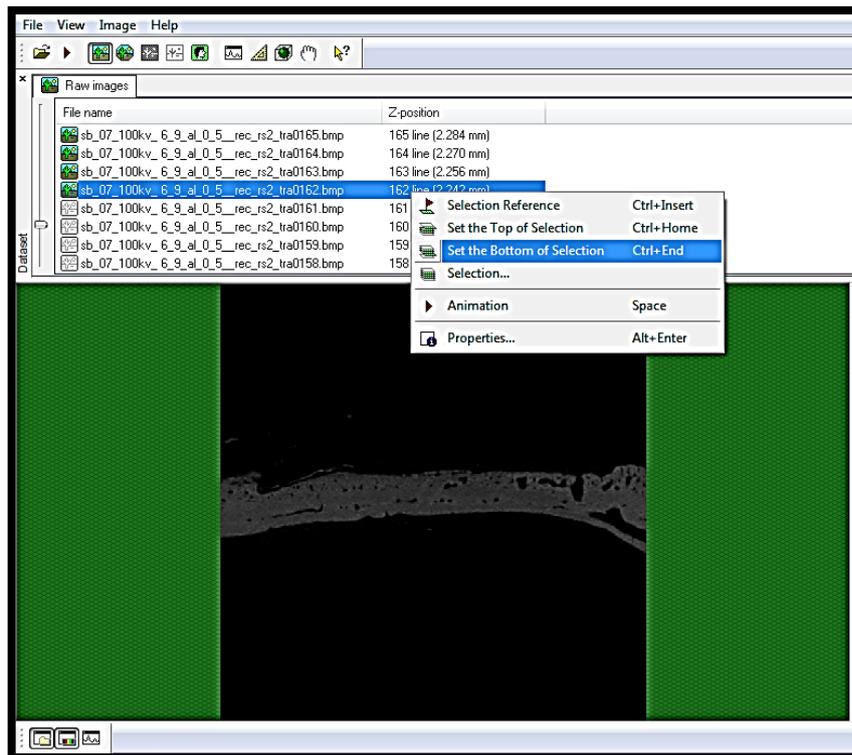


Figura 18 Seleção da linha inicial do enxerto na imagem pelo software CTAnalys (Bottom).

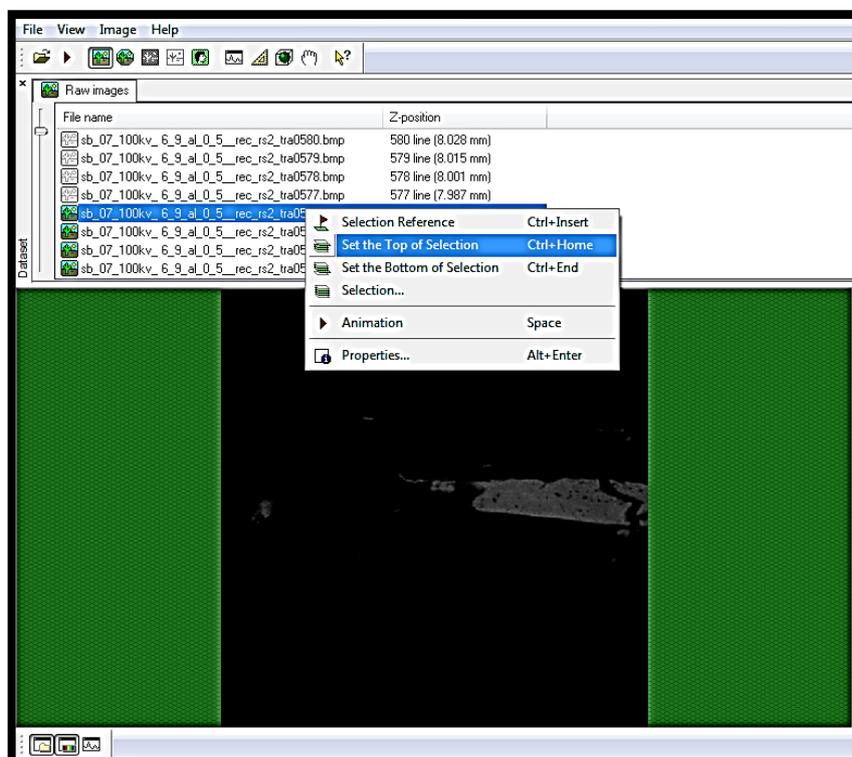


Figura 19 Seleção da linha final do enxerto na imagem (Top).

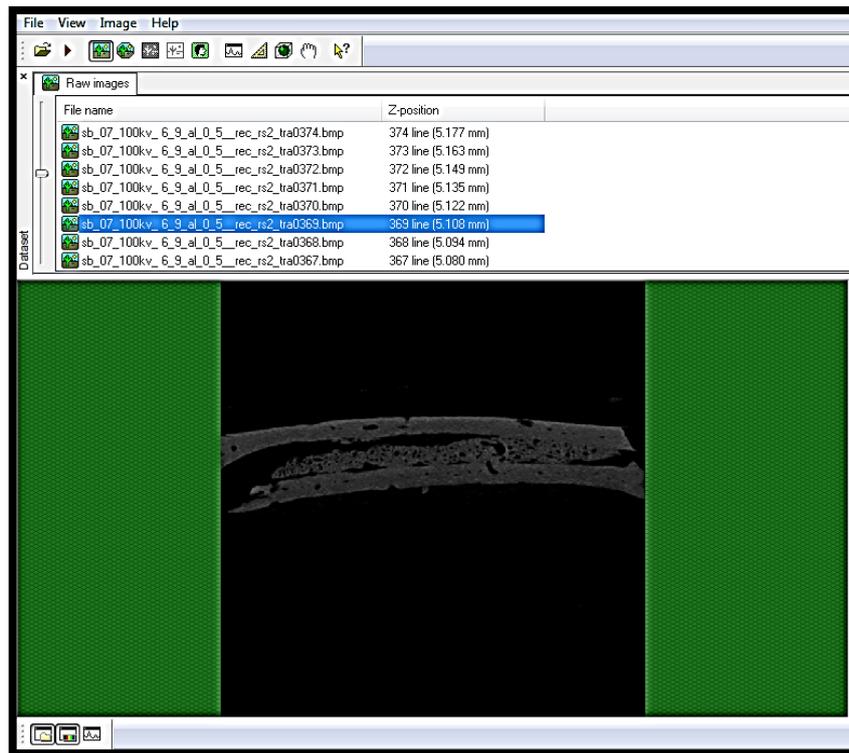


Figura 20 Seleção da linha base (intermediária).

4.12.2 Binarização das imagens

A seguir, foi realizada a binarização das imagens, para que o *software* pudesse fazer a leitura dos pixels. A segmentação das imagens é importante, pois o programa não consegue interpretar os pixels em tons de cinza, deste modo são transformados em um sistema binário de cores. Assim, os pixels marcados em branco representaram o tecido ósseo mineralizado, enquanto que os pixels marcados em preto representaram o tecido não mineralizado (Figura 21).

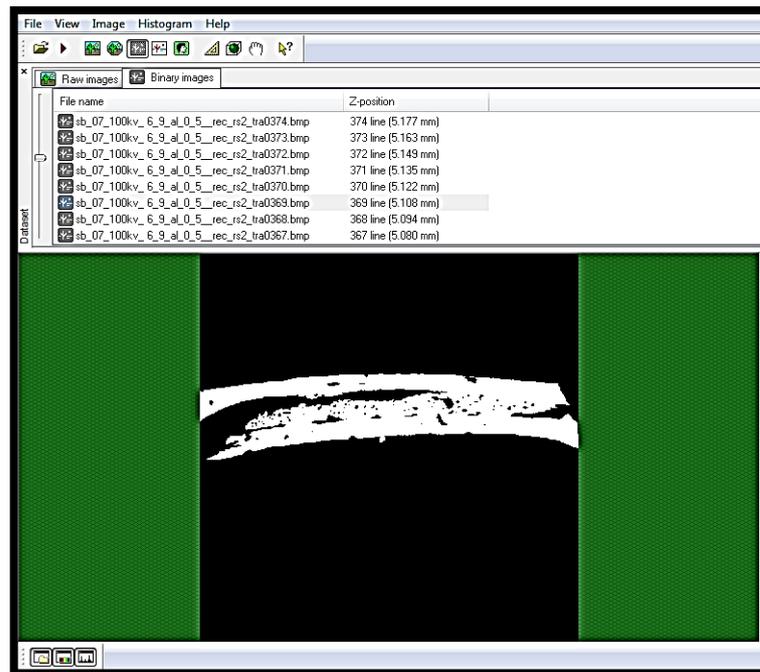


Figura 21 Imagem binarizada. Em branco o tecido mineralizado e em preto o tecido não mineralizado.

