

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

PAULA CAROLINA DE SOUZA CHANDRETTI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DE ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS
FIXADOS NAS EXTREMIDADES COM ETILCIANOACRILATO
COMPARADOS COM ENXERTOS FIXADOS COM PARAFUSO DE
TITÂNIO NA REGIÃO CENTRAL: UM ESTUDO EXPERIMENTAL EM
RATOS**

Juiz de Fora

2014

PAULA CAROLINA DE SOUZA CHANDRETTI

Análise histológica de enxertos ósseos autógenos fixados nas extremidades com etilcianoacrilato comparados com enxertos fixados com parafuso de titânio na região central: um estudo experimental em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.
Área de concentração: Clínica Odontológica

Orientadora: Prof^a. Dra. Neuza Maria Souza Picorelli Assis
Coorientadora: Prof^a. Dra. Ângela Maria Gollner

Juiz de Fora

2014

Chandretti, Paula Carolina de Souza.

Análise histológica de enxertos ósseos autógenos fixados nas extremidades com etilcianoacrilato comparados com enxertos fixados com parafuso de titânio na região central: um estudo experimental em ratos / Paula Carolina de Souza Chandretti. 2014.

78f. : il.

Orientadora: Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Coorientadora: Ângela Maria Gollner

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia - Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - Mestrado em Clínica Odontológica, 2014.

1. Enxerto ósseo.
2. Fixação óssea.
3. Adesivo tecidual.

Paula Carolina de Souza Chandretti

Análise histológica de enxertos ósseos autógenos fixados nas extremidades com etilcianoacrilato comparados com enxertos fixados com parafuso de titânio na região central: um estudo experimental em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Aprovada em ____ de _____ de 20____.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Neuza Maria Souza Picorelli Assis (Orientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª Drª Ângela Maria Gollner (Coorientadora)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Pietro Mainenti
Universidade Presidente Antônio Carlos

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação

*A meu mestre e Senhor:
Jesus, meu grande amigo...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus por me sustentar em todas as etapas desta dissertação. Por ter me concedido saúde física e mental, uma família maravilhosa, duas orientadoras dedicadas e uma equipe unida e competente. Senhor, toda a honra e toda glória seja para Ti.

A meu pai, por ser minha referência e conselheiro. À minha mãe, agradeço por ter sido minha melhor amiga nesta etapa árdua. Aos meus irmãos, Maickel e Guilherme, por me orientarem, incentivarem e confiarem nos momentos difíceis. À minha cunhada, Daniele, por estar do meu lado me ouvindo. Minha sobrinha, Manu, por trazer alegria e alívio nas jornadas de estudo e trabalho. Obrigada, minha família! Desculpe-me as ausências devido ao trabalho e estudo.

À minha orientadora Neuza pelas oportunidades, confiança, ensino e dedicação de tantos anos e inspiração. À minha coorientadora Ângela, por ter acreditado neste trabalho e investido tempo e carinho, obrigada por abrir as portas do laboratório para mim. Sou muito grata a vocês duas! Almejo ser uma professora tão competente como vocês.

À minha equipe: Rodrigo, meu braço direito, agradeço por compartilharmos este desafio sempre com muita competência e amizade; Priscila, por se integrar à equipe da maneira mais perfeita! Carol, Júnior e Thiago, agradeço a vocês por nos apoiarem e se dedicarem ao trabalho com os animais. Vocês são presentes de Deus para mim.

À professora Nádia por nos permitir utilizar o laboratório e nos ensinar tanto no tratamento dos animais.

À Aline por me ajudar com muita paciência e competência com as análises estatísticas.

À professora Sônia Cupolilo por me incentivar sempre com uma palavra de força.

À minha equipe de trabalho, Gustavo, Rodrigo, Pietro e Herbert, saibam que, em cada página deste trabalho, tem um pouco do que vocês me ensinaram. Obrigada pelas portas abertas e pelos incentivos. Tenho o prazer de trabalhar com vocês!

À minha amiga e companheira de trabalho Gilda Peron, participante indireta, porém indispensável para eu conseguir atingir este objetivo. Aprendo muito contigo não só na profissão mas, também, nas questões que os livros não ensinam como educação, respeito e carinho com o próximo. À minha amiga Thaís Polastri, por sempre me ouvir e, com tanto carinho, me apoiar. Às secretárias, Estela, Simone e Fabiana, pela paciência e dedicação.

Aos funcionários do laboratório Cito por me receberem, mesmo com suas atividades diárias em andamento, sempre com muita educação, profissionalismo e respeito. Nathália, Leonardo, Lucília e Regina, vocês fazem parte desta vitória.

Aos docentes Eduardo Vilella e Josemar Parreira Guimarães por fazerem parte da minha trajetória acadêmica. Admiro muito vocês.

Aos meus treinadores físicos, Marlos e Luana, por me proporcionarem momentos de alívio em meio aos estudos e trabalho.

RESUMO

Os enxertos ósseos autógenos *onlay* são largamente utilizados na reconstrução de rebordos alveolares atróficos. Recentemente, o etilcianoacrilato tem sido sugerido para a fixação desses enxertos. O objetivo deste estudo foi realizar uma análise histológica qualitativa e semiquantitativa dos enxertos ósseos autógenos em calota de ratos fixados com adesivo etilcianoacrilato e com parafuso de titânio durante 30 dias. Quatorze ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) foram submetidos a enxertos ósseos autógenos parietais *onlay*, fixados com etilcianoacrilato (Superbond® Flex Gel® - SB, n = 7), apenas nas bordas e parafuso de titânio no centro (n = 7). Após 30 dias, os animais foram eutanasiados e removidas às amostras para análise histológica. Depois da descalcificação das peças, estas foram coradas com hematoxilina e eosina. O seguinte aspecto foi analisado em ambos os grupos: vitalidade do enxerto pela presença de osteócitos. Na interface, foi avaliada a presença do adesivo (SB), presença de reação tecidual com formação de matriz osteoide, presença de reabsorção óssea, formação de capilares, infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica, presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os resultados foram submetidos à análise estatística realizada pelo software SPSS Statistic 15.0 ® e também foram realizados testes não paramétricos. Foi usado o teste de Mann-Whitney e o teste Exato de Fisher para comparação intergrupos e, para comparações intragrupos, foi usado o teste de Wilcoxon e o teste de McNemar (p -valor < 0,05) e todos os testes foram bicaudais. Nas avaliações qualitativas, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. Foi obtida diferença significativa na comparação da avaliação quantitativa intergrupo: PT apresentou mais osteócitos na região central ($p = 0,035$); em SB, foi observada maior inflamação ($p = 0,030$) e mais osteoclastos ($p = 0,048$). Quando se compararam as regiões centrais e as extremidades dos enxertos, o grupo PT demonstrou um processo de neoformação óssea mais adiantado, principalmente na região central. Nenhum enxerto se apresentou osteointegrado no grupo SB com 30 dias e, no PT, havia pontos de soldadura do enxerto ao osso receptor, mas não uma completa incorporação do enxerto ao leito receptor.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Fixação óssea. Adesivo tecidual.

ABSTRACT

Autogenous onlay bone grafts are widely used in the reconstruction of atrophic alveolar ridges. Recently, etilcianoacrilate was suggested for fixing autogenous bone onlay graft. The aim of this study was to perform a qualitative and semiquantitative histological analysis of autogenous bone grafts in the calvaria of rats fixed with etilcianoacrilate adhesive and titanium screw for 30 days. Fourteen Rattus novergicos Albinus (Wistar) underwent onlay parietal bone autografts fixed with etilcianoacrilate (Superbond Gel® Flex® - SB, n = 7) only in the edges and titanium screw in the center (n = 7). After 30 days, the animals were euthanized and the samples removed for histological analysis. After decalcification, the specimens were stained with hematoxylin and eosin. The graft vitality to the presence of osteocytes was analysed in the both groups. The interface was evaluated for the presence of: the adhesive (SB), tissue reaction with formation of osteoid matrix, bone resorption, formation of capillary, inflammatory infiltration, fibroblast proliferation, osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. Statistical analysis of the results by SPSS Statistic 15.0® software and nonparametric tests were performed. Mann-Whitney and Fisher's exact test were used for comparison between groups. Wilcoxon test and McNemar were used for intragroup comparisons (p - value < 0.05). In qualitative assessments, no statistically significant differences were found. A significant difference was found in the intergroup comparison for the quantitative evaluation: the central region of the PT group presented more osteocytes ($p = 0.035$), increased inflammation ($p = 0.030$) and more osteoclasts ($p = 0.048$) were observed in the edges of the SB group. When comparing the central regions and the edges of the grafts, PT group demonstrated more bone formation in the central region. The SB groups showed no osseointegration on the graft. At 30 days in the PT group the graft was only partially integrated to the host bed.

Keywords: Bone graft. Bone fixation. Tissue adhesives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ossificação intramembranosa	20
Figura 2	Exposição cirúrgica	35
Figura 3	Osteotomia do enxerto no grupo PT	37
Figura 4	Adaptação do parafuso	37
Figura 5	Esquema da fixação no grupo PT	37
Figura 6	Osteotomia do enxerto no grupo SB e Fixação do enxerto com o adesivo aplicado nos bordos do bloco	38
Figura 7	Esquema da fixação no grupo SB	38
Figura 8	Remoção dos espécimes do grupo PT	40
Figura 9	Remoção dos espécimes do grupo SB	40
Figura 10	Bloco ósseo após a remoção do parafuso	42
Figura 11	Esquema dos cortes realizados no bloco ósseo	42
Figura 12	Grupo PT. Animal 3. Região medial do enxerto	46
Figura 13	Grupo PT. Animal 1. Região medial do enxerto	46
Figura 14	Grupo PT. Animal 1. Região medial do enxerto	48
Figura 15	A- Grupo PT. Animal 1. Região medial do enxerto. B- Grupo PT. Animal 2. Região medial do enxerto	49
Figura 16	Grupo SB. Animal 2. Região medial do enxerto	50
Figura 17	Grupo SB. Animal 2. Região medial do enxerto	52
Figura 18	Grupo SB. Animal 3. Região medial do enxerto	52
Figura 19	Grupo PT. Animal 1. Extremidade	54
Figura 20	Grupo PT. Animal 4. Extremidade	55
Figura 21	Grupo PT. Animal 7. Extremidade	56
Figura 22	Grupo PT. Animal 1. Extremidade	56
Figura 23	Grupo PT. Animal 6. Extremidade	58
Figura 24	Grupo PT. Animal 3. Extremidade	58
Figura 25	Grupo SB. Animal 5. Extremidade	60
Figura 26	Grupo SB. Animal 5. Extremidade	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise qualitativa da região medial do grupo PT	45
Tabela 2	Análise semiquantitativa da região medial do grupo PT	47
Tabela 3	Análise qualitativa da região medial do grupo SB	49
Tabela 4	Análise semiquantitativa da região medial do grupo SB	51
Tabela 5	Análise qualitativa da extremidade do grupo PT	53
Tabela 6	Análise semiquantitativa da extremidade do grupo PT	55
Tabela 7	Análise qualitativa da extremidade do grupo SB	57
Tabela 8	Análise semiquantitativa da extremidade do grupo SB	59
Tabela 9	Comparação das avaliações qualitativas entre PT e SB	61
Tabela 10	Comparação das avaliações qualitativas entre centro e extremidade de PT e SB	62
Tabela 11	Comparação das avaliações quantitativas entre regiões de PT e SB	63
Tabela 12	Comparação entre região central e extremidade de cada grupo	64

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Certificado de aprovação do Comitê de ética na experimentação animal	74
ANEXO B	Análise semiquantitativa na região medial do grupo PT	75
ANEXO C	Análise semiquantitativa na região medial do grupo SB	76
ANEXO D	Análise semiquantitativa na extremidade do grupo PT	77
ANEXO E	Análise semiquantitativa na extremidade do grupo SB	78

LISTA DE SIGLAS

AD	Adesivo
BMPs	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
CEE/UFJF	Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora
CA	Cianoacrilato
EN	Enxerto
EM	Espaço medular
GT	Grupo tratado
GC	Grupo controle
HE	Hematoxilina e eosina
IN	Infiltrado inflamatório
NE	Necrose
ND	Não determinado
ON	Ossó neoformado
PT	Grupo parafuso
RPM	Rotações por minuto
SB	Grupo Superbonder®

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	19
	2.1 Tecido ósseo	19
	2.2 Fixação rígida e os cianoacrilatos	23
	2.3 Análises histológicas e o etilcianoacrilato	27
3	PROPOSIÇÃO	31
	3.1 Objetivos específicos	31
4	METODOLOGIA	32
	4.1 Aspectos éticos	32
	4.2 Amostra	32
	4.3 Grupos	32
	4.4 Fixação dos enxertos	33
	4.5 Preparo pré-operatório	33
	4.6 Anestesias dos animais	33
	4.7 Técnicas e materiais cirúrgicos	34
	4.8 Pós-operatório	39
	4.9 Obtenção das amostras	39
	4.10 Preparo das amostras	41
	4.11 Documentação fotográfica	43
	4.12 Análises qualitativa e quantitativa	43
5	RESULTADOS	45
	5.1 Descrições dos ensaios: Grupo PT – Região medial	45
	5.1.1 Análise qualitativa	45
	5.1.2 Análise semiquantitativa	47
	5.2 Descrições dos ensaios: Grupo SB – Região medial	49
	5.2.1 Análise qualitativa	49
	5.2.2 Análise semiquantitativa	50
	5.3 Descrições dos ensaios: Grupo PT - Extremidade	53
	5.3.1 Análise qualitativa	53
	5.3.2 Análise semiquantitativa	54
	5.4 Descrições dos ensaios: Grupo SB- Extremidade	57
	5.4.1 Análise qualitativa	57
	5.4.2 Análise semiquantitativa	59
	5.5 Comparações das avaliações qualitativas	61
	5.5.1 Entre diferentes regiões dos dois grupos	61
	5.5.2 Entre diferentes regiões no mesmo grupo	62
	5.6 Comparações das avaliações quantitativas	62
	5.6.1 Entre diferentes regiões nos dois grupos	62
	5.6.2 Entre diferentes regiões no mesmo grupo	64
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	
	ANEXO A Certificado de aprovação do Comitê de ética na experimentação animal	74
	ANEXO B Análise semiquantitativa na região medial do grupo PT	75

ANEXO C	Análise semiquantitativa na região medial do grupo SB	76
ANEXO D	Análise semiquantitativa na extremidade do grupo PT	77
ANEXO E	Análise semiquantitativa na extremidade do grupo SB	78

1 INTRODUÇÃO

O sucesso dos implantes dentários está alicerçado em um volume ósseo adequado no sítio de inserção dos mesmos. No entanto, devido à frequência de defeitos ósseos localizados ou generalizados do rebordo alveolar, como resultado de atrofia, traumatismo dentário, extrações ou doenças periodontais, uma fase de reconstrução prévia é necessária para regenerar tais defeitos (MAIORANA et al, 2011; NETO et al., 2013)

Para a instalação de implantes osteointegráveis, em posição protética adequada e estética aceitável, é necessário aumentar o volume da crista alveolar em largura e altura, na tentativa de obter resultados protéticos previsíveis e aceitáveis (BRUGNAMI; CAIAZZO; LEONE, 2009; MAESTRE-FERRÍN et al., 2009; MAIORANA et al., 2011; OLIVEIRA NETO et al., 2010).

