

Ministério da Saúde  
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE  
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ANQUILOSE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR NA INFÂNCIA:  
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA OSTEOPROTEGERINA E DO LIGANTE  
DO FATOR ATIVADOR DO RECEPTOR NUCLEAR KAPPA-B

André da Silveira Braune

Rio de Janeiro  
2017



INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ANQUILOSE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR NA INFÂNCIA:  
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA OSTEOPROTEGERINA E DO LIGANTE  
DO FATOR ATIVADOR DO RECEPTOR NUCLEAR KAPPA-B

André da Silveira Braune

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Marco Bernardo Cury Fernandes

Rio de Janeiro  
Agosto 2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
INTO/BIBLIOTECA SÉRGIO EDUARDO VIANNA

B825a Braune, André da Silveira.

Anquilose da articulação temporomandibular na infância: análise da expressão gênica da osteoprotegerina e do ligante do fator ativador do receptor nuclear kappa-B / André da Silveira Braune. — 2017. 86f.

Orientador: Marco Bernardo Cury Fernandes.

Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) — Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad, Rio de Janeiro, 2017.

1. Articulação temporomandibular. 2. Anquilose. 3. Expressão gênica. 4. Osteoprotegerina. 5. Fator ativador do receptor nuclear kappa-B. 6. Ortopedia. I. Fernandes, Marco Bernardo Cury, orient. II. Título.

NLM WU 100

INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético

ANQUILOSE DA ARTICULAÇÃO TEMPOROMANDIBULAR NA INFÂNCIA:  
ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA OSTEOPROTEGERINA E DO LIGANTE  
DO FATOR ATIVADOR DO RECEPTOR NUCLEAR KAPPA-B

André da Silveira Braune

Prof. Dr. Marco Bernardo Cury Fernandes

Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovada por:

Dra Mônica Diuana Calasans Maia (UFF)

Dr. Eduardo Seixas Cardoso (UFF)

Dr. Diego Pinheiro Aguiar (INTO)

Dra. Jamila Perini (INTO), revisora

Dra. Amanda dos Santos Cavalcanti (INTO), suplente

Rio de Janeiro  
Agosto de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família e aos meus antepassados por me permitirem estar aqui hoje concluindo esta etapa acadêmica. Agradeço também aos meus mestres pelos estímulos e ensinamentos, mas especialmente ao meu mestre Ricardo Lopes da Cruz pelo exemplo diário do “ser médico”.

Agradeço ao Instituto de Traumatologia e Ortopedia Jamil Haddad pela oportunidade de realizar o Mestrado no meu ambiente de trabalho e fazendo exatamente meu trabalho assistencial.

Agradecimentos não podem faltar para toda equipe do Centro de Cirurgia Craniomaxilofacial que se envolveram no tratamento destes pacientes, principalmente a fonoaudiologia encarregada pela reabilitação da motricidade oral, também à nutrição, à psicologia e a assistência social, todos tão importantes para fidelidade no tratamento e o resultado final.

Diretamente relacionado ao meu trabalho tenho que agradecer a Valkiria Quinelato(FAPERJ) e Priscila Casado (FAPERJ) que me estimularam o início desta jornada, apontando um caminho de estudo de um problema clínico difícil que enfrentamos com os casos de anquilose temporomandibular.

Agradeço também a todo staff da divisão de pesquisa do INTO pela ajuda na coleta e processamento do material cirúrgico.

Agradeço muito ao meu Orientador, Dr. Marco Bernardo Cury que me acolheu e estimulou em momentos difíceis durante o desenvolvimento do trabalho.

Agradecimento maior ainda à Dra Jamila Perini, que foi revisora, ajudou a organizar e costurar nossos resultados com análise crítica e construtiva, sempre objetiva e prática em suas ideias, fundamental na execução final deste trabalho.

E finalmente agradecer aos pacientes e suas famílias que se envolveram nesse trabalho voluntariamente para o benefício de todos.

## RESUMO

---

BRAUNE, André da Silveira. Anquilose da articulação temporomandibular na infância: análise da expressão gênica da osteoprotegerina e do ligante do fator ativador do receptor nuclear kappa-B. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas ao Sistema Musculoesquelético) - Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, Ministério da Saúde, 2017.

A anquilose da articulação temporomandibular (AATM) apesar de rara, é uma doença grave e de difícil tratamento, que restringe os movimentos articulares acarretando ao paciente problemas estéticos, nutricionais, psicológicos e sociais. A formação do bloco ósseo anquilótico determina a gravidade da doença. O remodelamento ósseo é um mecanismo coordenado e extremamente complexo responsável pela formação e pela reabsorção óssea, sendo necessário no reparo de trauma ósseo e na manutenção da homeostasia do metabolismo mineral. Assim, entender o processo de remodelamento ósseo envolvido na fisiopatologia das AATMs pode trazer perspectivas no tratamento desta doença. O objetivo do estudo foi avaliar o perfil de expressão dos genes envolvidos no remodelamento ósseo, osteoprotegerina (OPG) e do fator ativador do receptor nuclear kappa-B/ligante (RANKL), em amostras de crianças com AATM para verificar se existe associação com a degeneração articular da ATM. Foram incluídos no estudo 11 crianças com diagnóstico de AATM e 5 amostras de osso controle (sem alteração patológica na ATM). A idade média dos pacientes com AATM foi de 12 anos, sendo que 9 (82%) já haviam realizado cirurgia prévia de AATM, 36% (n = 4) apresentaram otite em fase neonatal e 18% (n = 2) infecção prévia. A expressão de *OPG* e *RANKL* foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa. Foi observado uma menor expressão de *OPG* e *RANKL* nas amostras de pacientes com AATM (bloco anquilótico e osso adjacente à anquilose) comparado as amostras controle. O *RANKL* e *OPG* regulam a reabsorção óssea por estimulação do *RANK* em células precursoras de osteoclastos. Nossos resultados são corroborados por um estudo recente, justificando a investigação da via *RANK-RANKL-OPG* na AATM, com o intuito de se explorar novas possibilidades terapêuticas, que possam auxiliar no tratamento desta doença que ainda é negligenciada. A menor expressão de *OPG* e *RANKL* indicam que a patogênese da AATM em crianças está relacionada a diminuição da reabsorção óssea.

Palavras-chave: Articulação temporomandibular, Anquilose, Expressão gênica, Osteoprotegerina, Fator ativador do receptor nuclear kappa-B.

## ABSTRACT

---

BRAUNE, André da Silveira. Temporomandibular joint ankylosis in childhood: analysis of the gene expression of osteoprotegerin and receptor for activation of nuclear factor kappa B ligand. Rio de Janeiro, 2017. Master Thesis. (Master's Degree in Science Applied to the Musculoskeletal System) – National Institute of Traumatology and Orthopedics, Ministry of Health, 2017.

Temporomandibular joint ankylosis (TMJA), although rare, is a serious and difficult to treat disease, which restricts joint movements, causing aesthetic, nutritional, psychological and social problems to the patient. The formation of the ankylotic bone block determines the severity of the disease. Bone remodeling is a coordinated and extremely complex mechanism responsible for bone formation and resorption, and is necessary for the repair of bone trauma and the maintenance of homeostasis of mineral metabolism. Thus, understanding the process of bone remodeling involved in the pathophysiology of TMJA may bring perspectives in the treatment of this disease. The aim of the study was to evaluate the expression profile of the genes involved in bone remodeling, osteoprotegerin (OPG) and nuclear kappa-B receptor activator / RANKL (RANKL) in samples from children with TMJA to verify if there is association with Joint degeneration of TMJ. The study included 11 children with TMJA diagnosis and 5 control bone samples (without pathological alterations in TMJ). The mean age of patients with TMJA was 12 years, and 9 (82%) had previously performed TMJA surgery, 36% (n = 4) presented otitis in the neonatal phase and 18% (n = 2) had previous infection. The expression of OPG and RANKL was evaluated by the quantitative polymerase chain reaction. Lower expression of OPG and RANKL was observed in the samples of patients with TMJA (ankylotic block and bone adjacent to ankylosis) compared to the control samples. RANKL and OPG regulate bone resorption by stimulating RANK in osteoclast precursor cells. Our results are corroborated by a recent study, justifying the investigation of the RANK-RANKL-OPG pathway in the TMJA, in order to explore new therapeutic possibilities that may help in the treatment of this disease that is still neglected. Lower expression of OPG and RANKL indicate that pathogenesis of TMJA in children is related with lower bone resorption.

Keywords: Temporomandibular joint, Ankylosis, Gene expression, Osteoprotegerin, Receptor for activation of nuclear factor kappa B.

## SUMÁRIO

---

RESUMO .....	VI
ABSTRACT.....	VII
SUMÁRIO .....	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	X
LISTA DE FIGURAS .....	XI
LISTA DE QUADROS E TABELAS .....	XIII
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1 Articulação Temporomandibular.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2 Anquilose da ATM .....</b>	<b>18</b>
1.2.1 Etiologia da anquilose da ATM.....	19
1.2.2 Diagnóstico da AATM.....	21
1.2.3 Tratamento da AATM .....	26
<b>1.3 Mecanismos moleculares envolvidos na AATM .....</b>	<b>32</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1 Objetivo Principal .....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>36</b>
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1 População do Estudo .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2 Protocolo cirúrgico para coleta do material biológico.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3 Processamento das amostras biológicas .....</b>	<b>42</b>
<b>4.4 Extração RNA e análise da expressão gênica .....</b>	<b>44</b>
<b>4.5 Análise estatística .....</b>	<b>45</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>

<b>5.1</b>	<b>Dados demográficos e clínicos .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2</b>	<b>Expressão gênica .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

---

°C	Graus Celsius
AATM	Anquilose da articulação temporomandibular
ATM	Articulação temporomandibular
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local
BSS-CMF	solução salina balanceada livre de íons cálcio e magnésio
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
DMEM	Meio de cultivo de células ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's médium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
mg	mg
mL	Mililitro
mm	Milímetro
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RANK	Fator ativador do receptor nuclear kappa-B
RANKL	Fator ativador do receptor nuclear kappa-B/ligante
RM	Ressonância Magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de transcrição reversa do PCR
SFB	Soro fetal bovino
TNFSF11	Superfamília do receptor do fator de necrose tumoral, membro 11a

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1: Vista lateral e medial da articulação temporomandibular. ....	14
Figura 2: Vista lateral do disco articular da articulação temporomandibular. ....	16
Figura 3: Articulação temporomandibular no plano sagital com o disco articular (D) em posição normal, considerando a posição da boca fechada. ....	16
Figura 4: Articulação temporomandibular no plano sagital, com o disco articular (D) em posição normal, considerando a posição da boca aberta ....	17
Figura 5: Etiologia da AATM.....	20
Figura 6: Tipos de anquilose, segundo classificação anatômica. ....	22
Figura 7: Classificação da anquilose da ATM, segundo Sawhney, em 1986.....	23
Figura 8: Tomografia computadorizada da seção coronal demonstrando anquilose do ATM esquerdo.....	25
Figura 9: Imagem de RM da AT, ponderada em T1, corte sagital de paciente com a boca fechada.....	26
Figura 10: Técnicas para o tratamento cirúrgico da AATM. ....	28
Figura 11: Descrições simplificadas de membros da via de sinalização RANK-RANKL-OPG. ....	33
Figura 12: Tomografia computadorizada com reconstrução 3D.....	38
Figura 13: Acesso a ATM esquerda por incisão pré-auricular com extensão temporal. ....	39
Figura 14: Artroplastia interposicional com utilização de retalho de músculo temporal como material interposicional.....	39
Figura 15: Coronoidectomia ipsilateral. Fragmento ósseo resseccionado. ....	40
Figura 16: Exemplo de resultado do tratamento cirúrgico da AATM.. ....	41
Figura 17: Paciente L.S.A.A. após tratamento cirúrgico da AATM.....	41
Figura 18: Local da anquilose tratada previamente pelos nove dos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.....	48
Figura 19: Características das comorbidades associadas relatadas pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.....	49
Figura 20: Presença de infecção e/ou inflamação, em fase neonatal, relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.....	49

Figura 21: Presença de traumatismo, em fase neonatal, relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.....	50
Figura 22: Presença de intercorrências durante o período de gestação ou no momento do parto relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo. .	50
Figura 23: Presença de nascimento prematuro relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo. ....	51
Figura 24: Fluxograma do estudo indicando as amostras incluídas, excluídas e as perdas. ....	55
Figura 25: Dados da expressão gênica de OPG comparando amostras de osso de pacientes com AATM com amostras controle.. ....	58
Figura 26: Dados da expressão gênica de RANKL comparando amostras de osso de pacientes com AATM com amostras controles. ....	59
Figura 27: Dados referente a razão da expressão gênica de OPG e RANKL comparando amostras de osso de pacientes com AATM com amostras controles..	60

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

---

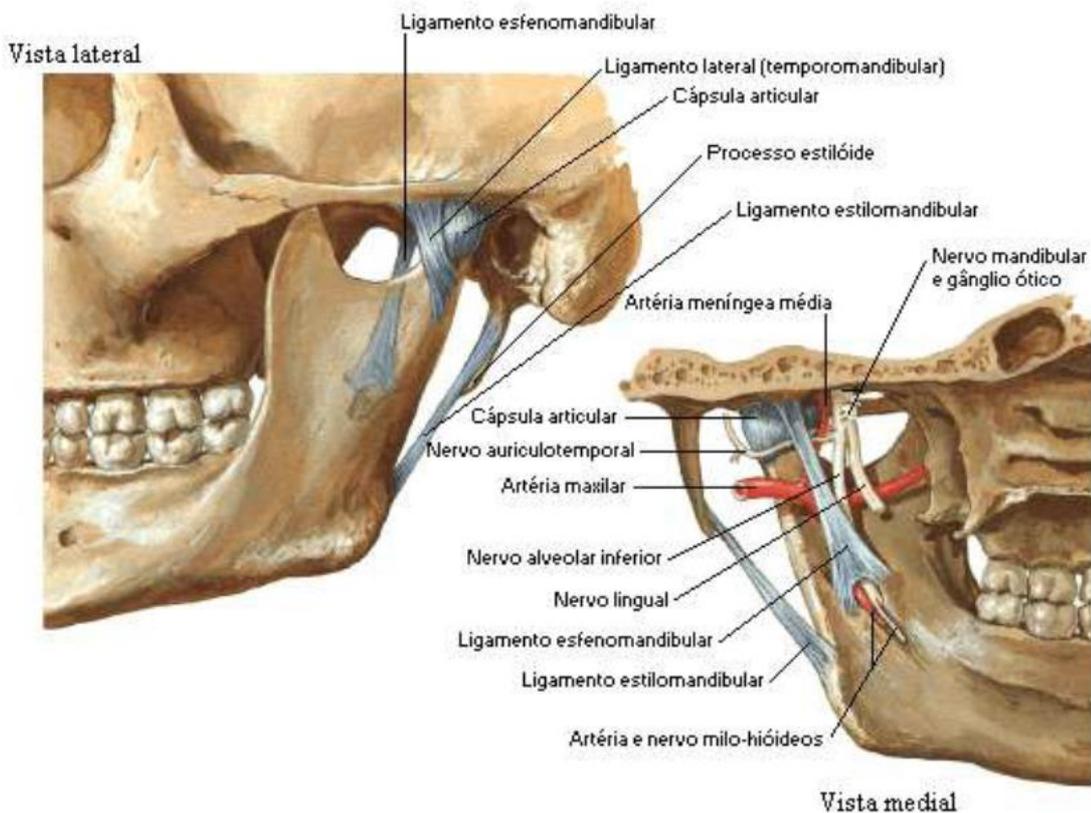
Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados para análise de expressão por qPCR para os genes OPG, RANKL e o controle $\beta$ -actina. ....	45
Tabela 2: Informações demográficas dos pacientes diagnosticados com AATM. ....	46
Tabela 3: Informações clínicas dos pacientes diagnosticados com AATM. ....	47
Tabela 4: Informações clínicas dos pacientes diagnosticados com AATM. ....	52
Tabela 5: Informações clínicas sobre a gestação e o parto dos pacientes diagnosticados com AATM. ....	53
Tabela 6: Informações dos indivíduos incluídos no grupo controle. ....	54
Tabela 7: Informações dos indivíduos incluídos na análise de expressão (n = 4). ....	56
Tabela 8: Média dos valores individuais da expressão gênica, de OPG e RANKL, considerando todas as amostras nos grupos estudados (método Livak). ....	57

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Articulação Temporomandibular

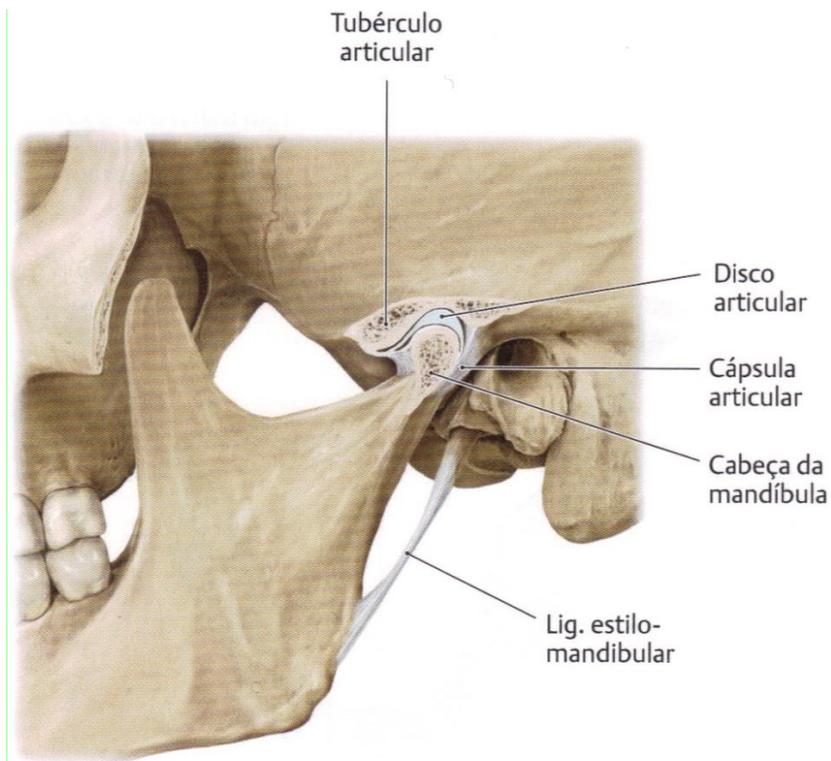
A articulação temporomandibular (ATM) é considerada a mais complexa das articulações do corpo humano, é a principal ligação entre o crânio e a mandíbula, sendo composta pelo côndilo da mandíbula, fossa mandibular, disco articular, tecido retrodiscal, membrana sinovial, cartilagem e cápsula articular (Figura 1), localizado no topo do pescoço condilar (MACIEL & TURELL, 2003).