A seleção do *threshold* para as 12 imagens foi realizada visualmente de acordo com Bouxsein et al. (2010), variando de 14 a 25 escala de cinza de uma escala que vai de 0 até 255. Não foi adotado o uso de um *threshold* único, pois cada imagem possuiu uma densidade óssea diferente. A escolha de um *threshold* para cada imagem baseia-se na similaridade com a imagem original ainda não binarizada. A utilização de um mesmo *threshold* para todas as imagens pode ocasionar resultados sub ou superestimados (Figura 22).

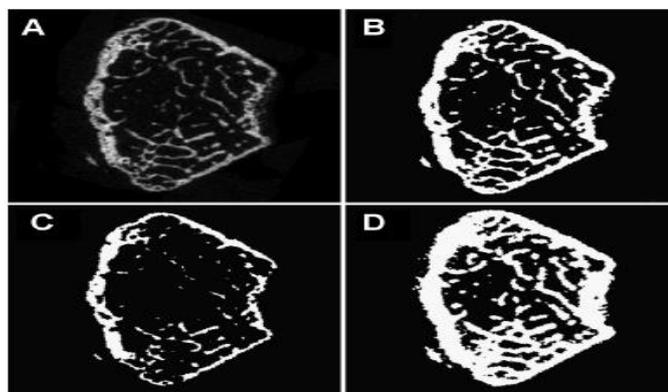


Figura 22 A) Imagem original, B) Imagem binarizada com *threshold* correto, C) Imagem binarizada com *threshold* elevado, D) Imagem binarizada com *threshold* baixo. **Fonte:** Bouxsein et al. (2010).

4.12.3 Definição das ROIs

Após a binarização das imagens foi definida uma ROI no formato retangular, pois esta geometria foi a que mais se aproximou do formato das imagens no plano selecionado. A determinação das ROIs serviu para filtrar a leitura do *software* apenas nas regiões selecionadas. Foram estabelecidas duas ROIs para cada imagem, localizadas no bordo direito e no bordo esquerdo da imagem aplicadas na linha base (Figura 23).

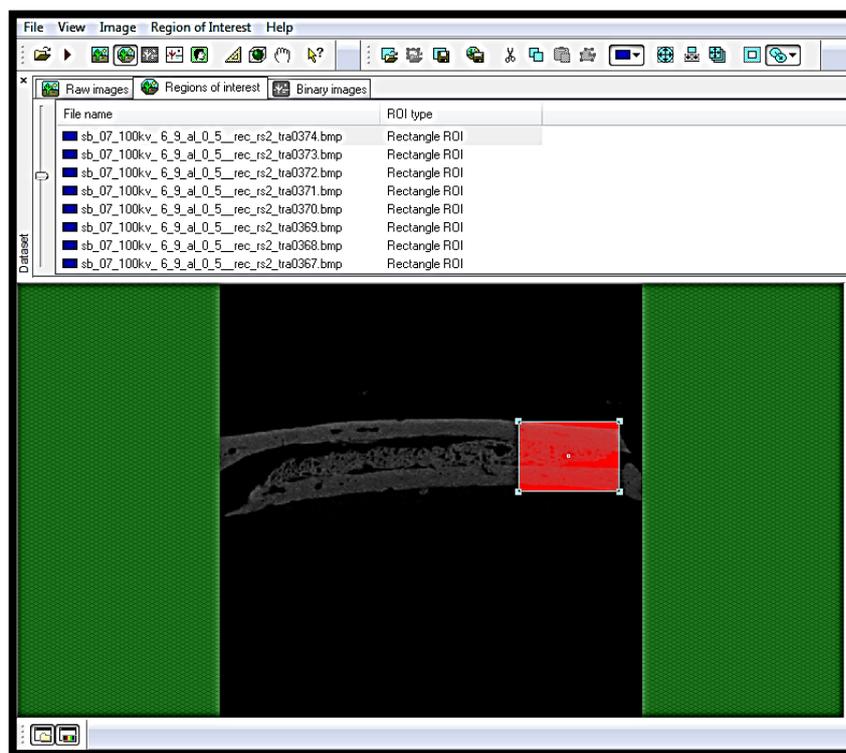


Figura 23 ROI em vermelho posicionada no lado direito da imagem.

As dimensões da ROI foram baseadas a partir do grupo PT, pois a presença do parafuso na região central da imagem poderia acarretar formação de artefato e ocasionar uma leitura incorreta pelo programa. Desta forma, apenas os bordos da imagem puderam ser utilizados para aplicação da ROI. Este posicionamento dos retângulos da ROI também foi adotado para o grupo SB, para

que uma mesma área da imagem fosse comparada entre os grupos. A largura do retângulo das ROIs foi definida baseando-se na linha base da imagem do grupo PT, que possuísse a menor distância entre a extremidade da cabeça do parafuso e o ângulo cortical do bordo do enxerto. Assim a largura do retângulo da ROI foi estabelecida em 2,0 mm para os lados direito e esquerdo de todas as imagens de ambos os grupos (Figura 24). A altura do retângulo variou de acordo com a espessura do conjunto enxerto/leito receptor. A média da área do retângulo da ROI de ambos os lados para os dois grupos foi de $2,52 \text{ mm}^2$.

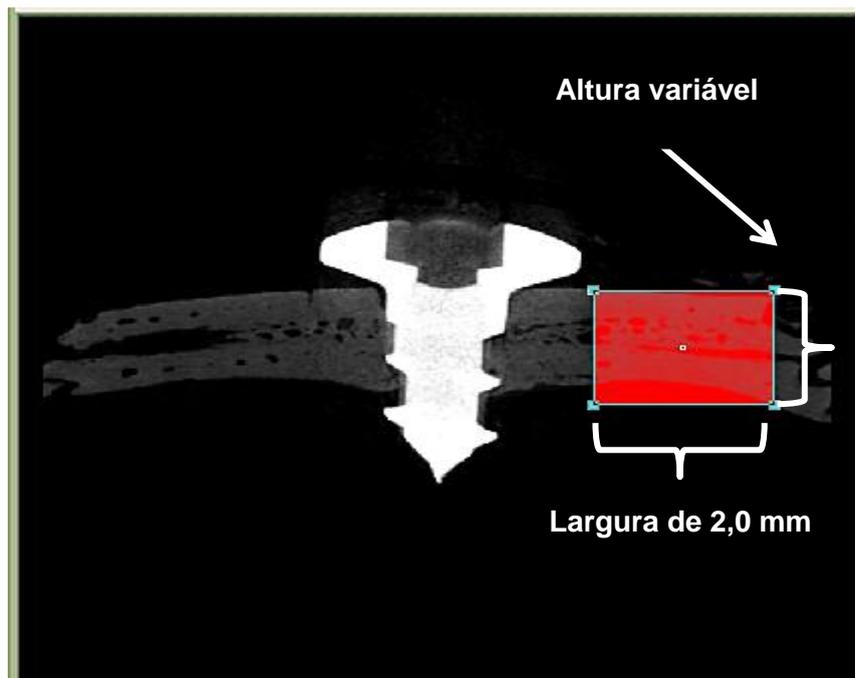


Figura 24 As dimensões da ROI foram baseadas a partir do grupo PT.

Foi determinado que o posicionamento do retângulo do lado direito fosse o espelho do lado esquerdo para os dois grupos. Então, o ângulo súpero-medial do retângulo tangenciou a cortical externa do enxerto, o ângulo ínfero-lateral tangenciou a cortical interna do leito receptor e o ângulo súpero-lateral do retângulo, posicionando-se alinhado ao ângulo lateral da cortical do enxerto (Figura 25).

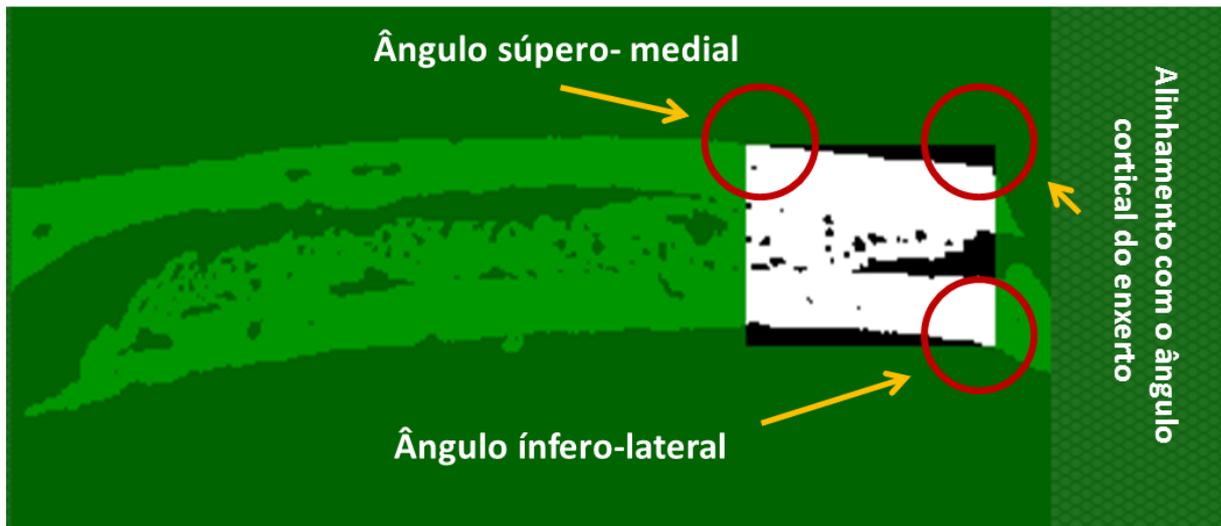


Figura 25 Tamanho e posicionamento da ROI na imagem.