Diversas possibilidades são relatadas na literatura para a reconstrução de maxilares atróficos, como os enxertos ósseos autógenos. Estes são os mais rotineiramente usados, por serem considerados como padrão-ouro para reconstrução de defeitos nas regiões bucais e maxilofaciais. Eles apresentam vantagens em comparação com outros materiais de enxertos, pois são os únicos que carregam células ósseas imunocompatíveis vivas e além de características osteoindutoras e osteocondutoras (BRUGNAMI; CAIAZZO; LEONE, 2009; ESTEVES et al., 2011).

Segundo Saska et al. (2009), a fixação dos enxertos ósseos autógenos é um procedimento fundamental para o sucesso da regeneração óssea.

Convencionalmente, as placas e parafusos de titânio bicorticais são usados para fixação interna rígida, visto que permitem adequado posicionamento tridimensional e estabilidade ao leito receptor. Todavia, a técnica de fixação rígida possui desvantagens para a sua aplicação clínica porque exige muito tempo transcirúrgico, habilidade do cirurgião, adequada espessura óssea remanescente e passiva adaptação do bloco ósseo ao leito receptor com ausência de espaço. Além disso, há necessidade de remoção do parafuso, num segundo tempo cirúrgico, para a instalação do implante dentário na região. Outro inconveniente da técnica é a formação de artefatos em exames de imagem que interferem na observação de estruturas adjacentes ao parafuso (BAŞ et al., 2012; ESTEVES et al., 2011; OLIVEIRA NETO et al., 2010).

Com o propósito de amenizar as dificuldades inerentes à técnica de fixação interna rígida, a eficiência dos adesivos teciduais tem sido estudada para a estabilização de tecidos duros (BAŞ et al., 2012; SASKA et al., 2004).

Desde 1949, os cianoacrilatos são propostos como adesivos cirúrgicos e descritos, desde 1970, na fixação óssea (BAŞ et al., 2012). Entretanto, poucos estudos existem avaliando o processo de neoformação óssea na interface entre o enxerto ósseo em bloco e o leito receptor, utilizando este tipo de fixação (BAŞ et al., 2012; ESTEVES et al., 2011; OLIVEIRA NETO et al., 2010; SASKA et al., 2009).

Os enxertos ósseos requerem um método de fixação que não interfira na incorporação ao leito receptor. Alguns estudos mostram o retardo no reparo pela presença do adesivo na interface enxerto/leito receptor (ESTEVES et al., 2011; ESTEVES et al., 2012; SASKA et al., 2009); e, apesar de a força de adesão ser forte, estudos in vivo confirmam que a inflamação e a necrose tecidual podem

ocorrer quando o etilcianoacrilato é usado (MELO et al., 2013). Porém, nos estudos disponíveis, o método de aplicação do adesivo não está descrito. Deste modo, é importante saber se o método de aplicação do adesivo pode trazer alteração na incorporação do enxerto por meio de análise histológica.

Este estudo pré-clínico se propõe a realizar análise histológica com avaliação qualitativa e quantitativa dos enxertos ósseos autógenos fixados em calota de ratos com adesivo etilcianoacrilato comparados aos enxertos fixados com parafuso de titânio.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo pode ser descrito, segundo sua microestrutura, em quatro componentes: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis – fatores de crescimento (AARESTRUP, 2012; STERNBERG, 1997).

O desenvolvimento de qualquer tecido ósseo ocorre por dois processos: ossificação endocondral ou intramembranosa. Na ossificação endocondral, o osso substitui um modelo precursor de cartilagem hialina; ocorre em ossos longos tais como a tíbia, fíbula, fêmur e crista ilíaca. Em contrapartida, a ossificação intramembranosa é precedida por mineralização direta da matriz orgânica, sem um intermediário cartilaginoso, a partir de células osteoprogenitoras situadas no interior de membranas conjuntivas osteogênicas; característica do desenvolvimento da maior parte dos ossos do complexo craniofacial e da calota craniana (AARESTRUP, 2012; BRUGNAMI; CAIAZZO; LEONE, 2009).

Segundo Aarestrup (2012), a ossificação intramembranosa ocorre em etapas consecutivas (Figura 1):

- 1- Células mesenquimais indiferenciadas passam por modificações morfofisiológicas induzidas por expressões genéticas e originam as células osteoprogenitoras (osteoblastos) em diversos locais da membrana.
- 2- O processo evolui com a produção de trabéculas desorientadas de osteoides, formando, em cada área isolada, um centro primário de ossificação.
- 3- O osteoide depositado em cada centro primário se mineraliza.
- 4- Surgem os primeiros osteócitos.

- 5- Com o aprisionamento dos primeiros osteócitos na matriz, osteoclastos são atraídos para a membrana.
- 6- Como o osso ainda é jovem, os osteoclastos realizam o modelamento dos canais vasculares e do canal medular.
- 7- Com o amadurecimento ósseo, inicia-se o remodelamento.
- 8- Com o aumento da produção de osso, há convergência de vários centros de ossificação até a membrana se ossificar por completo.

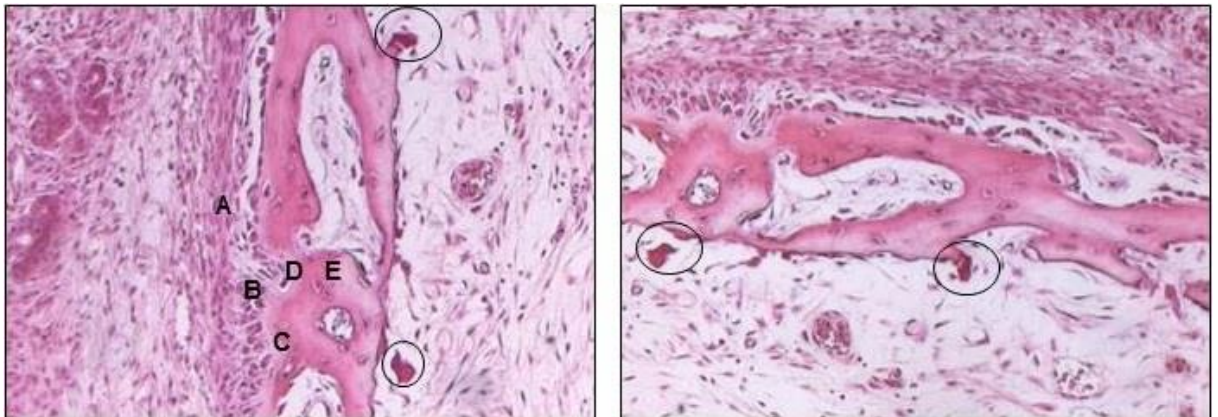


Figura 1 – Ossificação intramembranosa. Membrana conjuntiva osteogênica (A). Osteoblastos (B). Osteoide (C). Osteócitos jovens (D). Osteócitos maduros (E). Osteoclastos (círculos). HE. 100X
 Fonte – Aarestrup (2012).

Histologicamente, existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário; e o maduro, secundário ou lamelar. O tecido primário, como o próprio nome indica, é o que aparece primeiro tanto no desenvolvimento embrionário como na reparação de fraturas sendo temporário e substituído por tecido secundário. No tecido primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, existe menor quantidade de mineral e maior proporção de osteócitos. Já, no tecido ósseo secundário ou lamelar, essas fibras se organizam em lamelas paralelas ou

concêntricas separadas por uma substância cimentante que consiste em matriz mineralizada, porém com muito pouco colágeno (SENRA, 2006; STERNBERG, 1997).

A incorporação de um enxerto ósseo autógeno é o processo de integração do osso do doador na forma livre com o novo osso produzido pelo leito receptor. A incorporação pode ser obtida por três mecanismos fundamentados na osteogênese, osteocondução, osteoindução (NETO et al., 2013; BEDINI et al., 2009; CARDOSO; MACHADO, 2003).

A osteogênese é uma propriedade exclusiva do enxerto ósseo autógeno. Embora o enxerto livre possa ser rapidamente transplantado para a área receptora, os osteócitos morrem, deixando uma lacuna vazia na estrutura óssea. No entanto, uma pequena proporção de pré-osteoblastos e pré-osteoclastos pode sobreviver no enxerto. A sobrevivência de células do enxerto está na dependência direta de sua velocidade de revascularização (BRUGNAMI; CAIAZZO; LEONE, 2009; CARDOSO; MACHADO, 2003).

Na osteocondução, além da capacidade de atrair células vivas, o enxerto ósseo autógeno se comporta como um arcabouço, pois possui propriedades tridimensionais que facilitam a migração de capilares e células do leito receptor para se diferenciar dentro desta estrutura calcificada (BRUGNAMI; CAIAZZO; LEONE, 2009; CARDOSO; MACHADO, 2003).

No processo de osteoindução, na medida em que o enxerto ósseo é vascularizado e remodelado pelas células oriundas do leito receptor, há liberação de fatores de crescimento da matriz do osso enxertado. Os fatores de crescimento, sobretudo as *bone morphogenetic proteins* (BMPs), recrutam células indiferenciadas do tecido ósseo do hospedeiro para que estas se diferenciem em células produtoras

da matriz óssea. O modo de ação das BMPs é semelhante à via parácrina, na qual o fator de crescimento é transferido das células do enxerto para a população de células adjacentes do leito receptor, induzindo a diferenciação de osteoblastos (CARDOSO; MACHADO, 2003).

A reparação tecidual inicia-se com a hemostasia, formação do coágulo e de uma resposta inflamatória aguda com remoção de tecido necrótico, restos celulares e formação de uma base provisória, constituída, primeiramente, de uma malha de fibrina-fibronectina, para a migração de células adjacentes à ferida, que invadem e iniciam a limpeza e proporcionam a base para a repopulação da lesão. Em seguida, acontecem fenômenos de angiogênese e formação de tecido de granulação. Os fibroblastos secretam colágeno e o tecido de granulação transforma-se em tecido conjuntivo fibroso, que se interpõe no local da fratura, levando à formação de um calo fibroso temporário, que, em geral, está totalmente formado em uma a duas semanas. O calo fibroso é substituído por tecido osteoide, que se calcifica e forma o calo ósseo, constituído por células provenientes do perióstio e endóstio ou, frequentemente, há formação de cartilagem que precede a formação de tecido ósseo no calo. O calo ósseo primitivo é formado por um tecido ósseo fibrilar grosseiro, sendo substituído por um tecido ósseo lamelar maduro (calo secundário) num processo lento que pode durar de meses até anos. A remodelação do calo ósseo acontece por reabsorção osteoclástica e subsequente osteogênese, que converte esse osso primário em osso cortical, e restaura a forma e a integridade mecânica do osso fraturado (SENRA, 2006).

A reparação total de uma fratura será considerada completa somente quando não houver mais evidências radiográficas da linha de união dos fragmentos ósseos fraturados, quando acontecer a restauração total da arquitetura óssea

histologicamente e quando o osso neoformado recuperar integralmente sua resistência mecânica (SENRA, 2006).

A formação óssea depende de dois pré-requisitos indispensáveis: suprimento vascular amplo e imobilização. Estes princípios enfatizam o padrão de desenvolvimento ósseo inicial: na ossificação direta ou intramembranosa, o tecido conjuntivo serve como molde para a deposição óssea. O processo tem início pela diferenciação de células mesenquimatosas, que se transformam em grupos de osteoblastos, sintetizam osteoide, que logo se mineraliza, englobando alguns osteoblastos que se transformam em osteócitos. Vários desses grupos se formam havendo confluência das traves ósseas formadas, dando ao osso um aspecto esponjoso, com cavidades entre as traves penetradas por vasos sanguíneos e células mesenquimatosas indiferenciadas, que irão dar origem à medula óssea (SENRA, 2006).

Técnicas de enxertia, tipo de cirurgia, extensão e posição do enxerto, pressão e invasão dos tecidos moles e função muscular, revascularização e parâmetros genéticos podem influenciar a reabsorção óssea (MAIORANA, 2011).

2.2 Fixação rígida e os cianoacrilatos

A técnica do parafuso de compressão e a técnica de osteossíntese fundamentam-se em o parafuso atravessar livremente o orifício da perfuração da cortical do primeiro fragmento, fixando-se com as roscas na segunda cortical, promovendo a aproximação, a compressão e estabilização dos fragmentos (CARDOSO; MACHADO, 2003; MAESTRE - FERRÍN et al., 2009).

Apesar disso, a fixação interna rígida apresenta desvantagens, tais como reações inflamatórias, deslocamento do bloco ósseo, dificuldade da técnica, afrouxamento do parafuso, necessidade de remoção para instalação de implantes na posição protética adequada, risco de fratura durante a remoção, artefatos em tomografias computadorizadas e ressonância magnética, incômodo por parte do paciente à palpação da mucosa bucal, atrofia óssea e osteopenia causada por *stress shielding* e corrosão e reações alérgicas (BAŞ et al., 2012; ESTEVES et al., 2011; OLIVEIRA NETO et al., 2010).

Muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de substituir os materiais de fixação rígida convencional na reparação óssea, e uma alternativa para essa substituição seria a aplicação de um adesivo (SASKA et al., 2004). Os adesivos teciduais devem ser biodegradáveis e biocompatíveis. Para serem eficazes, devem ter propriedades coesivas (ligações covalentes entre as moléculas de cola) e adesivas (ligações das moléculas de cola ao tecido adjacente). Para serem biocompatíveis, os adesivos teciduais devem passar por testes de toxicidade aguda, subaguda e toxicidade mínima. O adesivo deve ter o tempo de presa adequado, ser de fácil manipulação; ser hidrófilo, gerar o mínimo de reação exotérmica e ser degradado com o mínimo de resposta inflamatória. Porém não existe um adesivo com todas estas características simultaneamente (BUCKLEY; BECKMAN, 2010).