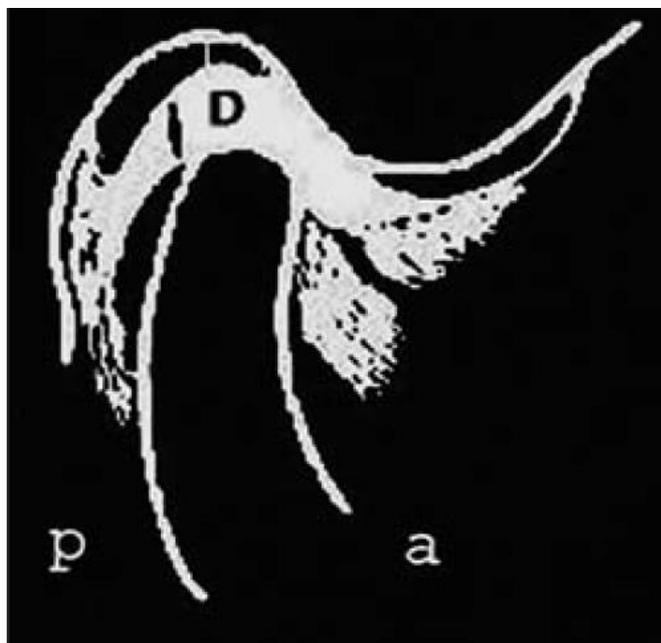
**Figura 1:** Vista lateral e medial da articulação temporomandibular (Adaptado de NETTER, 2000).

A ATM é dividida em um compartimento superior e um inferior, separado pelo disco articular, que é uma estrutura flexível e bicôncava, formada pelo tecido conjuntivo fibroso denso, situado entre o declive posterior da eminência articular e a superfície ântero-superior do côndilo (NETTER, 2000). O compartimento superior contém 1,2 ml de fluido sinovial, sendo responsável pelo movimento de translação da articulação, enquanto que o compartimento inferior é ligeiramente menor, apresentando 0,9 ml de volume de fluido sinovial e possibilitando movimentos rotacionais. Em condições normais os compartimentos superiores e inferiores não se comunicam (KATZBERG & WESTESSON, 1993; HEFFEZ, MAFEE & ROSENBERG, 1995).

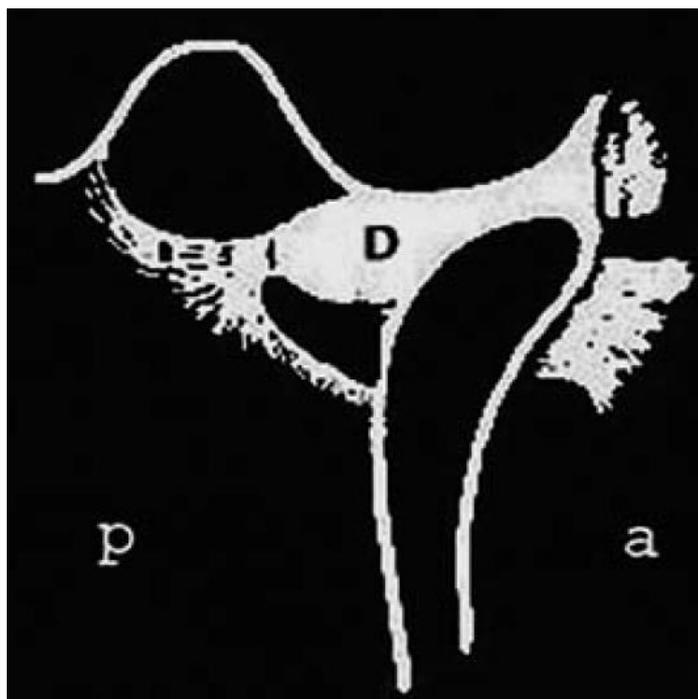
O disco articular (Figura 2) é dividido em: anterior, localizado anteriormente ao processo condilar da mandíbula; intermediário, localizado ao longo do tubérculo articular, sendo mais fino que a periferia; e posterior, localizado superiormente ao processo condilar da mandíbula, sendo mais espesso (OKESON, 2000). Considerando a posição da boca fechada, normalmente o disco articular encontra-se alinhado entre o ponto médio do contorno superior do côndilo da mandíbula e o limite distal da banda posterior do disco, conforme ilustrado na Figura 3. Contudo, existem variações desta normalidade, e qualquer deslocamento da zona intermediária para anterior já pode ser considerado como deslocamento do disco articular (RAMOS et al., 2004). Quando o disco articular apresenta-se entre a superfície pósterio-superior do côndilo e a superfície convexa do tubérculo do osso temporal, considera-se a posição de abertura máxima da boca, conforme Figura 4 (TASAKI et al., 1996)



**Figura 2:** Vista lateral do disco articular da articulação temporomandibular (Adaptado de NETTER, 2000).



**Figura 3:** Articulação temporomandibular no plano sagital com o disco articular (D) em posição normal, considerando a posição da boca fechada. (a) Porção anterior da ATM; (p) Porção posterior da ATM. (Adaptado de RAMOS et al., 2004)



**Figura 4:** Articulação temporomandibular no plano sagital, com o disco articular (D) em posição normal, considerando a posição da boca aberta. (a) Porção anterior da ATM; (p) Porção posterior da ATM (Adaptado de RAMOS et al., 2004)

Como componente do sistema estomatognático, a ATM está diretamente relacionada às funções fisiológicas. Além da ATM, também fazem parte do sistema estomatognático, musculatura de cabeça e pescoço, dentes, vasos sanguíneos, nervos, órgãos e glândulas, que após sinalização do sistema nervoso central, atuam na manutenção da postura e em funções neurovegetativas, como a sucção, mastigação, deglutição, respiração e fala (OLIVEIRA & CRIVELLO, 2004). A ATM pode ser afetada, assim como outras articulações do sistema músculo-esquelético, podendo sofrer deslocamentos de disco, sinovites, artrites inflamatórias, doenças articulares degenerativas, como a osteoartrite (RAMOS et al., 2004). Alterações neste complexo sistema podem provocar desequilíbrio resultando em uma disfunção temporomandibular (JACOB et al, 2005). Os distúrbios temporomandibulares estão

ganhando destaque no âmbito da saúde pública, já que se observa sinais clínicos, como estalidos, crepitação e dor, em 50% da população (KÖHLER et al., 2009).

## **1.2 Anquilose da ATM**

A anquilose da ATM (AATM) é a fusão entre o côndilo mandibular e a cavidade glenóide, restringindo os movimentos articulares, limitando a mastigação e induzindo a problemas estéticos, nutricionais, psicológicos, sociais, e alterações no crescimento facial, erupção e posicionamento dentário (BALAJI, 2009; PEREIRA FILHO et al, 2011; FIGUEIREDO et al., 2014). Os pacientes que sofrem de AATM geralmente apresentam uma incapacidade de abrir a boca, acompanhada de problemas de fala, mastigação, digestão e higiene oral (ROYCHOUDHURY, PARKASH & TRIKHA, 1999; LIU et al., 2015). Em pacientes em crescimento, deformidades da mandíbula e da maxila podem ocorrer juntamente com a má oclusão (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990; SARMA & DAVE, 1991; KUMAR et al., 2014).

A AATM pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais frequente em crianças com menos de 10 anos (PEREIRA FILHO et al., 2011). Quando ocorre em crianças e adolescentes, o crescimento é significativamente afetado, resultando em subdesenvolvimento mandibular, deformidade facial, desenvolvimento craniofacial incompleto e alterações na erupção e posicionamento dentários. Além disso, a AATM pode causar problemas fisiológicos e psicológicos (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990; SARMA & DAVE et al., 1991; LIU et al., 2015). Conseqüentemente,

intervenções precoces são necessárias uma vez que a condição é reconhecida (LIU et al., 2015).

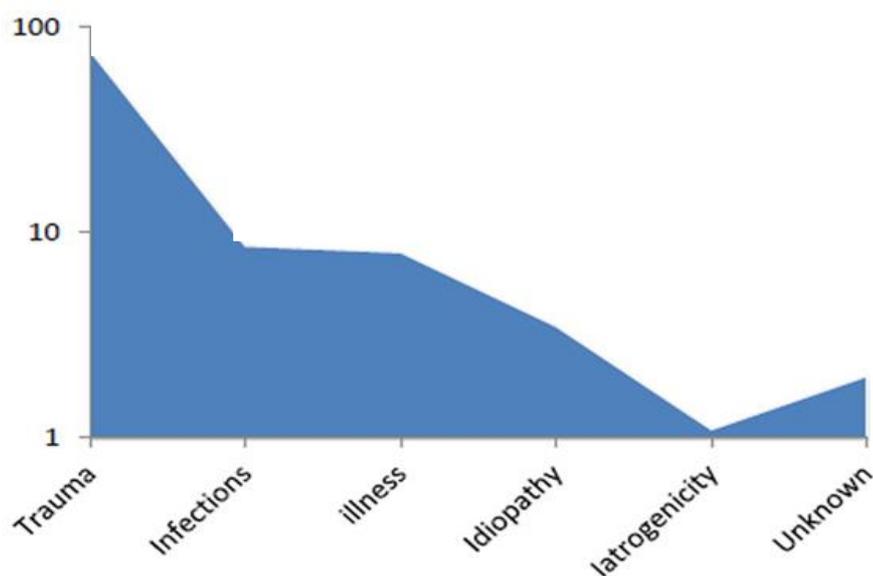
A AATM é uma doença rara, tendo poucos trabalhos na literatura relatando dados de incidência. Em 2012, GUPTA e colaboradores conduziram um trabalho entre 2010 e 2011, nas regiões rurais e urbanas de Lucknow, capital do estado de Uttar Pradesh, na Índia. Foram avaliadas 21.720 crianças e apenas 10 tiveram diagnóstico de AATM, sendo 6 com anquilose bilateral e 4 unilateral. A média de idade destes pacientes foi de 11 anos (idade mínima 10 anos e máxima de 15 anos) e 70% dos pacientes já tiveram tratamento prévio para AATM (GUPTA et al., 2012). A AATM é um problema grave e muitas vezes negligenciado e não diagnosticado em crianças (DAS et al., 2009).

### 1.2.1 Etiologia da anquilose da ATM

Dentre os fatores etiológicos estão o trauma, infecção na região da ATM (DAS et al, 2009, FIGUEIREDO et al, 2014), condições inflamatórias sistêmicas e locais, como artrite e otite (SIDEBOTTOM & SALHA, 2013), além de neoplasias (MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003; VASCONCELOS, PORTO & BESS-NOGUEIRA, 2008). Porém, alguns casos de anquilose não têm suas causas definidas, sendo denominadas anquilose idiopática (VASCONCELOS, PORTO & BESS-NOGUEIRA, 2008). Frequentemente, a AATM está associada ao trauma e a infecção (SU-GWAN, 2001; RAO et al., 2004; QUDAH, QUDEIMAT & AL-MAAITA, 2005), sendo que em adultos, o trauma é apontado como a causa mais comum. Já

em crianças, a infecção, principalmente quadros de otite, foi relatada como a principal causa (CHIDZONGA, 1999).

Em 2015, uma meta-análise envolvendo 740 participantes, com idade média de 18 anos (mínimo: 6,93 e máximo: 48,56 anos), oriundos de nove países diferentes (Índia, Turquia, Brasil, Estados Unidos, China, Suécia, Egito, Irã e Paquistão), identificou que o principal fator etiológico da anquilose da ATM foi o trauma (76,8%), seguido de infecção (8,6%). A anquilose idiopática correspondeu a cerca de 3,5% dos casos, conforme ilustrado na Figura 5 (LIU et al., 2015). SU-GWAN (2001) e ROYCHOUDHURY et al. (1999) descreveram uma taxa em torno de 86% para o fator etiológico trauma na AATM.



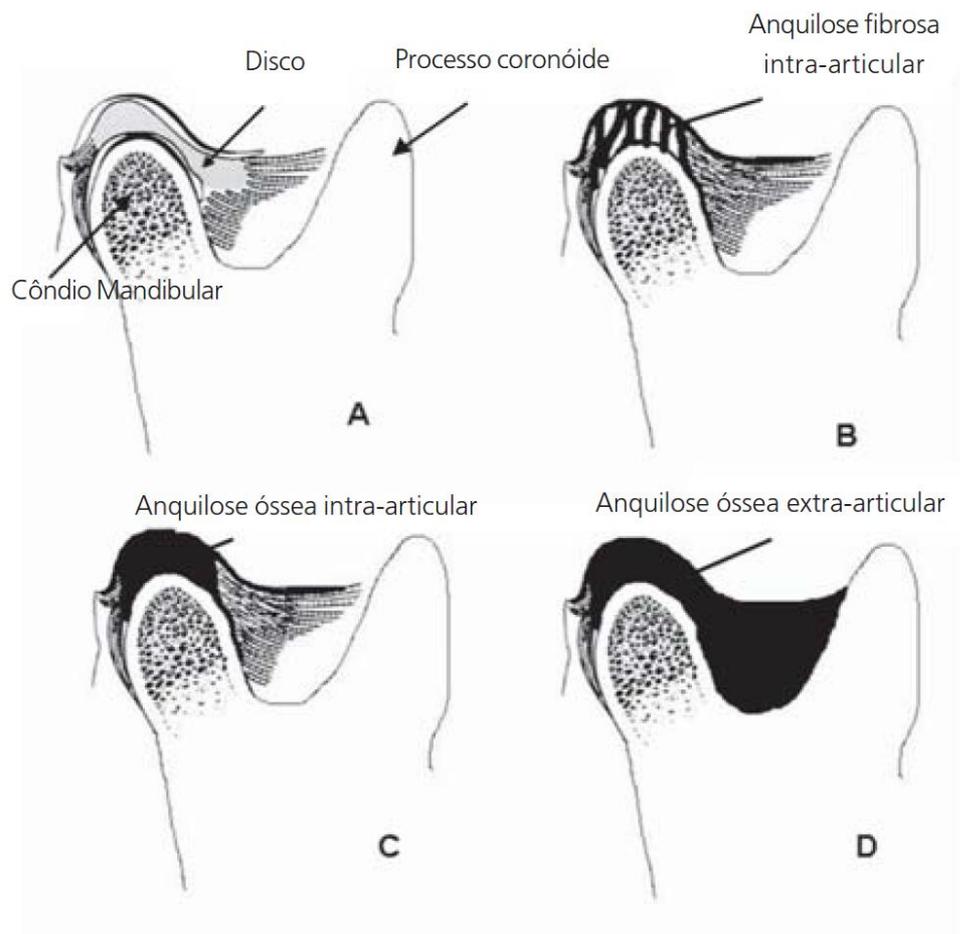
**Figura 5:** Etiologia da AATM. Fatores etiológicos da AATM provenientes de um estudo de meta-análise que incluiu 17 trabalhos. (Adaptado de LIU et al., 2015).

### 1.2.2 Diagnóstico da AATM

O diagnóstico da AATM é feito com base nos sinais e sintomas da anquilose e confirmado por exames de imagem. O detalhado exame clínico e anamnese são de grande importância para o levantamento de hipótese sobre o tipo de comprometimento articular. A micrognatia e assimetria facial são comumente observadas na AATM (MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003).

O exame clínico é de grande valia no diagnóstico das desordens temporomandibulares, mas tem suas limitações devido à dificuldade de padronizar seus critérios. Assim, são necessários métodos mais efetivos para obter dados auxiliares que complementem o exame clínico no diagnóstico e tratamento das alterações da AATM. Os exames radiográficos, tomografia e/ou ressonância nuclear magnética definem o tipo e a extensão da lesão mostrando os limites anatômicos preservados, presença de alterações e de tecido ósseo radiopaco ou outras alterações que dificultem ou impeçam os movimentos livres da mandíbula (MARZOTTO & BIANCHINI, 2007).

Algumas classificações já foram propostas para AATM (Figura 6) com base na localização (intra ou extra-articular), tipo de tecido envolvido (fibroso, fibro-ósseo ou ósseo) e extensão da fusão (completa ou incompleta), uni ou bilateral (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990; LIU et al., 2015). Quando ocorre em crianças pode ser um impedimento ao crescimento mandibular normal, resultando em uma hipoplasia mandibular, especialmente se houver um problema bilateral (VASCONCELOS, PORTO & BESS-NOGUEIRA, 2008).



**Figura 6:** Tipos de anquilose, segundo classificação anatômica. (A) articulação normal; (B) anquilose fibrosa; (C e D) anquilose óssea intra e extra articular. (Adaptado de PORTO e VASCONCELOS, 2007).

Na classificação clínica da AATM em crianças, existem quatro tipos diferentes, segundo Sawhney (1986), considerando o grau de limitação da mobilidade da ATM (Figura 7):

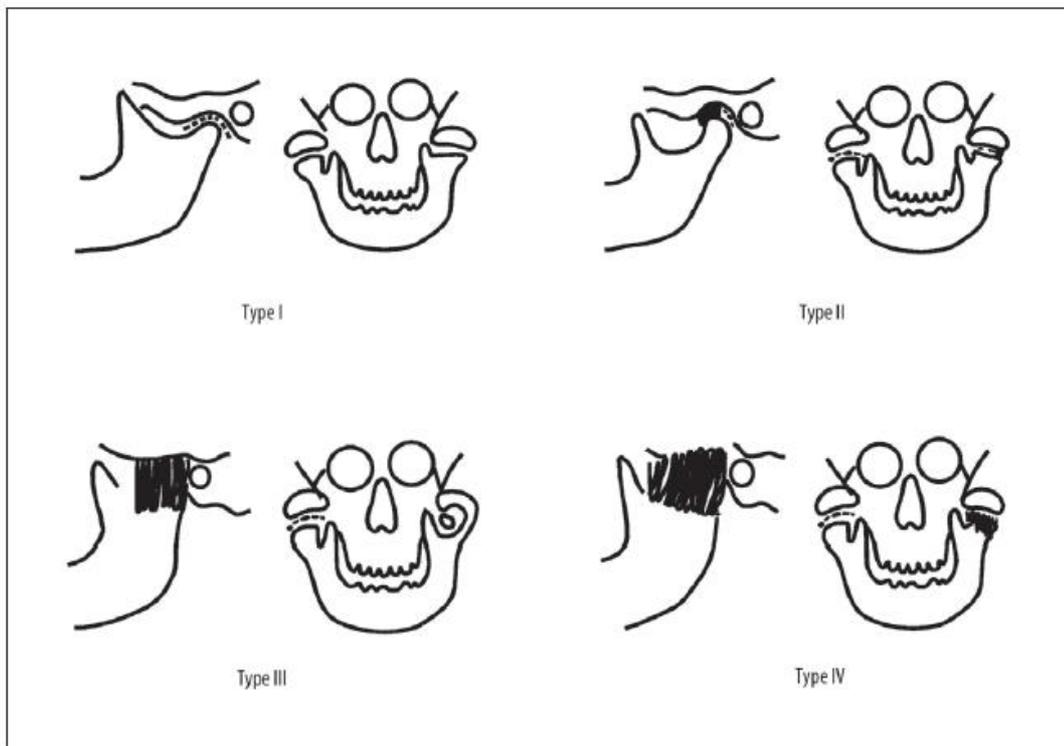
Tipo I: A cabeça do processo condilar é visível, há mínima fusão óssea com aderências fibrosas extensas ao redor da articulação, tornando o movimento da ATM impossível;

Tipo II: Observa-se uma maior fusão óssea. A consolidação da cabeça deformada do processo condilar e da superfície articular ocorre principalmente nas

bordas e nas partes anterior e posterior das estruturas, a parte medial da superfície da cabeça condilar permanece intacta;

Tipo III: É verificado uma ponte de osso entre a mandíbula e o osso temporal.