Após definido o tamanho e o posicionamento correto da ROI, foi dado o comando ao *software* para aplicar estas dimensões em todas as 414 linhas selecionadas previamente. Deste modo foi transformada uma ROI em um VOI tridimensional, por meio da união dos pixels de cada ROI em todas as linhas selecionadas, convertendo-os em voxels isotrópicos de $14 \mu\text{m}^3$. Desta forma, o programa conseguiu fazer a leitura dos voxels e gerar dados volumétricos das regiões selecionadas.

4.12.4 Análise em 3D

Após a formação dos 24 VOIs, os mesmos foram extraídos e submetidos a uma análise morfológica em 3D, adotada pela ASBMR. Os VOIs foram processados pelo programa para gerar parâmetros volumétricos e de densidade óssea, conforme propostos por Parfitt et al. (1987); Hildebrand et al. (1999); Bedini et al. (2009) e Bouxsein et al. (2010):

1 - Parâmetros volumétricos:

- Volume Total (**TV**): quantidade de voxels dentro do volume total de interesse, expresso em mm^3 ;
- Volume Ósseo (**BV**): quantidade de voxels presentes apenas no tecido ósseo mineralizado, expresso em mm^3 ;
- Fração do Volume Ósseo (**BV/TV**): volume ósseo dividido pelo volume total, expresso em %.

2 – Parâmetros densidade óssea:

- Espessura trabecular (**Tb.Th**): média da espessura das trabéculas, expressa em mm, determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram dentro da trave óssea (Figura 26);
- Distância entre as trabéculas (**Tb.Sp**): média da distância entre as trabéculas expressa em mm, determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram entre as traves ósseas (Figura 26);
- Número de trabéculas (**Tb.N**): mensuração da média do número de trabéculas por unidade de comprimento, expresso em $1/\text{mm}$.

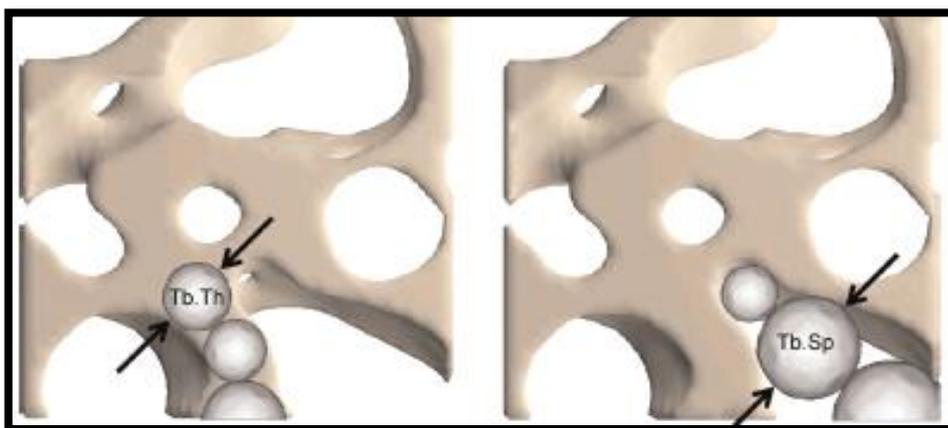


Figura 26 Representação esquemática do método em 3D. Aplicação das esferas para calcular a Tb.Th e Tb.Sp. **Fonte:** Bouxsein et al. (2010).

4.13 Análise Estatística

Os resultados de cada parâmetro (*TV, BV, BV/TV, Tb.Th, TB.Sp e Tb.N*) produzidos pelo programa *CTanalyzer* foram submetidos à análise descritiva para a obtenção da média, desvio padrão, mínimo e máximo. Para tal, os valores dos 12 VOIs de cada grupo foram somados, para que a descrição dos dados fosse realizada por meio da média da soma de todos os VOIs e não houvesse distinção entre os lados da imagem. Os dados das médias de todos os parâmetros, dos grupos PT e SB foram comparados pelo teste não paramétrico de *Mann Whitney* de variáveis independentes. Apesar de no teste de normalidade dos dados (*Kolmogorov-Smirnov*), todas as distribuições terem sido consideradas normais ($p > 0,05$) a prova de *Mann Whitney U* foi utilizada, por se tratar de um número amostral pequeno. Embora, nos testes de distribuição livre a normalidade não seja um pressuposto, o fato dos dados terem sido normais refletiu a homogeneidade das medidas obtidas nos animais. Depois foram realizadas as correlações entre cada parâmetro dos grupos PT e SB separadamente e em grupo, por meio do coeficiente de *Spearman*. O valor do coeficiente de correlação (r) varia de -1,0 a +1,0 onde o zero significa ausência total de correlação. O coeficiente de correlação entre 0,3 e 0,5 indica correlação fraca, entre 0,5 e 0,7 moderada e acima de 0,7 a correlação é elevada. A correlação pode ser positiva (o aumento de uma variável, aumenta a outra) ou negativa (o aumento de uma variável, diminui a outra). Em seguida foi aplicado um modelo de regressão linear. Toda a análise estatística foi realizada por meio do programa SPSS for Windows versão 13.0. Para todos os testes, considerou-se o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Análise descritiva

Os parâmetros volumétricos (TV, BV, BV/TV), e de densidade (Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N), da microarquitetura do enxerto ósseo em bloco, realizado na calota de ratos dos grupos PT e SB estão demonstrados na Tabela 1. Em relação aos parâmetros volumétricos, a média do volume total (TV) do grupo SB foi maior que o grupo PT, ocasionada por uma maior distância entre o enxerto e o leito receptor, após a tomada de presa do adesivo. A média do volume ósseo (BV) e do BV/TV foi maior no grupo PT do que no grupo SB, ou seja, a proporção de tecido ósseo em relação ao volume total de tecido foi maior no grupo controle (PT). Em relação aos parâmetros de densidade óssea, a média da espessura das trabéculas (Tb.Th) do grupo PT foi superior ao do grupo SB. Ambos os grupos obtiveram médias semelhantes do número de trabéculas por mm (Tb.N). A média da distância entre as trabéculas no grupo PT foi inferior a do grupo SB, sugerindo uma maior densidade óssea do grupo controle em relação ao grupo experimental.

Tabela 1 Análise descritiva dos parâmetros do grupo PT e SB.

Parâmetros	Grupo PT n=6				Grupo SB n=6			
	Média	Dp	Máximo	Mínimo	Média	Dp	Máximo	Mínimo
TV (mm³)	17,19	±1,39	19,23	15,08	18,34	±1,79	20,05	16,07
BV (mm³)	9,4	±1,08	10,82	8,19	8,92	±1,05	10,58	8,92
BV/TV (%)	55,03	±4,29	59,96	49,21	49,08	±4,44	53,06	43,41
Tb.Th (mm)	0,32	±0,03	0,36	0,28	0,28	±0,04	0,33	0,24
Tb.Sp (mm)	0,35	±0,03	0,40	0,32	0,41	±0,03	0,45	0,37
Tb.N (1/mm)	1,7	±0,23	2,06	1,39	1,71	±0,18	2,04	1,57

5.2 Análise comparativa entre os grupos controle e experimental

Apesar de a análise descritiva ter apresentado valores das médias a favor do grupo PT, o teste U de *Mann Whitney* conforme a Tabela 2, não mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os parâmetros propostos, com exceção da distância entre as trabéculas. O grupo SB apresentou uma Tb.Sp maior que o grupo PT ($p = 0,015$), com significância estatística. Este dado evidencia a presença de uma maior densidade do tecido ósseo no grupo controle, em relação ao grupo experimental, ou seja, quanto maior for a distância entre uma trabécula e outra, mais medular é o tecido ósseo.