Os cianoacrilatos não são biodegradáveis e podem induzir uma resposta inflamatória significativa dada a sua natureza hidrofóbica (BUCKLEY; BECKMAN, 2010). São considerados biocompatíveis, bacteriostáticos e um método rápido e pouco traumático de fixação (ESTEVES et al., 2011). São empregados com sucesso em lacerações de pele e incisões cirúrgicas, na estabilização de fragmentos de fraturas de órbitas e nas fraturas osteocondrais (ESTEVES et al., 2011).

Os adesivos à base de cianoacrilatos (CAs) são substâncias líquidas (monômeros), de baixa viscosidade, incolores e derivados do ácido cianoacrílico, apresentam fórmula geral $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{COOR}$, sendo que o *R* representa um radical metil, etil, butil, isopropil ou outros radicais livres (KIMAID et al., 2000).

Os CAs são aplicados como monômeros e rapidamente são polimerizados em uma substância de alto peso molecular. A presença do grupo ciano, no monômero de acrilato, possibilita a polimerização simplesmente por água ou grupo amina presente em proteínas (BUCLEY; BECKMAN, 2010; ESTEVES et al., 2011).

O etilcianoacrilato, um cianoacrilato de cadeia curta, foi um dos primeiros adesivos a serem estudados. Todavia, as pesquisas foram redirecionadas devido aos indícios de toxicidade aos tecidos moles. Assim os CAs de cadeia longa, como o butil e octilcianoacrilatos que apresentam maior biocompatibilidade, foram mais amplamente estudados. O etilcianoacrilato vem sendo pesquisado na fixação em tecido ósseo e os resultados têm sido satisfatórios (ESTEVES et al., 2011).

Esse polímero degrada-se em formaldeído e cianoacetato, compostos que se podem acumular nas áreas tratadas, sendo o primeiro considerado tóxico às células (MELO et al., 2013).

A toxicidade dos adesivos está relacionada com a velocidade de degradação e esta, ao tamanho da cadeia, ou seja, quanto maior for a cadeia menor a velocidade de degradação, menor a histotoxicidade (MELO et al., 2013). Com relação à ionização à base de cianoacrilatos, a presença de água ou sangue degrada em cianoacetato e formaldeído, com ligeira reação exotérmica (SASKA et al., 2004). Quanto maior a cadeia do radical *R*, menor a temperatura de polimerização,

resultando em menor toxicidade e reação inflamatória (BAŞ et al., 2012; MELO et al., 2013).

Melo et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade de dois CAs em cultura de osteoblastos oriundos de osso alveolar mandibular humano. CA1 foi considerado o grupo de células que foram cultivadas na presença de metil-2-cianoacrilato, CA2 o grupo cultivado com etil-2-cianoacrilato e CA3 era o grupo controle, sem nenhum tipo de CA. Nenhum halo de inibição, correspondente a células não viáveis, ocorreu em CA3; ao contrário, em CA1 e CA2, formaram-se halos cujo tamanho variou entre 200 e 500 µm. Não obstante, CA1 apresentou maior citotoxicidade que CA2, alicerçada na maior reação exotérmica do metil-2-cianoacrilato. Os autores concluíram que o etilcianoacrilato é biocompatível e sugeriram sua utilidade na fixação de enxertos ósseos.

Gonzalez et al. (2000) avaliaram a eficácia e segurança do etil-2-cianoacrilato na fixação de retalho ósseo após craniotomia (n= 100 pacientes). Com avaliações clínicas e radiográficas (três meses), observaram que, em 100% dos casos, ocorreu osteossíntese. Concluíram que este adesivo é adequado para a fixação de bordas de craniotomia por proporcionar estabilidade sem reação local ou deslocamento do fragmento. Consideraram, também, que o risco de infecções e reações do tipo corpo estranho foi reduzido devido à biocompatibilidade, efeitos bacteriostáticos e bactericidas deste polímero; sendo, portanto, favorável o seu uso em humanos. Uma vantagem adicional é que esse adesivo não interfere na aquisição de imagens de tomografia computadorizada e ressonância magnética.

2.3 Análises histológicas e o etilcianoacrilato

Kimaid et al. (2000) verificaram reações teciduais em desgastes ósseos cirúrgicos após a aplicação do etilcianoacrilato no osso parietal de ratos. Analisaram aceitação e possível interferência do adesivo no processo do reparo ósseo. Quarenta ratos foram divididos em dois grupos: GT, no qual o etilcianoacrilato foi aplicado na superfície do desgaste ósseo no parietal direito, e GC, em que nenhum material foi aplicado no parietal esquerdo. Avaliou-se o reparo ósseo com 24h, três, sete, 30 e 60 dias da cirurgia. Os autores puderam constatar que GT teve maior resposta inflamatória que GC; o etilcianoacrilato permaneceu sobre a área do desgaste ósseo até o período de observação de 60 dias, e os tecidos adjacentes ao referido material encontravam-se com aspecto de normalidade. O adesivo não interferiu no processo de reparo ósseo. No período de 30 dias, os autores notaram a total ausência de infiltrado inflamatório em ambos os grupos e lacunas vazias. Em relação a isso, duas hipóteses foram levantadas: a primeira é de que o etilcianoacrilato poderia possuir um fator irritativo local, impedindo o crescimento e a sobrevivência dessas células, e a segunda seria de que o etilcianoacrilato poderia atuar como uma barreira mecânica, impedindo a difusão de nutrientes para o tecido ósseo em razão de sua separação do periósteo. Em GT (30 dias), havia uma cavidade entre a lâmina óssea existente e o tecido conjuntivo, correspondente à região onde o adesivo foi aplicado; nenhum sinal de reabsorção óssea ou células inflamatórias foi evidenciado. Em GC (30 dias), o tecido ósseo era maduro e com maior número de osteócitos do que o tecido ósseo preexistente; apresentava ausência de inflamação no tecido conjuntivo adjacente ao tecido ósseo formado.

Saska et al. (2004) avaliaram o comportamento do etilcianoacrilato em fissuras tibiais de ratos (n=15) em comparação ao controle (GC), no mesmo animal, sem nenhum tipo de adesivo. Após sete, 15 e 30 dias, observaram a diferença entre

os dois grupos: no grupo tratado (GT), visualizaram o adesivo no interior da cavidade, ausência de células inflamatórias, área de neoformação óssea com osteoblastos, osteócitos e vasos sanguíneos e, no GC, em estágio mais adiantado, a cicatrização da fissura. Os autores concluíram que o adesivo *Super Bonder*® não provoca reação inflamatória.

Saska et al. (2009) compararam a fixação de enxertos ósseos onlay autógenos com etilcianoacrilato (*Super Bonder*® - G2) e com parafusos de titânio (4,0mm de comprimento x 1,5mm de diâmetro – G1). Foram realizadas osteotomias bilaterais nos ossos parietais de 20 coelhos. Os ossos foram fixados anteriormente aos defeitos ósseos. A análise histomorfométrica com 30 dias confirmou a neoformação óssea, em vários estágios de maturação, na interface enxerto/leito receptor, em ambos os grupos; em G2, espaços medulares pouco definidos do centro para a periferia. Neste mesmo período, nas lâminas do G2, havia macrófagos relacionados ao adesivo, osteócitos e angiogênese na área de contato (interface) e remodelação óssea na superfície adjacente ao periósteo e na extremidade do enxerto. Todavia, o infiltrado inflamatório era ausente em G2; e não se verificou nenhuma reação inflamatória em G1. Exclusivamente em dois animais do grupo G1, os osteoblastos estavam na superfície do osso receptor e do enxerto; esta situação parece confirmar completa a integração do enxerto. Os autores concluíram que o etilcianoacrilato é biocompatível, confere estabilidade similar à fixação rígida, mantém a área do enxerto, embora possa atrasar o processo de reparação óssea.

Esteves et al. (2011) realizaram análises histológicas e histomorfométricas de reparos ósseos de enxertos autógenos fixados com etilcianoacrilato na calvária de ratos em um período de dez e 30 dias. Trinta e dois ratos foram divididos em dois grupos: G1 controle (sem nenhum meio de fixação) e G2 (fixação com

etilcianoacrilato). Por meio da técnica histológica de rotina e coloração com hematoxilina e eosina, os seguintes itens foram avaliados na análise qualitativa: fragmentos do adesivo, infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica, neoformação óssea, angiogênese, nos tecidos superficiais e profundos. Com 30 dias, havia células gigantes multinucleadas (osteoclastos) formando área de reabsorção óssea na superfície externa do enxerto. Neste mesmo período, discreta formação óssea foi observada na superfície interna do enxerto que estava em contato com o CA. Porém, na maioria dos casos, não houve união: a interface estava preenchida com infiltrado inflamatório do tipo linfocitário, alguns vasos sanguíneos e muitas fibras colágenas. O adesivo estava presente com 30 dias. Ao passo que, no G1 (30 dias), havia discreto infiltrado inflamatório e o enxerto estava ligado ao leito receptor através de osso maduro (lacunas de osteócitos) e vascularizado (canais de Havers) na interface.

Esteves et al. (2012) analisaram o processo de reparação de enxertos ósseos autógenos em bloco fixados com etilcianoacrilato e 2-octilcianoacrilato em calvária de 48 ratos. Foram obtidos enxertos ósseos autógenos no osso parietal direito e foram fixados do lado oposto ao local doador com etil- cianoacrilato (grupo etil) e 2-octilcianoacrilato (grupo octil). No grupo controle, o fragmento de osso foi apenas justaposto à superfície óssea parietal, sem fixação. Os animais foram eutanasiados após dez e 60 dias de pós-operatórios. As calvárias foram processadas e obtidas lâminas coradas com hematoxilina e eosina para análises histológica e histométrica. A análise qualitativa mostrou um discreto infiltrado inflamatório no grupo controle e infiltrado moderado nos grupos etil e octil em dez dias; o infiltrado manteve-se aos 60 dias, principalmente no grupo octil. O fragmento de osso permaneceu ligado ao sítio receptor por meio do adesivo, mas a incorporação do enxerto não foi observada

em qualquer um dos espécimes. A reabsorção foi maior no grupo octil, seguido pelos grupos etil e controle, ambos em dez e 60 dias, mas sem significância estatística ($p < 0,05$). Apesar de promoverem a fixação do enxerto e sua manutenção no sítio receptor, ambos os adesivos estudados não permitiram a incorporação do enxerto, produzindo uma reação inflamatória discreta e localizada, que persistiu aos 60 dias, sendo mais intensa no grupo octilcianoacrilato.

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo pré-clínico se propõe a realizar análise histológica com avaliação qualitativa e semiquantitativa dos enxertos ósseos autógenos fixados em calota de ratos com adesivo etilcianoacrilato comparados aos enxertos fixados com parafuso de titânio.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar nos dois grupos:

- 1- Vitalidade do enxerto pela presença de osteócitos.
- 2- Interface quanto aos seguintes aspectos: presença do adesivo (grupo experimental), formação de matriz osteoide, presença de reabsorção óssea, infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica, formação de capilares, presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos para pesquisas com animais, segundo a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEEA/UFJF), sob o protocolo nº 15/2011.

4.2 Amostra

A amostra deste estudo foi constituída por 14 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* (Wistar), machos adultos, com aproximadamente três meses de idade e pesando entre 220g a 310g. 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.

4.3 Grupos

A amostra foi dividida aleatoriamente em dois grupos de sete 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, bem como todos os procedimentos cirúrgicos, foram realizadas por um cirurgião principal e um auxiliar para padronização.

4.4 Fixação dos enxertos

O adesivo biológico utilizado foi o etil-cianoacrilato (Super Bonder Flex Gel®, Loctite, São Paulo/SP, Brasil) e o parafuso utilizado foi de titânio com 1,4mm de diâmetro e 10,0mm de comprimento (S.I.N., São Paulo/SP, Brasil).

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 realizada 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 a imobilização do animal foram de suma importância, para que não ocorresse perda do volume anestésico, necessário para sedação.

As drogas anestésicas foram injetadas por via intraperitoneal na região abdominal. A medicação anestésica consistirá de uma associação de Cloridrato de Quetamina a 5% (VETANARCOL[®], Konig 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.

A antissepsia 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, os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre uma placa aquecida a 37°C graus, para manutenção da temperatura corporal durante o procedimento.

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, foi realizada uma incisão do tipo bicoronal na calota craniana dos animais com lâmina montada em 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 2). Os tecidos foram afastados com auxílio de uma pinça de adson (RHOSSE, Instrumentos cirúrgicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil).

Em seguida, foi realizada uma osteotomia retangular para remoção do bloco ósseo, mantendo a integridade da dura-máter e do cérebro, tendo como referências anteroposteriores a sutura coronal e lambdoide e laterolaterais 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 1.200 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 2) e imediatamente imerso em uma cuba com soro fisiológico.

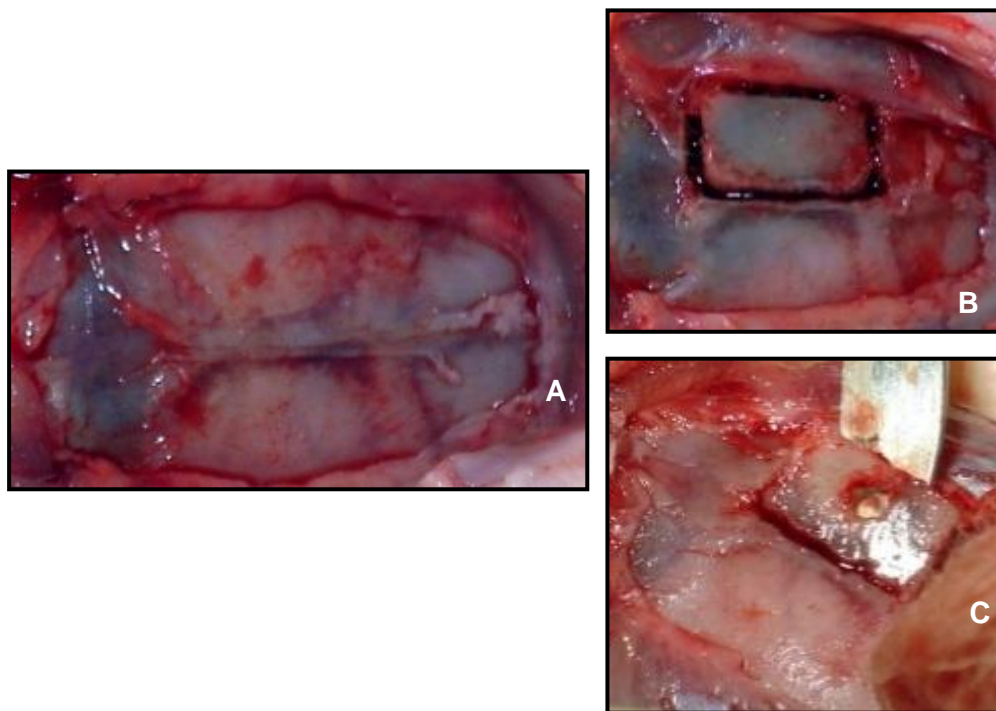


Figura 2 – Exposição cirúrgica. A) Exposição cirúrgica da calota craniana.
B) Osteotomia do enxerto na região parietal. C) Destacamento do enxerto.