Tipo IV: A articulação é substituída por uma massa de osso entre o ramo mandibular e a base cranial.



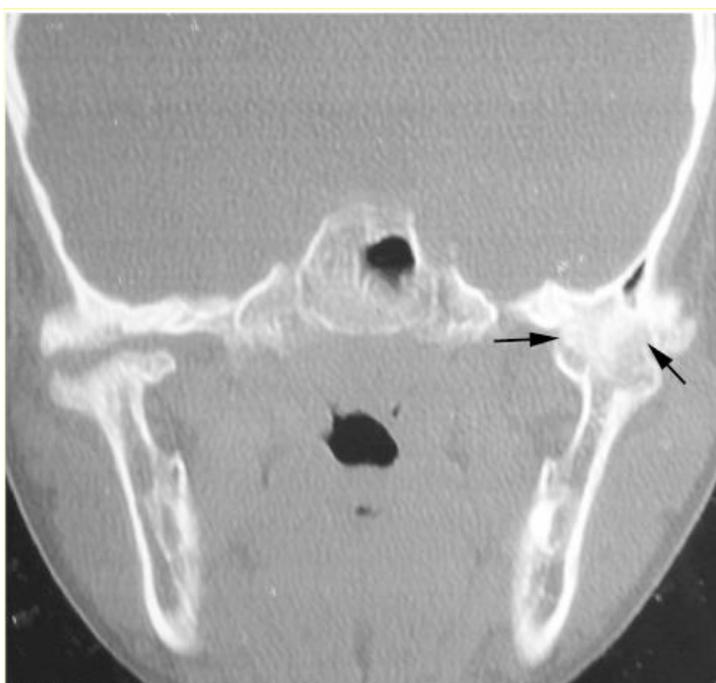
**Figura 7 :** Classificação da anquilose da ATM, segundo Sawhney, em 1986. Tipo I: A cabeça do processo condilar é visível, há mínima fusão óssea com aderências fibrosas extensas ao redor da articulação, tornando o movimento da ATM impossível; Tipo II: Observa-se uma maior fusão óssea. A consolidação da cabeça deformada do processo condilar e da superfície articular ocorre principalmente nas bordas e nas partes anterior e posterior das estruturas, a parte medial da superfície da cabeça condilar permanece intacta; Tipo III: É verificado uma ponte de osso entre a mandíbula e o osso temporal; Tipo IV: A articulação é substituída por uma massa de osso entre o ramo mandibular e a base cranial. (SPORNIK-TUTAK, JANISZEWSKA-OLSZOWSKA & KOWALCZYK, 2011).

Considerando a formação de osso heterotópico, dentro da massa anquilótica, a anquilose de ATM foi classificada por Turlington e Durr, em 1993, em 4 graus: grau 0: nenhuma ilha óssea visível; grau 1: presença de ilhas de osso visíveis dentro do tecido mole ao redor da articulação; grau 2: ocorre a formação óssea periarticular; grau 3: anquilose óssea aparente. As classes 1, 2 e 3 são ainda classificadas como sintomáticas e assintomáticas. A ossificação sintomática inclui: dor intensa, diminuição da abertura interincisal (15 mm ou menos), fechamento da mandíbula, diminuição do movimento lateral ou movimento protrusivo (DURR, TURLINGTON & FOOTE, 1993; SPORNIAK-TUTAK, JANISZEWSKA-OLSZOWSKA & KOWALCZYK, 2011).

As radiografias panorâmicas são utilizadas para permitir a identificação de alterações das porções lateral e central do côndilo, devido à orientação oblíqua do feixe de raios X em relação ao longo eixo do côndilo. São úteis pois permitem uma visão geral de todo o conjunto, contudo apresentam limitação devido à baixa acurácia na identificação de alterações da ATM. Todavia, as radiografias panorâmicas são indispensáveis no diagnóstico, indicadas no exame preliminar, antes de utilizar outras técnicas de diagnóstico por imagem, como tomografia computadorizada e ressonância magnética (CHEYNET et al., 1998).

A tomografia computadorizada é um importante exame de imagem, quando comparado aos métodos convencionais de imagem para ATM. Possui um papel diferenciado no diagnóstico de condições patológicas da ATM, como a AATM, permitindo a completa visualização da região articular, sem a limitação das sobreposições, fornecendo o tamanho e formato real das estruturas anatômicas, contribuindo para precisão do diagnóstico (SILVEIRA et al., 2014). A figura 8 ilustra uma tomografia computadorizada da AATM, podendo observar que o côndilo é

preenchido por osso temporal e existe uma área hipodensa dentro da lesão, o que representa um disco interarticular remanescente. Na avaliação das imagens tomográficas é crucial o conhecimento da anatomia seccional da região articular, com o intuito que se identifique as alterações estruturais da ATM (SILVEIRA et al., 2014).



**Figura 8:** Tomografia computadorizada da seção coronal demonstrando anquilose do ATM esquerdo (indicado por setas). (Adaptado de SILVEIRA et al., 2014).

A imagem por ressonância magnética produz uma imagem tomográfica detalhada direta dos tecidos moles, incluindo o disco articular e sua relação com o côndilo, fossa articular e cápsula articular (Figura 9). Normalmente, a ATM é verificada quando o paciente se encontra com a boca fechada, permitindo detectar o deslocamento anterior do disco. Quando a boca se encontra aberta é possível classificar a articulação anormal em três categorias: deslocamento anterior com

redução do disco, deslocamento anterior sem redução do disco e deslocamento anterior sem redução, associado à artrose (MAHL & SILVEIRA, 2002).

Os exames de imagem, juntamente com sinais clínicos e sintomas apresentados pelo paciente, contribuem para o diagnóstico e direcionam o tratamento da AATM (VASCONCELOS, PORTO & BESS-NOGUEIRA, 2008).



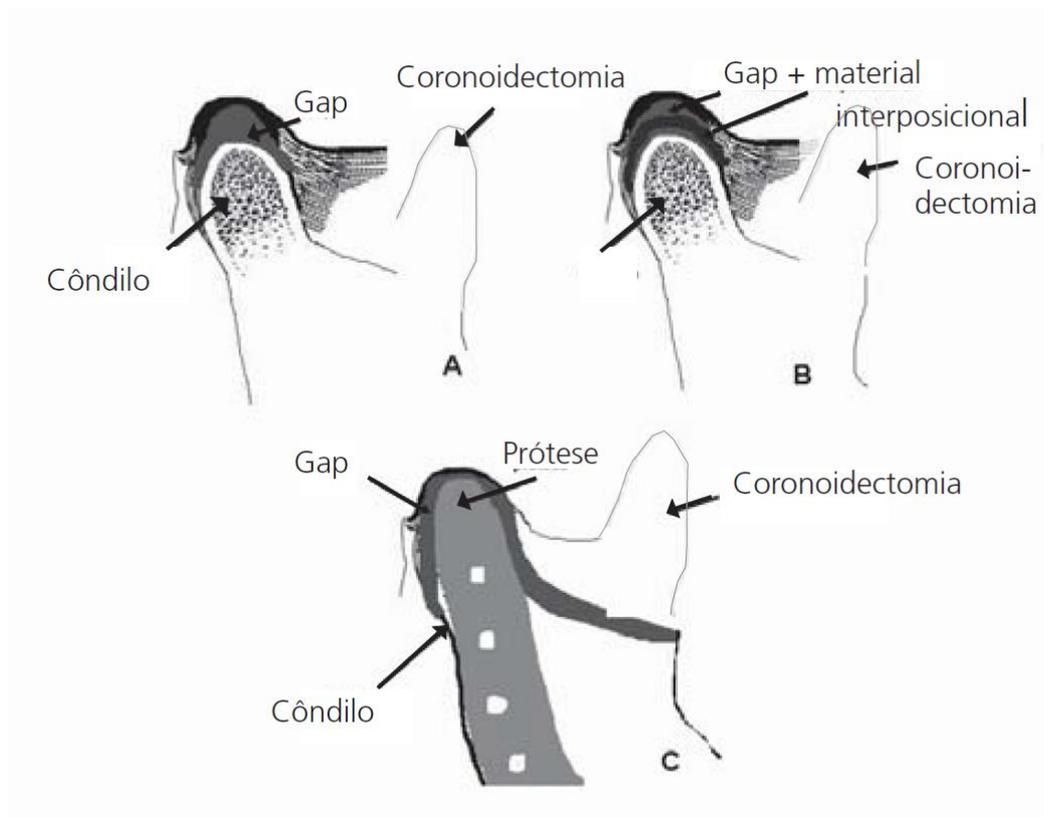
**Figura 9:** Imagem de RM da AT, ponderada em T1, corte sagital de paciente com a boca fechada (lado direito). A seta indica a posição em forma de gaveta borboleta. (a) porção anterior da ATM; (p) porção posterior da ATM. (Adaptado de RAMOS et al., 2004).

### 1.2.3 Tratamento da AATM

O tratamento da AATM visa restabelecer a função articular, melhorando a aparência estética e a qualidade de vida do paciente, evitando a reincidência da anquilose (GUNASEELAN, 1997; KUMAR et al., 2014). Os objetivos principais do

tratamento cirúrgico são a remoção meticulosa e radical da estrutura óssea anquilosada, além de reconstrução e restauração da função fisiológica da mandíbula. Normalmente requer uma adequada excisão das estruturas envolvidas, com ou sem reconstrução imediata com a interposição de estrutura autógena ou material aloplástico (CHIDZONGA, 1999; SU-GWAN, 2001). Entretanto, a exposição adequada da região da ATM, assim como ressecção do osso anquilosado é muitas vezes um processo difícil. A proximidade do nervo facial e os vasos da carótida, jugular e maxilar podem frequentemente resultar em paralisia do nervo facial e hemorragias durante a cirurgia (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990).

Diversas técnicas já foram descritas para o tratamento da AATM (Figura 10). Considerando o tratamento cirúrgico, três modalidades diferentes podem ser empregadas: artroplastia simples, artroplastia de intervalo interposicional e reconstrução articular com materiais aloplásticos ou autógenos (ERDEM & ALKAN et al., 2001; DIMITROULIS, 2004; KHADKA & HU, 2012; LIU et al., 2015).



**Figura 10:** Técnicas para o tratamento cirúrgico da AATM. (A) artroplastia simples; (B) artroplastia interposicional; (C) reconstrução articular com prótese (Adaptado de PORTO e VASCONCELOS, 2007).

A artroplastia simples envolve a ressecção do bloco anquilótico obtendo espaço entre a fossa mandibular e o ramo mandibular (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990). Apesar da vantagem em ser uma técnica simples, com curto tempo de cirurgia, comparado as demais técnicas, esta cirurgia tem sido associada a diversas complicações, dentre elas a formação de uma pseudo-articulação, com encurtamento do ramo mandibular. Em casos de anquilose bilateral e abertura limitada de boca também é possível verificar complicações como o desenvolvimento de mordida aberta. Assim, este tipo de cirurgia geralmente é indicado para anquiloses fibrosas, unilaterais e com comprometimento intra-articular de pouca proporção (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990; MANGANELLO-SOUZA &

MARIANI, 2003). Além disso, a técnica de artroplastia simples apresenta uma taxa de recorrência elevada (MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003; AL-MORAISSI et al., 2015). A artroplastia de bloco anquilótico com ressecção óssea simples foi primeiramente defendida pela Abbe, em 1880 (PARKER, 1948).

Considerando a artroplastia interposicional, após a ressecção do bloco anquilótico, um material interposicional (autógeno ou aloplástico) é inserido para evitar recidiva da doença (ERDEM & ALKAN, 2001; MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003). Diferentes enxertos de interposicionamento foram introduzidos na prática cirúrgica, incluindo material autólogo (retalho miofacial temporal, cartilagem auricular, derme e pele de espessura total), materiais aloplásticos (silicone, folha de ouro) e xenoenxertos (POGREL & KABAN, 1990; ERDEM & ALKAN, 2001; LEI, 2002; MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003; LIU et al., 2015). Ainda não existe um material de interposição ideal, já que morbidades ocorrem no sítio doador, verifica-se reação após utilização de material aloplástico, além de reabsorção imprevisível após utilização de materiais autógenos (MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003; SAEED & KENT, 2003). Dessa forma, a artroplastia interposicional geralmente é aplicada no tratamento de anquiloses fibrosas, unilaterais com envolvimento intra-articular (PORTO e VASCONCELOS, 2007).

Na tentativa de se obter resultados funcionais melhores, após a ressecção do bloco anquilótico, a estrutura comprometida é restaurada para se restabelecer a altura vertical e a estrutura condilar. Indica-se este procedimento nos casos de anquilose bilateral óssea com envolvimento intra ou extraarticulares. Na reconstrução articular pode-se utilizar próteses articulares (material aloplásticos) ou enxertos autógenos, como o processo coronóide, os costocondrais e a crista ílíaca (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990; ERDEM & ALKAN, 2001). Atualmente, o

costocondral é o enxerto autógeno mais adequado e mais utilizado em crianças, por ser funcionalmente adaptável e biologicamente compatível. Contudo, é possível verificar a presença de reanquiloze, crescimento variável do enxerto, morbidade do sítio doador e até mesmo fraturas (SAEED et al., 2002; PORTO e VASCONCELOS, 2007). Considerando pacientes adultos com anquiloze de maior amplitude, é possível utilizar o enxerto do processo coronóide, que viabiliza a reconstrução do côndilo, levando em consideração a abordagem pré-auricular (processo coronóide *in loco*), não causando danos a sítios doadores (PORTO e VASCONCELOS, 2007). A reconstrução articular com técnicas autólogas ou aloplásticas é também um tratamento alternativo para a anquiloze da ATM, especialmente na doença terminal (VOINER et al., 2011). No entanto, devido a limitações técnicas, custos mais elevados e complicações imprevisíveis, a reconstrução articular não é considerada como um tratamento de rotina em alguns países (MERCURI & ANSPACH, 2003).

Recentemente, uma meta-análise em que foram incluídos 17 estudos (BHATT et al., 2014; DANDA & CHINNASWAMI, 2009; ELGAZZAR et al., 2010; GUVEN, 2008; HOLMLUND, LUND & WEINER, 2013; MANSOOR et al., 2013; SHAIKH et al., 2013; TANRIKULU et al., 2005; YAVARY, 2006; ZHI et al., 2009; BALAJI, 2003; DIMITROULIS, 2004; MANGANELLO-SOUZA & MARIANI, 2003; QUDAH & QUDEIMAT, 2005; SAHOO et al., 2012; MABONGO, 2013; VASCONCELOS et al., 2009), envolvendo 740 participantes com anquiloze da ATM tratados com abordagens cirúrgicas (artroplastia de abertura, artroplastia de intervalo interposicional e reconstrução articular), concluiu que a artroplastia interposicional de gap é o tratamento mais frequente da anquiloze da ATM com menor taxa de recidiva, seguida da reconstrução articular e artroplastia de gap (LIU et al., 2015).

Frequentemente a ressecção agressiva do segmento anquilótico ósseo ou

fibrótico é crucial para prevenir a recorrência da AATM. A coronoidectomia ipsilateral, assim como a dissecação dos músculos do ramo mandibular são indicadas com o intuito de se evitar a limitação da abertura bucal no transoperatório, já que em casos de anquilose antiga o processo coronóide pode estar alongado. A coronoidectomia contralateral deve ser empregada quando não for possível alcançar uma abertura de boca passiva de 35mm (GUVEN, 2004).

O tratamento cirúrgico continua sendo um desafio nos dias atuais, já que os resultados são variáveis, não totalmente satisfatórios, além da alta taxa de recorrência que é ainda o maior problema ao se tratar uma anquilose. Dentre os fatores de risco associados a recorrência da doença, destacam-se a idade do paciente, o tipo de anquilose, a técnica cirúrgica, o acompanhamento sistemático após a cirurgia e a fisioterapia pós-operatória (LONG et al., 2005). A escolha adequada do material para interposição já tem sido mostrada como fator crucial para impedir a recorrência do quadro de anquilose (CHOSSEGROS, GUYOT & CHEYNET, 1999; MATSUURA et al., 2001). Além disso, as complicações mais frequentemente relatadas após o tratamento cirúrgico da anquilose são a abertura limitada da boca, recidiva do quadro e distúrbios oclusais (SU-GWAN, 2001). De acordo com MATSUURA et al. (2001), a reanquilose pode variar entre 14% a 100%, após tratamento cirúrgico por artroplastia simples.

Poucos estudos tentaram entender a base biológica para o desenvolvimento da anquilose, como forma de auxiliar na disseminação de um futuro tratamento mais eficaz (GU et al., 2008; PILMANE & SKAGERS, 2011).

### **1.3 Mecanismos moleculares envolvidos na AATM**

Algumas teorias já foram propostas com o intuito de explicar os mecanismos moleculares envolvidos na formação de massa óssea anquilosada (NORMAN, 1978; SAWHNEY, 1986; PORTO et al., 2011; LIU et al. 2012; YAN et al. 2012), contudo os mecanismos fisiopatológicos subjacentes permanecem pouco claros (HE et al., 2015).