Tabela 2 Comparações das médias entre os grupos.

Grupo PT x Grupo SB						
	TV	BV	BV/TV	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N
Mann Whitney U	12,000	13,000	7,000	11,000	3,000	17,000
p valor	0,394	0,485	0,093	0,310	0,015*	0,937

Teste não paramétrico de Mann Whitney

Nível de significância $p < 0,05$

* Diferença estatisticamente significativa

De acordo com o Gráfico 1, o grupo SB apresentou uma distância entre as trabéculas, variando entre 0,37 a 0,45 mm, enquanto que no grupo PT a separação inter-trabecular variou de 0,32 a 0,40 mm.

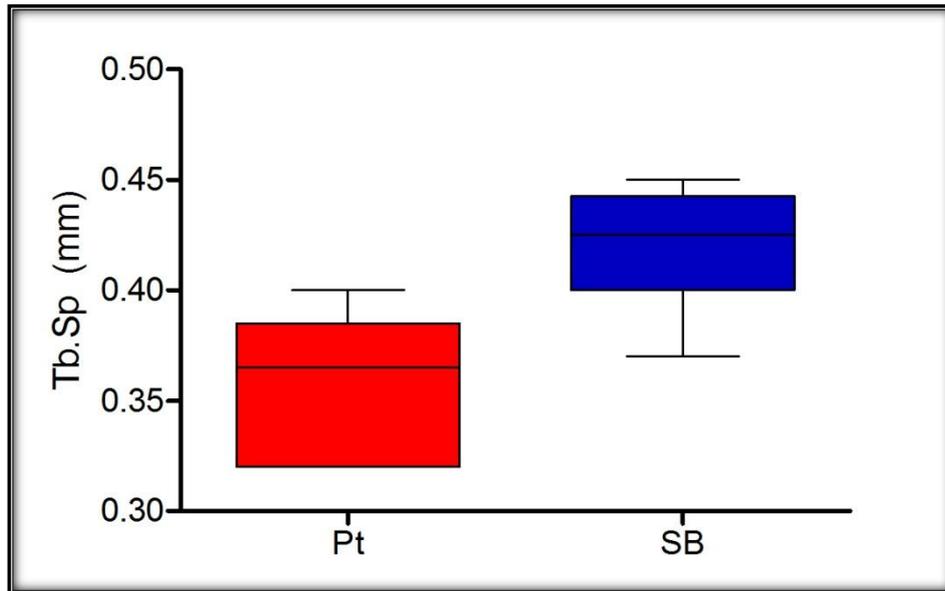


Gráfico 1 Variação da Tb.Sp nos grupos PT e SB.

5.3 Correlações entre os parâmetros volumétricos e de densidade óssea

Foram realizadas correlações entre todos os parâmetros por meio do teste de *Spearman*. As correlações significativas são relações numéricas entre duas variáveis quantitativas para ($p < 0,05$). Estas correlações foram realizadas entre os grupos separadamente (intra-grupos) e agrupados (inter-grupos). As correlações representadas nos gráficos 2, 3 e 4 foram entre os parâmetros de densidade óssea. As correlações representadas pelos gráficos 5 e 6 foram entre os parâmetros volumétricos e de densidade óssea.

5.3.1 Correlações intra-grupos

Houve uma correlação negativa e elevada ($r = -0,83$, $p = 0,042$) entre o Tb.N e a Tb.Th, no grupo PT e uma correlação semelhante ($r = -0,84$, $p = 0,036$) no grupo SB. Espera-se que, quanto mais espessa for a trabécula óssea, menor será o número delas por mm, sugerindo maior densidade óssea (Gráfico 2).

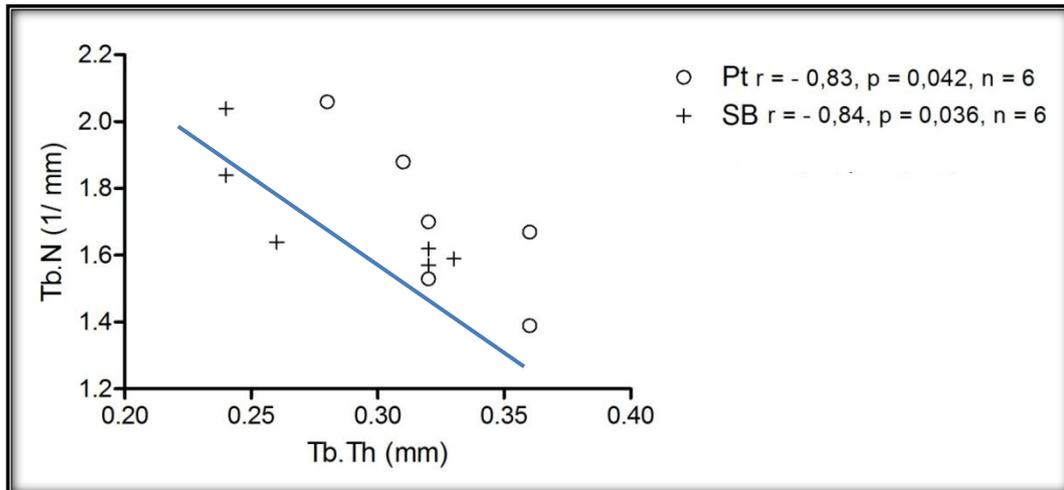


Gráfico 2 Correlação entre Tb.Th e Tb.N nos grupos PT e SB.

Houve uma correlação positiva e elevada ($r = 0,93$, $p = 0,008$) entre a Tb.Sp e a Tb.Th do grupo PT. Esta correlação significa que, quanto maior for a espessura da trabécula, maior é a distância entre elas. (Gráfico 3).

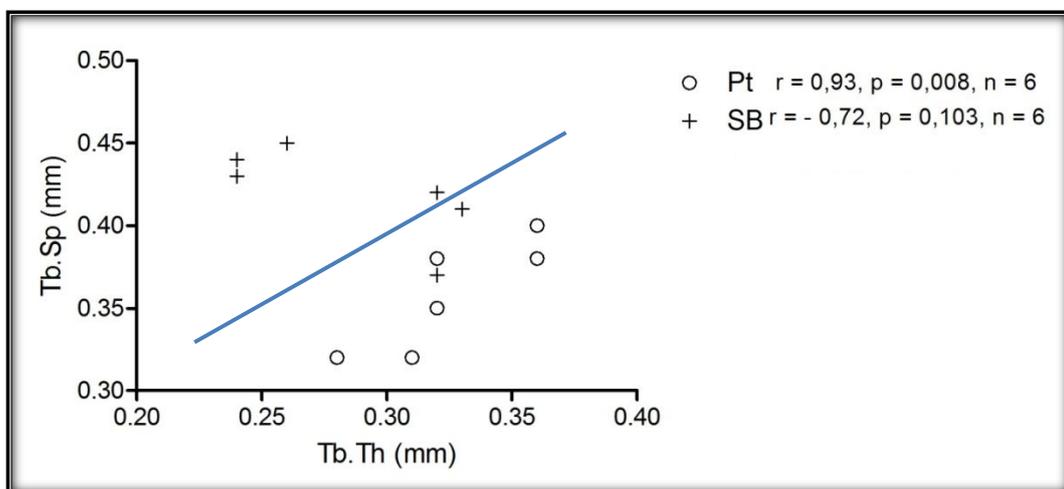


Gráfico 3 Correlação entre Tb.Sb e Tb.Th no grupo PT.

Existiu uma outra correlação negativa e elevada ($r = -0,92$, $p = 0,008$) entre a Tb.Sp e o Tb.N no grupo PT. Quanto maior for a distância entre as trabéculas ósseas, menor é o seu número por mm (Gráfico 4).

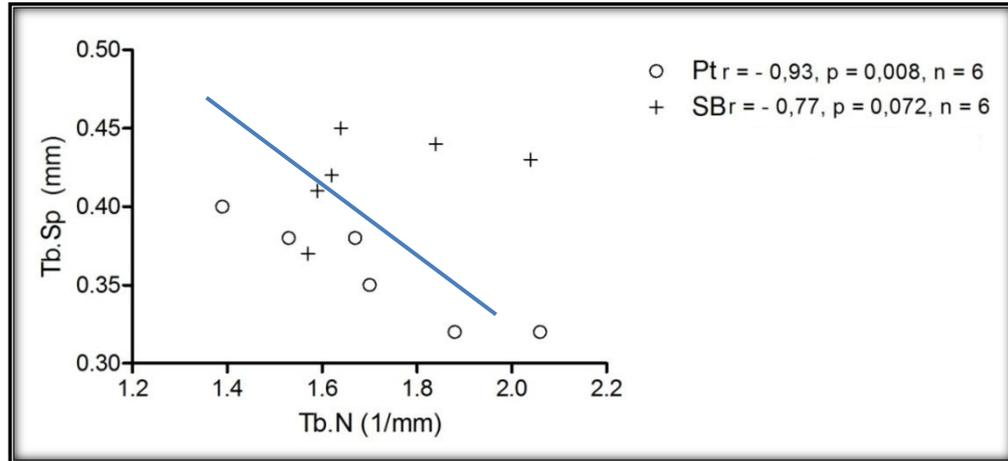


Gráfico 4 Correlação entre Tb.Sp e Tb.N no grupo PT.