Fonte – O autor (2014).

No grupo PT o enxerto foi perfurado na região central para passagem do parafuso antes de ser totalmente removido da região doadora. Para a 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 3).

Em seguida, o enxerto foi fixado no osso parietal direito, com parafuso bicortical de 1,4mm de espessura por 2mm 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 (Santos, 2013) (Figuras 4 e 5).

No grupo SB, o fragmento ósseo foi removido do osso parietal esquerdo e fixado no osso parietal direito, com o adesivo etilcianoacrilato (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 (Figuras 6 e 7). Uma pressão no sentido perpendicular ao enxerto foi realizada para evitar que o adesivo penetrasse na interface enxerto/leito receptor.

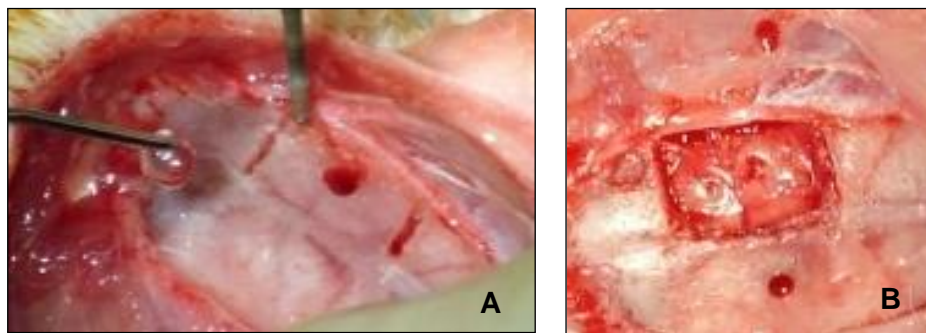


Figura 3 – Osteotomia. A) Osteotomia do enxerto no osso parietal no grupo PT, mostrando a perfuração para fixação do parafuso. B) Perfuração para fixação do parafuso no leito receptor.

Fonte – O autor (2014).

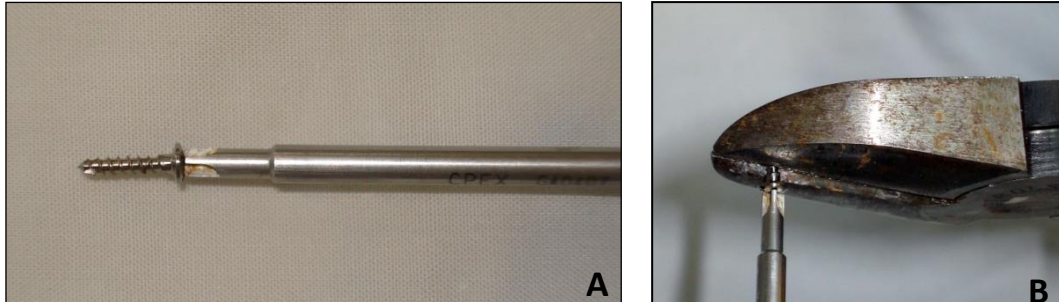


Figura 4 – Adaptação do parafuso. A) Parafuso de titânio com 10 mm de comprimento.
B) Corte do parafuso com alicate.
Fonte – O autor (2014).

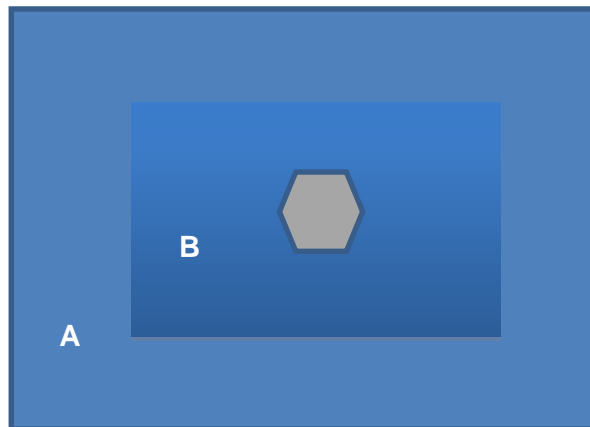


Figura 5 – Esquema do método de fixação no grupo PT. A) leito receptor. B) enxerto ósseo. Em cinza: parafuso de fixação.
Fonte – O autor (2014).

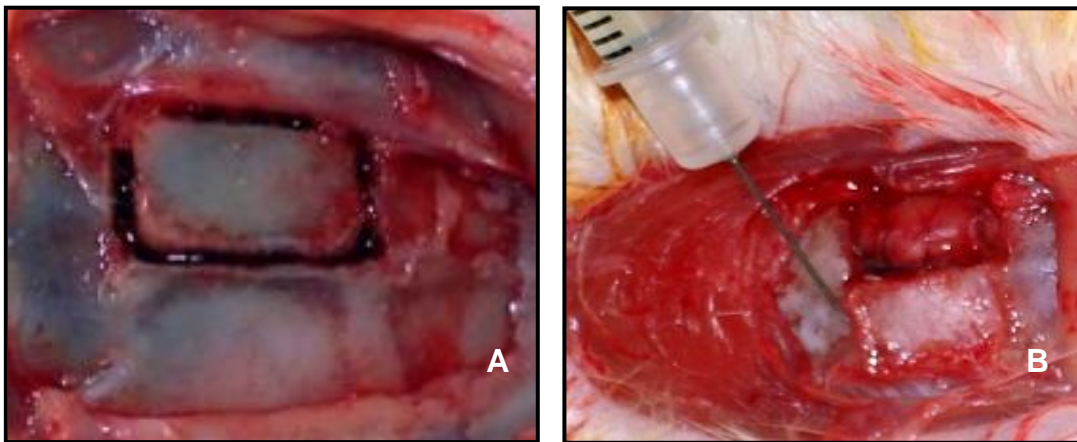


Figura 6 – A) Osteotomia do enxerto do grupo SB. B) Fixação do enxerto com o adesivo aplicado nos bordos do bloco.
Fonte – O autor (2014).

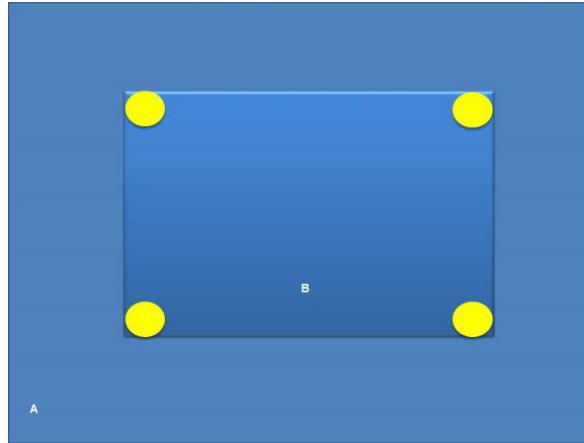


Figura 7 – Esquema da fixação no grupo SB.

A) leito receptor. B) enxerto ósseo. Em amarelo: Etilcianoacrilato. Ilustração da forma de aplicação do adesivo: uma gota em cada borda do bloco ósseo. O adesivo foi usado entre o enxerto e o leito receptor.

Fonte – O autor (2014).

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 4.0 (Technofio, ACE, Indústria e Comércio Ltda., Goiânia/GO, Brasil), com pontos simples interrompidos.

4.8 Pós-operatório

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

4.9 Obtenção das amostras

Os animais foram eutanasiados no 30º dia de pós-operatório, período em que a síntese óssea estaria em andamento conforme identificado na literatura pertinente como ponto em que é possível identificar a formação de matriz óssea (ESTEVES et al., 2011; SASKA et al., 2009).

Na eutanásia, foi administrada uma dose letal de Quetamina 180mg/kg (ESTEVES et al., 2011). Foi realizada a osteotomia do osso parietal na região enxertada, com broca tronco-cônica 701, com margem de 3mm das bordas do enxerto, excetuando-se a borda medial do enxerto que coincidia com a região doadora. Deste modo, foi obtida a amostra para avaliação histopatológica, composta pelo osso da calota e o enxerto (Figuras 8 e 9).

A seguir, as amostras de ambos os grupos foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24h e encaminhadas ao Laboratório de Patologia do Hospital da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Minas Gerais). Após este período, as peças foram processadas para as análises histológicas.

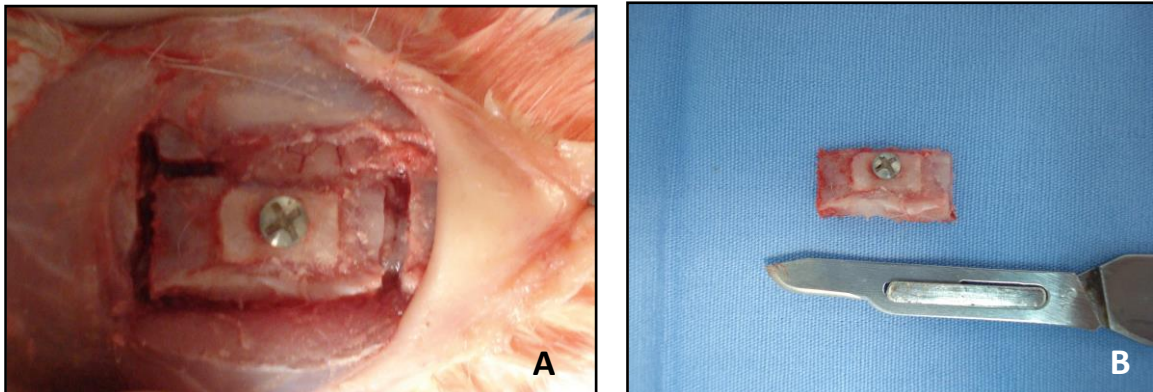


Figura 8 – Remoção dos espécimes do grupo PT. A) Osteotomia do bloco ósseo contendo o enxerto no grupo PT. B) Espécime foi encaminhado ao exame histológico.
Fonte – O autor (2014).

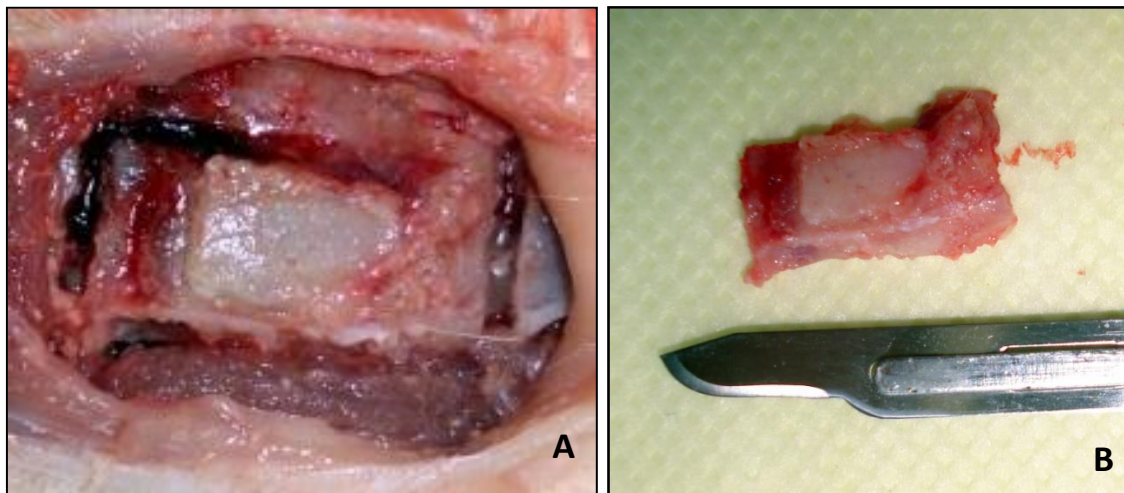


Figura 9 – Remoção dos espécimes do grupo SB. A) Osteotomia do bloco ósseo contendo o enxerto no grupo SB. B) Espécime para avaliação.
Fonte – O autor (2014).

4.10 Preparo das amostras

No grupo PT, foram retirados os parafusos com o auxílio de uma chave de parafuso de enxerto com cabeça com encaixe em cruz (Sistema de Implante – S.I.N., São Paulo, SP) para que a região relacionada ao parafuso também pudesse ser estudada (Figura 10).

Em virtude da consistência do tecido ósseo, foi realizada a desmineralização da amostra com imersão em líquido quelante, para a remoção de íons impregnados.

As amostras foram imersas em ácido nítrico a 10% (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2009), em frascos vedados durante 1h cronometrada com auxílio de um temporizador (Lupetec, Brasil).

Após esse procedimento, o osso com consistência fibro-óssea, foi lavado em água corrente por um minuto; subseqüentemente, imerso em solução tampão de sulfato de sódio a 5% por 30 minutos. A seguir, lavado em água corrente por um minuto e seco em papel-toalha. As amostras, então, foram seccionadas ao meio no sentido do maior e de cada lado foi retirada uma secção de 2mm considerada amostra central. Nas extremidades do enxerto, foram colhidas secções com a mesma espessura para visualização da interface do enxerto e leito receptor (Figura 11). No grupo experimental, pesquisou-se a presença do adesivo.



Figura 10 – Bloco ósseo após a remoção do parafuso.

Fonte – O autor (2014).

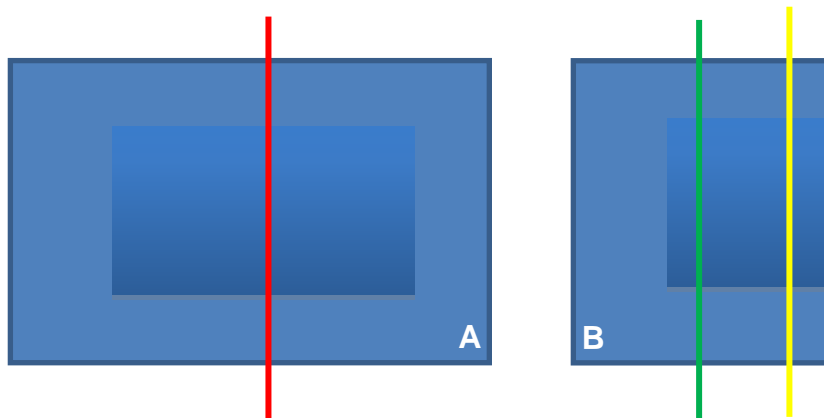


Figura 11 – Esquema dos cortes realizados no bloco ósseo. A) Bloco ósseo. B) Bloco resultante da secção do anterior. Secções representadas pelas linhas: vermelha – primeira secção realizada no meio do enxerto; verde – região de extremidade do enxerto; amarela – região central do enxerto.