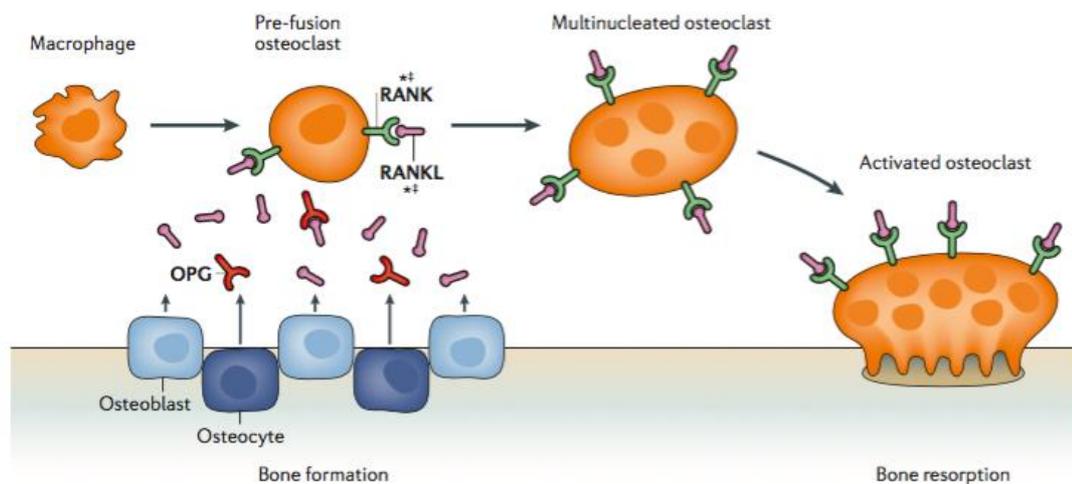
A formação e reabsorção óssea são processos essenciais durante a cicatrização do osso, pois mantêm o equilíbrio da remodelação óssea acoplando osteoblastos com osteoclastos. A radiologia e a histologia da massa óssea anquilosada demonstram que a AATM apresenta semelhanças com os processos de cicatrização de fraturas ósseas (YAN et al., 2013). Estudos já mostraram que as células-tronco mesenquimais na zona radiolúcida apresentam potencial osteogênico diminuído e que os genes relacionados à formação óssea encontram-se regulados negativamente no calo anquilosado da ATM (XIAO et al., 2013; YAN et al. 2014).

Avanços em biologia óssea demonstraram que a reabsorção óssea é regulada pela interação de um sistema de citocinas pertencentes à superfamília do receptor fator de necrose tumoral e ligante, que compõem o sistema de osteoclastogênese (Figura 11) – o fator ativador do receptor nuclear kappa-B (RANK) / ligante RANK (RANKL) / osteoprotegerina (OPG) (CHEN et al., 2014).

O RANKL, também conhecido como TNFSF11, é o décimo primeiro membro da família de OPG ligantes, expresso por osteoblastos, células do estroma, fibroblastos, células B e células T, quando estimulados por citocinas e lipopolissacarídeos bacterianos (DUTZAN et al., 2009). A ação do RANKL é conduzida pela ligação ao receptor RANK, que estão presentes na superfície dos

pré-osteoclastos/osteoblastos, e resulta no aumento da atividade dos osteoclastos maduros (KADKHODAZADEH et al., 2012).

Por outro lado, a OPG, também conhecida como fator inibidor da osteoclastogênese ou TNFRSF11B, é um receptor circulante solúvel, semelhante ao RANKL, que antagoniza a interação RANK-RANKL e, portanto, promove a formação de osso, inibindo a osteoclastogênese. Células do estroma da medula óssea, osteoblastos, células dendríticas, e células do músculo liso expressam OPG (BARTOLD, CANTLEY & HAYNES, 2000; WUYTS et al., 2001).



**Figura 7:** Descrições simplificadas de membros da via de sinalização RANK-RANKL-OPG identificadas em estudos de associação do genoma para a densidade mineral óssea. RANK é codificado pela superfamília do receptor do fator de necrose tumoral, membro 11a (TNFRSF11A), o seu ligando RANKL é codificado por TNFSF11 e o receptor de âncora OPG é codificado por TNFRSF11B. Para gerar osteoclastos ativados, RANKL é secretado por osteoblastos e osteócitos no osso, e estes se ligam ao seu receptor natural, RANK, na superfície de osteoclastos. Para equilibrar este sistema de ativação, os osteoblastos e osteócitos também secretam OPG, que é um ligante natural para RANKL e impede a ligação de RANKL a RANK (Adaptado de RICHARDS, ZHENG & SPECTOR, 2012).

Os osteoblastos e osteoclastos são responsáveis por manter o equilíbrio na remodelação óssea. Assim, possivelmente, a osteoclastogênese aberrante e osteogênese podem estar envolvidos na ocorrência de massa óssea anquilosada na ATM. Recentemente, HE e colaboradores (2015) caracterizaram a osteogênese de células-tronco da medula óssea e a osteoclastogênese de mielomonócitos em amostras de pacientes com AATM e compararam com controles. Os resultados mostraram que, comparadas com as células controle de medula óssea, as células dos pacientes com AATM tinham capacidades proliferativas e osteogênicas mais baixas. O número de osteoclastos no grupo de massa óssea anquilosada diminuiu drasticamente, e o potencial osteoclastogênico mielomonócito foi prejudicado. A razão RANKL / OPG do grupo de massa óssea anquilosada foi inferior à do grupo de controle, sugerindo que a deficiência de osteoclastos pode ser um fator importante que afeta a AATM (HE et al., 2015).

Finalmente, RANKL e OPG regulam a reabsorção óssea por estimulação positiva ou negativa de RANK em células precursoras de osteoclastos (HUGHES et al., 2000). A associação positiva de marcadores genéticos para RANK e OPG tem sido observada em doenças ósseas destrutivas, tais como a doença de Paget (WUYTS et al., 2001), osteólise expansível familiar e osteoporose humana (HUGHES et al., 2000). Níveis elevados de RANKL e uma redução dos níveis de OPG são característicos de perda óssea do rebordo alveolar (CROTTI et al., 2003). Até o momento, identificamos na literatura apenas um estudo que considerou o sistema de osteoclastogênese como mantenedor do estado de anquilose (HE et al., 2015).

## 2 JUSTIFICATIVA

---

A AATM em crianças é uma doença pouco estudada em sua etiologia, sendo ainda sua base biológica obscura e comprometedora na prática clínica. No entanto, sabe-se que há uma desregulação do processo de homeostase óssea e manutenção da arquitetura anatômica normal da ATM, culminando na formação de um bloco ósseo contínuo entre a fossa temporal e o côndilo mandibular, dificultando ou, muitas vezes, impedindo, as atividades funcionais relacionais à cavidade oral, tais como fonação, deglutição, mastigação e socialização. O tratamento cirúrgico da AATM apresenta resultados imprevisíveis, as complicações mais frequentemente, após o tratamento, são a abertura limitada da boca e recidiva do quadro (reanquiloze), podendo chegar a 100%.

Os osteoblastos e osteoclastos são responsáveis por manter o equilíbrio na remodelação óssea e, possivelmente, a osteoclastogênese aberrante e osteogênese podem estar envolvidos na ocorrência da massa óssea anquilosada na ATM. A reabsorção óssea é regulada pelo RANKL e OPG em células precursoras de osteoclastos. A associação positiva de marcadores genéticos para RANKL e OPG tem sido observada em doenças ósseas destrutivas, podendo também estar relacionada com a AATM em crianças. Recentemente, foi observado que a osteogênese de células-tronco da medula óssea e a osteoclastogênese de mielomonócitos de pacientes com AATM apresentavam capacidades proliferativas e osteogênicas mais baixas que o grupo controle, sugerindo que a deficiência de osteoclastos pode ser um fator importante que afeta a AATM. Assim, justifica-se o estudo da expressão dos genes *RANKL* e *OPG* com a degeneração articular da ATM em crianças.

### 3 OBJETIVOS

---

#### 3.1 Objetivo Principal

Avaliar as características demográficas e clínicas, e o perfil de expressão dos genes *OPG* e *RANKL* em amostras de crianças com AATM e verificar se existe associação com a degeneração articular da ATM.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Descrever as características demográficas e clínicas das crianças com AATM;
- Quantificar a expressão do RNA mensageiro, dos genes *OPG* e *RANKL*, em osteoblastos de amostras de anquilose coletadas de pacientes com AATM;
- Determinar a expressão do RNA mensageiro dos genes de interesse em osteoblastos de amostras de tecido ósseo mandibular adjacente ao bloco anquilótico, coletadas de pacientes com AATM;
- Quantificar a expressão do RNA mensageiro, dos genes *OPG* e *RANKL*, em osteoblastos de amostras de osso mandibular e/ou alveolar, coletadas de voluntários com diagnóstico negativo de AATM;
- Avaliar se existe associação da expressão dos genes *OPG* e *RANKL* com a degeneração articular da ATM.

## 4 METODOLOGIA

---

### 4.1 População do Estudo

O protocolo clínico e laboratorial deste trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), sob o número 401.481, em 20 de setembro de 2013 (Anexo A). Todos os pacientes incluídos, ou seu representante legal, concordaram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e/ou termo de assentimento informado (Anexo B e C).

Foram incluídos no grupo de casos (n = 11) todos os pacientes atendidos no setor de Cirurgia Cranio-Maxilofacial do INTO, para tratamento da AATM, durante o período de novembro de 2013 até março de 2015. Os participantes de pesquisa foram atendidos e operados pelo mesmo cirurgião no INTO. O INTO é um órgão de referência, consultivo e normativo do Ministério da Saúde, com ação direta na formulação de políticas públicas, no âmbito da Ortopedia e Traumatologia. No tratamento da AATM o INTO também é referência e recebe pacientes do Rio de Janeiro e de outros estados.

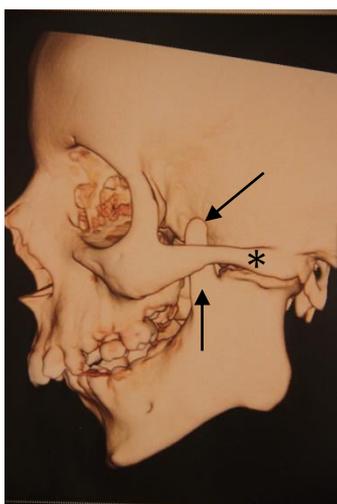
O grupo controle (n = 5) foi constituído de indivíduos adultos, sem alteração patológica na ATM, que necessitaram de cirurgia para tratamento de trauma mandibular, extração dentária ou colocação de implante para extração do osso alveolar.

Os participantes de pesquisa foram submetidos à avaliação clínica odontológica, sendo preenchida uma ficha de anamnese com histórico da saúde do

paciente e familiar, identificação de traumas pregressos ou infecções anteriores à manifestação da anquilose idiopática (Anexo D).

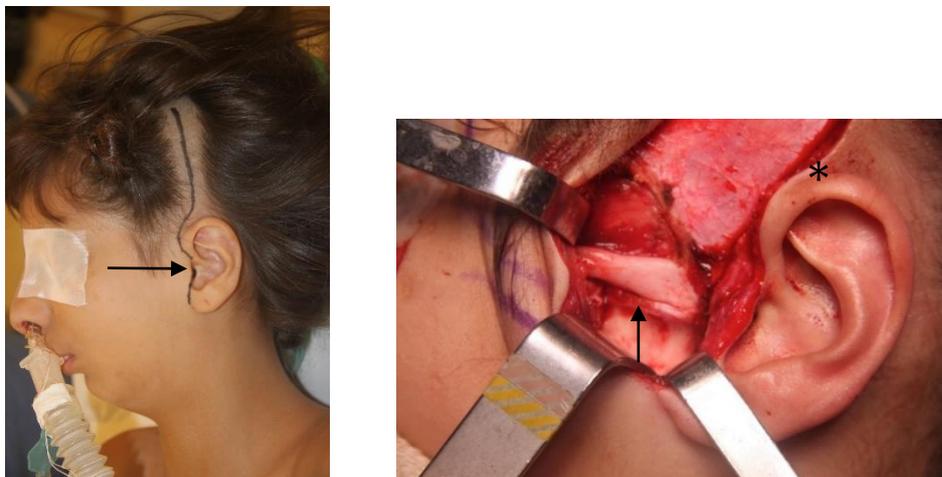
#### 4.2 Protocolo cirúrgico para coleta do material biológico

Considerando a conduta cirúrgica, a hipertrofia do processo coronóide e a fusão óssea verdadeira pode ser visualizada com dados tomográficos que evidenciam a AATM unilateral esquerda e deficiência mandibular (Figura 12). Após anestesia geral com auxílio de nasofibroscópio, o acesso à ATM foi realizado por meio de incisão pré-auricular com extensão temporal (Figura 13). A incisão inicial foi feita através da pele e tecido subcutâneo até a profundidade da fáscia temporal. A Figura 14 ilustra a técnica cirúrgica de artroplastia interposicional (AI) com utilização de retalho de músculo temporal como material interposicional, seguida de coronoidectomia ipsilateral (Figura 15).

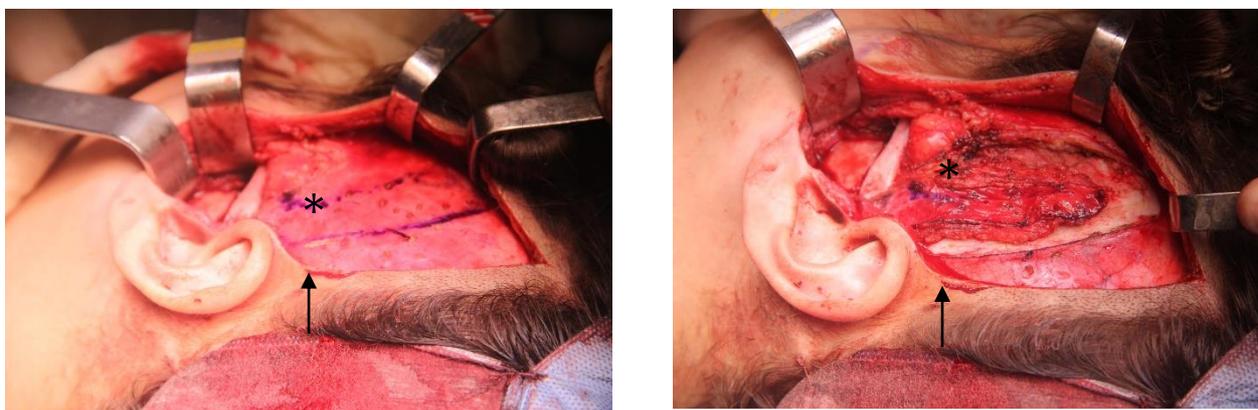


**Figura 12:** Tomografia computadorizada com reconstrução 3D. Visão lateral esquerda, evidenciando a hipertrofia do processo coronóide e a fusão óssea verdadeira. As setas (→)

indicam o processo coronóide e o asterisco (\*) a fusão óssea verdadeira ou bloco anquilótico (Arquivo pessoal).



**Figura 13:** Acesso a ATM esquerda por incisão pré-auricular com extensão temporal. (a) Marcação da linha de incisão. (b) Face do músculo temporal. As setas (→) indicam o bloco anquilótico. O asterisco (\*) indica o músculo temporal (Arquivo pessoal).



**Figura 14:** Artroplastia interposicional com utilização de retalho de músculo temporal como material interposicional. Acesso pré-auricular estendido para região temporal facilitando a dissecação da porção do músculo a ser interposto na artroplastia. As setas (→) indicam a marcação e dissecação do retalho do músculo temporal. Os asteriscos (\*) indicam o bloco anquilótico (Arquivo pessoal).



**Figura 15:** Coronoidectomia ipsilateral. Fragmento ósseo resseccionado. Coronóide hipertrofiado com 3 cm (coronóide normal cerca de 1 cm) (Arquivo pessoal).

Para exemplificar o resultado de um tratamento cirúrgico de AATM, utilizamos os dados da paciente L.S.A.S, do gênero feminino, que aos 9 anos foi encaminhada para setor de Cirurgia Cranio-Maxilofacial do INTO para avaliação de anquilose temporomandibular, com queixa de dor durante a mastigação e limitação de abertura bucal. A condição gerou transtornos emocionais devido ao “bullying” sofrido no ambiente escolar. A história médica pregressa mostrou episódio de otite média aos dois anos de idade com internação hospitalar de 18 dias. O quadro evoluiu com AATM unilateral esquerda. O parto da paciente ocorreu por cesárea sem intercorrências. Não houve relato de trauma na região da articulação temporomandibular. Durante a avaliação clínica, observou-se completa impossibilidade de abertura bucal (0mm) e micrognatia. Após o procedimento cirúrgico, obteve-se uma abertura de boca de 45mm (Figura 16). O acompanhamento multidisciplinar baseou-se em sessões de fonoterapia especializadas em motricidade oral realizado por dois anos com redução da frequência ao longo do tratamento. Inicialmente foi realizada três vezes por semana, e após três meses houve aumento de intervalo entre as sessões, entretanto com

continuidade da terapia domiciliar supervisionada. A paciente iniciou também tratamento odontológico e ortodôntico. Após dois anos do procedimento cirúrgico, apresentou abertura bucal de 38 mm e aguarda maturidade óssea para realização de cirurgia ortognática (Figura 17).



**Figura 16:** Exemplo de resultado do tratamento cirúrgico da AATM. (a) Zero de abertura de boca no pré-operatório. (b) 45mm de abertura interincisal no final da cirurgia com alongamento forçado. (c) Manutenção de boa abertura após o 3º mês do pós-operatório (Arquivo pessoal).



**Figura 17:** Paciente L.S.A.A. após tratamento cirúrgico da AATM. Manutenção de boa abertura de boca (38 mm) após 2 anos do pós-operatório (Arquivo pessoal).

### **4.3 Processamento das amostras biológicas**

No grupo dos casos de AATM, os descartes cirúrgicos do bloco anquilosado foram coletados durante a cirurgia para tratamento da anquilose (grupo anquilose). No mesmo ato cirúrgico, amostras de osso (descartes cirúrgicos) adjacentes ao bloco anquilosado correspondentes à parte do processo coronóide mandibular foram coletadas nos mesmos pacientes para compor o grupo osso adjacente.

No grupo controle, os descartes cirúrgicos correspondentes ao osso mandibular ou alveolar, removidos durante a cirurgia para tratamento de trauma mandibular, extração dentária ou colocação de implante foram incluídos na pesquisa.

As amostras de tecido coletadas foram enviadas ao Laboratório de Pesquisa do INTO para imediato processamento.