Houve uma correlação positiva e elevada ($r = 0,84$, $p = 0,036$) entre o BV/TV (parâmetro volumétrico) e a Tb.Th (parâmetro de densidade) no grupo SB. Quanto maior for a proporção de osso em relação ao volume total de tecido, possivelmente, a espessura das trabéculas da medular deste osso será maior (Gráfico 5).

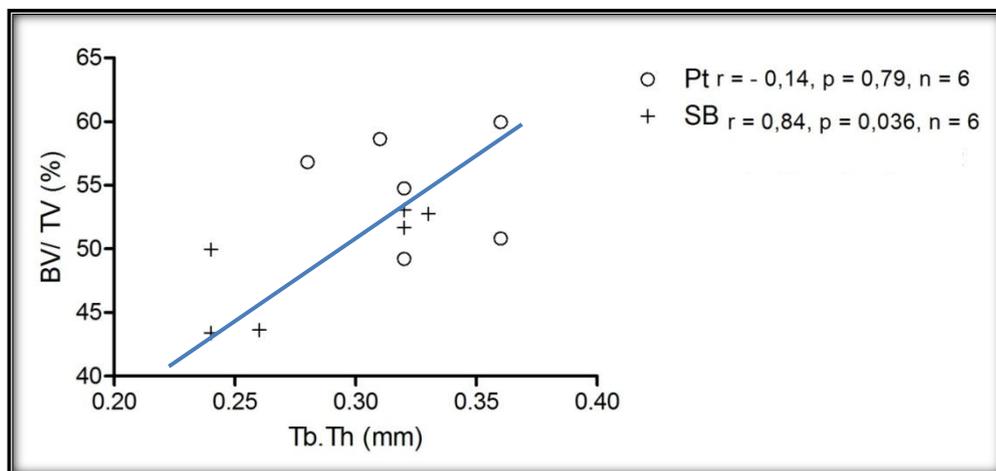


Gráfico 5 Correlação entre BV/TV e Tb.Th no grupo SB.

Uma correlação positiva e elevada ($r = 0,89$, $p = 0,015$) entre o BV e a Tb.Th no grupo SB. Quanto maior for o volume ósseo, supõe-se que haja uma maior espessura trabecular (Gráfico 6).

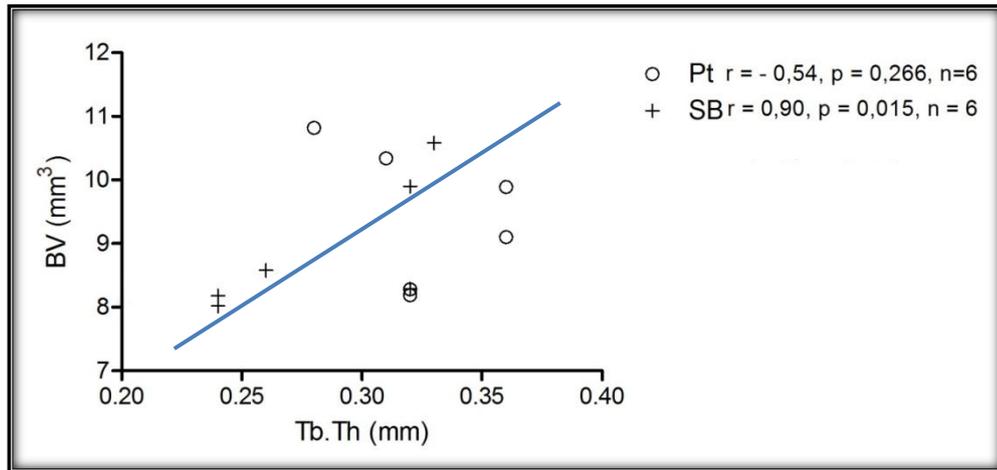


Gráfico 6 Correlação entre o BV e a Tb.Th, no grupo SB.

5.3.2 Correlações intergrupos

Reunindo-se os grupos PT e SB, a mesma correlação negativa e elevada ($r = -0,64$, $p = 0,025$) ocorre entre o Tb.N e a Tb.Th, vista no (Gráfico 7). Quanto mais espessa for a trabécula óssea, haverá um menor número delas por mm, sugerindo maior densidade óssea.

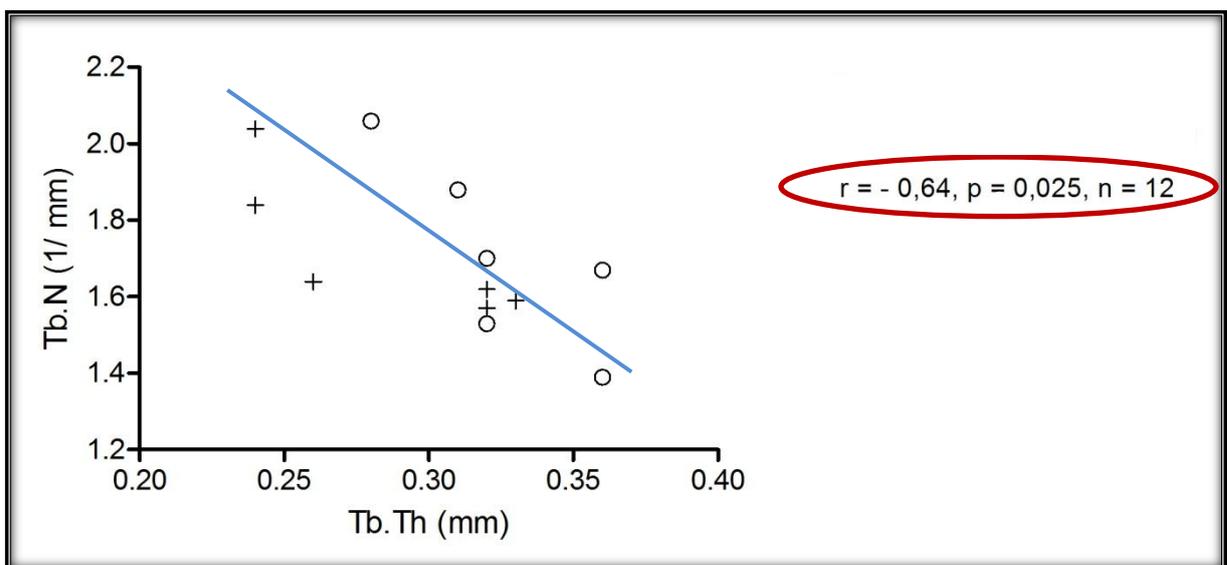


Gráfico 7 Correlação entre Tb.Th e Tb.N, quando feita nos dois grupos reunidos.

Uma outra correlação negativa e elevada intergrupos ($r = -0,70$, $p = 0,012$) ocorreu entre a BV/TV e a Tb.Sp. Quanto maior for a distância entre as trabéculas, maior é a presença de espaço medular com osso pouco mineralizado, pressupondo uma menor proporção de tecido ósseo em relação ao volume total de tecido (Gráfico 8).

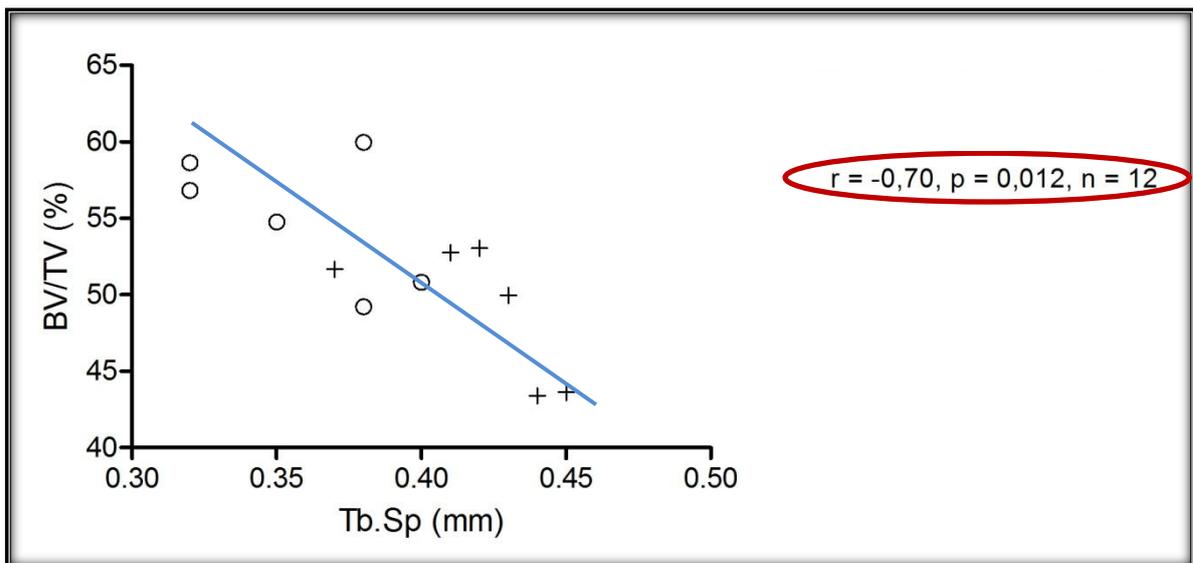


Gráfico 8 Correlação entre a Tb.Sp e a BV/TV, quando feita nos dois grupos reunidos.