Fonte – O autor (2014).

As secções foram processadas em processador de tecido (TP1020, Leica Microsystems, Alemanha). Após emblocadas em parafina, foram obtidos cortes

histológicos com 5µm de espessura e corados pelas técnicas histoquímicas de rotina, a saber: hematoxilina e eosina.

4.11 Documentação fotográfica

O material histológico foi analisados em microscópio óptico (Olympus Optical BX 40 F-3, Japão) e fotografados usando Câmera Digital Bel Photonics, modelo Eureka de 3,0 megapixels com CCD 2/3 polegadas e analisadas pelo software BEL View 7 (version 7.1.1.7, BEL Engineering). As fotografias foram realizadas com objetivas de 4x, 10x e 20x e ocular de 10x.

4.12 Análises qualitativa e quantitativa

As amostras foram avaliadas qualitativamente e quantitativamente pelo autor que foi calibrado juntamente com um patologista. Nas regiões previamente selecionadas para representação histológica, foram qualificados como presentes ou ausentes (sim ou não) os seguintes aspectos: presença do adesivo, vitalidade, formação de matriz osteoide, presença de área de reabsorção óssea, formação de capilares (CHAVES NETO et al., 2009; ESTEVES et al., 2011; ESTEVES et al., 2012). E aspectos quantitativos como infiltrado inflamatório, proliferação fibroblástica, presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, classificados em escores: 1- “discreto” (0 a 5 células), 2 - “moderado” (6 a 15 células) e 3 - “intenso” (acima de 15 células). A graduação da quantidade de células foi estabelecida a partir do estudo comparativo entre as amostras (BAŞ et al., 2012; MENDONÇA et al., 2007).

A análise estatística foi realizada com software SPSS Statistic 15.0 ® e foram feitos testes não paramétricos. Assim, foi usado o teste de Mann-Whitney e o teste Exato de Fisher para comparação entre os grupos PT e SB. Para comparações entre centro e extremidade de cada um dos grupos, foi usado o teste de Wilcoxon e o teste de McNemar. O p-valor foi considerado estatisticamente significativo quando menor que 0,05 e todos os testes foram bicaudais.

5 RESULTADOS

5.1 Descrição dos ensaios: grupo PT – região medial

5.1.1 Análise qualitativa

No grupo controle (PT), os enxertos apresentavam vitalidade que foi constatada pela presença de osteócitos, a exceção de um caso (Tabela 1 e Anexo B). A presença de capilares constituiu um achado comum a todas as amostras, enquanto a neoformação óssea (osteóide) foi evidenciada em cinco de sete amostras (Figuras 12 e 13) e a reabsorção, em quatro de sete casos.

Tabela 1 – Análise qualitativa da região medial do grupo PT

Achados histológicos	Amostras PT região medial							Animais positivos para o atributo n (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Vitalidade	+	+	+	+	-	+	+	6 (87,7)
Capilares	+	+	+	+	+	+	+	7 (100)
Osteóide	-	+	+	+	-	+	+	5 (71,4)
Reabsorção	+	-	-	-	+	+	+	4 (57,1)

Fonte – O autor (2014).

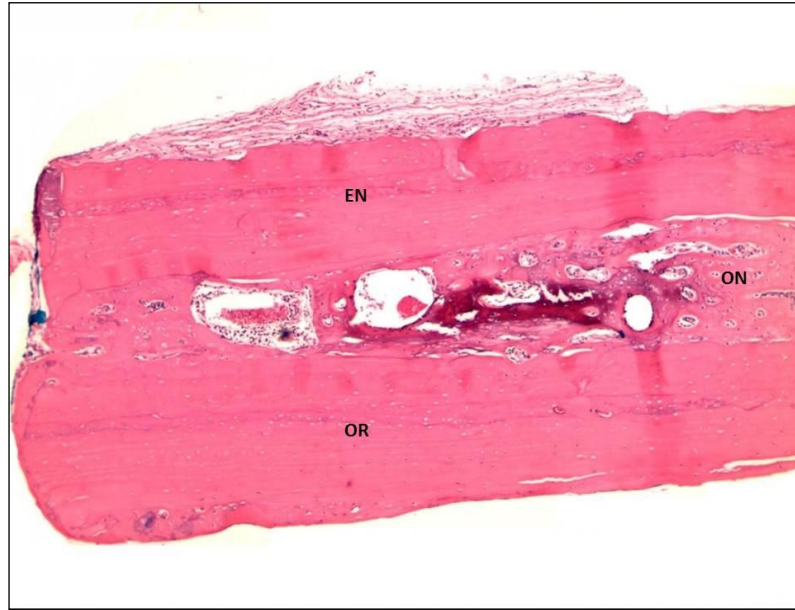


Figura 12 – Grupo PT. Animal 3. Região medial do enxerto: (OR) Osso Receptor. (EN) Enxerto. (ON) Osso neoformado - interface. HE 40x.

Fonte – O autor (2014).

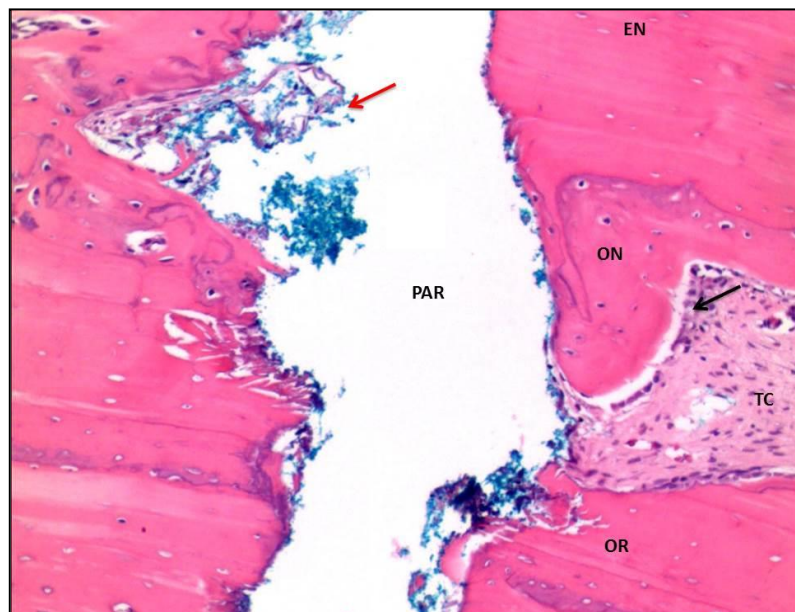


Figura 13 – Grupo PT. Animal 1. Região medial do enxerto. (TC) Tecido Conjuntivo. Seta preta: osteoblastos. Seta vermelha: tinta nanquim. (EN) Enxerto. (PAR) Imagem negativa do parafuso. (OR) Osso receptor. HE 100x.

Fonte – O autor (2014).

5.1.2 Análise semiquantitativa

Na análise semiquantitativa, evidenciou-se a presença de estroma conjuntivo com proliferação de fibroblastos em todas as amostras. Destacou-se a existência de osteócitos apontando para um amadurecimento ósseo (Tabela 2 e Anexo B) com baixa intensidade da atividade de remodelação (Figuras 14 e 15).

Tabela 2 – Análise semiquantitativa da região medial do grupo PT

Achados histológicos	Escore			
	Ausência (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
Inflamação	4 (57,1)	2 (28,6)	1 (14,3)	0 (0)
Fibroblastos	0 (0)	5 (71,4)	2 (28,6)	0 (0)
Osteoblastos	0 (0)	3 (42,9)	2 (28,6)	2 (28,6)
Osteócitos	1 (14,3)	1 (14,3)	0 (0)	5 (71,4)
Osteoclastos	2 (28,6)	5 (71,4)	0 (0)	0 (0)

1- Discreto (0 a 5 células por campo)

2- Moderado (6 a 15 células por campo)

3- Intenso (acima de 15 células por campo)

Fonte – O autor (2014).

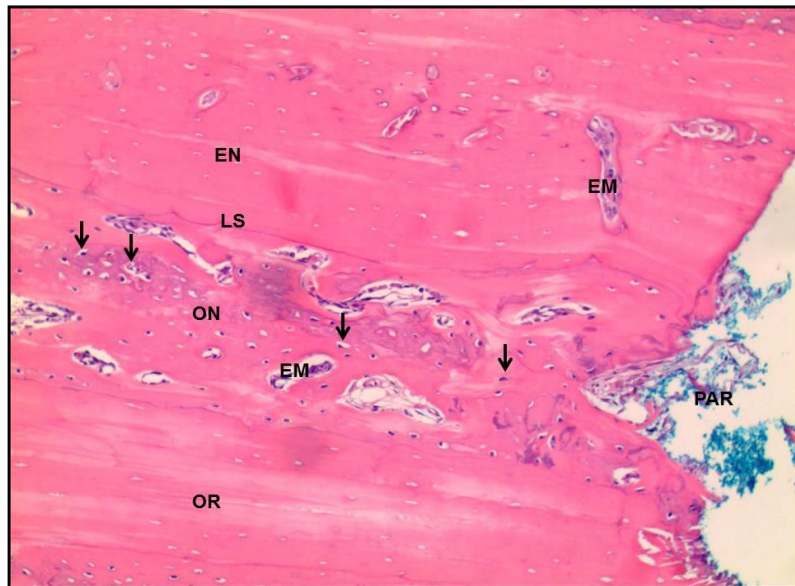


Figura 14 – Grupo PT. Animal 1. Região medial do enxerto. Setas pretas: osteócitos na interface. (ON) Osso neoformado. (EM) Espaço medular. (EN) Enxerto. (PAR) Imagem negativa do parafuso. (LS) Linha de soldadura. (OR) Osso receptor. HE 100X.

Fonte – O autor (2014).

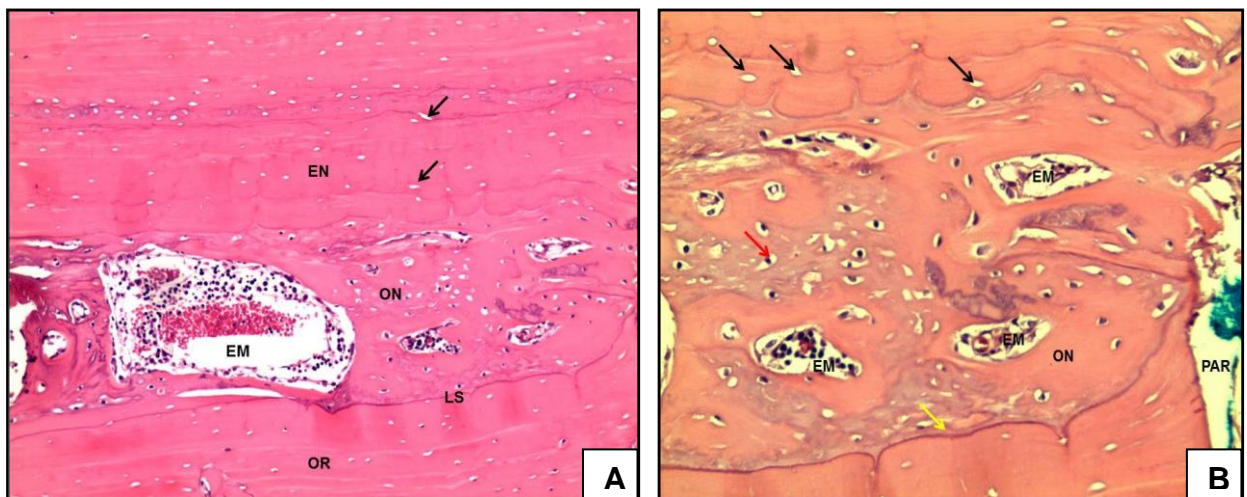


Figura 15 – A) Grupo PT. Animal 1. Região medial do enxerto. Setas pretas: lacunas vazias. (EN) Enxerto. (ON) Osso neoformado. (LS) Linha basofílica. (OR) Osso receptor. (EM) Espaço medular. HE 100x. B) Grupo PT. Animal 2. Região medial do enxerto. Setas pretas: lacunas vazias. (PAR) Imagem negativa do parafuso. (EM) Espaço medular. Setas: vermelha –osteócitos; amarela- integração do enxerto ao leito receptor; pretas- lacunas vazias. HE 200x.

Fonte – O autor (2014).

5.2 Descrição dos ensaios: grupo SB – região medial

5.2.1 Análise qualitativa

Na região medial do grupo SB, o adesivo não foi visualizado na interface, apenas na superfície externa do enxerto. Houve redução da vitalidade do enxerto justificada pela presença de lacunas vazias, em 66,7% dos casos (Figura 16). Na interface, observou-se estroma conjuntivo frouxo moderado com capilares. Notou-se ainda a presença focal de matriz osteoide e osso maduro. Em apenas um caso (16,7%), não havia área de reabsorção do enxerto (Tabela 3 e Anexo C).

Em uma das amostras, o enxerto foi totalmente reabsorvido logo, não havia região de interface e esta foi desconsiderada nas análises estatísticas.

Tabela 3 – Análise qualitativa da região medial do grupo SB

Achados histológicos	Amostras SB região medial							Animais positivos para o atributo n (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Vitalidade	ND	-	-	-	-	+	+	2 (33,3)
Capilares	ND	+	+	+	+	+	+	6 (100)
Osteoide	ND	+	-	+	-	+	+	4 (66,7)
Reabsorção	ND	+	+	+	-	+	+	5 (83,3)

(ND) Não determinado, pois a amostra do animal SB1 foi excluída do estudo devido à total reabsorção do enxerto

(+) Presença

(-) Ausência

Fonte – O autor (2014).

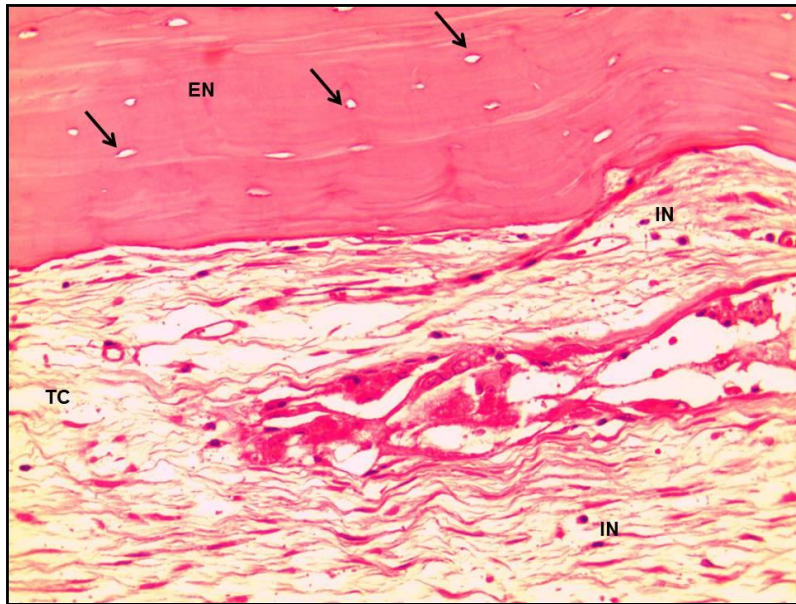


Figura 16 – Grupo SB. Animal 2. Região medial do enxerto. (EN) enxerto. Setas: lacunas vazias. (TC) Tecido conjuntivo. (IN) infiltrado inflamatório. HE 200x.

Fonte – O autor (2014).

5.2.2 Análise semiquantitativa

Na análise semiquantitativa da região medial do grupo SB, pode ser observado infiltrado inflamatório moderado com proliferação fibroblástica (Tabela 4 e Anexo C). A neoformação óssea foi focal, originando algumas “ilhas” ósseas, contendo osteócitos (Figura 17). Todavia, as maiores áreas foram constituídas por tecido conjuntivo frouxo (Figura 18).

Tabela 4 – Análise semiquantitativa da região medial do grupo SB

Achados histológicos	Escore			
	Ausência (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
Inflamação	1 (16,7)	2 (33,3)	2 (33,3)	1 (16,7)
Fibroblastos	0 (0)	5 (83,3)	0 (0)	1 (16,7)
Osteoblastos	1 (16,7)	3 (50)	2 (33,3)	0 (0)
Osteócitos	3 (50)	2 (33,3)	1 (16,7)	0 (0)
Osteoclastos	1(16,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	0 (0)

1- Discreto (0 a 5 células por campo)

2- Moderado (6 a 15 células por campo)

3- Intenso (acima de 15 células por campo)

Fonte – O autor (2014).

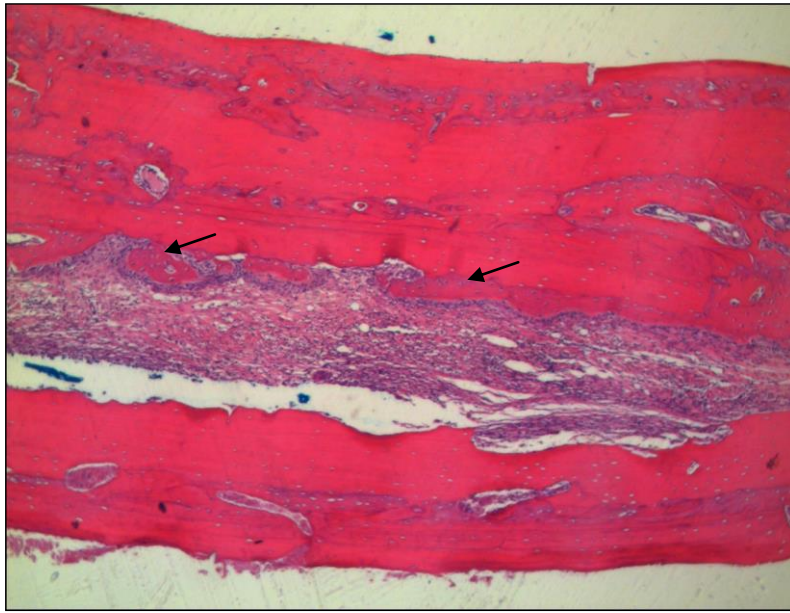


Figura 17 – Grupo SB. Animal 2. Região medial do enxerto.
Setas: focos de neoformação óssea. HE 40x.
Fonte – O autor (2014).

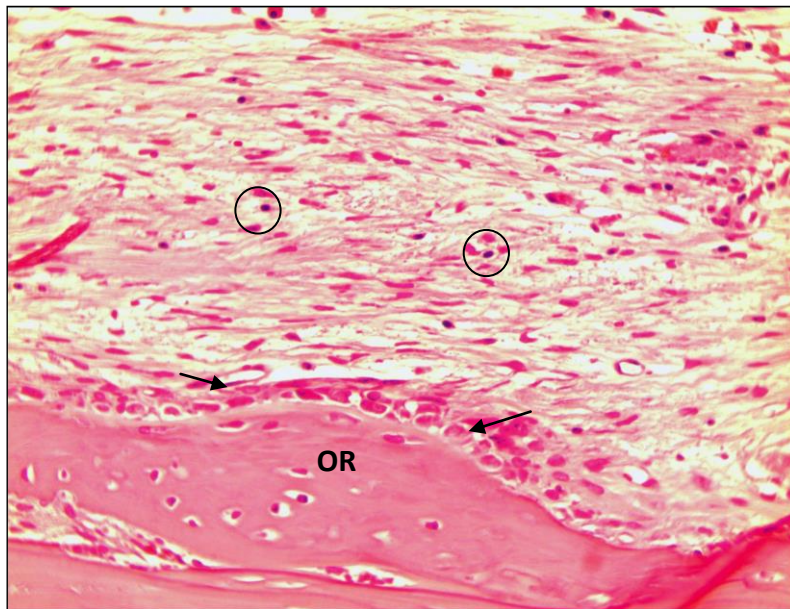


Figura 18 – Grupo SB. Animal 3. Região medial do enxerto. Setas:
osteoblastos. Círculos: infiltrado inflamatório. (OR)
Osso receptor. HE 100x.
Fonte – O autor (2014).

5.3 Descrições dos ensaios: grupo PT – extremidade

5.3.1 Análise qualitativa

As extremidades dos enxertos estavam vivas e, alguns deles, incorporados ao leito receptor. Em todos os casos observaram-se capilares na interface, associados à matriz osteoide (Figura 19); apesar disso, havia algumas áreas de reabsorção, principalmente nos extremos (Tabela 5 e Anexo D).

Na amostra PT6, foi possível observar intenso processo inflamatório induzido por contaminação por metazoários; em consequência disso, a amostra foi excluída.

Tabela 5 – Análise qualitativa da extremidade do grupo PT

Achados histológicos	Amostras PT região extremidade							Animais positivos para o atributo n (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Vitalidade	+	+	+	+	+	ND	+	6 (100)
Capilares	+	+	+	+	+	ND	+	6 (100)
Osteoide	+	+	+	-	+	ND	+	5 (83,3)
Reabsorção	+	-	-	+	+	ND	+	4 (66,7)

(ND) Não determinado, pois a amostra do animal PT6 – extremidade- foi excluída do estudo devido à contaminação por metazoários.

(+) Presença

(-) Ausência

Fonte – O autor (2014).

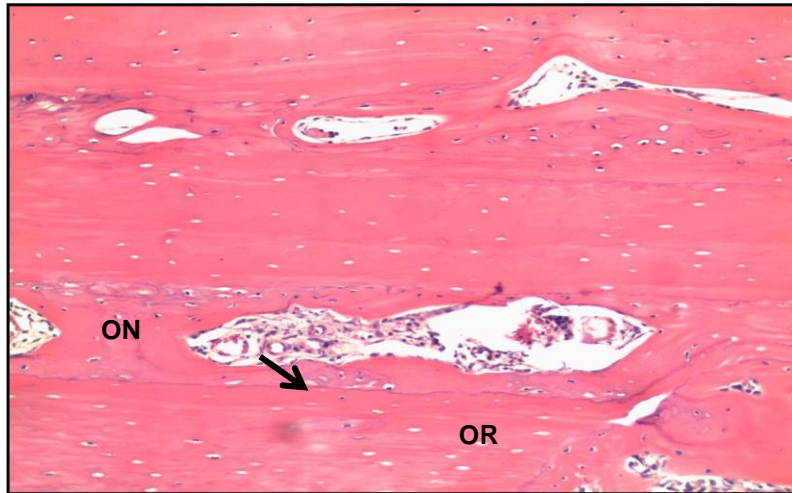


Figura 19 – Grupo PT. Animal 1. Extremidade. (OR) Osso receptor. (ON) Osso neoformado. Seta: linha basofílica. HE 40x.

Fonte – O autor (2014).

5.3.2 Análise semiquantitativa

Na porção da extremidade distal do enxerto, foi possível observar atividade osteoclástica formando “ilhas ósseas” associadas a tecido conjuntivo frouxo (Figura 20). Na extremidade do grupo PT, o processo inflamatório era ausente ou de intensidade discreta. Na interface, observou-se um escasso estroma com intensa proliferação de fibroblastos, osteoblastos e osteócitos (Tabela 6 e Anexo D). A neoformação óssea correspondia a um estágio de maturação avançado em algumas amostras, sugerindo a incorporação do enxerto (Figuras 21 e 22).

Tabela 6 – Análise semiquantitativa da extremidade do grupo PT

Aspectos histológicos	Escores			
	Ausente (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
Inflamação	2 (33,3)	4 (66,6)	0 (0)	0 (0)
Fibroblastos	0 (0)	2 (33,3)	1 (16,6)	3 (50)
Osteoblastos	0 (0)	2 (33,3)	0 (0)	4 (66,6)
Osteócitos	1 (16,6)	1 (16,6)	1 (16,6)	3 (50)
Osteoclastos	2 (33,3)	3 (50)	1 (16,6)	0 (0)

- 1- Discreto (0 a 5 células por campo)
 2- Moderado (6 a 15 células por campo)
 3- Intenso (acima de 15 células por campo)
 Fonte – O autor (2014).

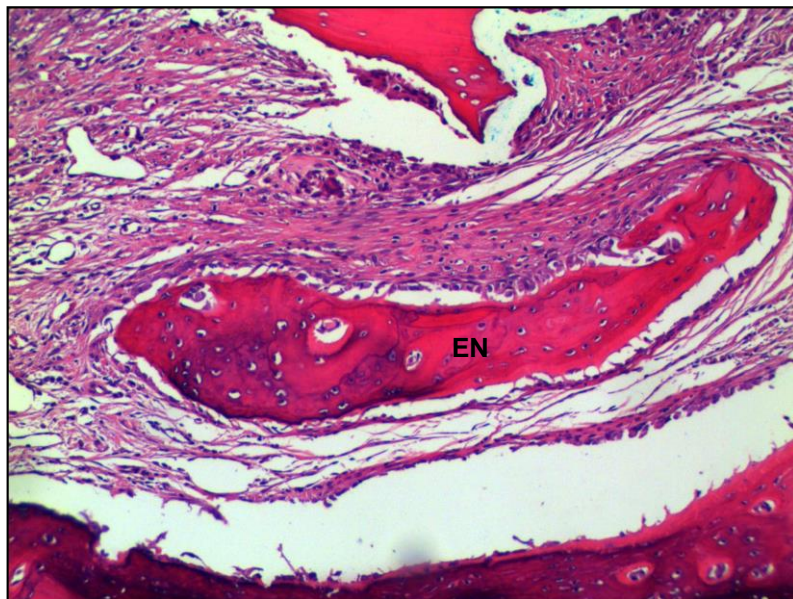


Figura 20 – Grupo PT. Animal 4. Extremidade. Remodelação óssea. (EN) Enxerto ósseo. HE 100x.
 Fonte – O autor (2014).

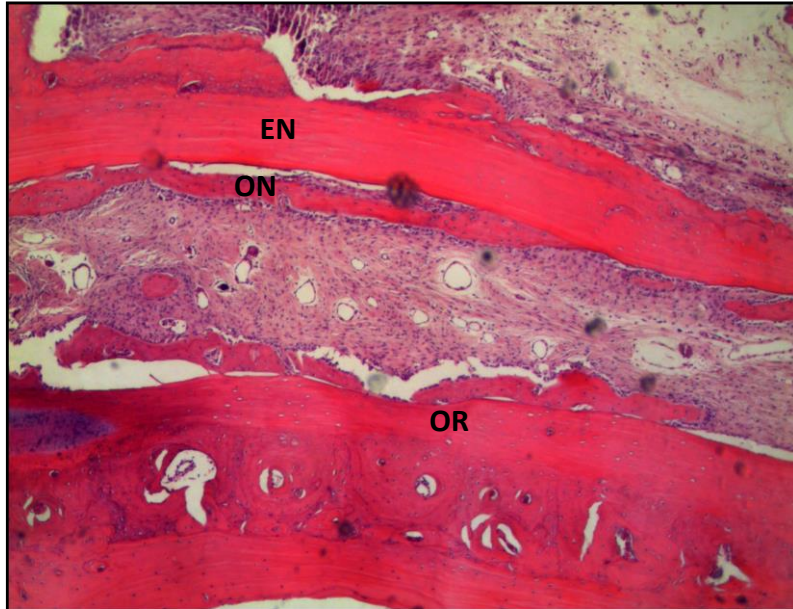


Figura 21 – Grupo PT. Animal 7. Extremidade. (OR) Osso receptor. (ON) Osso neoforado. (EN) Enxerto. HE 40x.

Fonte – O autor (2014).

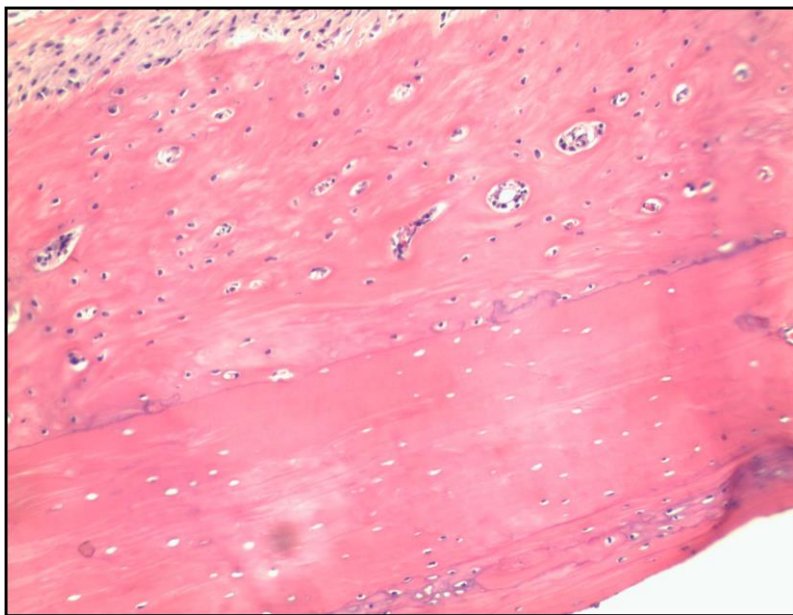


Figura 22 – Grupo PT. Animal 1. Extremidade. (OR) Osso receptor. (ON) Osso neoforado. Seta: Linha basofílica. HE 100x

Fonte – O autor (2014).

5.4 Descrições dos ensaios: grupo SB – extremidade

5.4.1 Análise qualitativa

Em 50% dos enxertos do grupo SB, na região de extremidade, ocorreu necrose identificada por lacunas de osteócitos vazias e espaços medulares com raros remanescentes medulares vitais e outros necrosados com aspecto fantasma. Além disso, nestes havia sequestros ósseos. Logo, os enxertos haviam perdido sua vitalidade (Figuras 23 e 24). O etilcianoacrilato formou uma barreira sobre o enxerto e as áreas onde foi encontrado o enxerto possuíam vitalidade focal com poucos espaços medulares (Tabela 7 e Anexo E).

Em dois espécimes, houve reabsorção do enxerto ósseo, de forma total (SB1) e parcial (SB2- extremidade). SB1 foi excluído das análises estatísticas da região medial e da extremidade, enquanto SB2 foi excluído apenas da extremidade.

Tabela 7 – Análise qualitativa da extremidade do grupo SB

Achados histológicos	Amostras SB região extremidade							Animais positivos para o atributo n (%)
	1	2	3	4	5	6	7	
Vitalidade	ND	ND	+	+	+	-	-	3 (60)
Capilares	ND	ND	+	+	+	+	+	5 (100)
Osteoide	ND	ND	-	+	+	-	-	2 (40)
Reabsorção	ND	ND	+	+	+	+	+	5 (100)

(ND) Não determinado, pois as amostras dos animais SB1 e SB2 foram excluídas do estudo devido à total reabsorção dos enxertos.

(+) Presença

(-) Ausência

Fonte – O autor (2014).

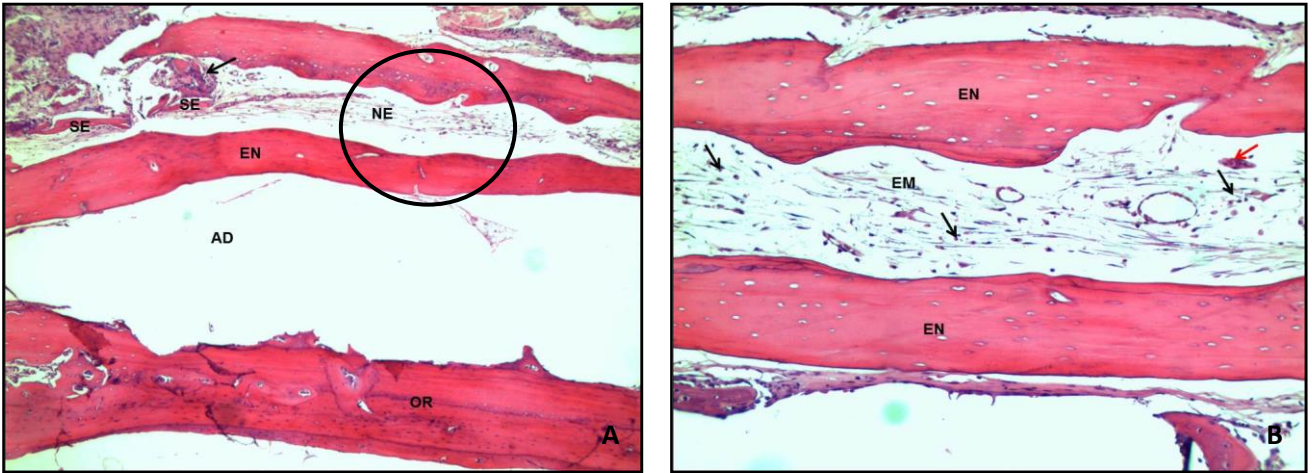


Figura 23 – Grupo SB. Animal 6. Extremidade. A) (EN) Enxerto, (SE) Sequestro ósseo, (NE) Necrose medular, Seta preta: célula gigante, (AD) Adesivo e (OR) Osso receptor. HE 40x. B) (EN) Enxerto, (EM) Espaço medular necrosado, setas pretas: infiltrado inflamatório, seta vermelha: célula gigante multinucleada. HE 100x.
Fonte – O autor (2014).

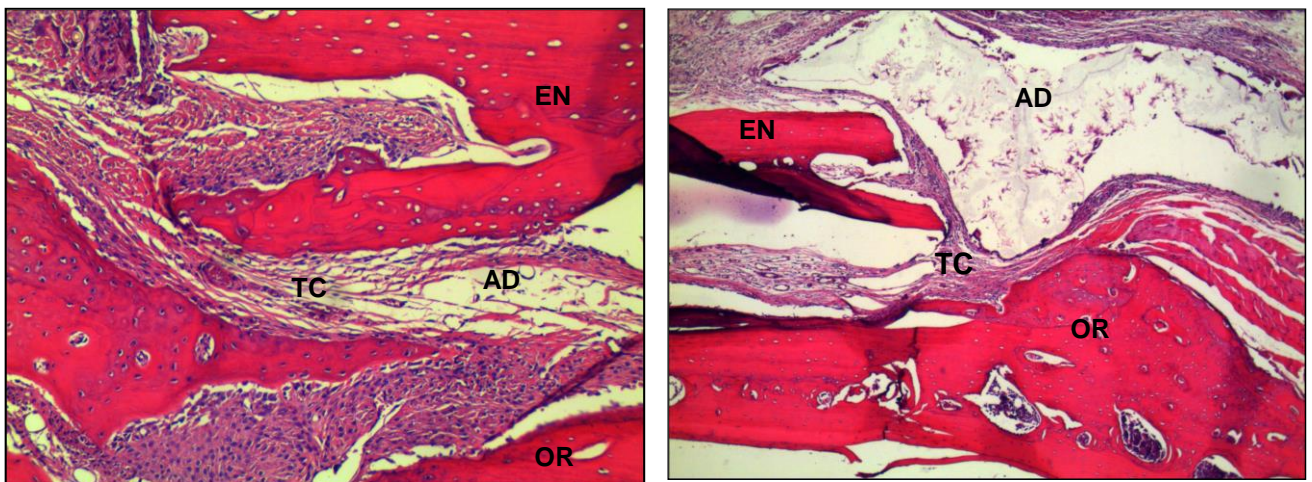


Figura 24 – Grupo SB. Animal 3. Extremidade. A) (EN) Enxerto, (AD) Adesivo, (OR) Osso receptor, (TC) Tecido conjuntivo. HE 40x. B) (EN) Enxerto, (AD) Adesivo, (TC) Tecido conjuntivo, (OR) Osso receptor. HE 40X.
Fonte – O autor (2014).

5.4.2 Análise semiquantitativa

Na interface, verificou-se a presença de resíduo do adesivo associado a numerosas células gigantes multinucleadas e processo inflamatório moderado (Figuras 25 e 26). Havia osteoblastos, poucos osteócitos e considerável proliferação fibroblástica (Tabela 8 e Anexo E).

Tabela 8 – Análise semiquantitativa da extremidade do grupo SB

Aspectos histológicos	Escore			
	Ausente (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)
Inflamação	0 (0)	2 (40)	3 (60)	0 (0)
Fibroblastos	0 (0)	3 (60)	1 (20)	1 (20)
Osteoblastos	1 (20)	2 (40)	2 (40)	0 (0)
Osteócitos	4 (80)	0 (0)	0 (0)	1 (20)
Osteoclastos	0 (0)	2 (40)	0 (0)	3 (60)

1- Discreto (0 a 5 células por campo)

2- Moderado (6 a 15 células por campo)

3- Intenso (acima de 15 células por campo)

Fonte – O autor (2014).



Figura 25 – Grupo SB. Animal 5. Extremidade. (EN) Enxerto, (OR) Osso receptor, (AD) Adesivo e (IN) Infiltrado inflamatório. HE 40X.
Fonte – O autor (2014).

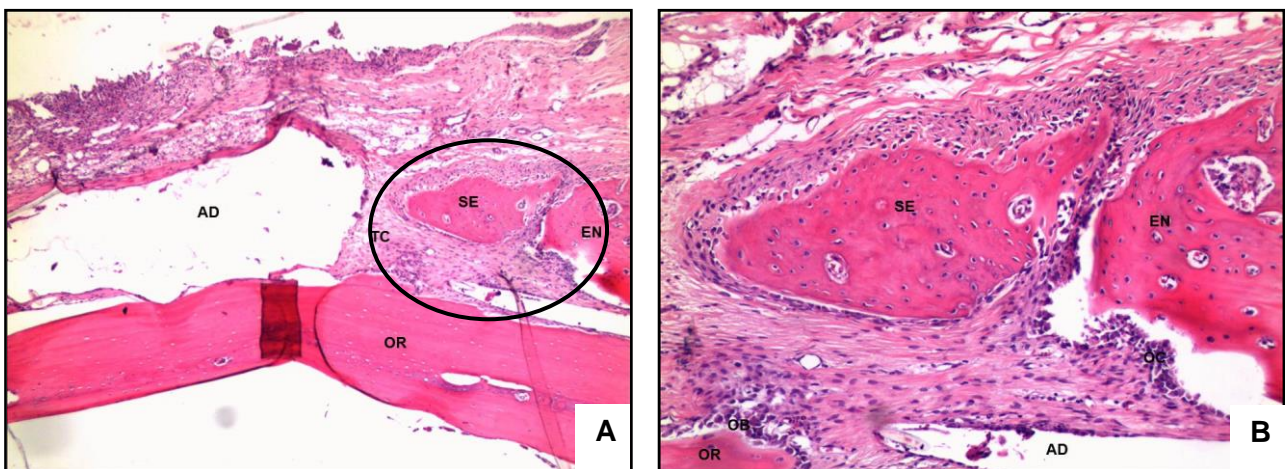


Figura 26 – Grupo SB. Animal 5. Extremidade. A) (AD) Adesivo, (SE) Sequestro ósseo, (EN) Enxerto, (TC) Tecido conjuntivo, (OR) Osso receptor. HE 40x. B) Visão em 10x da imagem em A. HE 100X
Fonte – O autor (2014).

5.5 COMPARAÇÕES DA AVALIAÇÃO QUALITATIVA

5.5.1 Entre regiões nos dois grupos

As regiões centrais de PT e de SB e as extremidades de PT e de SB foram analisadas pelo Teste de Fisher. Não foram encontrados valores estatisticamente significativos quanto aos achados histológicos avaliados nestas regiões; porém há uma tendência (p-valor = 0,080) do grupo PT em ter mais osteoide na extremidade que o SB.

Foi desconsiderada a análise do adesivo na região periférica e central visto que somente o grupo SB havia recebido o mesmo (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação das avaliações qualitativas entre PT e SB

Características histológicas	Região central (Teste Exato de Fisher p-valor)	Extremidade (Teste Exato de Fisher p-valor)
Vitalidade	0,103	0,182
Capilares	*	1,000
Osteoide	1,000	0,080
Reabsorção	0,559	1,000

Nível de significância $p < 0,05$

*Não foi computado porque era uma constante na região central de ambos os grupos

Fonte – O autor (2014).

5.5.2 Entre regiões no mesmo grupo

A análise da avaliação qualitativa entre as regiões central e extremidade de PT e SB foi feita pelo teste de McNemar e não foram encontrados valores estatisticamente significativos. O aspecto histológico “capilares”, no grupo PT, foi uma constante, portanto não foi computado (Tabela 10).

Tabela 10 – Comparação das avaliações qualitativas entre centro e extremidade de PT e SB

Características histológicas	PT p-valor	SB p-valor
Vitalidade	1,000	1,000
Capilares	*	1,000
Osteoide	1,000	0,375
Reabsorção	1,000	1,000

Teste de McNemar

Nível de significância $p < 0,05$

“Adesivo” foi desconsiderado, pois o mesmo estava limitado à extremidade

(-) PT não recebeu adesivo

(*) Não foi computado porque foi uma constante na região central de ambos os grupos

Fonte – O autor (2014).

5.6 Comparação da avaliação quantitativa

5.6.1 Entre diferentes regiões nos dois grupos

O teste U de Mann-Whitney demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os seguintes aspectos avaliados: grupo PT com mais osteoblastos na região central ($p = 0,035$), o grupo SB com maior inflamação ($p = 0,030$) e quantidade de osteoclastos na extremidade ($p = 0,048$) (Tabela 11).

Tabela 11 – Comparação das avaliações quantitativas entre regiões de PT e SB

Achados histológicos	Região	p-valor	Grupo	n	Média	Mediana
Inflamação	Central	0,138	PT	7	0,57	0
			SB	6	1,50	1,5
	Extremidade	0,030*	PT	6	0,67	1
			SB	5	1,60	2
Fibroblastos	Central	0,836	PT	7	1,29	1
			SB	6	1,33	1
	Extremidade	0,755	PT	6	2,17	2,5
			SB	5	1,60	1
Osteoblastos	Central	0,234	PT	7	1,86	2
			SB	6	1,17	1
	Extremidade	0,268	PT	6	2,33	3
			SB	5	1,20	1
Osteócitos	Central	0,035*	PT	7	2,29	3
			SB	6	0,67	0,5
	Extremidade	0,202	PT	6	2,00	2,5
			SB	5	0,60	0
Osteoclastos	Central	0,534	PT	7	0,71	1
			SB	6	1,00	1
	Extremidade	0,048*	PT	6	0,83	1
			SB	5	2,20	3

Teste não paramétrico de Mann Whitney

Nível de significância $p < 0,05$

*Diferença estatisticamente significativa

Fonte – O autor (2014).

5.6.2 Entre diferentes regiões no mesmo grupo

Mediante a aplicação do teste Wilcoxon, a comparação das frequências dos escores da extremidade X centro em cada grupo não apresentou resultados significativos (Tabela 12). Logo, não há diferença entre os aspectos avaliados na neoformação no centro, que não recebeu o etilcianoacrilato, e a extremidade que o recebeu.

Apesar disso, existe uma tendência a haver mais osteoclastos na extremidade do grupo SB que no centro ($p=0,063$).

Tabela 12 – Comparação entre região central e extremidade de cada grupo

Achados histológicos	PT	SB
	p-valor	
Inflamação	1,000	0,157
Fibroblastos	0,317	0,180
Osteoblastos	0,748	0,564
Osteócitos	0,357	1,000
Osteoclastos	1,000	0,063

Teste de Wilcoxon
Nível de significância $p<0,05$
Fonte – O autor (2014).

6 DISCUSSÃO

Os enxertos ósseos autógenos são largamente usados para reconstrução de rebordos atróficos e devem ser fixados justapostos ao sítio receptor. Baseados nisso, os parafusos de titânio representam, clinicamente, o padrão ouro para fixação de enxertos ósseos em bloco (BAŞ et al., 2012; SASKA et al., 2009).

No entanto, a utilização desses dispositivos metálicos para a fixação do enxerto ósseo traz algumas desvantagens e problemas, tais como: formação de artefatos em exames de imagem, custo elevado dos materiais utilizados, risco de exposição do parafuso levando à infecção, entre outros. Além disso, o tempo cirúrgico é maior e exige precisão e habilidade da técnica (OLIVEIRA NETO et al., 2010).

Para reprodução do mecanismo de reconstrução de rebordos atróficos, a calota craniana de rato ou de coelho tem sido utilizada em estudos experimentais. A calota de coelho possui espessura adequada para utilização de parafusos de titânio (OLIVEIRA NETO et al., 2010). Entretanto, a colocação do parafuso de titânio para fixação de enxerto em calota de ratos é considerada como impraticável devido à pouca espessura desta (ESTEVES et al., 2011). No modelo do presente estudo, a utilização de parafusos de titânio para fixação dos enxertos em calota de ratos só se tornou possível em função da adaptação do comprimento dos parafusos introduzida pelos autores.

Os adesivos cianoacrilatos estão sob estudos para serem uma alternativa na substituição dos métodos de osteossíntese que empregam materiais metálicos para a fixação óssea, promovendo uma fixação menos rígida, sem comprometer a

incorporação do enxerto e a sua manutenção volumétrica (OLIVEIRA NETO et al., 2010). Embora estudos clínicos e experimentais tenham demonstrado a eficácia dos cianoacrilatos na fixação de tecidos biológicos (BUCKLEY; BECKMAN, 2010; ESTEVES et al., 2011; ESTEVES et al., 2012; GONZALEZ et al., 2000; MELO et al., 2013; SASKA et al., 2004; SASKA et al., 2009), os mesmos são histotóxicos, quando degradam em formaldeído e cianoacetato, e promovem liberação de calor na polimerização (MELO et al., 2013).

Estes processos resultam em reações teciduais, tais como necrose, abscesso, sequestro ósseo, rejeição de enxerto, edema persistente e fibrose intensa. Em nosso experimento, duas amostras do grupo SB tiveram o enxerto reabsorvido totalmente em uma e parcialmente na porção distal de outra. Constatou-se reação inflamatória relacionada à cola na extremidade, bem como indução à resposta tecidual de reparo com presença de osteoclastos.

O etilcianoacrilato é um adesivo que tem sido utilizado em estudos de reparo do tecido ósseo *in vivo* em modelo humano (GONZALEZ et al., 2000) e animal (ESTEVES et al., 2011; ESTEVES et al., 2012; KIMMID et al., 2000; SASKA et al., 2004; SASKA et al., 2009) e foi considerado como biocompatível em estudos *in vitro* com osteoblastos (MELO et al., 2013).

Para a fixação dos enxertos ósseos o adesivo cianoacrilato deve ser aplicado nas superfícies ósseas e esta aplicação pode interferir nos resultados obtidos. Entretanto, a forma de aplicação do adesivo etilcianoacrilato não está clara na maioria dos estudos pesquisados (ESTEVES et al., 2011; ESTEVES et al., 2012; SASKA et al., 2009). Apenas o estudo de Oliveira Neto et al. (2010), que utilizou o adesivo butilcianoacrilato, descreveu a preocupação em não aplicar o adesivo em

toda extensão do leito receptor, mas somente nas bordas e de realizar perfurações no leito receptor para induzir revascularização. Para a escolha da metodologia a ser empregada neste estudo não foi encontrada na literatura publicada uma padronização para a aplicação, quantidade e modo de inserção do etilcianoacrilato no leito receptor. Deste modo, foi estabelecida como método de aplicação a utilização de uma gota (0,01 mL) do adesivo na forma em gel em cada uma das extremidades, obtendo-se, então, quatro pontos de fixação.

Apesar deste protocolo de aplicação, nos cortes histológicos, o adesivo foi encontrado na extremidade e, eventualmente, transbordando lateralmente sobre a superfície do enxerto. A padronização da técnica de fixação de enxertos com adesivos deve levar em conta a viscosidade dos mesmos que pode permitir ou não seu escoamento para áreas adjacentes à aplicação e, conseqüentemente, interferir no reparo ósseo.

No presente estudo, o adesivo extravasou para a região de superfície em um dos enxertos (Figura 25), formando uma barreira; em outros, permaneceu no sítio de aplicação sem que houvesse incorporação do enxerto. Este fato pode induzir a interpretação de que a cola atuou mais como barreira do que como “elemento solda”.

A incorporação completa dos enxertos ao leito receptor (Figura 22) não foi observada no grupo PT como nos estudos de Saska e outros (2009), que, no mesmo período, observaram a incorporação em apenas dois casos. Na região medial, em 71,4% dos espécimes, obteve-se o escore 1 (0 a 5 células por campo) para fibroblastos e 3 (acima de 15 células por campo) para osteócitos. Na região da extremidade, em 42,9% dos casos, obteve-se escore 3 para os dois tipos celulares.

Portanto, observou-se que a região medial estava em um estágio de maturação mais avançado que a extremidade, entretanto sem diferença estatisticamente significativa. A integralização do enxerto na região central do grupo PT foi maior que em SB ($p=0,035$) e pode ser justificada pela pressão que o parafuso é capaz de exercer no momento da instalação. Esta pressão, que não é exercida pelo adesivo, induz a menor formação de espaço morto. Além disso, foi observada insignificante reação inflamatória em 30 dias.

No presente trabalho, o etilcianoacrilato permaneceu nas extremidades após 30 dias, semelhante ao ocorrido no estudo de Kimaid e outros (2000). O adesivo constituiu-se em um obstáculo que favoreceu a manutenção do espaço morto na interface e, por consequência, interferiu na ocorrência de fenômenos biológicos, tais como a revascularização, proliferação de fibroblastos, neoformação óssea e a incorporação do enxerto. Pode ser observado que o adesivo proporcionou um retardo na reparação e neoformação óssea, corroborando os resultados encontrados por Saska e outros (2009) e Esteves e outros (2011). Entretanto, Kimaid e outros (2000) consideraram que a presença do etilcianoacrilato estimulou a atividade osteogênica e não interferiu no processo de neoformação óssea.

Na comparação das avaliações quantitativas entre regiões de PT e SB, foi possível observar que, na extremidade de SB, a inflamação era estatisticamente significativa ($p=0,030$) e havia maior remodelação óssea indicada pela presença de osteoclastos ($p=0,048$), o que confirma os resultados obtidos por Saska e outros (2009), Esteves e outros (2011) e Esteves e outros (2012). Estes resultados sugerem que o adesivo pode gerar um processo inflamatório importante e, ao mesmo tempo, promover uma maior remodelação óssea.

O método de aplicação do adesivo não demonstrou diferença de maturação óssea dentro do mesmo grupo. A região medial e a extremidade de SB não apresentaram diferenças estatísticas quanto aos aspectos histológicos à neoformação óssea.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados foi possível concluir que:

- Na extremidade do grupo SB, onde foi colocado o adesivo, observou-se maior intensidade do processo inflamatório e da remodelação óssea que no grupo PT;
- Não houve diferença nos aspectos histológicos entre as duas regiões nas comparações intragrupos;
- A forma de aplicação do adesivo apenas na extremidade não facilitou a incorporação do enxerto;
- O adesivo formou um espaço morto na interface enxerto/leito receptor o que fez com que ele atuasse mais como um dificultador do que como agente de união;
- O adesivo etilcianoacrilato interferiu impedindo adequado reparo ósseo;
- O grupo PT apresentou maior maturação óssea na região central que SB;
- Os parafusos de titânio representam clinicamente o padrão ouro de fixação de enxertos ósseos em bloco.

REFERÊNCIAS

AARESTRUP, B. J. **Histologia Essencial**. 1. ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2012. 457p.

BAŞ, B. et al. Screw fixation is superior to N-butyl-2-cyanoacrylate in onlay grafting procedure: a histomorphologic study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Rolling Meadows, v. 41, no. 4, p. 537-543, 2012.

BEDINI, R. et al. The use of microtomographic in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 45, no. 2, p. 178-184, 2009.

BUCKLEY, M. J.; BECKMAN, E. J. Adhesive use in oral and maxillofacial surgery. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, New York, v. 22, no. 1, p. 195-199, 2010.

BRUGNAMI, F.; CAIAZZO, A.; LEONE, C. Local intraoral autologous bone harvesting for dental implant treatment: alternative sources and criteria of choice. **The Keio Journal of Medicine**, Tokyo, v. 58, no. 1, p. 24-28, 2009.

CAPUTO, L. F.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: técnicas histológicas. **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 89-188, 2009.

CARDOSO, R. J. A.; MACHADO, M. L. **Odontologia: arte e conhecimento**. 3 vol. São Paulo: Artes Médicas, 2003. 472p.

CHAVES NETO, H. D. M. et al. Análisis histológico del proceso de reparación em defectos óseos: reconocimiento de defectos críticos. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 27, no. 4, p. 1121-1127, 2009.

ESTEVES, J. C. et al. Histomorphometric analysis of the repair process of autogenous bone grafts fixed at rat calvaria with cyanoacrylate. **Journal of Applied Oral Science**, Baurú, v. 19, n. 5, p. 529-534, 2011.

ESTEVEES, J. C. et al. Utilization of ethyl-cyanoacrylate and 2-octyl-cyanocrylate adhesive for autogenous bone graft fixation. Histomorphometric study in rats. **Journal of Oral Implantology**, Chicago, 20 Aug 2012. Disponível em: [http://www.joionline.org/doi/abs/10.1563/AAID-JOI-D-12-00063.1?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed ?].

MAESTRE-FERRÍN, L. et al. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: An update. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v, 14, n. 8, p. 402-7, 2009.

GONZALEZ, E. et al. Ethyl-2-Cyanoacrylate fixation of the cranial bone flap after craniotomy. **Surgical Neurology**, Mumbai, v. 53, n. 3, p. 288-289, 2000.

KIMMID, A. et al. Avaliação histológica do etil cianoacrilato na reparação óssea de ratos. **Revista de Odontologia da UNESP**, São Paulo, v. 29, n. 1/ 2, p. 145-157, 2000.

MAIORANA, C. et al. Histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone coverage to reduce autogenous grafts resorption: preliminary results. **The Open Dentistry Journal**, Los Angeles, v. 5, p. 71-78, 2011.

MAESTRE-FERRÍN, L. Augmentation procedures for deficient edentulous ridges, using onlay autologous grafts: an update. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, Valencia, v. 14, no. 82, p. 402-407, 2009.

MEDONÇA, R. G. et al. Avaliação histológica do processo de reparo ósseo após implantação de BMPs. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, Campina Grande, v. 7, n. 3, p. 291-296, 2007.

MELO, W. M. DE. et. al. Cytotoxicity testing of methyl and ethyl 2-cyanoacrylate using direct contact assay on osteoblast cell cultures. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Rolling Meadows, v. 71, no. 1, p. 35-41, 2013.

NETO, H. D. et al. Histometric analyses of cancellous and cortical interface in autogenous bone grafting. **International Journal of Experimental Pathology**, New York, v. 6, no. 8, p. 1532-1537, 2013.

OLIVEIRA NETO, P. J. DE. et al. Tomographic, histological, and immunohistochemical evidences on the use of N-butyl-2-cyanoacrylate for onlay graft fixation in rabbits. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, New York, v. 14, no. 6, p. 861-871, 2010.

SASKA, S. et al. Uso do adesivo à base de etil-cianoacrilato na reparação óssea. **Revista Brasileira de Ortopedia**, São Paulo, v. 39, n. 8, p. 461-467, 2004.

SASKA, E. S. et al. Fixation of autogenous bone graft with ethyl-cyanoacrylate glue or titanium screws in the calvaria of rabbits. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Rolling Meadows, v. 38, no. 2 , p. 180-186, 2009.

SENRA, G. S. **Estudo comparativo de reparação óssea em ratas ovariectomizadas tratadas com risedronato e calcarea fluorica**. 2006. 75-6p. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, São José dos Campos, 2006.

STERNBERG, S. S. **Histology for pathologists**. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1200p.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. **Handbook of laboratory animal management and welfare**. 3. ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2003. 409p.

ANEXO A



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

ANEXO B

Análise semiquantitativa na região medial do grupo PT

Achados histológicos	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7
Inflamação	1	1	N	N	2	N	N
Fibroblastos	1	1	1	2	2	1	1
Osteoblastos	1	3	3	2	1	2	1
Osteócitos	1	3	3	3	N	3	3
Osteoclastos	1	N	N	1	1	1	1

(N) Ausência, (1) Discreto, (2) Moderado e (3) Intenso

Fonte – O autor (2014).

ANEXO C

Análise semiquantitativa na região medial do grupo SB

Achados histológicos	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Inflamação	ND	3	1	1	N	2	2
Fibroblastos	ND	3	1	1	1	1	1
Osteoblastos	ND	2	2	1	N	1	1
Osteócitos	ND	1	N	2	N	1	N
Osteoclastos	ND	1	1	2	N	1	1

(ND) Não determinada. Amostra do animal SB1 foi excluída em função da total reabsorção do enxerto

(N) Ausência, (1) Discreto, (2) Moderado e (3) Intenso

Fonte – O autor (2014).

ANEXO D

Análise semiquantitativa na extremidade do grupo PT

Achados histológicos	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7
Inflamação	N	1	N	1	1	ND	1
Fibroblastos	1	3	1	2	3	ND	3
Osteoblastos	3	3	1	1	3	ND	3
Osteócitos	3	3	1	N	3	ND	2
Osteoclastos	N	1	N	1	1	ND	2

(ND) Não determinada. A amostra do animal PT6 foi excluída em função da contaminação por protozoário

(N) Ausência, (1) Discreto, (2) Moderado e (3) Intenso

Fonte – O autor (2014).

ANEXO E

Análise semiquantitativa na extremidade do grupo SB

Achados histológicos	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7
Inflamação	ND	ND	1	2	1	2	2
Fibroblastos	ND	ND	1	2	1	3	1
Osteoblastos	ND	ND	2	2	1	1	N
Osteócitos	ND	ND	N	N	3	N	N
Osteoclastos	ND	ND	1	3	1	3	3

(ND) Não determinada. Amostras da extremidade dos animais SB1 e SB2 foram excluídas em função da total reabsorção dos enxertos

(N) Ausência, (1) Discreto, (2) Moderado e (3) Intenso

Fonte – O autor (2014).