Após a coleta, as amostras de osso foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS) e cortadas em pequenos pedaços, com aproximadamente 2mm de diâmetro. Em seguida, os explantes de osso foram transferidos para um elermeyer e tratados com colagenase 1A (1,0mg/mL), por 2h a 37°C sob agitação. Os fragmentos de osso foram tratados com tripsina 0,5% na temperatura de 37°C por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos. A atividade de ambas as enzimas foi inibida por meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Os explantes foram lavados novamente em PBS 1x e transferidos para garrafas plásticas de cultivo, de 25cm<sup>2</sup> (Corning; New Jersey, EUA). A cada garrafa contendo um único fragmento ósseo foi adicionado um pequeno volume de meio DMEM suplementado com SFB 10x para expansão dos osteoblastos. O meio foi adicionado de modo a banhar somente a base do explante evitando sua flutuação, o que

impediria a migração das células do osso para a garrafa. Com a migração das células e formação de monocamadas confluentes, os explantes foram retirados e passados para novas garrafas, reiniciando o processo de obtenção das culturas primárias como descrito anteriormente. As células em confluência (sem o explante) foram repicadas através de tratamento com tripsina/EDTA (Gibco) por 10 min. Após este tempo as células eram centrifugadas a 360 g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi resuspenso em meio de cultivo DMEM (osteoblastos) e alfa-MEM (fibroblastos) suplementado com 10% de SFB sem antibióticos. Essa suspensão foi transferida para garrafas plásticas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> (Corning), mantidas em uma estufa a 37°C, sob atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO<sub>2</sub>. Garrafas contendo culturas semiconfluentes (na fase exponencial de crescimento), foram lavadas com uma solução salina balanceada livre de íons cálcio e magnésio (BSS-CMF) e em seguida, passaram pela ação da tripsina por 5 min. Após esse tempo, as células já no sobrenadante foram coletadas, e a ação proteolítica da tripsina foi bloqueada pela adição de soro fetal à solução. Após essa etapa, o material foi centrifugado e o pellet resuspenso em uma solução apropriada para o congelamento, que consiste em: SFB 95% e 5% de crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO). As células já contendo o crioprotetor foram distribuídas em tubos para a criopreservação, que seguiram para o aparelho de congelamento (Cryo Genetic Technology, INC. P.O. Box 430). Ao final do processo, as células foram estocadas em reservatórios contendo nitrogênio líquido (-196°C).

#### **4.4 Extração RNA e análise da expressão gênica**

O RNA total foi isolado de osteoblastos utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen™ por Life Technologies, Nova Iorque, NY, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Tratamento com DNase, para digerir o DNA genômico que poderia levar a falsos resultados positivos, foi realizado usando DNA-free DNase® (Ambion por Invitrogen™). A integridade do RNA foi confirmada e corrida em eletroforese, gel de agarose a 1,2%, corada com SYBR Stain® (Invitrogen™). A pureza do RNA foi confirmada com a razão das absorvâncias 260/280 em espectrofotômetro, e a quantidade de RNA foi estimada a 260 nm (Nanodrop® 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA).

A reação de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi realizada para a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 300 ng de RNA, utilizando o sistema ImProm-II Transcrição Reversa System™ (Promega Corporation, Fitchburg, WI, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

A reação em cadeia da polimerase quantitativo (qPCR) foram realizadas no aparelho LineGene 9660 (Bioer Technology, Binjiang, China), utilizando o sistema de detecção rápida SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com 1,5 ul de cDNA em cada reação. O qPCR foi realizado nas seguintes condições: 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação e polimerização (95° C durante 15 segundos, 60° C durante 1 minuto e 72° C por 30 segundos), acrescidos da curva de Melting para análise do padrão de fluorescência do SYBR nas reações (95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 95°C por 15 segundos).

Os iniciadores específicos para os genes *OPG* e *RANKL* (Tabela 1) foram confeccionados com base nos dados do BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>). Os valores foram normalizados em relação à expressão constitutiva de *β-actina*. O método Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi utilizado para determinar a quantificação relativa da expressão de *RANKL/OPG*.

Duas séries de experimentos foram realizados para cada amostra de tecido para assegurar a reprodutibilidade e todas as reações foram realizadas em duplicata.

**Tabela 1:** Sequência dos iniciadores utilizados para análise de expressão por qPCR para os genes *OPG*, *RANKL* e o controle *β-actina*.

Gene	Primer Senso	Primer Reverso
<i>OPG</i>	5'-AGGAGCTGCAGTACGTCAAG-3'	5'-TCTGGGGTTCCAGCTTGC-3'
<i>RANKL</i>	5'-GCAGAGAAAGCGATGGTGG-3'	5'-GGAACCAGATGGGATGTCGG-3'
<i>β-actina</i>	5'-AATTACGAGCTGCGTGTGG-3'	5'-AGAGCGCAGGTAGGATAGCA-3'

#### 4.5 Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a distribuição entre as variáveis. A análise de variância foi realizada utilizando (ANOVA)/t-Test ou Mann-Whitney para comparação das médias entre os grupos, quando a variável estava em uma distribuição normal ou não-normal, incluindo a análise de expressão gênica após o cálculo pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prisma 7 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EUA) e Excel.

## 5 RESULTADOS

---

### 5.1 Dados demográficos e clínicos

O grupo teste (Tabela 2) foi constituído por onze participantes de pesquisa com diagnóstico de AATM, sendo cinco recrutados em 2013, cinco em 2014 e um no início de 2015. A média de idade dos pacientes com AATM foi de 12 anos (idade mínima, 8 anos e máxima, 15 anos), sendo cinco do gênero feminino (45%) e seis masculino (55%).

**Tabela 2:** Informações demográficas dos pacientes diagnosticados com AATM.

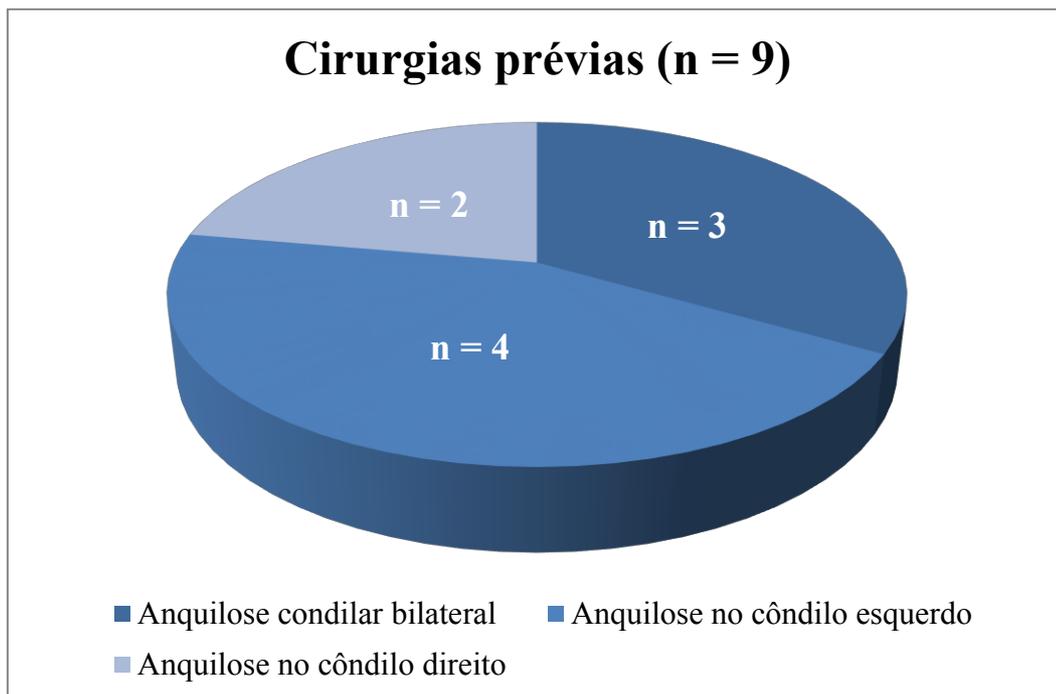
Identificação	Ano recrutamento para pesquisa	Gênero	Nascimento (ano)	Idade (anos)	Estado
ANQ001	2013	F	1998	15	RJ
ANQ002	2013	M	2001	12	RJ
ANQ003	2013	F	2005	8	RJ
ANQ004	2013	F	2001	12	RJ
ANQ005	2013	F	1998	15	RJ
ANQ006	2014	F	2003	11	ES
ANQ007	2014	M	1999	15	RJ
ANQ008	2014	M	2001	13	RJ
ANQ009	2014	M	2003	11	RJ
ANQ010	2014	M	2000	14	ES
ANQ011	2015	M	2005	10	RJ

F: gênero feminino; M: masculino. Estado de residência do paciente: RJ: Rio de Janeiro; ES: Espírito Santo.

Em relação aos dados clínicos do grupo teste, dentre os onze pacientes recrutados para nova cirurgia para tratamento da AATM, nove já haviam realizado uma ou mais cirurgias anteriores para tratamento da ATM (Tabela 3), sendo que três apresentaram anquilose condilar bilateral, quatro anquilose no côndilo esquerdo e dois no côndilo direito (Figura 18). Dois dos nove pacientes já haviam realizado três cirurgias anteriores de AATM.

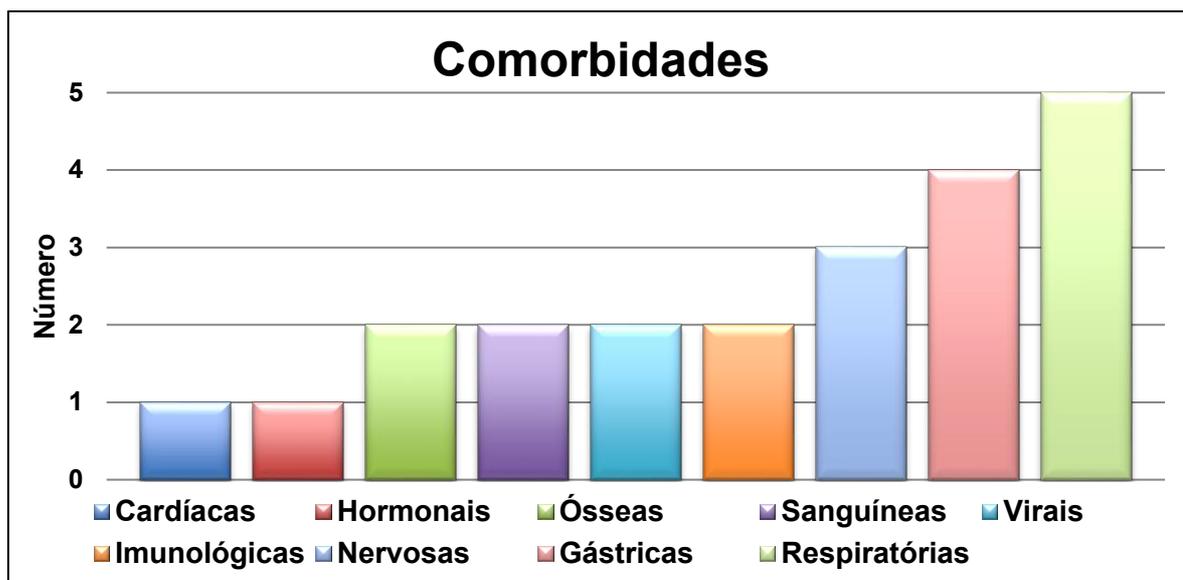
**Tabela 3:** Informações clínicas dos pacientes diagnosticados com AATM.

<b>Identificação</b>	<b>Idade</b>	<b>Cirurgia prévia de AATM</b>	<b>Idade da cirurgia anterior de AATM (anos)</b>
ANQ001	15	sim	sem informação
ANQ002	12	sim	11
ANQ003	8	sim	3 e 7
ANQ004	12	sim	4 e 11
ANQ005	15	sim	4, 12 e 14
ANQ006	11	não	-
ANQ007	15	sim	8, 10 e 14
ANQ008	13	sim	7
ANQ009	11	não	-
ANQ010	14	sim	sem informação
ANQ011	10	sim	9

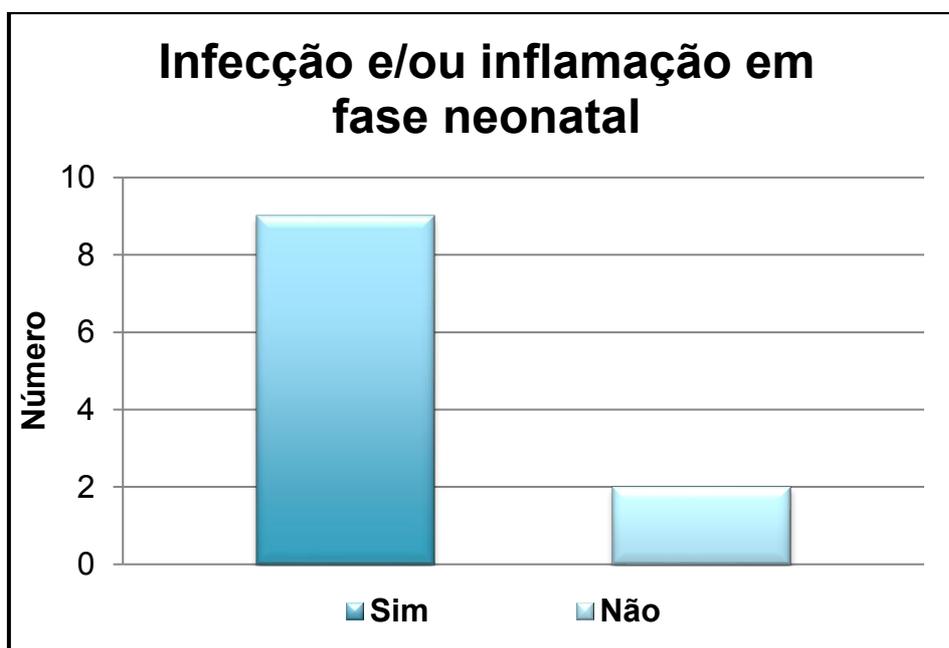


**Figura 18:** Local da anquilose tratada previamente pelos nove dos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.

Além disso, os participantes de pesquisa foram avaliados quanto ao histórico de saúde para identificação de traumas progressos ou infecções anteriores à manifestação da anquilose condilar (Tabela 4), incluindo alterações durante a gestação e o parto (Tabela 5). Dentre eles, três pacientes fizeram uso prévio de medicamentos como anti-inflamatórios, anti-histamínicos ou glicocorticoides; nove apresentaram alguma comorbidade associada (Figura 19) ou alguma infecção e/ou inflamação em fase neonatal (Figura 20). Também durante a fase neonatal, três dos onze pacientes apresentaram algum tipo de traumatismo (Figura 21), sendo que um deles já foi submetido à cirurgia de ATM nesta fase. Ao total, sete intercorrências foram relatadas, tendo ocorrido durante o período de gestação ou no momento do parto (Figura 22), sendo que cinco nasceram prematuros (Figura 23).



**Figura 19:** Características das comorbidades associadas relatadas pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo. Um mesmo paciente relatou mais de uma comorbidade.



**Figura 20:** Presença de infecção e/ou inflamação, em fase neonatal, relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.



**Figura 21:** Presença de traumatismo, em fase neonatal, relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.



**Figura 22:** Presença de intercorrências durante o período de gestação ou no momento do parto relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.



**Figura 23:** Presença de nascimento prematuro relatada pelos onze pacientes com AATM incluídos no estudo.

**Tabela 4:** Informações clínicas dos pacientes diagnosticados com AATM.

Identificação	Medicação	Comorbidades associadas	Infecção e/ou inflamação em fase neonatal	Traumatismo em fase neonatal
ANQ001	-			
ANQ002	-	alergia; anemia; herpes; estomatite; distúrbios psicológicos; alergia medicamentosa;	faringite otite	clavícula e braço -
ANQ003	-	alergia; asma; herpes; estomatite; bronquite	infecção hospitalar	joelho
ANQ004	-	-	pneumonia	-
ANQ005	anti-histamínico; glicocorticoide não-halogenado;	alergia; problema cardíaco;	otite	-
ANQ006	anti-histamínico;	alergia lactose; estomatite	otite	-
ANQ007	anti-inflamatório não esteroide;	-	-	-
ANQ008	-	nódulo cabeça do fêmur; escoliose	celulite nas mãos e incubadora durante 3 meses	-
ANQ009	-	alergia a vacina; bronquite; asma; estomatite; distúrbio psíquico	-	clavícula
ANQ010	-	anemia; estomatite	otite	-
ANQ011	antiepilético; hormônio tireoideano	Epilepsia; Hipotireoidismo	Infecção, osteomielite no fêmur e úmero	-

**Tabela 5:** Informações clínicas sobre a gestação e o parto dos pacientes diagnosticados com AATM.

<b>Identificação</b>	<b>Infecção e/ou inflamação durante a gestação</b>	<b>Complicações na gestação e no parto</b>	<b>Parto</b>
ANQ001	-	perda de líquido amniótico	normal
ANQ002	-	eclampsia; nascimento prematuro (7 meses)	cesariana
ANQ003	-	sangramento; nascimento prematuro (7 meses); infecção no parto	cesariana
ANQ004	-	-	normal
ANQ005	virose	falta de espaço intrauterino; nascimento prematuro	cesariana
ANQ006	internação (infecção urinária)	-	cesariana
ANQ007	-	-	normal
ANQ008	internação (sangramento)	perda de líquido amniótico (compressão placentária); nascimento prematuro	cesariana
ANQ009	-	-	normal
ANQ010	-	-	normal
ANQ011	-	pré-eclampsia; nascimento prematuro (37 semanas); baixo peso	cesariana

O grupo controle foi constituído de indivíduos adultos, sem alteração patológica na ATM, que realizaram cirurgia para tratamento de trauma mandibular (n = 2), colocação de implante (n = 2) e extração de siso incluso (n = 1). Os dados demográficos estão descritos na Tabela 6.

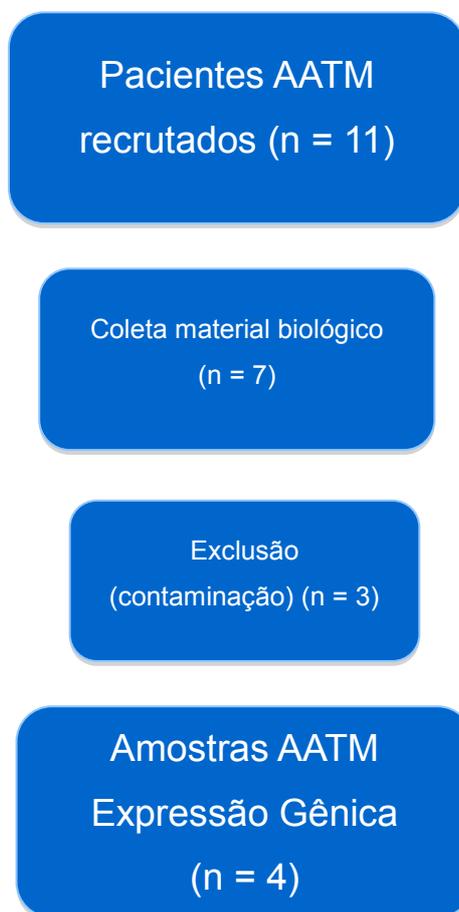
**Tabela 6:** Informações dos indivíduos incluídos no grupo controle.