5.4 Modelo de Regressão

Uma vez que as variáveis quantitativas apresentaram correlações entre si, o modelo de regressão linear simples serve para verificar se a variável dependente (BV/TV) é explicada pelas variáveis independentes (todas as demais). Pelo método de *Stepwise*, definiu-se que 54% da variabilidade é dependente da variável BV/TV. Verificou-se também, que a distribuição amostral dos resíduos foi normal, homocedástica e que os erros são descorrelacionáveis.

6 DISCUSSÃO

Estudos experimentais (SASKA et al., 2009; NETO et al., 2010; ESTEVES et al., 2011) têm demonstrado resultados similares na fixação de enxertos ósseos em bloco, realizados em ratos e coelhos, quando utilizados o parafuso de titânio e os cianoacrilatos. Porém, nenhum estudo verificou a capacidade do etil-cianoacrilato de promover a fixação e incorporação de enxertos ósseos em calota de ratos, analisada por meio de imagens geradas por microTC.

De acordo com Bedini et al. (2009), a necessidade por um método não destrutivo, não invasivo e que permita a visualização de um espécime em 3D, faz da microTC uma técnica de excelência no estudo do tecido ósseo.

Na presente investigação foi utilizado um voxel isotrópico de $14 \mu\text{m}^3$. Esta resolução foi capaz de detectar pequenas formações de tecido ósseo em ambos os métodos de fixação analisados. Segundo Umoh et al. (2009), um voxel isotrópico de $45 \mu\text{m}^3$ foi suficiente para se obter correlações estatisticamente significativas e elevadas, entre a microTC e a histomorfometria na análise da microarquitetura óssea em calvária de ratos.

No presente estudo todos os espécimes de enxerto fixados com adesivo etil-cianoacrilato e todos os espécimes de enxerto fixados com parafuso de titânio mostraram imagem sugestiva de formação de tecido ósseo mineralizado, entre o enxerto e o leito receptor, detectado pelo exame de microTC. Em uma das imagens do grupo SB, a formação de tecido ósseo mineralizado foi mais intensa, preenchendo uma grande parte da interface entre os fragmentos, como verificado na Figura 27. A presença de espaços escuros na imagem sugere uma penetração do adesivo ou uma proliferação de fibroblastos oriundos do tecido conjuntivo adjacente, e/ou a presença de uma matriz osteóide, ainda não mineralizada e não captada pelo aparelho de microTC (PARK et al., 2011).

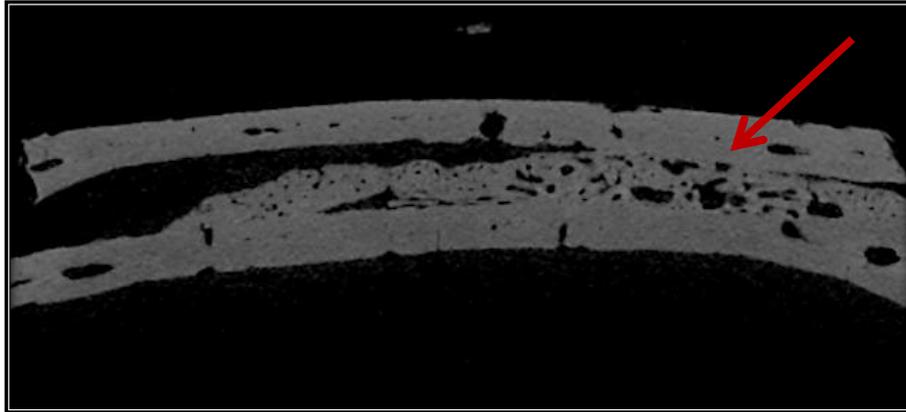


Figura 27 Formação de tecido ósseo mineralizado na interface do enxerto fixado com etil-cianoacrilato.

As imagens sugestivas de formação de pontes ósseas apresentadas neste estudo, não foram confirmadas no trabalho de Bas et al. (2012), que não verificaram por meio de análise histológica a formação de osso, entre os enxertos removidos da tíbia de coelhos e o leito receptor, fixados com n-butil-cianoacrilato, após 12 semanas de incorporação. Os autores ressaltaram que o método de aplicação do adesivo foi na superfície óssea, o que pode ter contribuído para obtenção de resultados desfavoráveis. O mesmo método de aplicação foi realizado por Saska et al. (2009), que também relataram a presença do adesivo etil-cianoacrilato na interface em até 120 dias após a sua aplicação. No presente estudo, a metodologia de aplicação de adesivo foi distinta dos métodos propostos anteriormente, porém similar a técnica proposta por Neto et al. (2010), que fizeram a deposição do adesivo nos bordos do enxerto e não em toda a sua superfície. Assim, não detectaram a presença do n-butil-cianoacrilato, após 42 dias de incorporação do enxerto. Por outro lado, Esteves et al. (2011) verificaram em seu estudo que, mesmo permitindo a manutenção e estabilidade do enxerto por 30 dias de acompanhamento, a persistência do etil-cianoacrilato na interface enxerto/leito receptor não permitiu a formação de tecido ósseo neste local.

Estes diferentes resultados podem advir dos métodos de aplicação descritos e da viscosidade do produto. Em nenhum dos estudos analisados (SASKA et al., 2009; NETO et al., 2010; ESTEVES et al., 2011; BAS et al., 2012) foi descrita claramente a técnica de aplicação do adesivo, a quantidade de adesivo utilizado para fixação e nem os instrumentos de inserção do material.

No presente estudo foi utilizado e descrito um criterioso método de aplicação do adesivo. O etil-cianoacrilato foi depositado nos bordos do enxerto por meio de uma seringa e agulha de insulina, na quantidade de uma gota por margem, contendo 0,01 ml da cola/gota. O uso de um material mais viscoso também serviu para evitar seu escoamento para a superfície do leito receptor. A penetração do adesivo entre os fragmentos interfere diretamente nos resultados pela alteração no reparo do tecido ósseo (SASKA et al., 2009; ESTEVES et al., 2011).

Na análise descritiva, o grupo PT apresentou médias mais elevadas do que o grupo SB nos parâmetros volumétricos (BV e BV/TV) e na espessura trabecular (Tb.Th). Possivelmente, o método utilizado para o posicionamento das ROIs teve grande influência a favor do grupo PT, na composição destes resultados. Como no grupo PT havia o parafuso na região central da imagem, para a padronização do método, as ROIs só puderam ser posicionadas nos bordos da imagem. Para seguir a padronização, as ROIs também foram posicionadas nos bordos da imagem no grupo SB. Contudo, deixou-se de contabilizar inúmeros pixels de tecido ósseo mineralizado, presentes na região central das imagens do grupo experimental (Figura 28).

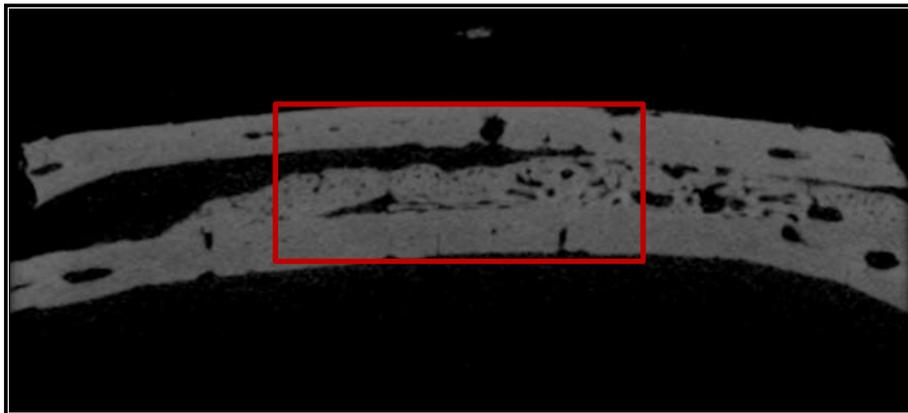


Figura 28 Região central da imagem do grupo SP, que não foi analisada pelo programa *CTAnalyzer*.

Comparativamente, no teste U de *Mann Whitney* não houve diferença significativa na maioria dos parâmetros avaliados, entre os grupos PT e SB. Sugere-se então, a partir de imagens geradas por microTC, que o método de fixação por meio do adesivo etil-cianoacrilato em ratos proporciona estabilidade suficiente ao enxerto ósseo autógeno em bloco, permitindo a formação de tecido ósseo e sua incorporação, no período proposto. O único parâmetro, em que ocorreu uma diferença significativa foi a Tb.Sp, que foi maior no grupo SB, no qual uma maior distância entre as trabéculas, pressupõe um tecido ósseo mais medular e esponjoso. Entretanto, este parâmetro está relacionado apenas com a densidade e não com a formação óssea. Para que haja incorporação do enxerto, basta que o mesmo fique estável, que não haja espaço morto entre os fragmentos e tenha suporte sanguíneo adequado (BEDINI et al., 2009; CORINALDESI et al., 2009).

A maioria das correlações entre os parâmetros de densidade, que foram estatisticamente significativas, seguiram os padrões da microarquitetura do tecido ósseo. A correlação entre espessura (Tb.Th) e número de trabéculas (Tb.N) foi inversamente proporcional (grupos PT e SB), assim como a correlação entre distância inter-trabecular (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N) (apenas no grupo PT). Somente a correlação ($r= 0,93$, $p= 0,008$) entre os parâmetros de densidade (Tb.Th x Tb.Sp do grupo PT) mostrada no Gráfico 3, não apresentou uma coerência com os padrões da microarquitetura óssea propostos por Brandi (2009), pois um aumento na espessura de uma trabécula reflete em uma menor distância para a trabécula adjacente, quando analisada em uma mesma área de tecido ósseo. As correlações entre os parâmetros de densidade e os parâmetros volumétricos também atenderam aos padrões da microarquitetura óssea no grupo SB, visto que, quanto maior for BV ou BV/TV maior deverá ser a espessura das trabéculas (Tb.Th). Esta correlação corrobora com o estudo de Hildebrand et al. (1999), que também verificaram uma correlação positiva e elevada entre a Tb.Th e o BV/TV, gerados por meio de microTC. Contudo, um aumento do volume ósseo, não está relacionado, necessariamente, com a densidade deste mesmo tecido. Nas etapas iniciais da reparação óssea há formação de tecido ainda pouco mineralizado e muito esponjoso. Com o transcorrer do tempo o tecido ósseo vai se mineralizando e se tornando menos medular, aumentando, assim, sua densidade. Como no presente estudo, o tempo de avaliação foi de 30 dias, espera-se encontrar neste estágio de

maturação, um bom volume de tecido ósseo neoformado, associado a uma maior densidade óssea.

Durante o processo de binarização das imagens foi determinado para este estudo o uso de um *threshold* manual e variável, de acordo com as diferenças de densidade óssea observadas em cada amostra (BOUXSEIN et al., 2010). Embora Maréchal et al. (2005) e Park et al. (2011) utilizaram um *threshold* global para determinar a escala de cinza de todas as amostras, o uso de um *threshold* fixo para todas as imagens pode ocasionar uma leitura errônea do *software*, produzindo resultados sub ou superestimados da quantidade de voxels, que estão envolvidos com tecido ósseo mineralizado (BOUXSEIN et al., 2010).

Park et al. (2011) avaliaram a indução de formação óssea após a aplicação de BMP₂, em defeito crítico na calvária de ratos por imagens de microTC, com uso de diferentes *thresholds*. Verificaram que o volume ósseo neoformado nas imagens analisadas, com baixos *thresholds*, teve uma correlação elevada com a análise histomorfométrica, enquanto que as imagens com *thresholds* altos não se correlacionaram com a histomorfometria. A utilização de um *threshold* abaixo de 50 favorece a detecção de tecido ósseo pouco mineralizado, obtendo-se resultados volumétricos e de densidade mais precisos. Este achado corrobora com o presente estudo, pois apesar de ter sido utilizado um *threshold* variável (14 – 25 escala de cinza) para cada imagem, todos foram abaixo de 30.

Em uma amostra do grupo PT houve reabsorção óssea detectável no bordo direito da imagem, o que contribuiu para não contagem de voxels na região. No grupo SB, não ocorreu reabsorção óssea detectável em nenhuma das imagens. Este fato sustenta uma afirmação proposta por Saska et al. (2009), que verificaram em seu experimento, que a pressão exercida pelo parafuso sobre o enxerto favorece a uma maior perda óssea volumétrica (Figura 29).



Figura 29 Reabsorção óssea no espécime do grupo PT (seta).

Segundo Esteves et al. (2011) uma reabsorção parcial do enxerto em bloco é um processo natural, que ocorre durante o estágio de remodelação. Contudo, a presença de reação inflamatória e micro-movimentos, tende a intensificar este processo. É importante enfatizar que enxertos ósseos em calvária de ratos não estão sujeitos a movimentação, e sua incorporação ocorre entre 10 e 30 dias. Na região bucal, diferentemente da calvária, a ação muscular e a mastigação, podem deslocar o fragmento ósseo com mais facilidade, exigindo que nesta área a fixação seja mais eficiente.

A utilização do parafuso de titânio para fixação de enxerto ósseo na calvária dos ratos pode ser crítica, pois a espessura do osso parietal é muito delgada, dificultando seu uso. Assim, Esteves et al. (2011) utilizaram no seu grupo controle, apenas enxertos justapostos ao tecido ósseo. Esta técnica se contrapõe ao presente estudo, pois foi utilizado no grupo controle a fixação do enxerto por meio de um parafuso de titânio. Este método de fixação, quando realizado de maneira correta, não oferece riscos à sobrevivência do animal. O parafuso tem que possuir no máximo 2 mm de comprimento, para não comprimir a dura-máter. Como no mercado é difícil encontrar parafusos com esta medida, estes devem ser cortados para ficar com comprimento adequado. Deve-se ter o cuidado em preservar pelo menos duas espiras do parafuso durante o corte, pois o travamento do enxerto depende do embricamento destas espiras com o osso do leito receptor.

A utilização de imagens geradas por microTC produz resultados precisos da microarquitetura óssea em ratos. Desta forma, a precisão dos dados favorece a uma diminuição no número de animais da amostra (COWAN et al., 2007; KOCHI et al., 2010).

A microTC proporciona uma grande precisão na avaliação dos parâmetros qualitativos e quantitativos do tecido ósseo, quando comparada com a histomorfometria. Uma elevada correlação estatística entre a microTC e a histomorfometria foi observada na avaliação da formação de tecido ósseo sob uma barreira de titânio (MARÉCHAL et al., 2005) e em defeitos críticos em calvária de ratos (UMOH et al., 2009)

O exame de microTC apresenta como limitações a impossibilidade de avaliar o crescimento ósseo em nível celular e a capacidade de detectar apenas o tecido ósseo mineralizado (MARÉCHAL et al., 2005; COWAN et al., 2007). No entanto, se constitui como excelente método não destrutivo, que possibilita a avaliação do tecido ósseo intacto. Com o aprimoramento das técnicas de medições em 3D de alta resolução, uma nova maneira de analisar a arquitetura óssea torna-se disponível.

Como a total degradação do etil-cianoacrilato é necessária, para uma completa reparação do tecido ósseo na interface enxerto/leito receptor, futuros estudos, com um tempo maior de avaliação da incorporação do enxerto são necessários para verificar a relação entre absorção do adesivo e crescimento ósseo.

7 CONCLUSÃO

Mediante a metodologia utilizada no estudo e os resultados obtidos pode-se concluir que:

- O exame de microtomografia computadorizada foi capaz de detectar formações de tecido ósseo mineralizado, na interface enxerto/leito receptor após 30 dias do experimento. Uma seleção criteriosa dos *thresholds* durante o processo de binarização foi fundamental para precisão dos resultados;
- Comparativamente, no modelo utilizado neste estudo, o etilcianoacrilato foi tão eficiente quanto o parafuso de titânio na incorporação de enxerto ósseo na calvária de ratos, tanto em relação aos parâmetros volumétricos, quanto em relação aos parâmetros de densidade óssea com exceção da Tb.Sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, D. et al. Craniofacial skeletal fixation using biodegradable plates and cyanoacrylate glue. **Plast Reconst Surg**, 99: 1508–1517, 1997.