	<b>Gênero</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Motivo da cirurgia</b>
<b>Controle 1</b>	M	45	Implante dentário
<b>Controle 2</b>	F	30	Extração de siso incluso
<b>Controle 3</b>	F	52	Extração de siso incluso
<b>Controle 4</b>	M	24	Fratura de mandíbula
<b>Controle 5</b>	M	26	Fratura de mandíbula

## **5.2 Expressão gênica**

Conforme ilustrado no fluxograma (Figura 24), para análise de expressão dos genes *OPG* e *RANKL*, foi possível realizar a coleta de material ósseo (descartes cirúrgicos) de sete pacientes com AATM (grupo teste e anquilose), sendo que amostras de três pacientes foram excluídas devido a contaminação na cultura para expansão dos osteoblastos. Assim, quatro pacientes com AATM (ANQ006, ANQ007, ANQ010 e ANQ011) foram incluídos na etapa de análise da expressão gênica (Tabela 7). Além do bloco anquilótico também foi possível coletar, destes quatro pacientes do grupo anquilose, amostras de osso que não faziam parte do foco da anquilose, sendo denominado de osso adjacente. Ao total foram processadas com sucesso quatorze amostras de osso dos quatro pacientes com AATM. No grupo

controle, cinco descartes cirúrgicos da região de osso alveolar (n = 3) e mandibular (n = 2) foram coletados e processados com sucesso.



**Figura 24:** Fluxograma do estudo indicando as amostras incluídas, excluídas e as perdas.

**Tabela 7:** Informações dos indivíduos incluídos na análise de expressão (n = 4).

<b>Variável</b>	<b>ANQ006</b>	<b>ANQ007</b>	<b>ANQ010</b>	<b>ANQ011</b>
Gênero	Feminino	Masculino	Masculino	Masculino
Idade	11	15	14	10
Cirurgia prévia de AATM	Não	Sim	Sim	Sim
Idade da Cirurgia prévia de AATM	-	8, 10 e 14	Sem informação	9
Infecção e/ou inflamação fase neonatal	Otite	-	Otite	Infecção, osteomielite no fêmur e úmero
Complicações na gestação ou parto	-	-	-	Pré-eclampsia; nascimento prematuro

(-) não apresentou cirurgia prévia de AATM, infecção/inflamação ou complicações na fase neonatal, gestação ou parto.

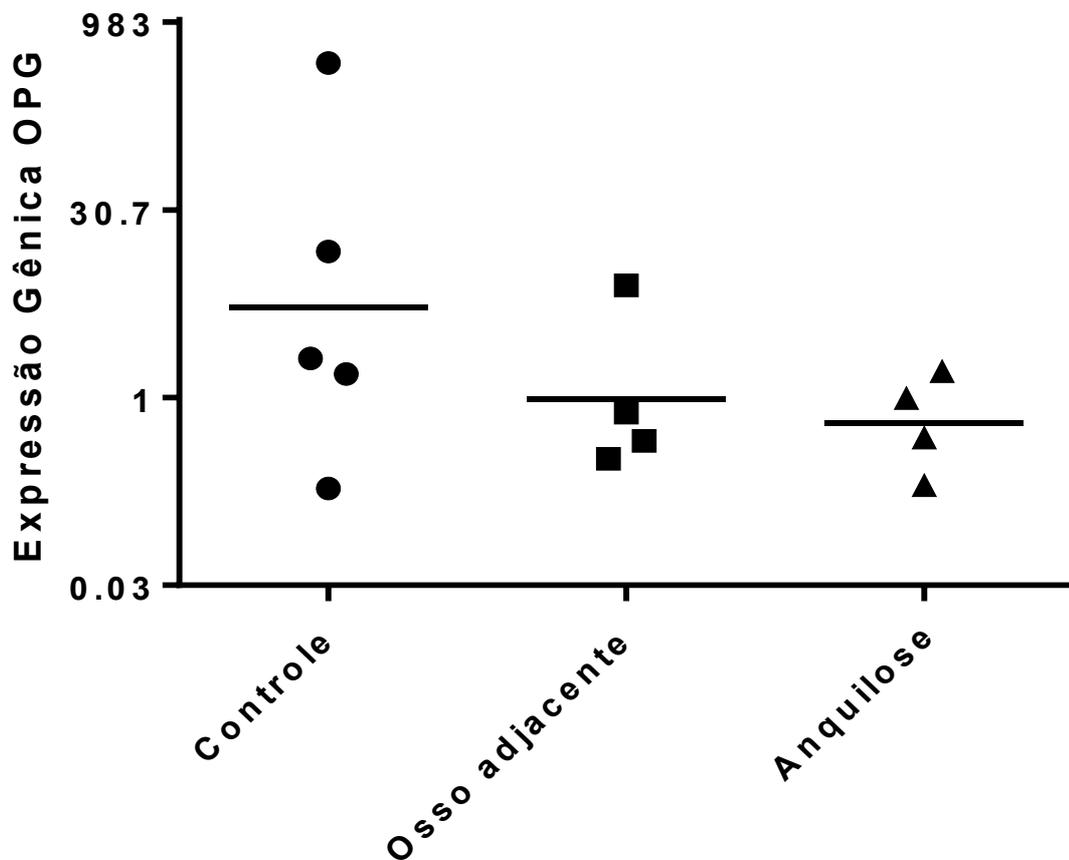
A análise de expressão dos genes *OPG* e *RANKL* pelo teste de Shapiro-Wilk mostrou que não houve distribuição normal nos níveis de *OPG* e *RANKL* nos grupos controle e nos grupos testes (osso e anquilose). Sendo assim, o teste de Mann-Whitney foi utilizado, ao nível de significância de 0.05, para comparar, entre os três grupos (anquilose, osso adjacente e controle), os níveis de RNAm dos genes *OPG* e *RANKL* (Tabela 8).

**Tabela 8:** Média dos valores individuais da expressão gênica, de *OPG* e *RANKL*, considerando todas as amostras nos grupos estudados (método Livak).

Grupo	<i>OPG</i>	<i>RANKL</i>	<i>OPG/RANKL</i>
Controle	95,86	40,67	2,36
Osso Adjacente *	1,82	0,32	5,69
Anquilose	0,79	2,43	0,33

\*Descartes cirúrgicos de pacientes do grupo anquilose (amostras de ossos que não faziam parte do foco da anquilose). Valores da expressão gênica com base no cálculo de  $2^{-\Delta\Delta CT}$

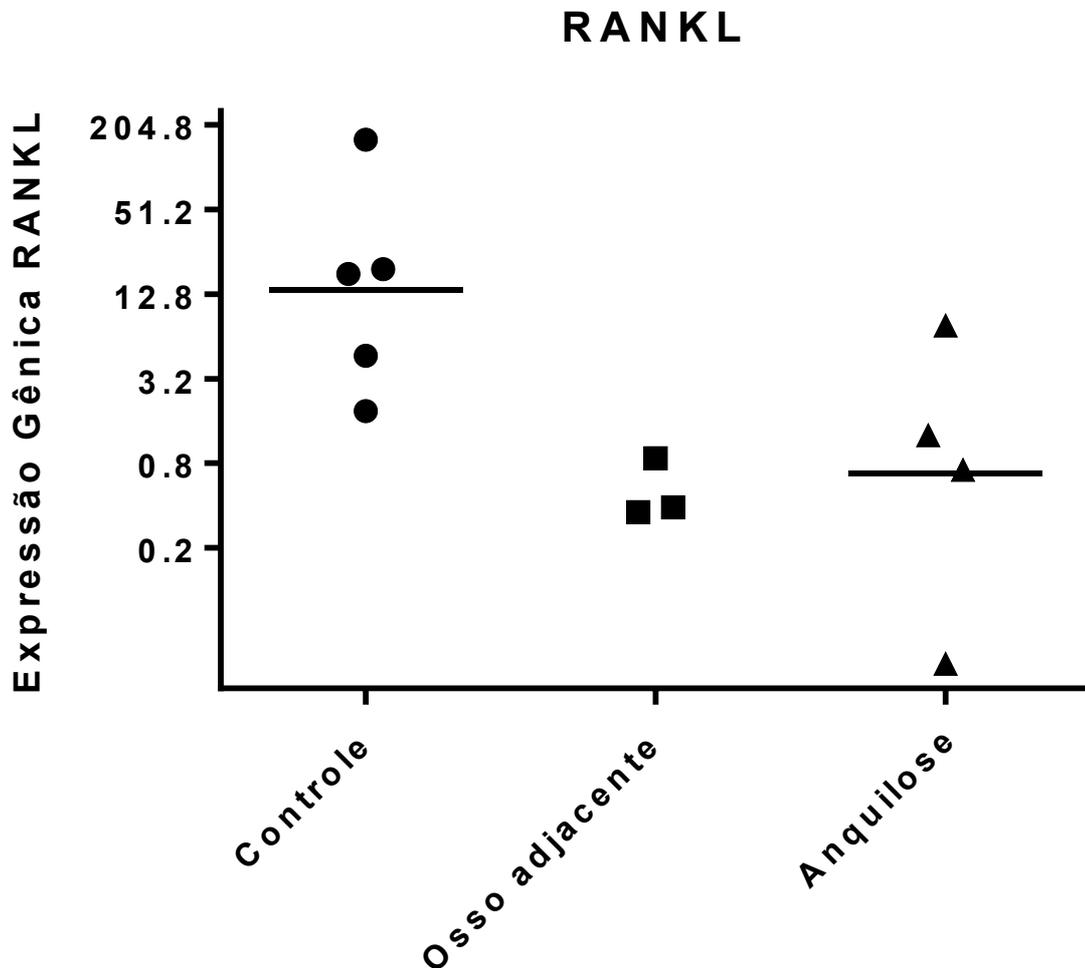
Os resultados referentes a análise de expressão gênica do gene *OPG* estão apresentados na figura 25. Não foi observada diferença significativa na expressão de *OPG* ao comparar as amostras de ossos dos pacientes com AATM fora do foco da anquilose (osso adjacente) com o osso do foco da anquilose ( $P = 0,73$ ). Além disso, também não foi observada diferença significativa na expressão de *OPG* comparando os grupos osso adjacente e controle ( $P = 0,32$ ) e os grupos anquilose e controle ( $P = 0,28$ ).



**Figura 25:** Dados da expressão gênica de *OPG* comparando amostras de osso de pacientes com AATM com amostras controle. Osso adjacente são amostras de descartes cirúrgicos de pacientes do grupo anquilose (amostras de ossos que não faziam parte do foco da anquilose). Grupo anquilose corresponde as amostras de descartes cirúrgicos do foco da anquilose de pacientes do grupo AATM. Não houve diferença significativa na expressão de *OPG* comparando os três grupos (controle, osso adjacente e anquilose). Gráfico em escala log 2. Barra horizontal demonstrando a média da expressão em cada grupo.

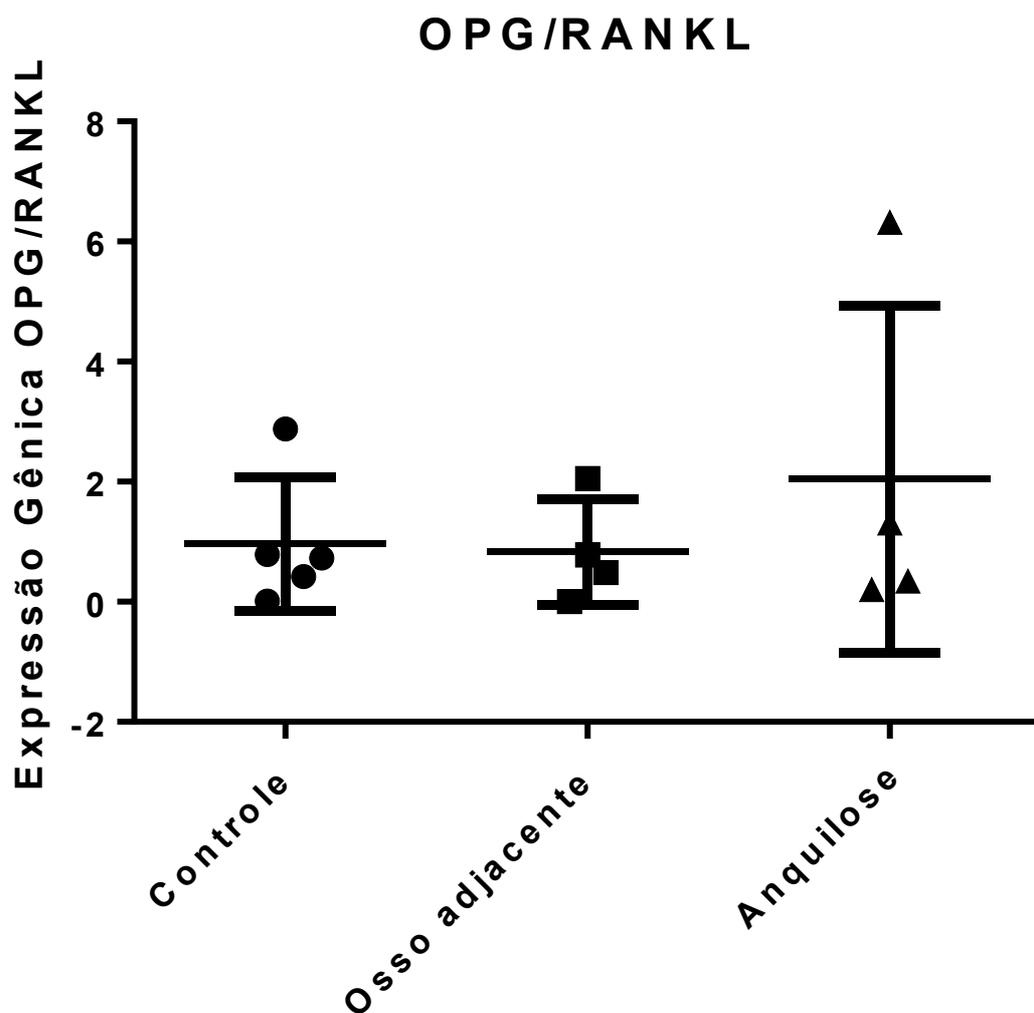
Em relação a expressão gênica do gene *RANKL* (figura 26) foi observada diferença significativa ( $P = 0,01$ ) comparando o grupo do osso adjacente (amostras de ossos dos pacientes com AATM fora do foco da anquilose) e o grupo controle (pacientes com diagnóstico negativo de AATM). Não foi observado diferença significativa na expressão de *RANKL* ao comparar o grupo anquilose com o grupo

adjacente ( $P = 0,34$ ). No entanto, no grupo anquilose foi observada uma menor expressão de *RANKL* comparado ao grupo controle ( $P = 0,06$ ).



**Figura 26:** Dados da expressão gênica de *RANKL* comparando amostras de osso de pacientes com AATM com amostras controles (pacientes com diagnóstico negativo de AATM). O osso adjacente é proveniente de amostras de descartes cirúrgicos de pacientes do grupo anquilose (amostras de ossos que não faziam parte do foco da anquilose). O grupo anquilose corresponde as amostras de descartes cirúrgicos do foco da anquilose de pacientes do grupo AATM. Foi observada diferença significativa comparando o osso adjacente e o grupo controle ( $P = 0,01$ ). Uma amostra do grupo do osso adjacente apresentou valor menor que 0,02, assim não pode ser evidenciado no gráfico acima. O gráfico é apresentado em escala log 2.

Considerando a razão de expressão gênica dos genes *OPG* e *RANKL* (figura 27) não foi observada diferença significativa comparando os três grupos (anquilose, osso adjacente e controle).



**Figura 8:** Dados referente a razão da expressão gênica de OPG e RANKL comparando amostras de osso de pacientes com AATM com amostras controles. As amostras de osso adjacente são de descartes cirúrgicos de pacientes do grupo anquilose (amostras de ossos que não faziam parte do foco da anquilose). O grupo anquilose corresponde as amostras de descartes cirúrgicos do foco da anquilose de pacientes do grupo AATM. Não houve diferença significativa na razão da expressão de OPG/RANKL comparando os três grupos (Controle x Osso adjacente,  $P = 0,82$ ; Controle x Anquilose,  $P = 0,87$ ; Anquilose x Osso adjacente,  $P = 0,81$ ).

Aproximadamente 50% da população apresenta sinais clínicos relacionados aos distúrbios temporomandibulares, como estalidos, crepitação e dor, tornando-se um problema de saúde pública relevante (KÖHLER et al., 2009). A AATM, que promove a incapacidade de abrir a boca, é um problema grave e muitas vezes negligenciado e não diagnosticado em crianças (DAS et al., 2009). Em revisão da literatura, poucos trabalhos relatam dados de incidência da AATM. Gupta e colaboradores, em 2012, diagnosticaram a AATM em apenas 10 de 21.720 crianças avaliadas em uma região na Índia (GUPTA et al., 2012). No Brasil, os dados são semelhantes, visto que neste trabalho foram recrutados apenas 11 pacientes com AATM, durante o período de aproximadamente 17 meses de coleta, em um centro nacional de referência para o tratamento e diagnóstico de doenças do músculo esquelético. O INTO, além de ser um órgão de referência em Ortopedia e Traumatologia do Ministério da Saúde, também se destaca no atendimento aos pacientes com AATM. O setor de Cirurgia Cranio-Maxilofacial do INTO recebe pacientes referenciados do Rio de Janeiro e de outros estados. Dos pacientes incluídos neste estudo, 18% foram encaminhados de outro estado para tratamento da AATM no INTO.

A AATM pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais frequente em crianças com menos de 10 anos (PEREIRA FILHO et al., 2011), sendo uma patologia relevante, já que restringe os movimentos articulares, limitando a mastigação, impactando em problemas estéticos, nutricionais, psicológicos, sociais, além de promover alterações no crescimento facial, deformidades da mandíbula e da maxila, na erupção e posicionamento dentário (FIGUEIREDO et al., 2014). Em

nosso estudo todos os pacientes incluídos eram crianças com idade entre 8 e 15 anos.

A etiologia da AATM inclui trauma, artrites, infecções, cirurgias prévias na ATM, além da possibilidade de ser congênita ou idiopática (LOVELESS et al., 2010). De forma geral, a causa mais comum da AATM é o trauma, seguido de infecções (EROL, TANRIKULU & GORGUN, 2006; LIU et al., 2015). Já em crianças, a infecção, principalmente quadros de otite, é relatada na literatura como a principal causa da AATM (CHIDZONGA, 1999), corroborando com os resultados observados neste estudo, já que 36,4% apresentaram otite em fase neonatal e 18,2% apresentaram infecção prévia. Além disso, neste estudo 4 pacientes já haviam realizado cirurgia prévia de AATM, que também é um fator de mal prognóstico pelo risco aumentado de recidiva. Os nossos resultados estão também de acordo com o estudo de KABAN et al. (2009), os quais relatam otite prévia em paciente infantil diagnosticada com AATM. O autor relata ainda, que em países de terceiro mundo, a infecção permanece como a causa mais comum de AATM em crianças, variando entre infecções odontogênicas, orais, cutâneas locais otológicas e quadros de osteomielite (KABAN et al., 2009).

Os recursos de imagens utilizados no diagnóstico da AATM são variáveis. Pode-se utilizar a radiografia panorâmica evidenciando deformidade articular, perda total de espaço articular e formação óssea anormal ao redor da articulação. Contudo, não revela a natureza e a extensão total da patologia (SALES, OLIVEIRA & CAVALCANTI, 2007). Enquanto a tomografia computadorizada apresenta uma maior riqueza de detalhes, como a redução do espaço articular e a presença de crescimento ósseo anormal, permitindo a realização de diagnóstico diferencial com outras alterações morfológicas e patológicas da ATM (EL-HAKIM e METWALLI,

2002). O diagnóstico definitivo dos 11 casos de AATM incluídos neste estudo baseou-se nos achados clínicos e imagens de tomografia computadorizada, as quais auxiliaram no planejamento do tratamento proposto.

A AATM pode causar problemas fisiológicos e psicológicos, assim, intervenções precoces são necessárias uma vez que a condição é reconhecida (LIU et al., 2015). Apesar dos avanços biotecnológicos nas últimas décadas, a AATM em crianças tem sido desafiadora e muitas vezes frustrante para os mais experientes cirurgiões, tanto por sua dificuldade técnica cirúrgica, como pela alta taxa de complicações e alto índice de recidiva (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990; KABAN et al., 2009). A situação socioeconômica e ou apoio social eficiente, além da colaboração com o trabalho de reabilitação em motricidade oral são fundamentais para o sucesso do tratamento que é sempre longo e trabalhoso. Neste estudo, os pacientes e seus familiares foram atendidos no INTO por uma equipe multidisciplinar, com o intuito de avaliar o perfil sócio econômico, psicológico e nutricional da família e do paciente com AATM. Esta avaliação contribuiu significativamente para se alcançar a aderência ao tratamento de reabilitação da AATM, que envolve exercícios de motricidade oral pelo grupo da fonoaudiologia, mantido por, no mínimo, 9 meses até 1 ano no pós-operatório.

O tratamento cirúrgico da AATM envolve técnicas de artroplastia simples, artroplastia de intervalo interposicional e reconstrução articular com materiais aloplásticos ou autógenos. Todas são empregadas com o intuito de restabelecer a função articular, pela remoção da estrutura óssea anquilosada e prevenção da recidiva, e ainda melhorando a aparência estética e a qualidade de vida do paciente (LIU et al., 2015; KUMAR et al., 2014; BEDI et al., 2017). Neste estudo, o tratamento cirúrgico dos 11 pacientes incluídos foi realizado seguindo o protocolo estabelecido

por KABAN, PERROTT e FISHER (1990), em que o foco da AATM foi abordado com extensa artroplastia do bloco anquilótico, seguido de coronoidectomia ipsilateral e coronoidectomia contra lateral, quando a abertura era ainda insuficiente. Foi considerado insuficiente qualquer abertura bucal abaixo de 30 mm, sendo ideal maior que 40 mm, conforme descrito anteriormente por KABAN, PERROTT e FISHER (1990). Em seguida, foi realizada a interposição do músculo temporal incluindo a porção do ventre muscular fixado por sutura transbucal, visto que acreditamos que este procedimento possa garantir a manutenção músculo temporal no lugar correto (interposto no espaço articular), evitando contato ósseo e dor no pós-operatório. Mesmo assim, foi verificada perda de resultado cirúrgico em um dos onze pacientes, que necessitou ser reoperado, após aproximadamente 3 meses. Além disso, este paciente apresentou paralisia do tronco do nervo facial transitória com total restabelecimento em 3 meses. Na ocasião da reoperação observamos calcificação heterotópica na musculatura do temporal interposto. Nesse caso usamos um fixador externo que manteve o GAP forçadamente por 2 semanas como tática cirúrgica. Após ser retirado o fixador o paciente passou a evoluir bem. A exposição adequada da região da ATM, assim como ressecção do osso anquilosado é um processo árduo. Conforme já descrito por KABAN, PERROTT e FISHER (1990), a proximidade do nervo facial e os vasos da carótida, jugular e maxilar podem frequentemente resultar em paralisia do nervo facial e hemorragias durante a cirurgia (KABAN, PERROTT & FISHER, 1990). Assim, todos os pacientes incluídos neste estudo seguiram o mesmo protocolo cirúrgico e foram operados pelo mesmo cirurgião para evitar qualquer diferença na abordagem cirúrgica entre os pacientes.

Apesar de todos os esforços para o tratamento da AATM, um alto índice de pacientes apresenta recidiva da doença e isso pode estar associado com o

metabolismo reabsortivo, como a doença de Padgett e osteopetrose (LI et al., 2000). Nesse sentido, o entendimento da via do metabolismo ósseo pode orientar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, com a utilização de medicamentos anti-absortivos no tratamento adjuvante. A reabsorção óssea é regulada pelo sistema de osteoclastogênese (RANK, RANKL e OPG), sendo um processo essencial que ocorre durante a cicatrização do osso, pois mantêm o equilíbrio da remodelação óssea acoplando osteoblastos com osteoclastos (YAN et al., 2013; CHEN et al., 2014). No presente estudo foi avaliado o perfil de expressão dos genes *OPG* e *RANKL*, em amostras de pacientes com AATM e amostras de osso de indivíduos controles. Foi observado uma menor expressão de *OPG* e *RANKL* nas amostras de pacientes com AATM (bloco anquilótico e osso adjacente) comparado as amostras controle. O RANK está presente na superfície dos pré-osteoclastos/osteoblastos e a ligação com RANKL promove um aumento da atividade dos osteoclastos maduros (KADKHODAZADEH et al., 2012), enquanto o OPG antagoniza a interação RANK-RANKL promovendo a formação de osso e inibindo a osteoclastogênese (WUYTS et al., 2001). Assim, o RANKL e OPG regulam a reabsorção óssea por estimulação do RANK em células precursoras de osteoclastos (HUGHES et al., 2000).

Nossos resultados estão de acordo com estudo recente realizado por HE e colaboradores (2015), que avaliaram a expressão dos genes *OPG* e *RANKL*, e a densidade óssea de 14 pacientes com AATM pós-traumática. Os autores observaram também uma menor expressão dos genes *OPG* e *RANKL* nas amostras do bloco anquilótico comparado ao controle, sugerindo que a deficiência de osteoclastos contribui para formação do bloco anquilótico. Além disso, eles observaram um aumento da densidade mineral óssea no bloco anquilótico

comparado ao côndilo normal (HE et al., 2015). O remodelamento ósseo é mantido pelo equilíbrio da formao e a reabsoro óssea (TANAKA, NAKAYAMADA & OKADA, 2005). Em nosso estudo observamos também uma menor expressão gênica de *RANKL* e *OPG*, no osso adjacente do paciente com AATM (osso que não estava relacionado ao bloco anquilótico), comparado ao controle, indicando que a alteração da expressão destes genes ocorre também em locais distantes do foco da anquilose.

Apesar dos resultados promissores referente aos genes envolvidos na formação da massa óssea anquilosada de pacientes com AATM, nosso estudo apresenta limitações relevantes em relação ao número de amostras analisadas tanto no grupo caso (AATM) como no grupo controle. Além disso, houve limitação na coleta de amostras de osso controle de crianças, que julgamos ser o controle ideal, visto que o processo de remodelamento ósseo é alterado nas diferentes fases do desenvolvimento (RAGGATT et al., 2010). O grupo controle incluído neste estudo foi constituído de indivíduos adultos, durante extração dentaria de dentes inclusos, tratamento de fraturas mandibulares ou colocação de implantes para extração do osso alveolar. Dessa forma, podemos ter um viés de comparação, já que o osso alveolar apresenta características relacionadas a um maior remodelamento e as fraturas mandibulares estão em processo de reparo ósseo (RAGGATT et al., 2010).

## 7 CONCLUSÕES

---

- Observamos que a presença de otite, infecção e cirurgia prévia de AATM foram os fatores etiológicos da AATM nas crianças incluídas neste estudo;
- Foi observado uma menor expressão de *OPG* e *RANKL* nas amostras de pacientes com AATM (bloco anquilótico e osso adjacente à anquilose) comparado as amostras controle;
- O *RANKL* e *OPG* regulam a reabsorção óssea por estimulação do *RANK* em células precursoras de osteoclastos, podendo estar associado com a degeneração articular da ATM. Nossos resultados sugerem uma ampla investigação da via *RANK-RANKL-OPG* na AATM, com o intuito de se explorar, nesta via, novas possibilidades terapêuticas para esta patologia de difícil tratamento.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Al-Moraissi EA, El-Sharkawy TM, Mounair RM and El-Ghareeb TI. A systematic review and meta-analysis of the clinical outcomes for various surgical modalities in the management of temporomandibular joint ankylosis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015; 44(4):470-482.

Balaji SM. Modified temporalis anchorage in craniomandibular reankylosis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 32(5):480-5.

Balaji SM. Teeth position, eruption and temporomandibular joint ankylosis. *J Maxillofac Oral Surg.* 2009; 8(4):340–343.

Bartold PM, Cantley MD & Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology.* 2000; 53:55-69.

Bedi RS, Khemka U, Singh J, Yadav M, Singh P. Use of T.M.J. Disc as a Soft Tissue Interpositional Graft Material for Functional Rehabilitation of Ankylosed T.M. Joint. *J Maxillofac Oral Surg.* 2017 Jun;16(2):219-225.

Bhatt K, Roychoudhury A, Bhutia O and Pandey RM. Functional outcomes of gap and interposition arthroplasty in the treatment of temporomandibular joint ankylosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72(12):2434-9.

Chen B, Wu W, Sun W, Zhang Q, Yan F, Xiao Y. RANKL Expression in Periodontal Disease: Where Does RANKL Come from? *BioMed Res Int.* 2014; 731039.

Cheyne F, Gola R, Chossegras C, Orthlieb JD, Giraudeau A, Falanga HJ. Apport des radiographies standart dans le bilan des dysfonctionnements de l'appareil manducateur (D.A.M.). *Rev Stomatol Chir Maxillofac,* 1998; 99(2):88-102.

Chidzonga MM. Temporomandibular joint ankylosis: review of thirty-two cases. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1999; 37(2):123-6.

Chossegros C, Guyot L, Cheynet F. Full-thickness skin graft interposition after temporomandibular joint ankylosis surgery: a study of 31 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1999; 28(5):330-4.

Crotti T, Smith MD, Hirsch R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M, Ahern MJ, Haynes D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Periodontal Res*. 2003; 38(4):380-7.

Danda AK, S R, Chinnaswami R. Comparison of gap arthroplasty with and without a temporalis muscle flap for the treatment of ankylosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2009; 67(7):1425-31.

Das UM, Keerthi R, Ashwin DP, VenkataSubramanian R, Reddy D, Shiggaon N. Ankylosis Of Temporomandibular Joint In Children. 2009; 27(2):116-20.

Dimitroulis G. The interpositional dermis-fat graft in the management of temporomandibular joint ankylosis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33(8):755-60.

Durr ED, Turlington EG, Foote RL: Radiation treatment of heterotopic bone formation in the temporomandibular joint articulation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1993; 27(4):863-9.

Dutzan N, Gamonal J, Silva A, Sanz M, Vernal R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2009; 36(5):396-403.

El-Hakim IE, Metwalli SA. Imaging of temporomandibular joint ankylosis. A new radiographic classification. *Dentomaxillofac Radiol* 2002;31:19- 23.

Elgazzar RF, Abdelhady AI, Saad KA, Elshaal MA, Hussain MM, Abdelal SE and Sadakah AA. Treatment modalities of TMJ ankylosis: experience in Delta Nile, Egypt. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39(4):333-42.

Erdem E, Alkan A. The use of acrylic marbles for interposition arthroplasty in the treatment of temporomandibular joint ankylosis: follow up of 47 case. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001; 30(1):32-6.

Erol B, Tanrikulu R, Görgün B: A clinical study on ankylosis of the temporomandibular joint. *J Craniomaxillofac Surg* 34:100, 2006

Figueiredo LMG, Oliveira TFL, Valente ROH, Sarmiento VA. Tratamento de anquilose da articulação temporomandibular subsequente à trauma mandibular em pacientes pediátricos. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.*, 2014; 14(3):53-58.

Gu S, Wei N, Yu L, Jian Fei, and Chen YP. Shox2-deficiency leads to dysplasia and ankylosis of the temporomandibular joint in mice. *Mech Dev.* 2008; 125(8): 729–742.

Gunaseelan R. Condylar reconstruction in extensive ankylosis of temporomandibular joint in adults using resected segment as autograft. A new technique. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 26(6):405-7.

Gupta VK, Mehrotra D, Malhotra S, Kumar S, Agarwal GG, Pal US. An epidemiological study of temporomandibular joint ankylosis. *Natl J Maxillofac Surg.* 2012 Jan;3(1):25-30. doi: 10.4103/0975-5950.102146.

Güven O. Treatment of temporomandibular joint ankylosis by a modified fossa prosthesis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004; 32(4):236-42.

Güven O. A clinical study on temporomandibular joint ankylosis in children. *J Craniofac Surg* 2008; 19(5):1263-9.

He LH, Xiao E, Duan DH, Gan YH, Zhang Y. Osteoclast Deficiency Contributes to Temporomandibular Joint Ankylosed Bone Mass Formation. *J Dent es.* 2015 Oct;94(10):1392-400. Epub 2015 Aug 6.

Heffez LB, Mafee MF, Rosenberg HM. Imaging atlas of the temporomandibular joint. 1st ed. Philadelphia, PA: Williams & Wilkins, 1995.

Holmlund A, Lund B and Weiner CK. Mandibular condylectomy with osteoarthrectomy with and without transfer of the temporalis muscle. Br J Oral Maxillofac Surg 2013; 51(3):206-10.

Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, Macpherson H, Wallace RG, Van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. Nat Genet. 2000, V 24(1), P 45-48.

Jacob LCB, Rabiço TM, Campêlo RM, Aguiar FP, Zeigelboim BS. Sintomas auditivos e análise das emissões otoacústicas evocadas por estímulo transiente em indivíduos portadores de disfunção temporomandibular. Distúrbios da Comunicação. 2005;17(2):173-82.

Kaban LB, Perrott DH and Fisher K. A protocol for management of temporomandibular joint ankylosis. J Oral Maxillofac Surg 1990; 48(11):1145-51.

Kaban LB, Bouchard C, Troulis MJ. A Protocol for Management of Temporomandibular Joint Ankylosis in Children .J Oral Maxillofac Surg 67:1966-1978, 2009

Kadkhodazadeh M, Tabari ZA, Ardakani MR, Ebadian AR, Brook A. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. Eur J Oral Implantol. 2012, v 5(4), p 381-8.

Katzberg RW, Westesson PL. Diagnosis of the temporomandibular joint. Philadelphia, PA: WB. Saunders, 1993.

Khadka A and Hu J. Autogenous grafts for condylar reconstruction in treatment of TMJ ankylosis: current concepts and considerations for the future. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2012; 41(1):94-102.

Köhler AA, Helkimo AN, Magnusson T, Hugoson A. Prevalence of symptoms and signs indicative of temporomandibular disorders in children and adolescents. A cross-sectional epidemiological investigation covering two decades. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009 Nov;10 Suppl 1:16-25.

Kumar D, Rajan G, Raman U, Varghese J. Autogenous Reconstructive Modalities of TMJ Ankylosis-A Retrospective Analysis of 45 cases. *J. Maxillofac. Oral Surg*. 2014; 13(4):359–365.

Lei Z. Auricular cartilage graft interposition after temporomandibular joint ankylosis surgery in children. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 60(9):985-7.

Li J, Mori S, Kaji Y, Kawanishi J, Akiyama T, Norimatsu H. Concentration of bisphosphonate (incadronate) in callus area and its effects on fracture healing in rats. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(10):2042–2051.

Liu CK, Liu P, Meng FW, Deng BL, Xue Y, Mao TQ, Hu KJ. The role of the lateral pterygoid muscle in the sagittal fracture of mandibular condyle (SFMC) healing process. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 50(4):356–360.

Liu X, Shen P, Zhang S, Yang C, Wang Y. Effectiveness of different surgical modalities in the management of temporomandibular joint ankylosis: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 15;8(11):19831-9.

Long X, Li X, Cheng Y, Yang X, Qin L, Qiao Y, et al. Preservation of disc for treatment of traumatic temporomandibular joint ankylosis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(7):897-902.

Loveless TP, Bjornland T, Dodson TB, Keith DA. Efficacy of Temporomandibular Joint Ankylosis Surgical Treatment. *J Oral Maxillofac Surg* 68:1276-1282, 2010

Mabongo M. Temporomandibular joint ankylosis in Children. IOSR J Dental Med Sci 2013; 12: 35-41.

Maciel RN, Turell JCF. Anatomia da ATM. In:Maciel RN, Westesson PL, Turell JCF, et al. ATM e dores craniofaciais – fisiopatologia básica. 1\_ed. São Paulo, SP: Livraria Editora Santos, 2003:63–90.

Mahl CRW, Silveira MW. Diagnostic Images of the Temporomandibular Joint: Techniques and Indications. Jornal Brasileiro de Oclusão, ATM e Dor Orofacial. 2002; 16(5):355-64.

Manganello-Souza LC, Mariani PB. Temporomandibular joint ankylosis: Report of 14 cases. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2003;32(1): 24-29.

Mansoor N, Khan M, Mehboob B, Din Q. Gap vs interpositional arthroplasty in the management of temporomandibular joint ankylosis. Pakistan Oral & Dental Journal 2013; 33.

Marzotto SR, Bianchini EMG. Anquilose temporomandibular bilateral: aspectos fonoaudiológicos e procedimentos clínicos. Rev CEFAC, 2007; 9(3):358-66.

Matsuura H, Miyamoto H, Ogi N, Kurita K, Goss AN. The effect of gap arthroplasty on temporomandibular joint ankylosis: an experimental study. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001; 30(5):431-7.

Mercuri LG and Anspach WE 3rd. Principles for the revision of total alloplastic TMJ prostheses. Int J Oral Maxillofac Surg 2003; 32(4):353-9.

Netter, Frank H. Atlas de anatomia humana. 2ed. Porto Alegre. Artmed, 2000.

Norman JE. Ankylosis of the temporomandibular joint. Aust Dent J. 1978; 23(1):56–66.

Okeson JP. Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão. 4\_ ed. São Paulo, SP: Artes Médicas, 2000.

Oliveira MFR, Crivello JR. O comportamento da movimentação mandibular em pacientes com disfonia funcional e organofuncional. J. Bras. Fonoaudiol. 2004; 5(19):110-7.

Parker DB. Ankylosis of the temporomandibular joint. J Oral Surg (Chic) 1948; 6(1):42-50.

Pereira Filho EM, de Carvalho Neto LG, Granville-Garcia AF, Cavalcanti AL. Anquilose da articulação temporomandibular em criança: relato de caso. Odonto 2011; 19 (38): 31-38.

Pilmane M, Skagers A. Growth factors, genes, bone proteins and apoptosis in the temporomandibular joint (TMJ) of children with ankylosis and during disease recurrence. Stomatologija, Baltic Bental and Maxillofacial Journal, 2011; 13(3):96-101.

Pogrel MA, Kaban LB. The role of a temporalis fascia and muscle flap in temporomandibular joint surgery. J Oral Maxillofac Surg 1990; 48(1):14-9.

Porto GG e Vasconcelos BC. Treatment of temporomandibular joint ankylosis. Rev. Ciênc. Méd., Campinas, 16(1):43-50, jan./fev., 2007

Porto GG, Vasconcelos BC, Fraga SN, Castro CM, Andrade ES. Development of temporomandibular joint ankylosis in rats using stem cells and bone graft. Int J Oral Maxillofac Surg. 2011 Dec;40(12):1414-20. doi: 10.1016/j.ijom.2011.07.910. Epub 2011 Sep 1.

Qudah MA, Qudeimat MA and Al-Maaita J. Treatment of TMJ ankylosis in Jordanian children-a comparison of two surgical techniques. J Craniomaxillofac Surg 2005; 33(1):30-6.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087. Epub 2010 May 25. Review.

Ramos ACA, Sarmiento VA, Campos PSF, Gonzalez MOD. Temporomandibular joint - normal features and disc displacements: magnetic resonance imaging. *Radiol Bras*, 2004; 37:6.

Rao K, Kumar S, Kumar V, Singh AK, Bhatnagar SK. The role of simultaneous gap arthroplasty and distraction osteogenesis in the management of temporomandibular joint ankylosis with mandibular deformity in children. *J Craniomaxillofac Surg*, 2004; 32(1):38-42.

Richards JB, Zheng HF, Spector TD. Genetics of osteoporosis from genome-wide association studies: advances and challenges. *Nature Reviews/Genetics*, 2012; 13(8):576-88.

Roychoudhury A, Parkash H, Trikha A. Functional restoration by gap arthroplasty in temporomandibular joint ankylosis: a report of 50 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 87(2):166-9.

Saeed NR, Hensher R, McLeod NMH, Kent JN. Reconstruction of the temporomandibular joint autogenous compared with alloplastic. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2002; 40(4):296-9.

Saeed NR, Kent JN. A retrospective study of the costochondral graft in TMJ reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 32(6):606-9.

Sahoo NK, Tomar K, Kumar A and Roy ID. Selecting reconstruction option for TMJ ankylosis: a surgeon's dilemma. *J Craniofac Surg* 2012; 23(6):1796-801.

Sales MAO, Oliveira JX, Cavalcanti MGP. Computed Tomography Imaging Findings of Simultaneous Bifid Mandibular Condyle and Temporomandibular Joint Ankylosis: Case Report. *Braz Dent J* 2007; 18(1): 74-77.

Sarma UC and Dave PK. Temporomandibular joint ankylosis: an Indian experience. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72(6):660-4.

Sawhney CP. Bony ankylosis of the temporomandibular joint: followup of 70 patients treated with arthroplasty and acrylic spacer interposition. *Plast Reconstr Surg*. 1986; 77(1):29–40.

Shaikh SK, Mishra M, Tiwari AK, Chander M, Gaur A and Singh H. Comparative Evaluation of Gap Arthroplasty and Interpositional Arthroplasty using Temporalis Fascia in the Management of Temporomandibular Joint Ankylosis. *J Orofac Res*, 2013; 72(6):660-4.

Sidebottom AJ and Salha R. Management of the temporomandibular joint in rheumatoid disorders. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51(3):191-8.

Silveira OS, Silva FCS, de Almeida CEN, Tuji FM, Seraidarian PI, Manzi FR. Use of ct for diagnosing temporomandibular joint. *Rev. CEFAC*. 2014; 16(6):2053-2059.

Sporniak-Tutak K, Janiszewska-Olszowska J, Kowalczyk R. Management of temporomandibular ankylosis – compromise or individualization – a literature review. *Med Sci Monit*. 2011; 17(5): RA111-116

Su-Gwan K. Treatment of temporomandibular joint ankylosis with temporalis muscle and fascia flap. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 30(3):189-93.

Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(3):325–8.

Tanrikulu R, Erol B, Gorgun B and Soker M. The contribution to success of various methods of treatment of temporomandibular joint ankylosis (a statistical study containing 24 cases). *Turk J Pediatr*, 2005; 47(3):261-5.

Tasaki MM, Westesson PL, Isberg AM, Ren YF, Tallents RH. Classification and prevalence of temporomandibular joint disk displacement in patients and symptom-free volunteers. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1996; 109(3):249-62.

Vasconcelos BCE, Porto GG, Bessa-Nogueira RV. Anquilose da articulação têmporo-mandibular. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008; 74(1):34-8.

Vasconcelos BC, Porto GG, Bessa-Nogueira RV and Nascimento MM. Surgical treatment of temporomandibular joint ankylosis: follow-up of 15 cases and literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2009; 14(1):E34-8.

Voiner J, Yu J, Deitrich P, Chafin C and Gianna-kopoulos H. Analysis of mandibular motion following unilateral and bilateral alloplastic TMJ reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011; 40(6):569-71.

Wuyts W, Van Wesenbeeck L, Morales-Piga A, Ralston S, Hocking L, Vanhoenacker F, Westhovens R, Verbruggen L, Anderson D, Hughes A, Van Hul W. Evaluation of the role of RANK and OPG genes in Paget's disease of bone. *Bone*. 2001; 28(1):104-7.

Xiao E, Li JM, Yan YB, An JG, Duan DH, Gan YH, Zhang Y. Decreased osteogenesis in stromal cells from radiolucent zone of human TMJ ankylosis. *J Dent Res*. 2013; 92(5):450–455.

Yan YB, Duan DH, Zhang Y, Gan YH. The development of traumatic temporomandibular joint bony ankylosis: a course similar to the hypertrophic nonunion. *Med Hypotheses*. 2012; 78(2):273–276.

Yan YB, Zhang Y, Gan YH, An JG, Li JM, Xiao E. Surgical induction of TMJ bony ankylosis in growing sheep and the role of injury severity of the glenoid fossa on the development of bony ankylosis. *J Craniomaxillofac Surg*. 2013; 41(6):476–486.

Yan YB, Li JM, Xiao E, An JG, Gan YH, Zhang Y. A pilot trial on the molecular pathophysiology of traumatic temporomandibular joint bony ankylosis in a sheep

model: part II. The differential gene expression among fibrous ankylosis, bony ankylosis and condylar fracture. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014. 42(2): e23–e28.

Yavary MRT. Comparison of gap arthroplasty and interpositional gap arthroplasty on the temporomandibular joint ankylosis. *Acta Medica Iranica*, 2006; 44: 391-394.

Zhi K, Ren W, Zhou H, Gao L, Zhao L, Hou C and Zhang Y. Management of temporomandibular joint ankylosis: 11 years' clinical experience. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(5):687-92.

## ANEXOS

### ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP.

<b>INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATO - ORTOPEDIA / INTO / SAS/ MS</b>		
<b>PARECER COM SUBSTANCIADO DO CEP</b>		
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>		
<b>Título da Pesquisa:</b> Anquilose idiopática da articulação temporomandibular em crianças: correlação de polimorfismo genético e expressão de microRNAs na saliva		
<b>Pesquisador:</b> Valquíria Quinolato		
<b>Área Temática:</b>		
<b>Versão:</b> 2		
<b>CAAE:</b> 17514013.9.1001.5273		
<b>Instituição Proponente:</b> Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ		
<b>Patrocinador Principal:</b> Instituto Nacional de Traumatismo - Ortopedia / INTO / SAS/ MS - RJ		
<b>DADOS DO PARECER</b>		
<b>Número do Parecer:</b> 401.461		
<b>Data da Relatoria:</b> 26/08/2013		
<b>Apresentação do Projeto:</b> A apresentação do projeto está adequada.		
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> Os objetivos da pesquisa estão claros e bem definidos.		
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> Está bem explicitado no projeto os riscos/benefícios.		
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Projeto já foi aprovado anteriormente.		
<b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> Não há considerações.		
<b>Recomendações:</b> Não há.		
<b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> Não há pendências.		
<b>Situação do Parecer:</b> Aprovado		
<b>Endereço:</b> Avenida Brasil, nº 500		
<b>Bairro:</b> São Cristóvão	<b>Cep:</b> 20.940-070	
<b>Uf:</b> RJ	<b>Município:</b> RIO DE JANEIRO	
<b>Telefone:</b> (21)2134-5000	<b>Fax:</b> (21)2134-5228	<b>E-mail:</b> cep.info@info.saude.gov.br

Página 01 de 02

INSTITUTO NACIONAL DE  
TRAUMATO - ORTOPEDIA /  
INTO / SAS/ MS



Contribuição do Parecer: 401.481

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

RIO DE JANEIRO, 20 de Setembro de 2013

---

**Assinador por:**  
**Marta Peter Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Brasil, nº 500

**Bairro:** São Cristóvão

**Cep:** 20.940-070

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)2134-5000

**Fax:** (21)2134-5228

**e-mail:** [cep.into@nto.saude.gov.br](mailto:cep.into@nto.saude.gov.br)

## ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Seu filho (a) e familiares estão sendo convidados a participarem da pesquisa “Anquilose idiopática da articulação temporomandibular em crianças: correlação de polimorfismo genético e expressão de microRNAs na saliva”. A participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar da pesquisa e retirar seu consentimento ou o consentimento dado para seu filho (a). Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

O objetivo deste estudo é correlacionar à presença de anquilose idiopática na articulação temporomandibular (articulação para abertura de boca) e sua característica genética (características transmitidas de pais para filhos).

A participação nesta pesquisa consistirá em doar saliva e sangue para exame laboratorial, e em caso de necessidade de cirurgia dessa mesma articulação, doar o material que seria descartado, para análise laboratorial também. E permitir que estes materiais sejam armazenados para futura análise e realizar exame da boca e exame (palpação) da articulação temporomandibular (articulação para abertura de boca).

A participação na pesquisa pode ter o risco de ficar roxo e dolorido no local da coleta de sangue. Os benefícios relacionados com a sua participação é principalmente um futuro entendimento da origem e desenvolvimento desta lesão.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação e/ou de seu filho (a). Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. As coletas serão numeradas e seu nome e/ou do seu filho (a) não constará em qualquer recipiente a ser armazenado.

Em caso de trauma na articulação temporomandibular serei excluído da pesquisa.

Você receberá uma cópia deste Termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Marcar e preencher a opção (1) para termo de consentimento para criança e adolescente, opção (2) para a participação dos familiares na pesquisa.

1.( ) Declaro que entendi a pesquisa e aceito que o meu filho (a) participe da mesma.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

Nome da criança ou adolescente: \_\_\_\_\_

Data Nasc.: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_, endereço: \_\_\_\_\_

Nome dos pais ou responsável legal e nº de RG: \_\_\_\_\_

---

---

Assinatura dos pais ou responsável legal:

---

---

Assinatura e carimbo do pesquisador:

2.( ) Declaro que entendi a pesquisa e aceito participar.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Nome da criança ou adolescente: \_\_\_\_\_

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Data

Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, RG: \_\_\_\_\_ Org. emissor: \_\_\_\_\_

Data de emissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, endereço: \_\_\_\_\_

---

---

Assinatura do voluntário ou responsável legal

---

Assinatura e carimbo do pesquisador

Av. Brasil, nº 500- Anexo 4- Térreo– Centro de Terapia Celular (CTCel)-INTO-Tel: 2134-5300.

## ANEXO C- TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO

### TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO

Você \_\_\_\_\_ está sendo convidado (a) a participarem da pesquisa “Anquilose idiopática da articulação temporomandibular em crianças: correlação de polimorfismo genético e expressão de microRNAs na saliva”. Seus pais já permitiram que você participe, mas você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, a qualquer momento você pode desistir e não haverá nenhum problema se desistir.

Queremos saber se anquilose idiopática (impossibilidade de abertura da boca) na articulação temporomandibular (articulação para abertura de boca) está relacionada com suas características genéticas (características herdadas dos pais). As crianças e adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de 8 a 18 anos de idade.

A sua participação nesta pesquisa é feita com a doação de saliva e sangue para exame laboratorial e caso haja necessidade de cirurgia, doação de material biológico (raspado da articulação) que seriam jogados fora durante a cirurgia para pesquisa e a realização de exame da boca e exame (palpação) da articulação temporomandibular (articulação para abertura de boca).

A participação na pesquisa não trará nenhum risco para sua saúde, somente pode ocorrer um desconforto durante a avaliação do dentista, mas há coisas boas que podem acontecer como um futuro entendimento do por que essa doença acontece e com isso tentar melhorar o tratamento.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças e adolescentes que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa, as nossas descobertas serão escritas em revistas próprias para publicação de pesquisa. Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou ao seu médico, ou ainda pode ligar depois no telefone abaixo.

Eu aceito participar da pesquisa “Anquilose idiopática da articulação temporomandibular em crianças: correlação de polimorfismo genético e expressão de microRNAs na saliva”, que é para entender melhor como a anquilose idiopática se desenvolve. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar bravo. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Rio de Janeiro, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ .

\_\_\_\_\_  
Assinatura da criança ou adolescente

\_\_\_\_\_  
Assinatura dos pais ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura e carimbo do pesquisador

Av. Brasil, nº 500- Anexo 4- Térreo– Centro de Terapia Celular (CTCel)-INTO-Tel: 2134-5300.

## ANEXO D – FICHA DE ANAMNESE

Nº do Questionário : \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Pesquisa: “Anquilose idiopática em crianças: correlação com expressão de microRNAs na saliva” Aprovação CEP: \_\_\_\_\_

### Dados do Paciente

1. Nº Prontuário: \_\_\_\_\_ 2. Banco DNA: \_\_\_\_\_ 3. Iniciais \_\_\_\_\_

4. Nascimento \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ 5. Sexo ( ) 1.Fem ( ) 2.Masc

6. Etnia: \_\_\_\_\_

### 7. Informações sobre a mãe do voluntário:

a) Tem doença autoimune? ( ) não ( ) sim – especificar: \_\_\_\_\_

b) Teve alguma quadro de infecção/inflamação durante a gravidez? ( ) não ( ) sim –especificar: \_\_\_\_\_

c) ( ) Parto normal ( ) cesariana – complicações (uso de forceps) ( ) não ( ) sim - expecificar \_\_\_\_\_

### 8. Informações sobre o voluntário:

a) Sofreu traumatismo craniofacial recém-nascido?

( ) 2.Não ( ) 1.Sim – especificar: \_\_\_\_\_

b). Teve algum quadro de infecção/inflamação/alérgia rescém-nascido?

( ) 2.Não ( ) 1.Sim – especificar: \_\_\_\_\_

c) Tem doença autoimune? ( ) não ( ) sim – especificar: \_\_\_\_\_

d) Apresenta anquilose condilar?

( ) Não ( ) Sim

( ) Unilateral ( ) Bilateral - ( ) Direito ( ) Esquerdo

( ) Fibrosa ( ) Óssea

e) Grau de comprometimento, classificação? \_\_\_\_\_

e) Já realizou procedimento cirúrgico na ATM? ( ) não ( ) sim – Quantos? \_\_\_\_\_ Quais idades: \_\_\_\_\_

Motivos: \_\_\_\_\_

9- Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

10. GRUPO: ( ) A.Controle ( ) B.Teste

## Ficha Clínica Odontológica

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banco DNA: \_\_\_\_\_

Prontuário:	Iniciais:	Nasc.:	Endereço:	Telefone:	Sexo
Nacionalidade:					

Projeto : \_\_\_\_\_

Queixa Principal \_\_\_\_\_

### INQUÉRITO DE SAÚDE

Está em tratamento médico ?  não  sim

Está usando medicação ?  não  sim

Alergia:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Anemia:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Hepatite:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Sífilis:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
HIV:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Tuberculose:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Asma:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Fumante:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Homôfilos:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Alcoólata:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Tatagens:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Hepes/Altas:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Grovidez:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Desmaios:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Febre Reumática:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Diabetes:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI
Epilepsia:	<input type="checkbox"/> SIM	<input type="checkbox"/> NÃO	<input type="checkbox"/> NÃO SEI

- Cicatrização rum       SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Distúrbios Psico       SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Endocardite Bact.     SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Problema Hepático    SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Problema Renal       SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Problema Cardíaco    SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Tensão Arterial       SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Cirurgia                 SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Tumor                    SIM                       NÃO                       NÃO SEI
- Internação Hospital    SIM                       NÃO                       NÃO SEI

AUDIT: (valor) \_\_\_\_\_

Edentado:	<input type="checkbox"/> parcial	<input type="checkbox"/> total
CPOD		
Anomalias dentárias		
Agnesias		
Fenótipo periodontal:	<input type="checkbox"/> Espesso	<input type="checkbox"/> Fino
Tabagista:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Etilista:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
História de periodontite:	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não
Acúmulo de placa na boca (higiene oral)	<input type="checkbox"/> Boa	<input type="checkbox"/> Ruim