ALONSO, F.; JORNET, P. Effects of scalpel (with and without tissue adhesive) and cryosurgery on wound healing in rat tongues. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 100:58-63, 2005.

ALONSO, F.; JORNET, P. Clinical-pathological study of the healing of wounds provoked on the dorso-lingual mucosa in 186 albino rats. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, 136: 119-124, 2007.

AMARANTE, M. et al. Cyanoacrylate fixation of the craniofacial skeleton an experimental study. **Plast. Reconst Surg**, 95: 639-46, 1995.

ANAVI, Y. et al. Bone remodeling in onlay beta-tricalcium phosphate and coral grafts to rat calvaria: microcomputed tomography analysis. **Jornal Oral Implant.** 37:4, 379-386, 2011.

BAS, B. et al. Screw Fixation is Superior to N-Butyl-Cyanoacrylate in Onlay Grafting Procedure: a Histomorphologic Study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 41: 537-543, 2012.

BEDINI, R. et al. The Use of Microtomographic in bone Tissue and Biomaterial Three-Dimensional Analysis. **Ann Ist Super Sanita**, 45(2): 178-184, 2009.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for Assessment of Bone Microstructure in Rodents Using Micro–Computed Tomography. **J Bone Mineral Res**, 25 (7): 1468-86, 2010.

BRANDI, L. B. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology**, 48: 3-8, 2009.

BRUGNAMI, F.; CAIAZZO, A.; LEONE, C. Local Intraoral Autologous Bone Harvesting for Dental Implant Treatment: Alternative Sources and Criteria of Choice. **Keio J Med**, 58 (1):24 – 28, 2009.

BUCKLEY, M.; BECKMAN, E. Adhesive Use in Oral and Maxillofacial Surgery. **Oral Maxillofacial Surg Clin N Am**, (22), 195–99, 2010.

CHAPPARD, D. et al. Computed Microtomography of Bone Specimens for Rapid Analysis of Bone Changes Associated with Malignancy. **The Anatomical Record**, 293: 1125-1133, 2010.

CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone Augmentation Procedures in Implant Dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**,24: 237-59, 2009.

- CHOI, B. H. et al. Cyanoacrylate Adhesive for Closing Sinus Membrane Perforations During Sinus Lifts. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, 34: 505-509, 2006.
- CORINALDESI, G. et al. Evaluation of Survival and Success Rates of Dental Implants Placed at the of or After Alveolar Ridge Augmentation with an Autogenous Mandibular Bone Graft an Titanium Mesh: a 3 to 8- year Retrospective Study. **Int J Oral Maxillofac Implants**,24: 1119-1128, 2009.
- COWAN, C. M. et al. MicroCT Evaluation of Three-Dimensional Mineralization in Response to BMP-2 Doses In Vitro and in Critical Sized Rat Calvarial Defects. **Tissue Engineering**. 13:3, 501-515, 2007.
- EMAM, H. et al. Microcomputed Tomographic and Histologic Analysis of Anorganic Bone Matrix Coupled with Cell-Binding Peptide Suspended in Sodium Hyaluronate Carrier After Sinus Augmentation: a Clinical Study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 26: 561-570, 2011.
- ESTEVEZ, C. J. et al. Histomorphometric analysis of repair process of autogenous bone grafts fixed at rat calvaria with cyanoacrylate. **J Appl Oral Sci**. 19(5):529-34, 2011.
- FERRIGNO, C. et al. Comparação entre os efeitos da mistura gelatina-resorcina-formaldeído e do n-butil-cianoacrilato em angiografias de veia jugular externa de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Acta Cirúrgica Brasileira**. 18 (3): 250-56, 2003.
- FERRIN L. et al. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: An update. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 1;14 (8):402-7, 2009.
- HILDEBRAND, T. et al. Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. **J Bone Miner Res**, v.14, n.7,p.1167-74, Jul. 1999.
- INAL S. et al. Biochemical and histopathological findings of N-Butyl-2-Cyanoacrylate in oral surgery: an experimental study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** ,102: 14-7, 2006.
- JONHSON, L. C. et al. Longitudinal Live Animal MicroCT allow for Quantitative Analysis of Tumor Induced Bone Destruction. **Bone**, 48(1): 141-151, 2011.
- KIMMID A, NOGUEIRA T, ARAÚJO A, SALGADO M, GOMES M. Avaliação Histológica do Étil- Cianoacrilato na Reparação Óssea de Ratos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo. 29 (1/2): 145-157, 2000.
- KOCHI G. et al. A comparative study of microfocus CT and histomorphometry in the evaluation of bone augmentation in rat calvarium. **Journal of Oral Science**. 52:2, 203-211, 2010.
- MAIORANA, C. et al. Histomorfometric Evaluation of Anorganic Bovine Bone Coverage to Reduce Autogenous Grafts Resorption: Preliminary Results. **The Open Dentistry Journal**, 5: 71-78, 2011.
- MARÉCHAL et al. Histomorfometric and microcomputed tomography of bone augmentation under titanium membrane. **Clin. Oral Impl. Res**. 16, 708-714, 2005.

NETO, P. J. O. et al. Tomographic, Histological and Immunohistochemical Evidences on Use of N-Butyl-2-Cyanoacrylate for Onlay Graft Fixation in Rabbits. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, 2010.

PARFFIT A, DREZNER M, GLORIEUX F. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. **J Bone Mineral Res**; 2: 595-610, 1987.

PARK, C. H. et al. Three Dimensional Microcomputed Tomographic Imaging of Alveolar Bone in Experimental Bone Loss or Repair. **J Periodontol**, 78(2): 273-281, 2007.

PARK, S.U. et. al. The evaluation of the correlation between histomorphometric analysis and microcomputed tomography analysis in AdBMP-2 induced bone regeneration in rat calvarial defects. **J Periodontal Implant**. 41: 218-226, 2011.

PEREZ, M. et al. Use of N-Butyl-2-Cyanoacrylate in Oral Surgery: Biological Evaluation. **Artif Organs**, 24(3): 241-3, 2007.

REBAUDI, A. et al. Microcomputed Tomographic Analysis of Bone Reaction at Insertion of Orthodontic Mini-implants in Sheep. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 26: 1233-1240, 2011.

SANTOS, F. et al. Use of n-butyl cyanoacrylate glue in the recession sulcoplasty in rabbits - histologic study. **Ciência Rural, Santa Maria**, 34 (1): 139-45, 2004.

SASKA, S. et al. Fixation of autogenous bone grafts with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**. 38: 180-86, 2009.

SASKA S, ROSLINDO E, BOLINI P, GASPAR A Use of ethyl-cyanoacrylate adhesive for bone repair. **Rev Bras Ortop**. 39 (8): 461-67, 2004.

SINGER, A. J.; MCCLAIN, S. A.; KATZ, A. A Porcine Epistaxi Model: Hemostatic Effects of Octylcyanoacrylate. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 130:553-7, 2004.

STEPHAN, S.J. et al. Injectable Tissue Engineered Bone Repair of a Rat Calvarial Defect. **Laryngoscope**, 120(5): 895-901, 2010.

STOCK, S. R. et al. Bone Formation During Forelimb Regeneration: a Microtomographic Analysis. **Developmental Dynamics**, 226: 410-417, 2003.

UEDA, E. L. et al. Avaliação de um Cianocrilato Quanto à Esterilidade e Atividade Biocida. **Arq Bras Oftalmol**, 67:397-400, 2004.

UMOH, J.U. et al. In vivo micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. **Phys Med Biol**. 54: 2147-2161, 2009.

ZERBO, I. R. et al. Fate of Monocortical Bone Blocks Grafted in the Human Maxila: a Histological and Histomorfometric Study. **Clin Oral Impl Res**, 14: 759-766, 2003.

ZUHR, F.S. et al. Hard Tissue Alterations After Socket Preservation with Additional Buccal Overbuilding: a Study in the Beagle Dog. **J Clin Periodontol**, 36: 898-904, 2009.

WOLFENSOHN, S.; LOYD, M. Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. 3rd ed. Oxford UK: Blackwell Publishing; 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Aprovação na CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 015/2011 – CEEA sobre “A EFICÁCIA DO ADESIVO ETIL-CIANOACRILATO NA ESTABILIZAÇÃO DE ENXERTOS ÓSSEOS: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS.”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de NEUZA MARIA PICORELLI ASSIS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 03/05/2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 015/2011 - CEEA about “EFFICACY OF ETHYL-CYANOACRYLATE ADHESIVE IN THE STABILIZATION OF BONES GRAFTS: NA EXPERIMENTAL STUDY IN RATS” – NEUZA MARIA PICORELLI ASSIS - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 03/05/2011.

Juiz de Fora, 04 de maio de 2011.



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA