



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: IMPLANTODONTIA

**ISIS CARVALHO ENCARNAÇÃO**

**ANÁLISE DO USO DE SINVASTATINA E ARCABOUÇOS DE  
PLGA+HA NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS NA  
CALOTA CRANIANA DE RATOS.**

Dissertação de Mestrado

Florianópolis  
2012



**ISIS CARVALHO ENCARNAÇÃO**

**ANÁLISE DO USO DE SINVASTATINA E ARCABOUÇOS DE  
PLGA+HA NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS NA  
CALOTA CRANIANA DE RATOS.**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração: Implantodontia.

**Professora Orientadora: Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro**  
**Professor Coorientador: Dr. Águedo Aragonés**

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

E56a Encarnação, Isis Carvalho  
Análise do uso de sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA  
no reparo ósseo de defeitos criados na calota craniana de  
ratos [dissertação] / Isis Carvalho Encarnação ; orientadora,  
Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro. - Florianópolis, SC, 2012.  
124 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Ossos - Reparos e reconstrução. 3.  
Ossos - Crescimento. I. Cordeiro, Mabel Mariela Rodríguez.  
II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU 616.314

Isis Carvalho Encarnação

**ANÁLISE DO USO DE SINVASTATINA E ARCABOUÇOS DE  
PLGA+HA NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRIADOS NA  
CALOTA CRANIANA DE RATOS.**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “MESTRE EM ODONTOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM IMPLANTODONTIA”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 10 de fevereiro de 2012.

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Banca Examinadora:**

---

Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro  
Orientadora – UFSC

---

Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho  
Membro

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini  
Membro

---

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Suplente



*Com carinho, dedico esta dissertação,*

*Aos meus queridos pais, **Januário e Liliane**, pelo imenso amor, dedicação e humildade, por me apoiar e acreditar em minhas escolhas, permitindo que meus sonhos se tornem realidade e pelo exemplo de força para superar todos os obstáculos.*

*Às minhas doces irmãs, **Lara e Lais**, amigas de todas as horas e circunstâncias, pelo companheirismo e incentivo nos momentos difíceis e pela felicidade de tê-las ao meu lado.*

*À minha querida tia **Inês**, pelo exemplo de apoio e incentivo, determinantes em minha vida. E por acreditar nos seus sobrinhos com tanto amor!*

*Ao amor da minha vida, **Fernando**, pelo seu apoio e carinho nas horas mais difíceis da jornada, por acalmar minhas preocupações, enxugar minhas lágrimas e me trazer sempre a esperança e a felicidade. Você faz de mim uma pessoa melhor e me fortalece para seguir adiante!*

*Vocês são parte deste trabalho!!!*





## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A Deus, por seu infinito amor e por permitir que o Espírito Santo ilumine os meus caminhos todos os dias e pela bênção de viver cercada por pessoas tão boas, carinhosas e competentes.*

*À minha querida orientadora, **Prof. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro**, obrigada pelo exemplo de disposição, determinação, honestidade e dedicação ao ensino e à pesquisa e, principalmente pelo exemplo de que trabalhar em equipe enriquece a todos. Pela paciência e pelo dom de esclarecer e simplificar as minhas dúvidas, sempre. Aprendi muito com você não só pelos ensinamentos, mas pela sua doce postura perante a vida. Sua paixão é contagiante, muito obrigada pelo convívio enriquecedor e por me orientar. Minha imensa gratidão!*

*Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Águedo Aragones**, obrigada por me orientar no momento em que precisei, pelas oportunidades colocadas em meu caminho, pela disponibilidade e por compartilhar seus aprendizados sobre os arcabouços na engenharia tecidual. Sua contribuição foi fundamental para o desfecho deste trabalho.*

*Ao **Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos**, obrigada por abrir as portas do seu laboratório e me receber como sua aluna, pelo carinho e atenção durante todo o nosso trabalho, por sua presença constante e pelo exemplo como pessoa e professor que nortearão minha vida.*

*Ao **Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini**, banca desta dissertação, obrigada pelo incentivo constante à pesquisa, pelo exemplo de grande orador que nos motiva a buscar sempre a excelência, por abrir as portas de sua casa e me receber em sua família, esses momentos ajudaram a aplacar as saudades de casa!*

*Ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Cardoso**, obrigada por sua imensa sabedoria em trabalhar as qualidades de cada aluno, por sua carinhosa atenção em todos os momentos, ouvindo nossos anseios e expectativas, por sua postura contestadora e pelo exemplo de vida. Obrigada por fazer parte desta trajetória.*

*Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Bianchini**, obrigada pelo exemplo de persistência e força, acreditando sempre na nossa odontologia e pela incessante busca pelo melhor.*

*Ao **Prof. Dr. José Scarso Filho**, obrigada por ter acreditado em mim, por todos os valiosos ensinamentos que tive no período em que trabalhamos juntos e, principalmente, por ter despertado em mim a*

*paixão pelo ensino que me motivaram chegar até aqui. Por sua dedicação, amor e humildade, muito obrigada!*

*Ao **Prof. Dr. João Neudenir Arioli Filho**, banca desta dissertação, obrigada por ser um exemplo de professor, por sua competência e dedicação aos seus alunos, muito me orgulha ter sido um deles. Obrigada por estar aqui neste momento!*

*Às minhas avós **Nilza e Conceição**, e ao meu avô **Januário**, obrigada pelo amor e carinho que sempre dedicaram a mim e às incessantes preces em meu nome e da nossa família. E aos meus **tios e tias, primos e primas**, que estão sempre presentes, é uma benção ter vocês!*

*Ao meu avô **Cid** e minha bisavó **Aparecida**, que de algum lugar sei que estarão me aplaudindo e me abençoando por esta conquista.*

*Ao meu cunhado, **Juba**, obrigada por tornar os dias da nossa família mais divertidos e felizes, e por ser o meu irmão mais velho. E, também ao meu cunhado **Ângelo**, pela torcida e incentivo.*

*À **Magna** e ao **Áureo**, obrigada pelo filho maravilhoso, pela atenção e carinho, e por compreenderem minha ausência. Adoro estar com vocês!*

*À minha querida amiga e colega de mestrado **Maria Del Piñal Luna**, que durante o curso se tornou minha “irmã”, obrigada pela parceria nos trabalhos que realizamos juntas, pela amizade e cumplicidade, por dividir comigo as angústias, as noites mal dormidas, as ansiedades, os sonhos, e por vibrar comigo a cada conquista. Sua força de vontade e dedicação são um exemplo, tenho orgulho e torço muito por você.*

*Ao meu amigo e colega do mestrado **Carlos Clessius Ferreira Xavier**, obrigada pela parceria fundamental neste e em outros trabalhos que fizemos juntos, por sua prontidão e companhia em todas as jornadas, por ter paciência com as minhas ansiedades, pela amizade sincera e verdadeira, pela troca de experiências pessoais e profissionais.*

*Ao meu amigo e colega de mestrado **Ivan Contreras Molina**, obrigada pela parceria e por sua fascinante dedicação e talento à odontologia, por compartilhar suas experiências profissionais, pelos momentos divertidos, por ajudar, ao lado da Maria e do Clessius, com as fotos da pesquisa no laboratório durante os finais de semana, aprendi muito com você.*

*À minha doce amiga e colega de mestrado **Rafaella Monteiro Cid Oliveira**, obrigada por sua presença sempre alegre, por compartilhar comigo todos os momentos dessa trajetória, pela força e dedicação.*

*A todos os amigos de mestrado citados acima e ainda ao **Guenther Schuldt Filho, Eduardo Vilain de Melo e José Moisés Souza Jr.**, agradeço pelos 2 anos de convívio, pela trajetória de nossas vidas que passamos juntos, por compartilharem os desafios, as experiências, as incertezas e, principalmente, pelo crescimento pessoal proporcionado por nosso convívio. Torço muito por todos vocês!!!*

*Aos meus amigos e colegas do doutorado **Armando Lopes Pereira Neto, Ernesto Barquero Cordero, João Gustavo Oliveira de Souza, Newton Bergamaschi Lucciari e Pâmela Cândida Ribas de Andrade**, obrigada pelo acolhimento, pela troca de experiências e pela amizade.*

*Aos residentes **Fernanda, Haline, João, Roberta e Rafaela**, obrigada pelo convívio, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.*

*Aos meus amigos e amigas, em especial **Maria Julia, Fernanda, Livia, Luciana e Ana Paula** que estão sempre ao meu lado, torcendo e vibrando a cada conquista, me apoiando em todos os momentos.*

## AGRADECIMENTOS

À *Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia*, pela oportunidade de aprendizado e contribuição para a minha formação profissional.

Aos professores do curso de Graduação e Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, pelo carinho e contribuição para minha formação neste período.

Ao **Prof. Dr. Márcio Côrrea**, pela contribuição ao trabalho, pela atenção e conhecimentos transmitidos.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Fernando Torres de Freitas**, pela contribuição com a análise estatística e pela paciência e atenção durante a interpretação dos resultados.

Aos **animais** utilizados nesta pesquisa, à doação imensurável feita por vocês à Ciência, a vocês todo o meu respeito e gratidão.

Aos alunos do Curso de Graduação em Odontologia da UFSC, pela amizade e por me proporcionarem a experiência da docência, especialmente as alunas **Paula Canever, Raissa Borges Curtarelli e Fernanda Carrera Schroeder** que me auxiliaram no laboratório, vocês são muito queridas!

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC **Ana Maria**, e às funcionárias do Centro de Ensino e Pesquisas em Implantes Dentários - CEPID, **Mirian e Gisela** pelo trabalho diário e a **Nilcéia** por sua alegre presença.

Aos funcionários da clínica de radiologia, da biblioteca, do setor de esterilização e da limpeza por sua atenção e carinho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Neurociências** da UFSC, por permitir a utilização do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação – LANDI, pela receptividade, disponibilidade, paciência e colaboração de todos os seus alunos, em especial ao **Fábio**, por nos ensinar a trabalhar com os animais e a **Franciane**, pela indispensável ajuda na execução do Elisa e análise dos dados.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, aos professores do Curso de Especialização em Implantodontia da Associação Brasileira de Odontologia de São Paulo - ABOSP que contribuíram para a minha formação profissional e, aos meus colegas de curso pela amizade e incentivo.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ**, e a **Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP**, essenciais para a execução deste trabalho.

*A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!!!*



## EPÍLOGO

*“Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida e a única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. A única maneira de fazer um ótimo trabalho é fazendo o que você ama fazer”.*

*“Cada sonho que você deixa para trás, é um pedaço do seu futuro que deixa de existir”.*

**Steve Jobs**





## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1 – Manipulação dos arcabouços de PLGA+HA.** A – Arcabouços prontos após a evaporação dos solventes e remoção da sacarose, inicialmente com o formato dos moldes cilíndricos de 5 mm de diâmetro por 2 cm de comprimento; B – Arcabouços seccionados por discos diamantados em peça de mão, sob refrigeração constante para evitar aquecimento; C – Arcabouço pronto para ser embalado e esterilizado por radiação gama.

**Figura 2 – Preparo da sinvastatina.** Eppendorf direito contendo solução “mãe” de sinvastatina solubilizada a 6 mg/ml em solução 1:1 de álcool etílico e, eppendorf esquerdo contendo a solução de trabalho a 4 mg/ml.

**Figura 3 – Distribuição dos grupos em relação aos períodos experimentais e às metodologias realizadas.**

**Figura 4 – Intervenção cirúrgica experimental.** A – Mesa de estereotaxia; B – Animais com a parte dorsal do crânio tricotomizada e posicionados sobre a mesa cirúrgica, em decúbito ventral, com a cabeça imobilizada em três pontos fixos, com o auxílio da mesa de estereotaxia; C – Área operatória preparada assepticamente; D e E – Incisão cutânea e muscular; F – Tecidos adjacentes divulsionados; G – Incisão e descolamento do periósteo permitindo a exposição dos ossos parietais. O grupo *naïve* recebeu apenas este procedimento cirúrgico, seguindo para a sutura dos tecidos; H e I – Nos demais grupos, sob irrigação constante com solução salina, foram realizados dois defeitos ósseos, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital. Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro externo; J – Tecidos ósseos internos à trefina removidos. Pode-se visualizar parte do crânio, seus vasos sanguíneos e a dura-máter expostas pelo defeito ósseo. Esta imagem também ilustra o tratamento realizado no grupo *sham*; K – Fragmentos circulares dos tecidos ósseos removidos; L – Aplicação de sinvastatina (grupo sinvastatina isolado) sobre o defeito realizado no lado direito da calota craniana. Da mesma maneira foi aplicado o veículo sobre o defeito; M – Adaptação do arcabouço sobre o defeito realizado no lado direito. No grupo sinvastatina + arcabouço a sinvastatina foi aplicada ao arcabouço sobre uma placa de Petri e, em seguida, posicionados sobre o defeito ósseo; N – Sutura do periósteo. É possível observar, por transparência, a adaptação do arcabouço após esta

sutura; O – Sutura dos tecidos subcutâneos e cutâneos. A ferida cirúrgica foi limpa e o iodopovidine foi aplicado novamente.

**Figura 5 – Remoção das amostras dos tecidos moles adjacentes ao defeito ósseo.** A – Primeiro dia de pós-operatório do grupo *sham*; B – Tecido incisado. É possível observar a presença de líquido do exsudato inflamatório após a incisão; C – Remoção dos tecidos moles adjacentes ao defeito ósseo; D – Fragmento removido.

**Figura 6 – Teste imunoenzimático para dosagem de citocinas.** A – Os tecidos foram transportados e mantidos constantemente em recipiente contendo gelo; B – Fragmentação dos tecidos para facilitar a homogeneização; C – Os tecidos foram homogeneizados em processador de tecidos Ultra-Turrax IKA T18 *basic*; D – As amostras foram homogeneizadas em 1,6 ml de solução tampão para citocinas; E – Amostras imersas em solução tampão; F e G – Homogeneização dos tecidos imersos em cuba contendo gelo; H – Homogenato pronto; I – Homogenatos acondicionados em eppendorfs de 1,5 ml; J e K – Centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, a 4°C; L – O sobrenadante obtido para as análises foi armazenado a -80°C; M e N – Leitura da densidade óptica utilizando-se filtros de 450 e 550 nm.

**Figura 7 – Remoção das amostras para análise radiográfica.** A – Primeiro dia de pós-operatório do grupo *sham*; B – Calota craniana exposta (grupo *sham*); C – Posicionamento da trefina; D – Calota craniana exposta (grupo arcabouço 1 dia); E – Amostra removida; F – Calota craniana exposta (grupo sinvastatina 60 dias); G – Calota craniana exposta (grupo sinvastatina + PLGA+HA 60 dias); H – Amostra removida, vista superior; I – Amostra removida, vista inferior.

## *LISTA DE TABELAS*

**Tabela 1** - Distribuição dos grupos em relação aos períodos experimentais e às metodologias realizadas.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- – Menos

-80°C – Oitenta graus Celsius abaixo de zero

(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>n</sub> – Álcool polivinílico

% – Por cento

+ – Mais

= – Igual

< – Menor

> – Maior

**ANOVA 2** – Análise de variância de 2 vias

**ANOVA 3** – Análise variância de 3 vias

**BMP2** – Proteína Óssea Morfogênica 2 (*Bone Morphogenic Protein 2*)

**BMPs** – Proteínas Ósseas Morfogênicas (*Bone Morphogenic Proteins*)

**BSA** – Albumina de Soro Bovino (*Bovine Serum Albumin*)

°C – Graus Celsius

**ChCl<sub>3</sub>** – Clorofórmio

**cm** – Centímetro(s)

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

**ELISA** – Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

**EPM** – Erro padrão da média

**F** – Teste de variância

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**g** – Grama(s)

**h** – Hora(s)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio

**HA** – Hidroxiapatita

**HMG-CoA** – 3-hidroxi 3-metilglutaril coenzima A

**ICAM-1** – Molécula de adesão intercelular 1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*)

**IL1β** – Interleucina 1 beta

**kg** – Quilograma(s)

**KVp** – Quilovolt(s) power

**l** – Litro(s)

**LFA-1** – Antígeno associado ao linfócito 1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*)

**M** – Molar

**mA** – Miliampére(s)

**mg** – Miligrama(s)

**min** – Minuto(s)  
**ml** – Mililitro(s)  
**mm** – Milímetro(s)  
**mM** – Milimolar  
**n** – Número absoluto  
**NaCl** – Cloreto de sódio  
**Naïve** – Controle positivo  
**NFκβ** – Fator Nuclear kappa beta (*Nuclear Factor kappa beta*)  
**ng** – Nanograma(s)  
**NO** – Óxido nítrico  
**p** – Valor de p  
**PA** – Pureza absoluta  
**PBS** – Tampão salina-fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)  
**pH** – Potencial hidrogeniônico  
**PLGA** – Ácido polilático coglicólico  
**PLGA+HA** – Ácido polilático coglicólico associado a hidroxiapatita  
**PLGA+HA/SIN** – Grupo ácido polilático coglicólico associado a hidroxiapatita com sinvastatina  
**PMSF** – Fluoreto de fenilmetilsulfonil (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*)  
**PO** – Pós-operatório  
**RANKL** – Receptor ativador do ligante NFκβ (*Receptor activator of NFκβ ligand*)  
**rhBMP2** – Proteína Óssea Morfogênica Recombinante Humana 2 (*recombinant human Bone Morphogenic Protein 2*)  
**Ros** – Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)  
**rpm** – Rotações por minuto  
**Runt** – Domínio de ligação com o DNA  
**Runx2** – Fator de transcrição relacionado ao Runt 2  
**s** – Segundo(s)  
**Sham** – Controle negativo  
**SIN** – Grupo sinvastatina isolada  
**Smad-BMP** – Proteína intracelular ativada pela cascata de BMP  
**TGFβ1** – Fator de crescimento transformador beta 1 (*Transforming Growth Factor beta 1*)  
**TNFα** – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*)  
**UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina  
**VEGF** – Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)  
**vs** – Versus  
**μl** – Microlitro(s)  
**μm** – Micrometro(s)



## *SUMÁRIO*

<b>Capítulo I</b> .....	25
Resumo .....	27
Abstract .....	29
<b>Capítulo II</b> .....	31
Introdução e Revisão da Literatura.....	33
<b>Capítulo III</b> .....	39
Artigo.....	41
<b>Capítulo IV</b> .....	93
Bibliografia Consultada.....	95
<b>Capítulo V</b> .....	105
Apêndices.....	107
Apêndice A – Metodologia expandida.....	107
Apêndice B – Figuras da metodologia expandida.....	114
Apêndice C – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	121
Anexos.....	124
Anexos A –Normas do Periódico <i>Journal of Clinical Periodontology</i>	124
Anexos B – Produção científica durante o Mestrado.....	141





# CAPÍTULO I

---



ENCARNAÇÃO, I. C. **Análise do uso de sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA no reparo ósseo de defeitos criados na calota craniana de ratos.** 2012. 127p. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Implantodontia) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

Este estudo avaliou a resposta tecidual e inflamatória do uso de sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA no reparo ósseo de defeitos produzidos na calota craniana de ratos. Um defeito de 5 mm de diâmetro foi criado em cada osso parietal de 180 animais, divididos em 6 grupos: *naïve*, *sham*, veículo, arcabouço de PLGA+HA, sinvastatina (4 mg/ml) e a combinação de arcabouço e sinvastatina. As intervenções foram realizadas somente no lado direito e o lado esquerdo serviu como controle. Seis animais de cada grupo foram sacrificados nos 1, 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios para coleta das amostras teciduais. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância ANOVA, seguida pelos testes de Tukey e Bonferroni para múltiplas comparações ( $p < 0,05$ ). A atividade inflamatória foi avaliada nos dias 1, 7 e 15 por meio da dosagem das citocinas TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ . A sinvastatina aumentou, significativamente, os níveis de TNF $\alpha$  no período de 1 dia quando comparado ao grupo *naïve* ( $p < 0,05$ ). A presença do arcabouço aumentou, significativamente, os níveis de IL1 $\beta$  no período de 1 dia quando comparado aos grupos *naïve* ( $p < 0,001$ ), *sham* ( $p < 0,001$ ), veículo ( $p < 0,001$ ), sinvastatina + arcabouço ( $p < 0,001$ ) e, sinvastatina ( $p < 0,01$ ). As análises de 7 e 15 dias mostraram queda nos níveis destas citocinas em todos os grupos. O reparo ósseo foi avaliado por densitometria nas radiografias das amostras de tecido ósseo, observando-se atraso na mineralização nos grupos veículo e sinvastatina nas análises de 15 e 30 dias ( $p < 0,01$ ). Nos demais grupos ocorreu mineralização progressiva a partir do sétimo dia e, aos 60 dias, todos os grupos apresentaram valores de densitometria estatisticamente semelhantes. Não houve diferença estatística em relação à mineralização dos lados direito e esquerdo, exceto entre o grupo sinvastatina + arcabouço do lado direito, com densitometria superior ao lado esquerdo ( $p < 0,001$ ). Conclui-se que o uso da sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA, isolados ou associados, não permitiram um melhor reparo ósseo quando comparados aos controles.

**Palavras-chave:** reparo ósseo, sinvastatina, arcabouço, PLGA+HA, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , osteogênese.

ENCARNAÇÃO, Isis Carvalho. **Assessment of the association of simvastatin and PLGA+HA scaffolds on bone repair in defects created in rat calvaria.** 2012. 127p. Dissertation (Master's Degree in Dentistry – Concentration Area in Implant Dentistry) – Post-Graduate Program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina - Florianópolis.

### ***ABSTRACT***

To evaluate tissue repair and inflammatory responses promoted by simvastatin and PLGA+HA scaffolds in bone defects created in rat calvaria. A 5-mm-diameter defect was created in each parietal bone of 180 animals, divided into 6 groups: naïve, sham, vehicle, PLGA+HA scaffold, simvastatin (4 mg/ml) and the combination of simvastatin and scaffold. All the interventions were done only on the right parietal bone while the left side served as control. Tissue sample collection was performed on postoperative days 1, 7, 15, 30, and 60. Data were statistically analyzed using ANOVA followed by post-hoc tests ( $p < 0.05$ ). Tissue levels of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  were evaluated on days 1, 7 and 15 in order to assess the inflammation status. Simvastatin significantly increased levels of TNF $\alpha$  on day 1 compared to the naïve group ( $p < 0.05$ ). The scaffold group significantly increased the levels of IL1 $\beta$  on day 1 compared to naïve ( $p < 0.001$ ), sham ( $p < 0.001$ ), vehicle ( $p < 0.001$ ), simvastatin + scaffold ( $p < 0.001$ ), and simvastatin alone ( $p < 0.01$ ) groups. In all groups, at 7 and 15 days, these cytokines showed a decrease in levels. Bone healing was evaluated by densitometry on radiographs of the bone tissue samples, indicating that there was a delay in mineralization in vehicle and simvastatin groups until the 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days ( $p < 0.01$ ). From the seventh day on, a progressive mineralization was observed in all other groups while, within 60 days, all groups showed statistically similar values of density. There was no statistical difference between the sides, except between the right side of simvastatin + scaffold, with higher density than the left ( $p < 0.001$ ). It may be concluded that the use of simvastatin and scaffolds of PLGA + HA, alone or in association, did not allow a better bone repair when compared to controls.

**KEY-WORDS:** Bone repair, simvastatin, scaffold, PLGA+HA, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , osteogenesis.



# CAPÍTULO II

---





## ***INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA***

Na odontologia, procedimentos de reconstrução óssea são necessários para reabilitação de pacientes edêntulos com rebordos alveolares atroficos (CHIAPASCO et al., 2009). A exigência de uma área doadora para essas reconstruções permanece como um desafio nos dias atuais, pois embora o uso de enxerto ósseo autógeno seja o padrão-ouro, as dificuldades relacionadas à quantidade limitada de material ósseo autógeno disponível nas áreas doadoras intra e extraorais e às frequentes morbidades e complicações locais ainda são grandes obstáculos (MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007). Tal fato tem fomentado pesquisas na área de engenharia tecidual com base no desenvolvimento de alternativas promissoras ao enxerto autógeno, como o uso de arcabouços, fatores de crescimento e células-tronco (HÄMMERLE & KARRING 1998; BUSER et al., 2000; CORDEIRO, et al., 2008; SAKAI, et al., 2010).

O papel dos arcabouços no reparo ósseo é servir como meio para a osteocondução. Dessa maneira, devem apresentar resistência mecânica para impedir compressão e movimentação sobre a área, biocompatibilidade para serem reabsorvidos pelo organismo sem provocar qualquer tipo de alteração funcional ou estrutural, porosidade capaz de permitir migração, adesão e proliferação celular, além de serem capazes de carrear fatores de crescimento (EBERLI, et al., 2009; SAITO, et al., 2010). A hidroxiapatita (HA) é o principal componente inorgânico da matriz óssea humana (DORAIRAJAN, et al., 2005), sendo a HA sintética utilizada para reparar defeitos ósseos devido à sua excelente biocompatibilidade, propriedades osteocondutoras (ISHIHARA, et al., 1992) e lenta degradação (BOULER, et al., 1993), apesar de ser um material frágil e de baixa estabilidade mecânica (LOPES, et al., 1999). Por outro lado, polímeros como o ácido polilático coglicólico (PLGA) produzem arcabouços muito estudados na engenharia de tecidos em decorrência de suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, biocompatibilidade, fácil absorção, controle de sua macro e microestrutura, e incorporação e liberação de proteínas com substantividade (LANSMAN, et al., 2006; GÓMEZ, et al., 2006). De acordo com SUI et al. em 2007, e MESSIAS et al. em 2009, a adição de HA ao polímero (PLGA+HA), associando as características físicas do polímero às químicas da HA, possibilitou maior crescimento de osteoblastos, adesão celular e síntese de colágeno quando comparado aos arcabouços de PLGA sem HA. Essa diferença parece estar

relacionada ao tipo celular, já que a HA é um componente do tecido ósseo e, por isso, tem maior afinidade a osteoblastos (SUI, et al., 2007).

Em direção à osteogênese, as proteínas ósseas morfogênicas (BMPs), presentes na matriz extracelular, são a família mais importante de fatores de crescimento para o reparo ósseo e possuem uma grande variedade de atividades biológicas incluindo a indução de tecidos cartilaginoso e ósseo, diferenciação, proliferação celular e apoptose (JANSEN, et al., 2005). A utilização de uma dosagem única de rhBMP-2 exógena tem sido questionada por não induzir o estímulo adequado para a osteoindução devido à sua rápida meia vida, principalmente quando a situação clínica é de grandes defeitos ósseos, ou quando o potencial biológico do hospedeiro está comprometido de alguma forma (DRAGOO, et al., 2003). Portanto, a associação de fatores de crescimento a biomateriais como carreadores, para promover a liberação lenta e gradual desses fatores de crescimento, têm sido o alvo de muitas pesquisas com resultados favoráveis à osteoindução (JANSEN, et al., 2005; KAO, et al., 2009; LING-LING, et al., 2010; NEVINS; LIN, et al., 2011; REYNOLDS, et al., 2011).

Associado a isso, estudos na área de engenharia genética têm mostrado que a BMP-2 pode promover a diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais e melhorar a produção de matriz extracelular no processo de reparo ósseo por transfecção de genes de BMP-2 (ASAHARA, et al., 2000; ZHENG, et al., 2004; SUGIYAMA, et al., 2005; PHILLIPS, et al., 2007). No entanto, devido aos riscos e altos custos das terapias gênicas e fatores de crescimento, como a falta de controle de atuação desses fatores (devido à cinética de liberação complexa, uso de dosagens não fisiológicas, duração da expressão dos genes, imunogenicidade e segurança a longo prazo), deve-se assumir maior cautela para o seu emprego (BODEN, 1999; DOLL, et al., 2001, RIOS, et al., 2011; CASAGRANDE, et al., 2011). Por esses motivos, existe ainda a tentativa de encontrar outros compostos farmacológicos que possam regular favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos, para estimular a osteogênese e associá-los a substitutos osteocondutores, reduzindo os riscos e os custos dessas terapias, sem prejuízo da efetividade para a regeneração óssea.

Neste contexto, devemos considerar o uso da sinvastatina. Assim como a rhBMP-2, as estatinas são aprovadas pelo *Food and Drug Administration*. No entanto, os níveis requeridos de rhBMP-2 para a regeneração óssea são mais de 6 vezes maiores que a quantidade de BMP endógena (SERVICE, 2000). As estatinas são moléculas menores, estáveis, não susceptíveis à degradação proteolítica e facilmente

sintetizadas, o que faz com que seu custo seja 16.000 vezes menor que a produção de rhBMP-2 (MUNDY, et al., 1999). As estatinas são potentes redutores da síntese do colesterol, amplamente utilizadas devido à sua capacidade de inibir a coenzima A hidroximetilglutaril (HMG-CoA) redutase que está envolvida na síntese do colesterol endógeno, bloqueando a conversão do HMG-CoA em mevalonato (ZHANG, et al., 1997) e, portanto, úteis no tratamento de hipercolesterolemia, um fator de risco essencial para a aterosclerose. Por essa e outras vias de ação, a sinvastatina apresenta inúmeros efeitos pleiotrópicos, que são acompanhados por numerosos outros efeitos cardioprotetores, afetando quase todo o processo de aterogênese, desde a injúria endotelial inicial até a progressão e reparo das lesões de aterosclerose, além de influenciar a agregação plaquetária e a deposição de trombos (LACOSTE, et al., 1995; DUBUC, et al., 2004). Destaca-se ainda sua ação anti-inflamatória e antioxidante (SAKODA, et al., 2006; NAKA, et al., 2008), estímulo à angiogênese (KUREISHI, et al., 2000), redução dos peptídios amilóides relacionados ao mal de Alzheimer (FASSBENDER, et al., 2001; KOJRO, et al., 2001) e supressão da ativação de linfócitos T (KWAK, et al., 2000).

A atuação da sinvastatina sobre o tecido ósseo foi primeiramente descrita por Mundy et al. em 1999, que demonstraram que as estatinas estimulam a formação óssea *in vivo* em roedores e são capazes de aumentar o volume de novo osso em cultura de células derivadas da calvária de camundongos. Seu efeito foi descrito como aumento do nível de expressão de BMPs nas células ósseas e estimulação da formação óssea (MUNDY, et al., 1999; SUGIYAMA, et al., 2000; OHNAKA, et al., 2001; MAEDA, et al., 2001 e 2004; MACIEL-OLIVEIRA, et al., 2011). A sinvastatina induz a diferenciação dos osteoblastos antagonizando a ativação da proteína quinase pelo TNF $\alpha$ , revertendo seus efeitos supressores e prevenindo a inibição de BMP-2 mediada pela fosforilação das Smads 1/5/8, ativando a cascata de BMP, resultando na expressão de Runx2 e na atividade de fosfatase alcalina (YAMASHITA, et al., 2008). Além disso, as estatinas também aumentaram acentuadamente a expressão de genes para VEGF em células da linhagem osteoblástica. Dessa forma, BMPs e VEGF interagem para estimular a formação óssea pelos osteoblastos (MAEDA, et al., 2001; DECKERS, et al., 2002). LIU et al., em 2008, também observaram aumento na expressão de TGF $\beta$ 1, BMP-2 e VEGF após a administração local de sinvastatina, uma semana após a extração de dentes, associados ao aumento temporal na expressão de marcadores osteogênicos como fosfatase alcalina e mineralização, assim como

aumentou a expressão de sialoproteína óssea, osteocalcina e colágeno tipo I. O aumento da expressão desses fatores de crescimento é semelhante ao que ocorre no processo de reparo. As células endoteliais produzem BMP-2 para a diferenciação de células osteoprogenitoras e os osteoblastos produzem altos níveis de VEGF estimulando o processo de diferenciação endotelial e angiogênese, fundamentais para a neovascularização da área afetada. Essa interação de fatores de crescimento é benéfica, pois regula o processo de reparo e também tem sido objeto de estudos em engenharia tecidual, e apontam que a associação de fatores de crescimento mimetiza os eventos moleculares endógenos (MAEDA, et al., 2003; TAKENAKA, et al., 2003; WALTER, et al., 2004; UNGER, et al., 2010). Entretanto, seu efeito pró-angiogênico ocorre em baixas dosagens administradas em experimentos *in vitro* e *in vivo*, correspondendo aos níveis fisiológicos encontrados na prática clínica. Em contrapartida, efeitos antiangiogênicos foram observados em altas dosagens e níveis tóxicos de sinvastatina (WEITZ-SCHMIDT, 2002).

A administração de sinvastatina inclui geralmente a via oral, injeções múltiplas em lesões e a aplicação local em materiais específicos. A concentração de estatina disponível nos tecidos quando se utiliza administração oral é menor que 2,4% (SERVICE, 2000), sendo insuficiente para a estimulação de formação óssea em defeitos peri-implantares (JADHAV; JAIN, 2006; MA, et al., 2008). Entretanto, já foi observada associação do uso de sinvastatina em pacientes idosos com melhora na densidade óssea e redução do risco a fraturas de quadril (WANG, et al., 2000; MAEDA, et al., 2001; WU, et al., 2008). Uma opção é injetar sinvastatina diretamente no local de ação, em fraturas ou defeitos, porém, são ineficientes devido à rápida difusão de sua molécula de baixo peso molecular, requerendo injeções repetidas para obter o efeito desejado. Além disso, altas concentrações locais de estatina podem ser tóxicas devido à redução drástica da produção de colesterol, substância importante para manter a integridade das membranas celulares (WHANG, et al., 2005). Estudos prévios mostraram que injeções múltiplas de estatina não são condutoras para o tratamento de defeitos de furca classe II e defeitos intraósseos em cães (MORRIS, et al., 2008).

A sinvastatina, assim como os fatores de crescimento, requer um meio adequado para controlar a sua liberação local para permitir a formação óssea. Estudos recentes testaram o efeito da aplicação local de sinvastatina associada a diferentes carreadores, como a gelatina (OZEC, et al., 2008), ácido poliláctico coglicólico (WU, et al., 2008),

nanopartículas adicionadas ao PLGA (HO, et al., 2011), sulfato de cálcio (NYAN, et al., 2007) e beta tricálcio fosfato (NYAN, et al., 2009), e têm demonstrado potencial em aumentar a formação óssea (PARK, 2009). Apesar disso, não há um consenso do carreador ideal para a sinvastatina nos defeitos ósseos e mais estudos são necessários.

Em estudo histológico, foi observada baixa atividade de fosfatase ácida tartrato-resistente após uso oral de sinvastatina, indicando diminuição de atividade osteoclástica (MUNDY, et al., 1999). MACIEL-OLIVEIRA et al., em 2011, avaliando o uso de sinvastatina em gel em defeitos criados no processo alveolar de ratos, além de observarem formação óssea mais rapidamente nos defeitos tratados com sinvastatina, mostraram também a ausência de osteoclastos nestas amostras. As estatinas inibiram, *in vitro*, a reabsorção óssea por meio da supressão da cascata do mevalonato, bloqueando a prenilação de moléculas sinalizadoras essenciais para a atividade osteoclástica (STAAL et al., 2003). MOON et al., em 2011, mostraram que a sinvastatina inibe a osteoclastogênese induzida pela cascata de RANKL, por meio da inibição da sinalização induzida pelo ROS (MOON, et al., 2011). Além disso, a sinvastatina parece inibir também a indução de metaloproteinase-9 que está relacionada à reabsorção óssea (KIM, et al., 2009).

A maior limitação à aplicação clínica de sinvastatina para a regeneração óssea é o meio apropriado de entrega e liberação. Baixas doses não têm impacto na formação óssea, enquanto que altas dosagens estão associadas a uma alta citotoxicidade e estímulo de processo inflamatório, atrasando o reparo. Inflamação significativa do tecido mole foi observada quando utilizadas altas concentrações (THYLIN, et al., 2002; STEIN, et al., 2005; NYAN, et al., 2007). A liberação pelo carreador da droga também tem papel importante na concentração local e na efetividade da sinvastatina (LIMA, et al., 2011). STEIN et al., em 2005, utilizando 0,1 mg de sinvastatina em gel de metil-celulose não observaram a estimulação de formação óssea, enquanto que NYAN et al., em 2009, utilizaram a mesma quantidade de sinvastatina combinada com beta tricálcio fosfato e reportaram formação de tecido ósseo, resultados melhores do que com as dosagens de 0,25 e 0,5 mg de sinvastatina. Quando utilizadas dosagens superiores a 2,2 mg houve exacerbação do processo inflamatório e inibição da formação óssea.

A incorporação de substâncias aos arcabouços de PLGA permite que, durante a sua degradação em ácido lático, sejam liberadas moléculas de sinvastatina por até 6 semanas, *in vitro* (WHANG, et al., 2005). A administração local de 1,2 mg de sinvastatina, carregada por

PLGA, promoveu a formação de novo osso e reparo de alvéolos de ratos e manteve a altura residual do rebordo alveolar (WU, et al., 2008). Da mesma maneira, resultados favoráveis à formação de tecido ósseo foram demonstrados em outros estudos (NYAN, et al., 2007 e 2009; OZEC, et al., 2008; WU, et al., 2008; PARK, et al., 2009; HO, et al., 2011).

Frente aos resultados promissores da associação da sinvastatina aos arcabouços poliméricos no reparo ósseo como alternativa aos enxertos ósseos autógenos, foi questionado se a presença de HA no arcabouço poderia melhorar a eficácia deste material, acelerando o processo de reparo, uma vez que suas propriedades osteocondutoras podem amplificar os benefícios dos arcabouços de PLGA. Além disso, o efeito da sinvastatina ainda permanece controverso frente à exacerbação do processo inflamatório.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, a capacidade osteoindutora da sinvastatina em arcabouços de PLGA+HA e reações inflamatórias associadas ao seu uso.

#### Objetivos Específicos:

- a) Avaliar comparativamente, pela densitometria visualizada por radiografias, a mineralização óssea nos tempos de 1, 7, 15, 30 e 60 dias de pós-operatório (PO) presente nos grupos experimentais.
- b) Avaliar comparativamente, por meio de método ELISA, a concentração de citocinas presentes nos tecidos moles de revestimento da calvária, nos períodos de 1, 7 e 15 dias após a implantação dos arcabouços.

# CAPÍTULO III

---





***ARTIGO EM PORTUGUÊS***

O artigo a seguir foi formatado de acordo com as Normas para Elaboração de Artigos do periódico *Journal of Clinical Periodontology*.

## ANÁLISE DO REPARO ÓSSEO E PROCESSO INFLAMATÓRIO PROMOVIDOS POR SINVASTATINA E ARCABOUÇOS DE PLGA+HA

Isis Carvalho Encarnação <sup>(1)</sup>

Águedo Aragones <sup>(2)</sup>

Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Mestranda em Implantodontia na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (isisencarnacao@hotmail.com)

<sup>(2)</sup>Pós-doutorando em Implantodontia na Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (aguedo@terra.com.br)

<sup>(3)</sup>Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brasil. (m.cordeiro@ufsc.br)

**Título resumido:** Reparo ósseo com sinvastatina e PLGA+HA

**Palavras-Chave:** reparo ósseo, sinvastatina, arcabouço, PLGA+HA, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , osteogênese.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual e inflamatória do uso da sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA no reparo ósseo. Para tanto, foram confeccionados dois defeitos de 5 mm de diâmetro na calota craniana de 180 ratos, divididos em 6 grupos: *naïve*, *sham*, veículo, arcabouço de PLGA+HA, sinvastatina (4 mg/ml) e a combinação de arcabouço e sinvastatina. As amostras teciduais foram coletadas nos períodos de 1, 7, 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Os achados foram submetidos à análise estatística usando ANOVA seguido de testes *post-hoc* ( $p < 0,05$ ). A atividade inflamatória foi avaliada por meio da dosagem de IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . No período de 1 dia houve maior expressão dessas citocinas nos grupos arcabouço e sinvastatina ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente). O reparo ósseo foi avaliado pela densitometria nas amostras de tecido ósseo e apontou que no período de 60 dias todos os grupos apresentaram valores de densitometria semelhantes entre si, apesar de ter ocorrido atraso no início da formação óssea no grupo sinvastatina ( $p < 0,01$ ). Pode-se concluir que o uso da sinvastatina e arcabouços de PLGA+HA, isolados ou associados, não promoveram um melhor reparo ósseo quando comparados aos controles.

## RELEVÂNCIA CLÍNICA

Tem sido investigado o efeito osteogênico do uso local de sinvastatina em reparos ósseos. As associações de arcabouços e sinvastatina apresentaram grande potencial para aumentar a formação óssea, porém não há estudos avaliando a associação dessa substância a arcabouços de PLGA e hidroxiapatita, um componente do tecido ósseo. Neste estudo, não se observou melhora na formação óssea quando empregados sinvastatina e arcabouço, associados ou não, em relação aos controles e, ainda, verificou-se aumento da expressão de citocinas inflamatórias no período inicial de reparo. Esses achados indicam a importância de avaliarmos o processo de reparo do seu início até a mineralização final e que ainda há fatores a serem controlados para otimizar os efeitos osteogênicos da sinvastatina nesses arcabouços.

## INTRODUÇÃO

Na odontologia, procedimentos de reconstrução óssea são necessários para a reabilitação de pacientes edêntulos com rebordos alveolares atróficos (Chiapasco et al. 2009). A exigência de uma área doadora para essas reconstruções permanece como um desafio nos dias atuais, pois embora o uso de enxerto ósseo autógeno seja o padrão-ouro, as dificuldades relacionadas à quantidade limitada de material ósseo autógeno disponível, e às frequentes morbidades e complicações locais, ainda são grandes obstáculos (McAllister & Haghghat 2007). Tal fato tem fomentado pesquisas na área de engenharia tecidual com base no desenvolvimento de alternativas promissoras ao enxerto autógeno, como o uso de arcabouços, fatores de crescimento e células-tronco (Hämmerle & Karring 1998; Buser et al. 2000; Cordeiro et al. 2008; Sakai et al. 2010).

A sinvastatina é uma estatina sintética e apresenta, dentre seus diversos efeitos pleiotrópicos, um efeito osteogênico, comprovado pelo aumento da expressão de TGF $\beta$ 1, BMP-2 e VEGF após sua administração local e consequente aumento na expressão de marcadores osteogênicos como colágeno tipo I, osteocalcina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina e mineralização (Mundy et al. 1999; Deckers et al. 2000; Sugiyama et al. 2000; Ohnaka et al. 2001; Maeda et al. 2001 e 2004; Liu et al. 2008; Yamashita et al. 2008; Maciel-Oliveira et al. 2011), adequando-se à busca de compostos farmacológicos capazes de regular favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos para estimular a osteogênese e associá-los a substitutos osteocondutores. Além disso, seu uso requer menores custos que as terapias gênicas ou com fatores de crescimento, os riscos são menores e não há prejuízo da efetividade para a regeneração óssea.

Estudos recentes testaram o efeito da aplicação local de sinvastatina associada a diferentes carreadores e têm demonstrado seu potencial para estimular a formação óssea (Ozec et al. 2008, Wu et al. 2008, Nyan et al. 2007 e 2009, Ho et al. 2011). Entretanto, não há um consenso em relação ao carreador ideal para a sinvastatina e mais estudos são necessários. Os polímeros, como o PLGA, são arcabouços muito estudados na engenharia de tecidos em decorrência de suas excelentes propriedades físico-químicas e biológicas, biocompatibilidade, taxas diferentes de degradação, fácil absorção, controle de sua macro e microestrutura, e incorporação e liberação de proteínas com substantividade (Gómez et al. 2006; Lansman et al. 2006). De acordo com Sui et al. em 2007, e Messias et al. em 2009, a adição de

HA ao polímero (PLGA+HA), associando as características físicas do polímero às químicas da HA, possibilitou maior crescimento de osteoblastos, adesão celular e síntese de colágeno quando comparado aos arcabouços de PLGA sem HA. Essa diferença parece estar relacionada ao tipo celular, já que a HA é um componente do tecido ósseo e, por isso, tem maior afinidade a osteoblastos (SUI, et al., 2007). Apesar disso, a literatura não apresenta estudos que avaliem a associação de sinvastatina a arcabouços de PLGA+HA.

Frente aos resultados promissores da associação da sinvastatina aos arcabouços poliméricos no reparo ósseo como alternativa aos enxertos ósseos autógenos, foi questionado se a presença de HA no arcabouço poderia melhorar a eficácia deste material, acelerando o processo de reparo, uma vez que suas propriedades osteocondutoras podem amplificar os benefícios dos arcabouços de PLGA. Além disso, o efeito da sinvastatina ainda permanece controverso frente à exacerbação do processo inflamatório. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, a capacidade osteoindutora da sinvastatina em arcabouços de PLGA+HA e reações inflamatórias associadas ao seu uso.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número de protocolo PP00689.

Foram utilizados 180 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g, considerando 6 animais para cada grupo: *naïve*, *sham*, veículo, arcabouço, sinvastatina e sinvastatina + arcabouço, e os tempos experimentais de 1, 7, 15, 30 e 60 dias, para avaliar inicialmente a resposta inflamatória aguda e crônica, bem como o início até a maturação da mineralização óssea. Os animais foram mantidos sob condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h. Os ratos foram alimentados (*ad libitum*) com dieta sólida padrão e água. Os experimentos foram realizados após um período de 3 dias de aclimação.

### **Obtenção e preparo do arcabouço de PLGA+HA**

Os arcabouços foram produzidos com copolímero de ácido polilático coglicólico associado a hidroxiapatita (PLGA+HA), e obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero de ácido polilático coglicólico (PLGA) (Resomer, Evonik Ind., Essen - Alemanha), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio PA (ChCl<sub>3</sub> –

Synth – LabSynth, Diadema, São Paulo - Brasil) (10% m/v), em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, foram adicionadas partículas de sacarose (Microbiology – Merck, Darmstadt Alemanha) (75% m/v) com granulação inferior a 500 µm, bem como partículas de 50 µm de hidroxapatita (30% m/v) (Genphos Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil). Essa solução foi vertida em moldes cilíndricos de 5 mm de diâmetro. Após a evaporação de solvente, a sacarose foi removida usando-se álcool polivinílico PS ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro). A peça foi seccionada com disco diamantado para obtenção de amostras com espessura de 1 mm para adaptação no defeito ósseo criado na calvária dos ratos. Os arcabouços foram esterilizados por radiação gama.

### **Preparo da sinvastatina**

A sinvastatina foi solubilizada em uma concentração de 6 mg/ml, com solução 1:1 de álcool etílico (Álcool Etílico PA, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro) e PBS (pH7,4). Desta solução “mãe” foram removidos 33 µl e adicionados 17 µl de PBS para obter em 50 µl, 0,2 mg de sinvastatina (4 mg/ml), que foram aplicados durante o experimento aos arcabouços de PLGA+HA previamente à sua implantação, ou diretamente sobre o defeito ósseo no grupo em que foi testada isoladamente. Um grupo recebeu somente o veículo para avaliar possíveis interferências do álcool etílico a 33% na solução tamponada.

### **Intervenção cirúrgica**

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina 2% ( Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo). A parte dorsal do crânio foi tricotomizada e preparada assepticamente com algodão embebido em solução de iodopovidine (Povidine, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo), com o animal posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em três pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia.

Foi utilizada técnica cirúrgica descrita previamente (Thylin et al. 2002; Nyan et al. 2007 e 2009; Calixtro et al. 2011; Lima et al. 2011). Uma incisão cutânea e muscular de 15 a 20 mm de comprimento foi realizada na porção posterior da calvária ao longo da sutura sagital, com auxílio de bisturi e lâmina nº 15 (Swann-Morton® Surgical Blades, Inglaterra). A pele e o tecido subcutâneo foram refletidos e, em seguida, os tecidos subjacentes foram divulsionados com o auxílio de uma

tesoura pequena com extremidade romba e pinça de dissecação até a exposição do perióstio, que foi incisado permitindo a exposição do osso parietal.

Dois defeitos ósseos foram realizados, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital (lado direito e lado esquerdo). Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba - Paraná) sob irrigação constante com solução salina para prevenir o superaquecimento das paredes ósseas. Esse procedimento foi realizado delicadamente para evitar danos à dura-máter. Em todos os animais, os grupos experimentais (PLGA+HA/SIN, PLGA+HA ou SIN) foram implantados no defeito do lado direito e o lado esquerdo serviu como controle interno para observar se a sinvastatina utilizada no preenchimento do defeito influenciou o reparo do lado contralateral. O grupo *naïve* serviu de parâmetro para comparação, por ser a condição natural. O perióstio e o tecido subcutâneo foram reposicionados e suturados com fio de sutura Vicril 4.0 (Ethicon, Johnson&Johnson Company, SP, Brasil) e o tecido cutâneo com fio Nylon 5.0 (Ethicon, Johnson&Johnson Company, SP, Brasil). Os animais foram monitorados diariamente para observação e tratamento de qualquer intercorrência.

### **Remoção das amostras**

Para avaliar os defeitos imediatamente após a cirurgia, bem como a formação óssea e a remodelação do defeito, decorridos 1, 7, 15, 30 ou 60 dias pós-operatórios, as amostras do tecido mole sobre a área do defeito ósseo foram removidas para análise de citocinas. Imediatamente após, a região sobre os ossos parietais foi dissecada e permitiu a coleta das amostras ósseas com brocas trefinas de 10 mm de diâmetro para análise por raios-X.

### **Quantificação dos níveis de citocina tecidual pelo teste ELISA**

Para investigar a dosagem de citocinas pró-inflamatórias presentes na área adjacente ao defeito ósseo, o tecido mole localizado sobre a região dos defeitos foi removido, pesado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para posterior utilização.

O tecido foi cortado em partes menores e homogeneizados em processador de tecidos (Ultra-Turrax IKA T18 basic, IKA<sup>®</sup>, Alemanha) em volume fixo de 1,6 ml de solução tampão para citocinas de PBS (solução tampão salina-fosfato) contendo Tween 20 (0,05%), EDTA 10 mM, cloreto de benzametônio 0,1 mM, 0,5% de BSA (albumina de soro bovino), 0,4 M de NaCl, aprotinina 2 ng/ml, e fluoreto de



fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,1 mM. O homogenato foi transferido para eppendorfs, centrifugado a 10.000 *rpm* por 10 min, a 4°C, e o sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -80°C para as análises. A proteína total foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Alíquotas de 100 µl das amostras foram utilizadas para mensurar os níveis de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  utilizando kits de ensaio imunoenzimático para citocinas anti-rato (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN), conforme as instruções do fabricante. A absorvância de todas as citocinas foi mensurada em leitor de microplacas nos comprimentos de onda de 450 e 550 nm.

### **Processamento e análise radiográfica**

Para a avaliação radiográfica, foram realizadas radiografias digitais das amostras após a sua remoção com trefina de 10 mm de diâmetro (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba - Paraná) e fixação para análises posteriores. Foi utilizado um sensor radiográfico digital (Digora Optime, Soredex, Alemanha) paralelamente às amostras. As radiografias foram realizadas em equipamento de raios X (Gendex 765DC, Gendex Dental Systems, Inglaterra) sob as seguintes condições: 8mA; 70KVp; distância focal de 30cm; 0,32s de exposição.

A densitometria óssea no local das amostras foi determinada pela análise dos tons de cinza, calculada com o auxílio do *software ImageJ64* (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) que forneceu a média e o desvio padrão dos tons de cinza nessas regiões pré-determinadas por meio da linha de histograma. As imagens foram analisadas duas vezes pelo mesmo observador, previamente calibrado.

### **Análise estatística**

Uma análise descritiva das observações foi realizada para todas as amostras e para todos os grupos estudados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A comparação entre os grupos e a análise estatística de possíveis dados obtidos das observações foi realizada por meio da análise de variância de 2 vias (ANOVA2) e 3 vias (ANOVA3), seguida pelos Tukey e Bonferroni para múltiplas comparações. O nível de significância foi estabelecido como  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no tecido mole**

O teste Anova2 comparando grupos e períodos revelou uma diferença significativa entre os valores de TNF $\alpha$  das amostras coletadas observadas pelo efeito de interação (F=12,9; p<0,05). Considerando os efeitos principais, houve interação entre os períodos (F=8,11; p<0,001), mas não entre os grupos (F=0,3; p>0,05).

A figura 1A apresenta os resultados das dosagens de TNF $\alpha$  no tecido mole adjacente. Pode-se observar que a presença de sinvastatina no defeito ósseo aumentou, significativamente, os níveis de TNF $\alpha$  no período de 1 dia quando comparado ao grupo *naïve* (p<0,05). Já nos períodos de 7 e 15 dias observou-se uma queda nos níveis desta citocina em todos os grupos, com diferença significativa apenas no grupo arcabouço entre os períodos de 1 dia quando comparado a 7 e 15 dias (p<0,05). A sinvastatina, quando associada ao arcabouço, apresentou níveis de TNF $\alpha$  semelhantes ao *naïve*.

Da mesma maneira que para o TNF $\alpha$ , o teste Anova2, comparando grupos e períodos, revelou uma diferença significativa entre as concentrações de IL1 $\beta$  das amostras coletadas observadas pelo efeito de interação (F=14,65; p<0,05). Considerando os efeitos principais, houve interação entre os grupos (F=2,1; p<0,05) e os períodos (F=27,06; p<0,001).

A figura 1B apresenta os achados da avaliação dos níveis de IL1 $\beta$  no tecido mole. A presença do arcabouço sozinho aumentou, significativamente, os níveis desta citocina no período de 1 dia quando comparado com os grupos *naïve* (p<0,001), *sham* (p<0,001), veículo (p<0,001), sinvastatina + arcabouço (p<0,001) e sinvastatina (p<0,01). Da mesma maneira, observou-se uma redução nos níveis de IL1 $\beta$  nos tempos de 7 e 15 dias, entretanto, foi observada diferença significativa nos grupos veículo e arcabouço entre os períodos de 1 dia quando comparados com 7 e 15 dias (p<0,05), e no grupo sinvastatina quando comparados 1 dia com 15 dias.

### **Densitometria óssea**

Para análise da mineralização óssea, obtida por densitometria, os dados foram submetidos a estatística descritiva, média e erro padrão da média (Tabela 1). Na comparação individual entre os grupos pelo teste de Tukey, o grupo tratado apenas com sinvastatina obteve resultado significativamente inferior ao *naïve* e arcabouço (p<0,001). O grupo com arcabouço foi equivalente ao *naïve* e ambos significativamente superiores a todos os grupos (p<0,001). As demais comparações foram equivalentes (Figura 2A). O período de 60 dias foi significativamente

superior a todos os períodos, enquanto que todos os demais foram equivalentes (Figura 2B).

O teste Anova2, comparando grupos e períodos, revelou uma diferença significativa entre os valores de densidade das amostras coletadas observadas pelo efeito de interação ( $F=2,01$ ;  $p<0,001$ ). Considerando os efeitos principais, houve interação entre os grupos ( $F=6,57$ ;  $p<0,001$ ) e os períodos ( $F=8,95$ ;  $p<0,001$ ), mostrando que esses efeitos não podem ser analisados separadamente.

Os valores de densitometria, expressos em graus de cinza, foram superiores e equivalentes entre si nos grupos: *naïve*, nos períodos de 1, 15, 30 e 60 dias; sinvastatina + arcabouço, no período de 60 dias; veículo, no período de 30 e 60 dias; arcabouço em todos os períodos; sham, no período de 1, 15, 30 e 60 dias; e Sinvastatina, no período de 1 dia. Os grupos sinvastatina 15 e 30 dias e o veículo 7 dias são equivalentes entre si e significativamente inferiores aos demais grupos e períodos. Outras comparações entre as médias não mostraram diferenças significantes (Figura 3A).

Devido à possível difusão da sinvastatina, além das comparações citadas anteriormente, foi aplicado o teste ANOVA3 para realizar a comparação entre grupos, períodos e a localização do defeito, uma vez que o lado direito recebeu o tratamento e o lado esquerdo serviu apenas como controle para observar esta interação. Neste caso, foram comparados apenas os grupos com presença de sinvastatina (sinvastatina + arcabouço e sinvastatina sozinha) e os grupos *sham* e *naïve*. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os lados, enquanto que as demais características repetiram os achados demonstrados no teste ANOVA2, exceto com a interação entre grupos *vs* lados, em que houve significância estatística ( $F=8,24$ ;  $p<0,0001$ ). Nesse caso, os dados podem ser mais bem observados nas comparações pelo teste de Tukey e pela figura apresentada (Figura 3B).

## DISCUSSÃO

A descoberta do potencial da sinvastatina como estimulador do processo de osteogênese e formação de novo osso (Mundy et al. 1999) chamou a atenção para a busca de compostos farmacológicos que poderiam regular favoravelmente os fatores de crescimento intrínsecos, como TGF $\beta$ 1 (Liu et al. 2008), BMP-2 (Mundy et al. 1999; Sugiyama et al. 2000; Maeda et al. 2001 e 2004; Ohnaka et al. 2001) e VEGF (Maeda et al. 2001), e associá-los a substitutos osteocondutores para promover a formação de novo osso; pois, até então, a maioria das drogas disponíveis e utilizadas para o tratamento de doenças do tecido ósseo

como os bifosfonatos, estrogênio e calcitonina atuavam inibindo o processo de reabsorção óssea pela redução do *turnover* ósseo (Cremers & Papoulos 2011). Deste modo, o propósito deste estudo foi associar a sinvastatina ao arcabouço de PLGA+HA para combinar suas propriedades osteoindutoras e osteocondutoras.

A mineralização dos defeitos ósseos foi avaliada e, quando as densitometrias dos grupos entre 1 e 60 dias foram comparadas, o tratamento com arcabouços foi semelhante ao *naïve*, indicando que o arcabouço de PLGA+HA atuou efetivamente como osteocondutor para a formação óssea, confirmando estudos prévios que apontam o potencial dos arcabouços de PLGA isoladamente (Gómez et al. 2006; Lansman et al. 2006) ou associados à HA (Sui et al. 2007). Entretanto, a densitometria, neste caso, possivelmente é influenciada pela radiopacidade da HA presente no arcabouço que é lentamente reabsorvida (Legeros & Craig 1993). Neste caso, uma análise histológica daria a formação qualitativa do tecido presente neste grupo.

O uso de sinvastatina sozinha ou associada ao arcabouço mostrou resultados semelhantes ao *sham*, ou seja, a sinvastatina não estimulou a formação óssea. Da mesma maneira, Stein et al. em 2005, mostraram maior crescimento ósseo na associação a um carreador de PLGA, além da presença de um processo inflamatório exacerbado. Os autores avaliaram diferentes dosagens de sinvastatina (0,1, 0,5, 1,0, 1,5, ou 2,2 mg) em gel de metilcelulose, injetada sob o periósteo de mandíbulas de ratos, e mostraram que, reduzindo a dose de 2,2 mg para 0,5 mg, o processo inflamatório não afetou o potencial de crescimento ósseo após 24 dias. Thylin et al. em 2002, aplicaram gel de metilcelulose contendo o 2,2 mg de sinvastatina sob o periósteo da calota craniana de camundongos e relataram aposição óssea após 44 dias, mesmo na presença de inflamação e feridas sobre a pele. Nyan et al. em 2007, utilizaram 1,0 mg de sinvastatina combinada a sulfato de cálcio em defeitos produzidos na calvária de ratos e observaram inflamação dos tecidos sobre a área do defeito da 1<sup>a</sup> a 5<sup>a</sup> semana após o tratamento, sem formação óssea significativa durante este período. Porém, com a resolução da inflamação, houve formação óssea significativamente superior no grupo sinvastatina associada ao sulfato de cálcio após 8 semanas. É importante salientar que a resolutividade do processo inflamatório dá início ao reparo, portanto, nos resultados desses estudos, devemos observar o comportamento dos grupos conforme os períodos analisados, principalmente quando se inicia a formação óssea e não somente sua formação no período final de 60 dias.

O processo de reparo inicia-se com uma fase de reação inflamatória aguda evoluindo para a cura por proliferação celular, deposição de matriz extracelular, mineralização e remodelação óssea (Ho et al. 2011). No período de 1 dia após a cirurgia, os grupos *naïve*, *sham*, arcabouço e sinvastatina foram equivalentes e superiores aos grupos sinvastatina + arcabouço e ao veículo, verificando-se o reflexo imediato da cirurgia e da presença de inflamação aguda. Na análise da densitometria entre os períodos de 1 e 7 dias, observamos uma queda geral na densidade óssea, e esta, mesmo não sendo significativa, é um reflexo da atuação das células clásticas, uma vez que este período é caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório crônico que promove a limpeza do local e a quimiotaxia de células osteogênicas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento, os quais irão promover a revascularização e formação óssea da área que sofreu a injúria tecidual. Este mesmo achado foi observado também no grupo *naïve*, no qual nenhum defeito ósseo foi realizado, mostrando que uma injúria ao tecido mole e o estresse cirúrgico provocam, no animal, uma queda na mineralização óssea adjacente ao trauma. Com 15 dias, houve aumento da densidade óssea nos grupos arcabouço, *naïve* e *sham* de maneira equivalente e significativamente superior aos demais grupos, refletindo o início da mineralização óssea sendo que o grupo sinvastatina foi significativamente inferior aos grupos sinvastatina + arcabouço e veículo, ocorrendo um atraso no início da mineralização óssea. Nos períodos de 15 dias em diante, exceto pela sinvastatina com 30 dias, todos os grupos exibiram crescimento ósseo progressivo na região dos defeitos. No período de 30 dias, os grupos *naïve*, *sham*, veículo e arcabouço, que nesta fase já está parcialmente degradado, foram equivalentes e significativamente superiores aos grupos sinvastatina sozinha e associada ao arcabouço. Entretanto, no período de 60 dias, a mineralização continuou em todos os grupos e, neste momento, foram estatisticamente equivalentes entre si e superiores ao período de 30 dias. Esses achados são semelhantes ao estudo de Nyan et al. em 2007, que observaram um atraso na formação óssea do grupo com sinvastatina, resultado de um intenso processo inflamatório que obteve resolução com 5 semanas e, com 8 semanas, o crescimento ósseo no biomaterial associado à sinvastatina foi, significativamente, superior ao biomaterial isolado no mesmo período.

Neste estudo foi possível observar que no grupo *sham* houve uma diminuição na densidade óssea entre 30 e 60 dias que, mesmo não sendo significativa, pode ser um indicador do processo de remodelação óssea que ocorre após o reparo e a formação do calo ósseo. Este

resultado é esperado pela mineralização que tem início aproximadamente com 15 dias de reparo ósseo e que atinge um pico máximo na formação do calo ósseo e posterior remodelação óssea.

Um dos efeitos pleiotrópicos da sinvastatina é a sua ação anti-inflamatória verificada em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. Essa ação pode ser dependente da inibição da cascata do mevalonato (reduzindo além da produção do colesterol, a síntese de isoprenóides) e, consequente inibição sobre a cascata de adesão leucocitária às células endoteliais e interferência na expressão de  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$  nessas células (Inoue et al. 2000; Romano et al. 2000, Weitz-Schmidt 2002), na síntese de NO,  $NF\kappa\beta$  e proteína C-reativa (Zelvyte et al. 2002). Também foram propostos efeitos independentes desta cascata, pela inibição da ligação de receptores LFA-1 (associada à função dos linfócitos) que é altamente específica para ICAM-1 (molécula de adesão intercelular), inibindo a adesão celular necessária à leucodiapedese (Weitz-Schmidt 2001). Dessa forma, Yamashita et al. em 2008, mostraram que a sinvastatina bloqueou este efeito supressor do  $TNF\alpha$ , permitindo o processo osteogênico. Entretanto, uma alta dosagem de sinvastatina induz processo inflamatório ao redor do local da aplicação. A justificativa para este comportamento da sinvastatina é decorrente de sua citotoxicidade devido à redução drástica da produção de colesterol na região aplicada, substância importante para manter a integridade das membranas celulares (Whang et al. 2005). Para avaliar, neste estudo, se a intensidade e duração do processo inflamatório influenciaria o reparo ósseo, foram coletadas amostras dos tecidos adjacentes à região do defeito ósseo e realizada dosagem de  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ . A sinvastatina e o arcabouço induziram maior expressão dessas citocinas. Os níveis de  $TNF\alpha$  aumentaram na presença de sinvastatina em relação ao *naïve*, entretanto, no grupo onde a sinvastatina estava associada ao arcabouço, a quantidade de  $TNF\alpha$  foi semelhante ao *naïve*. Já a expressão de  $IL1\beta$  foi significativamente superior no grupo do arcabouço quando comparado com os demais grupos no período de 1 dia, inclusive quando o arcabouço estava associado à sinvastatina. A tendência é de que essas citocinas diminuam com o avanço do reparo, o que foi corroborado. Com base nesses achados, sugere-se que o arcabouço pode ter atuado modulando a solubilização da sinvastatina gradativamente, reduzindo o processo inflamatório associado à mesma. Esses resultados associados aos da densitometria, justificam o atraso no início da mineralização no grupo da sinvastatina que só ocorreu com 30 dias. Mukai et al. em 2007, mostraram que o  $TNF\alpha$  suprime a expressão de BMP-2 e de marcadores osteogênicos como Runx2, osteocalcina e fosfatase alcalina.

A sinvastatina, após administração oral, sofre amplo metabolismo na primeira passagem pelo fígado, principal local para sua ação, com subsequente excreção na bile, por isso a disponibilidade da droga à circulação geral é baixa, menor que 5%. Essa característica farmacocinética leva a sua pouca disponibilidade nos tecidos (Wu et al. 2008). Já na administração local, a sinvastatina está em contato direto com os tecidos, sendo parte difundida entre os tecidos adjacentes e parte absorvida pela circulação sanguínea. Nyan et al. em 2009, sugeriram um possível efeito parácrino da sinvastatina ao observarem formação óssea considerável no defeito ósseo contralateral ao defeito preenchido com 0,1 mg de sinvastatina e beta tricálcio fosfato. Dessa forma, foi questionado se sua aplicação local apresentaria algum efeito osteogênico nos tecidos adjacentes ao reparo e, para encontrar esta resposta, foram comparados os grupos e períodos com o lado direito, que recebeu o tratamento, contra o lado esquerdo, que recebeu apenas a confecção do defeito ósseo e foi observado que não houve diferença significativa na densitometria entre os grupos e o controle negativo, exceto pelo grupo sinvastatina associada ao arcabouço, com o lado direito significativamente superior ao lado esquerdo. Esses resultados sugerem que o arcabouço absorveu maior parte da sinvastatina (em contraste ao grupo sinvastatina isolada), reduzindo a quantidade de droga livre para difusão ao defeito contralateral e absorção sistêmica.

A sinvastatina, assim como outros fatores de crescimento, necessita de um carreador para promover sua liberação lenta e gradual (Park 2009), permitindo a indução do estímulo osteogênico local durante períodos prolongados, modulando o processo inflamatório de maneira favorável. Neste estudo, é provável que tenha acontecido uma alta difusão inicial da sinvastatina aos tecidos, que foi desfavorável ao processo de reparo por exacerbar a resposta inflamatória. Isso pode ser devido à concentração da droga ou à sua incorporação ao carreador. Uma avaliação histológica dos tecidos pode contribuir para a confirmação dos testes realizados, avaliando qualitativamente a área de reparo.

Esse estudo mostrou que sinvastatina e arcabouço de PLGA+HA, associados ou não, quando empregados em defeitos de 5 mm produzidos na calota craniana de rato promoveram formação óssea semelhante aos controles com 60 dias de reparo e aumento da expressão de citocinas inflamatórias nos tecidos adjacentes.

## **Agradecimentos**

Esta pesquisa foi financiada pela FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos e pelo CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, programa RHAÉ.

Os autores declaram não existir nenhum conflito de interesse.



## REFERÊNCIAS

- Buser, D., Dula, K., Hess, D., Hirt, H. P. & Belser, U. C. (2000) Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. *Periodontology* 2000, 19, 151-63.
- Calixtro, J. C., Castro-Lima, C. E. V., Frederico, L., Castro-Lima, R. P. S. & Anbinder A. L. (2011) The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 39, 215-220.
- Chiapasco, M., Casentini, P. & Zaniboni, M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24, 237-259.
- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A. J; & Nör, J. E. (2008) Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics*, 34, 962-9.
- Cremers S. & Papapoulos S. (2001) Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*, 49, 42-9.
- Deckers, M. M., Van Bezooijen, R. L., Van Der Horst, G., Hoogendam, J., Van Der Bent, C., Papapoulos, S. E. & Löwik, C. W. (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, 143, 1545-53.
- Gómez, G., Korkiakoski, S., González, M. M., Lansman, S., Ella, V., Salo, T., Kellomaki, M., Ashammakhi, N. & Arnaud, E. (2006) Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17, 935-942.
- Hammerle, C. H. & Karring, T. (1998) Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology* 2000, 17, 151-75.
- Ho, M., Chiang, C., Liu, Y., Kuo, M. Y., Lin, S., Lai, J. & Lee, B. (2011) Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic

acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 1343-51.

Inoue, I., Goto, S., Mizotani, K., Awata, T., Mastunaga, T., Kawai, S., Nakajima T., Hokari, S; Komoda, T. & Katayama S. (2000) Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: Reduction of mRNA levels for interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phlox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in primary endothelial cells. *Life Science*, 67, 863–876.

Lansman, S., Paakko, P., Ryhanen, J., Kellomaki, M., Waris, E., Tormala, P., Waris, T. & Ashmmakhi, N. (2006) Poly-L/D-lactide (PLDLA) fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17, 1121-28.

Legeros, R. Z & Craig R.G. (1993) Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *Journal of Bone Mineralization Research*, 8, 583-96.

Lima, C. E. V. C., Calixtro, J. C. & Anbinder, A. L. (2011) Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Brazilian Oral Research*, 25, 42-8.

Liu, C., Wu, Z., Sun, H. (2009) The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-b1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. *International Journal of Oral Science*, 1, 90-98.

Maciel-Oliveira, N., Bradaschia-Correa, V. & Arana-Chavez V. E. (2011) Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, 112, 170-9.

Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T. & Horiuchi, N. (2001) Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3–E1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 874–877.

Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H. & Horiuchi, N. (2004) Induction of osteoblast differentiation indices by

statins in MC3T3-E1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92, 458–471.

McAllister, B. S. & Haghghat, K. (2007) Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*, 78, 377–396.

Messias, A. D, Aragonés, A, Duek, E. A. R. (2009) PLGA-Hydroxyapatite composite scaffolds for osteoblast-like cells. *Key Engineering Materials*, 396, 461-464.

Mukai T, Otsuka F, Otani H, Yamashita M, Takasugi K, Inagaki K, Yamamura M, Makino H. (2007) TNF-alpha inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18, 1004-10.

Mundy, G., Garrett, R. & Harris, S. (1999) Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 286, 1946–1949.

Nyan, M., Sato, D., Kihara, H., Maschida, T. & Ohya, K. (2009) Effects of the combination with tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clinical of Oral Implants Research*, 20, 280-287.

Nyan, M., Sato, D., Oda, M., Machida, T., Kobayashi, H., Nakamura, T. (2007) Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *Journal of Pharmacological Sciences*, 104, 384-6.

Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., Iwamoto, Y. & Takayanagi, R. (2001) Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 287, 337–342.

Ozeç, I., Kiliç, E., Gümüş, C. & Göze, F. (2007) Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *Journal of Craniofacial Surgery*, 18, 546-50.

Park, J. B. (2009) The use of simvastatin in bone regeneration. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 14, 485-8.

Romano, M., Diomedè, L., Sironi, M., Massimiliano, L., Sottocorno, M., Polentarutti, N., Guglielmotti, A., Albani D., Bruno, A., Fruscella, P.,

Salmona, M., Vecchi, A., Pinza, M. & Mantovani, A. (2000) Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Laboratory Investigation*, 80, 1095–1100.

Sakai, V. T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K. G., Machado, M. A. A. M., Shi, S., Santos, C.F., Nor, J. E. (2010) SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *Journal of Dental Research*, 89, 791-6.

Stein, D., Lee, Y., Schmidt, M. J., Killpack, B., Genrich, M. A. & Narayana, N. (2005) Local simvastatin effects on mandibular growth and inflammation. *Journal Periodontology*, 76, 1861-70.

Sugiyama, O., Dong, S. A., Sam, P. K., Brian, T. F., Gamradt, S., Nancy, Q. L., Irvin, S. Y., Chen, S. Y. & Lieberman, J. R. (2005) Lentivirus-Mediated Gene Transfer Induces Long-Term Transgene Expression of BMP-2 in Vitro and New Bone Formation in Vivo. *Molecular Therapy*, 11, 390-398.

Sui, G., Yang, X., Mei, F., Hu, X., Cheng, G., Deng, X. & Ryu, S. (2007) Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 82, 445–454.

Thylin, M. R., McConnell, J. C., Schmid, M. J., Reckling, R. R., Ojha, J. & Bhattacharyya, I. (2002) Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *Journal of Periodontology*, 73, 1141-8.

Weitz-Schmidt, G. (2001) Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Natural Medicine*, 7, 687–692.

Weitz-Schmidt, G. (2002) Statins as anti-inflammatory agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 482-6.

Whang, K. M., McDonald, J., Khan, A. & Satsangi, N. (2005) A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: synthesis and in vitro release. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 74, 237–46.

Wu, Z., Liu, C., Zang, G. & Sun, H. (2008) The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 37, 170-6.

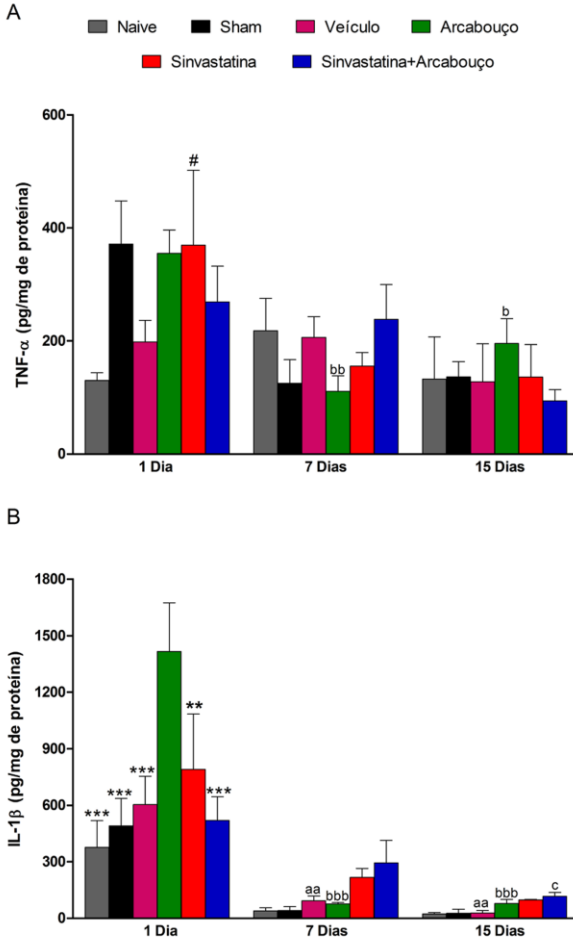
Yamashita, M., Otsuka, F., Mukai, T., Otani, H., Inagaki, K., Miyoshi, T., Goto, J., Yamamura M. & Makino, H. (2008) Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Endocrinology*, 196, 601-613.

Zelvyte, I., Dominaitiene, R., Crisby, M. & Janclauskiene, S. (2002) Modulation of inflammatory mediators and PPAR $\gamma$  and NF $\kappa$ B expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes *in vitro*. *Pharmacological Research*, 45, 147–154.

Zhang, J., Dricu, A. & Sjövall, J. (1997) Studies on the relationships between 7  $\alpha$ -hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 18, 241-9.

## FIGURAS

Figura 1



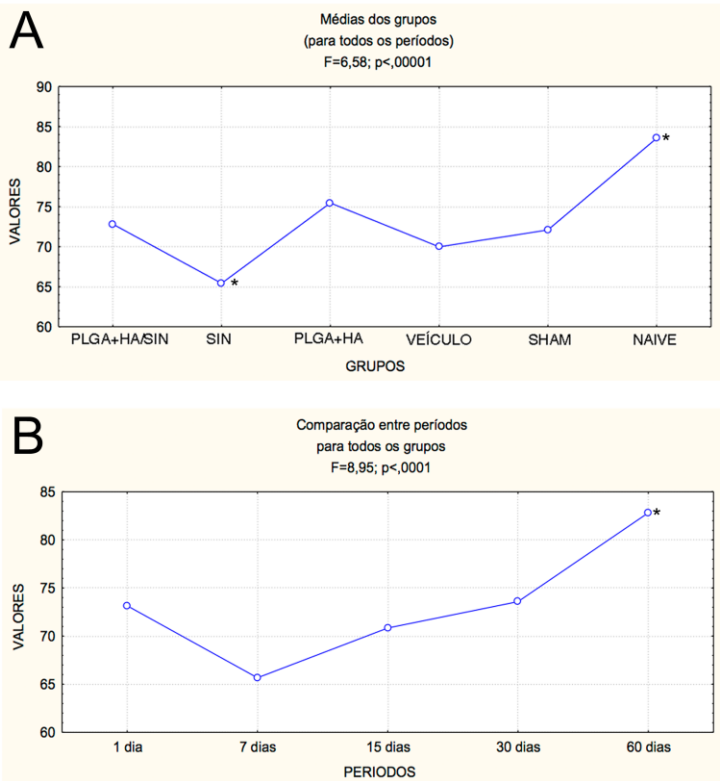
**Figura 1:** Avaliação dos níveis de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  nos tecidos moles nos grupos *naïve*, *sham*, veículo, arcabouço, sinvastatina e sinvastatina + arcabouço, nos tempos de 1, 7 e 15 dias. Valores representados pelas médias de 6 animais por grupo; linhas verticais indicando o desvio padrão. (A) Os níveis de TNF $\alpha$  apresentaram diferença entre os grupos

sinvastatina e *naïve*, #  $p < 0,05$ . Na comparação entre os períodos, observou-se diferença entre os grupos arcabouço 1 dia vs arcabouço 15 dias, b  $p < 0,05$ ; e entre arcabouço 1 dia vs arcabouço 7 dias, bb  $p < 0,01$ . **(B)** Já os níveis de IL1 $\beta$ , apresentaram diferença entre o grupo arcabouço vs todos os outros, \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . Na comparação entre os períodos, apresentou diferença entre arcabouço 1 dia vs arcabouço 7/15 dias, bbb  $p < 0,001$ ; entre veículo 1 dia vs veículo 7/15 dias, aa  $p < 0,01$ ; e, entre sinvastatina+arcabouço 1 dia vs sinvastatina+arcabouço 15 dias, c  $p < 0,05$ .

**Tabela 1** - Distribuição dos grupos em relação aos períodos experimentais e às metodologias realizadas.

<b>Grupo</b>	<b>Materiais</b>	<b>1 dia (n=6)</b>	<b>7 dias (n=6)</b>	<b>15 dias (n=6)</b>	<b>30 dias (n=6)</b>	<b>60 dias (n=6)</b>
<b>A</b>	PLGA+HA/SIN	A1	A2	A3	A4	A5
<b>B</b>	SIN	B1	B2	B3	B4	B5
<b>C</b>	PLGA+HA	C1	C2	C3	C4	C5
<b>D</b>	Veículo	D1	D2	D3	D4	D5
<b>E</b>	“Falso Operado” ( <i>Sham</i> )	E1	E2	E3	E4	E5
<b>F</b>	“Controle” ( <i>Naïve</i> )	F1	F2	F3	F4	F5

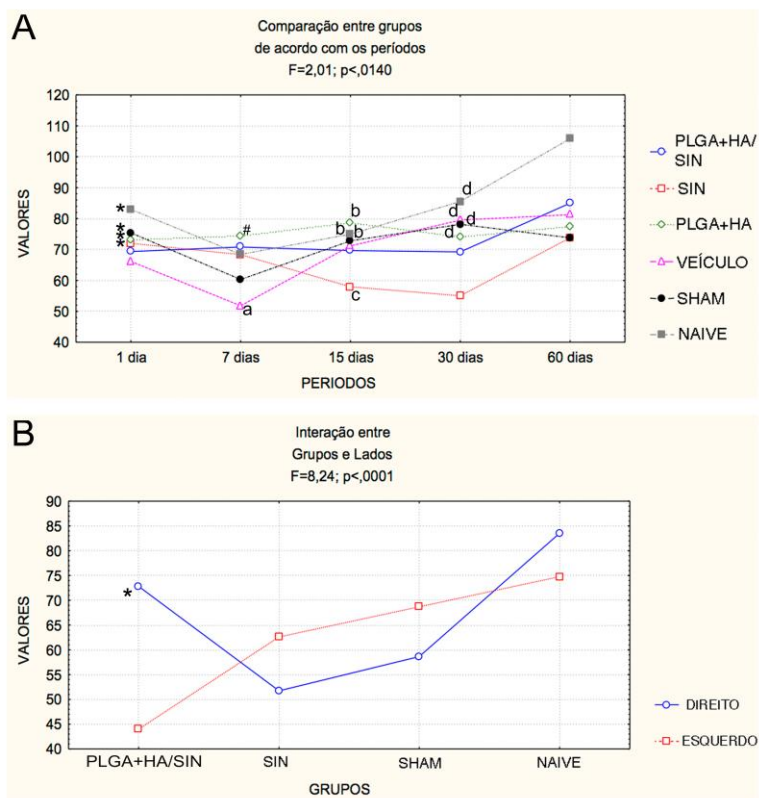
Figura 2



**Figura 2:** Análise da densitometria. Em **A** e **B**, são mostrados os gráficos para as comparações individuais da densitometria pelo teste de Tukey. Das diferenças entre os grupos, em **A**: o grupo sinvastatina apresentou resultado, significativamente inferior à *naïve* e arcabouço (\* $p < 0,0001$ ); *naïve* equivalente a arcabouço e superior a todos os grupos (\* $p < 0,0001$ ); as demais comparações são equivalentes. Das diferenças entre os períodos, em **B**: o período de 60 dias foi, significativamente, superior a todos os períodos (\* $p < 0,0001$ ), os demais são equivalentes.



Figura 3



**Figura 3** – Análise da densitometria. Em **A**, encontra-se a análise de comparação entre os grupos experimentais, de acordo com os grupos e períodos analisados, ANOVA 2. Nesta comparação, observamos no período de 1 dia que os grupos *naïve*, *sham*, arcabouço e sinvastatina foram equivalentes e superiores aos grupos sinvastatina + arcabouço e ao veículo (\*p<0,01); no período de 7 dias, o grupo arcabouço foi significativamente superior a todos os grupos (#p<0,01) e o grupo veículo, inferior aos demais (a p<0,01). Com 15 dias, os grupos arcabouço, *naïve* e *sham* foram equivalentes e, significativamente, superiores aos demais grupos (b p<0,01), e, a sinvastatina foi, significativamente, inferior aos demais grupos (c p<0,01). No período de 30 dias, os grupos *naïve*, veículo, *sham* e arcabouço (d p<0,01), foram equivalentes e significativamente superiores aos grupos sinvastatina sozinha e associada ao arcabouço. Já no período de 60 dias, todos os

grupos foram estatisticamente equivalentes entre si. Em **B**, os resultados do teste de análise de variância a três critérios (ANOVA3), para comparação entre os grupos experimentais, de acordo com os grupos, períodos e lados analisados. Nesta comparação, o grupo sinvastatina + arcabouço do lado direito foi, significativamente, superior ao sinvastatina + arcabouço esquerdo (\*  $p < 0,01$ ).

***ARTICLE IN ENGLISH***

The following manuscript has been formatted in accordance with the Writing Guidelines of the periodical *The Journal of Clinical Periodontology*.

## **ANALYSIS OF BONE REPAIR AND INFLAMMATORY PROCESS CAUSED BY SIMVASTATIN COMBINED WITH PLGA+HA SCAFFOLD**

Isis Carvalho Encarnação <sup>(1)</sup>

Águedo Aragones <sup>(2)</sup>

Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro <sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup>Master's student in Implant Dentistry at the Federal University of Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brazil. (isisencarnacao@hotmail.com)

<sup>(2)</sup>Post-doctorate student in Implant Dentistry at the Federal University of Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brazil. (aguedo@terra.com.br)

<sup>(3)</sup>Professor of the Graduate Program of Dentistry at the Federal University of Santa Catarina – UFSC – Florianópolis – Santa Catarina – Brazil. (m.cordeiro@ufsc.br)

**Brief title:** Bone repair with simvastatin and PLGA+HA

**Key-words:** bone repair, simvastatin, scaffold, PLGA+HA, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , osteogenesis.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the tissue and inflammatory responses to the use of simvastatin combined with PLGA+HA scaffold for bone repair. Two defects of 5mm in diameter were made in the calvaria of 180 rats, which were divided into 6 groups: naive, sham, vehicle, HA+PLGA scaffold, simvastatin (4 mg/ml), and a combination of simvastatin with scaffold. Tissue samples were collected at intervals of 1, 7, 15, 30, and 60 days following surgery. Data were statistically analyzed using ANOVA followed by post-hoc tests ( $p < 0.05$ ). Inflammatory activity was evaluated by IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  quantification. There was an increased cytokine expression in the scaffold and simvastatin groups ( $p < 0,001$  and  $p < 0,05$ , respectively) one day after surgery. Bone repair was evaluated using densitometry on the bone tissue samples and it was found that 60 days after surgery all groups presented similar densitometry values, despite the occurrence of bone formation delay in the simvastatin group ( $p < 0.01$ ). It can be concluded that the use of simvastatin and PLGA+HA scaffold, isolated or combined, did not lead to improvement in bone repair compared to controls.

## CLINICAL RELEVANCE

The osteogenic effect of local use of simvastatin on bone repair has been previously investigated. Although the combination of simvastatin with scaffolds possesses considerable potential for enhancing bone formation, there are no studies evaluating the association of this substance with PLGA and hydroxyapatite, a component of bone tissue. In the present study, improvement in bone formation was not observed when using simvastatin and scaffold, either combined or not, in comparison to controls and, furthermore, an increase in inflammatory cytokine expression was verified in the initial repair periods. These findings indicate the importance of evaluating the repair process from the beginning until the final stage of mineralization, and also that there are factors that may be manipulated in order to optimize the osteogenic effects of simvastatin on these scaffolds.

## INTRODUCTION

In dentistry, bone reconstruction procedures are necessary for the rehabilitation of edentulous patients with atrophic alveolar ridges (Chiapasco et al. 2009). The need of a donating area for such reconstruction remains a challenge even today, since though the use of autogeneous bone graft would be ideal, the limited quantity of autogeneous material available associated with high morbidity rates and local complications represent considerable obstacles (McAllister & Haghghat 2007). This fact has encouraged research in the field of tissue engineering, based on the development of alternative solutions to autogeneous bone graft, such as the use of scaffolds, growth factors and stem cells (Hämmerle & Karring 1998; Buser et al. 2000; Cordeiro et al. 2008; Sakai et al. 2010).

Simvastatin is a statin that possesses, among several pleiotropic effects, an osteogenic effect, demonstrated by up-regulation of TGF $\beta$ 1, BMP-2, and VEGF expressions, when administered locally and subsequently, leading to an increase in the expression of osteogenic markers such as type I collagen, osteocalcin, bone sialoprotein, and alkaline phosphatase (Mundy et al. 1999; Deckers et al. 2000; Sugiyama et al. 2000; Ohnaka et al. 2001; Maeda et al. 2001 and 2004; Liu et al. 2008; Yamashita et al. 2008; Maciel-Oliveira et al. 2011), serving to the search for pharmacological compounds capable of favorably regulating intrinsic growth factors to stimulate osteogenesis and associating to osteoconductive substitutes. Additionally, its use requires lower costs than gene therapy or using growth factors, the risks are lower, while the effectiveness of bone regeneration is not compromised.

Recent studies have tested the effect of local application of simvastatin combined with different carriers, and have demonstrated its potential in stimulating bone formation (Ozec et al. 2008, Wu et al. 2008, Nyan et al. 2007 and 2009, Ho et al. 2011). However, consensus regarding the ideal carrier for simvastatin has not been reached and as such further studies are necessary. Polymers, such as PLGA, are scaffolds that have been considerably studied in tissue engineering as a result of their excellent physiochemical and biological properties, biocompatibility, varying rates of degradation, easy absorption, control of macro and microstructure, and incorporation and substantive liberation of proteins (Gómez et al. 2006; Lansman et al. 2006). According to Sui et al., in 2007, and Messias et al., in 2009, the addition of HA to the polymer (PLGA+HA), combining the physical characteristics of the polymer with the chemical characteristics of HA, allowed for increased

osteoplastic growth, cell adhesion, and collagen synthesis when compared to PLGA scaffolds without HA. This difference appears to be related to cell type, as HA is a component of bone tissue, and, accordingly, possesses greater affinity with osteoblasts (SUI, et al., 2007). Despite this, there is a lack of studies evaluating the association between simvastatin and PLGA+HA scaffold.

Compared to the promising results presented by the association of simvastatin with polymeric scaffolds in bone repair as an alternative to autogenous bone graft, it is questioned if the presence of HA in the scaffold could improve the effectiveness of the material, accelerating repair process, as its osteoconductive properties may increase the benefits of the PLGA scaffold. Additionally, the effect of simvastatin remains controversial due to the exacerbation of the inflammatory process. Therefore, the objective of this study was to evaluate, *in vivo*, the osteoinductive capacity of simvastatin in PLGA+HA scaffolds and the inflammatory reactions associated with its use.

## MATERIALS AND METHODS

This research project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Santa Catarina (UFSC), protocol number PP00689.

A total of 180 adult (aged between 20 and 24 weeks) rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), weighing approximately 180g, were used in the study. The animals were divided into six groups: naive, sham, vehicle, scaffold, simvastatin and simvastatin with scaffold, using experiment measurement points of one, seven, 15, 30 and 60 days, to evaluate the initial acute and chronic inflammatory response, and also from the beginning until maturation of the bone mineralization process. The animals were kept under similar conditions, in a room with a controlled temperature of 22°C +/- 2°C, humidity of 60% +/- 5%, and a light/dark cycle of 12/12h. The rats were fed (*ad libitum*) with a standard solid diet and water. Experiments were performed following a three day acclimatization period.

### **Obtainment and preparation of PLGA+HA scaffold**

The scaffolds were produced with copolymer of polylactic co-glycolic acid associated with hydroxyapatite (HA + PLGA), and then obtained using the solvent evaporation technique. The copolymer of polylactic co-glycolic acid (PLGA) (Resomer, Evonik Ind., Essen - Germany), in a proportion of 82:18 (m:m), was dissolved in PA chloroform (ChCl<sub>3</sub> – Synth – LabSynth, Diadema, Sao Paulo - Brazil)



(10% m/v), at room temperature. Once the polymer was completely dissolved, saccharose particles were added (Microbiology – Merck, Darmstadt, Germany) (75% m/v) with granulation inferior to 500  $\mu\text{m}$ , in addition to 50  $\mu\text{m}$  of hydroxyapatite particles (30% m/v) (Genphos Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brazil). This solution was poured into 5mm diameter cylindrical molds. Following the evaporation of the solvent, the saccharose was removed using polyvinyl alcohol PS (( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ) $_n$ , Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro). The material was sectioned using a blade to obtain samples with a thickness of 1mm to be placed on the bone defects created in the calvaria of the rats. The scaffolds were sterilized using gamma radiation.

### **Simvastatin Preparation**

The simvastatin was solubilized in a concentration of 6 mg/ml, with 1:1 solution of ethanol alcohol (Álcool Etílico PA, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro) and PBS (pH7.4). From this “mother” solution 33  $\mu\text{l}$  were removed and 17  $\mu\text{l}$  of PBS was added to obtain in 50  $\mu\text{l}$ , 0.2 mg of simvastatin (4 mg/ml), which were applied to the PLGA+HA scaffolds prior to their insertion, or directly upon the bone defect in groups which were tested in isolation. One group received only vehicle, to evaluate possible ethanol interference (33% buffered solution).

### **Surgical intervention**

The animals were anaesthetized through intraperitoneal injection of a combination of 90 mg/kg of ketamine hydrochloride 10% (Ketamine, Syntec, Cotia – Sao Paulo) and 10 mg/kg hydrochloride of xylazine 2% (Xilazine, Syntec, Cotia – Sao Paulo). The dorsal part of the cranium was shaved and aseptically prepared with cotton dipped in iodopovidine solution (Povidine, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo), with the animal positioned prone on the surgical table and attached to three fixed points with the help of a stereotactic table.

The surgical technique previously described in literature was performed (Thylin et al. 2002; Nyan et al. 2007 and 2009; Calixtro et al. 2011; Lima et al. 2011). A cutaneous muscular incision of 15 to 20 mm in length was made in the superior part of the skull along the sagittal suture, using a scalpel and blade n° 15 (Swann-Morton® Surgical Blades, England). The skin and the subcutaneous tissues were reflected and the underlying tissue divulsed using small blunt scissors and dissecting calipers until the periosteum was exposed, which was incised, allowing the exposure of the parietal bones.

The bone defects were performed, one in each parietal bone, alongside the sagittal suture (right and left side), using a 5mm trephine drill (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba - Parana) with constant irrigation with a saline solution to avoid overheating of the bone walls. This procedure was performed with considerable delicacy to avoid dura-mater damage. In all the animals, the experimental groups (PLGA+HA/SIN, PLGA+HA or SIN) were implanted in the defect on the right side and the left side served as an internal control to observe if the simvastatin used to fill the defect influenced the repair contra laterally. The naive group served as a parameter for comparison, being of normal condition. The periosteum and the subcutaneous tissue were repositioned and stitched with stitching thread Vicril 4.0 (Ethicon, Johnson&Johnson Company, SP, Brazil) and the cutaneous tissue with Nylon 5.0 thread (Ethicon, Johnson&Johnson Company, SP, Brazil). The animals were monitored daily for surgery follow-up and treatment of complications.

### **Sample retrieval**

To evaluate the bone defects immediately after surgery, together with bone formation and defect remodeling, and then again one, seven, 15, 30 or 60 days following surgery, samples of soft tissue around the area of the bone defect were removed to analyze cytokines. Immediately afterwards, the region of the parietal bones was dissected, permitting the collection of bone samples with a 10mm diameter trephine drill, for analysis by X-ray.

### **Cytokine quantification by ELISA**

To investigate the level of pro-inflammatory cytokine expression present in the soft tissue adjacent to the bone defect, this tissue was removed, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for later use.

The collected tissue was cut into smaller pieces and homogenized in a tissue processor (Ultra-Turrax IKA T18 basic, IKA<sup>®</sup>, Germany) in a fixed volume of 1.6 ml of PBS cytokine buffer solution (saline-phosphate buffer solution) containing Tween 20 (0.05%), EDTA 10 mM, 0.1 mM of benzethonium chloride, 0.5% of BSA (bovine serum albumin), 0.4 M of NaCl, 2 ng/ml of aprotinin, and 0.1 mM of fluoride phenylmethylsulfonyl (PMSF). The homogenate was transferred to an eppendorf tube, centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, at 4°C, and the ensuing supernatant collected and stored at -80°C for analysis. Total protein was quantified using the Bradford (1976) method. Aliquots of 100 µl of the samples were used to measure levels of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  using Enzyme-linked immunosorbent assay kits for anti-rat

cytokines (ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN), in accordance with the manufacturer's instructions. The absorbance of the cytokines was measured in a microplate reader at a wavelength of 450 and 550 nm.

### **Processing and radiographic analysis**

To perform radiographic evaluation, digital radiographs of the samples were taken following their removal with a 10mm diameter trephine (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba - Paraná) and fixation. A radiographic digital sensor was used (Digora Optime, Soredex, Germany) parallel to the samples. The radiographs were performed using X ray equipment (Gendex 765DC, Gendex Dental Systems, England) under the following conditions: 8mA; 70KVp; 30cm focal distance 30cm; 0.32s of exposure. Bone densitometry in the area of the samples was determined for analysis by grayscale, calculated using software ImageJ64 (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) which supplied the average and standard deviance of grayscale in pre-determined regions through line histogram. The images were analyzed twice by the same calibrated observer.

### **Statistical Analysis**

A descriptive analysis of the observations was performed for all samples and study groups. The results were presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Comparison between groups and statistical analysis of possible data obtained from the observations was performed using 2-way analysis of variance (ANOVA2) and 3-way analysis of variance (ANOVA3), followed by Tukey and Bonferroni tests for multiple comparisons. Level of significance was established as  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Evaluation of pro-inflammatory cytokine levels in soft tissue**

Anova2 test comparing groups and periods revealed significant difference between the TNF $\alpha$  values of the samples, observed by interaction effect ( $F=12.9$ ;  $p < 0.05$ ). When the principal effects were considered there was interaction between periods ( $F=8.11$ ;  $p < 0.001$ ), but not between groups ( $F=0.3$ ;  $p > 0.05$ ).

Figure 1A shows the results of TNF $\alpha$  dosages on the adjacent soft tissue. It can be observed that the presence of simvastatin significantly increased the levels of TNF $\alpha$  after one day following surgery when compared to the naive group ( $p < 0.05$ ). After seven and 15 days there was a fall in cytokine levels in all groups, with significant difference

only in the scaffold group between the one day period and the seven and 15 day periods ( $p < 0.05$ ). Simvastatin, when combined with scaffold, had TNF $\alpha$  levels similar to the naive group.

Similarly to TNF $\alpha$ , the Anova2 test comparing groups and periods revealed significant difference between IL1 $\beta$  expression levels, observed by interaction effect ( $F=14.65$ ;  $p < 0.05$ ). Considering the principal effects, there was interaction between groups ( $F=2.1$ ;  $p < 0.05$ ) and periods ( $F=27.06$ ;  $p < 0.001$ ).

Figure 1B shows the results of an evaluation of levels of IL1 $\beta$  in soft tissue. The presence of scaffold only increased, significantly, the levels of this cytokine during the one day period when compared to naive ( $p < 0.001$ ), sham ( $p < 0.001$ ), vehicle ( $p < 0.001$ ), simvastatin + scaffold ( $p < 0.001$ ) and simvastatin ( $p < 0.01$ ). In the same way, a reduction in IL1 $\beta$  levels was observed after seven and 15 days, however, a significant difference was observed in the vehicle and scaffold groups after one day when compared to the seven and 15 day periods ( $p < 0.05$ ), and the simvastatin group when the results after one day and 15 days were compared.

### **Bone densitometry**

To analyze bone mineralization, obtained by densitometry, data was submitted to descriptive statistics, mean and standard error of mean (Table 1). In an individual comparison of groups using Tukey's test, the group treated with simvastatin only obtained a result significantly inferior to the naive and scaffold groups ( $p < 0.001$ ). The scaffold group was equivalent to the naive and both of these were significantly superior to all other groups ( $p < 0.001$ ). The other groups were equivalent (Figure 2A). The 60 day period was significantly superior to all other periods, while the other time points were equivalent (Figure 2E).

The Anova2 test, comparing groups and periods, revealed a significant difference between density values of the collected samples by interaction effect ( $F=2.01$ ;  $p < 0.001$ ). Considering the principal effects, there was interaction between groups ( $F=6.57$ ;  $p < 0.001$ ) and periods ( $F=8.95$ ;  $p < 0.001$ ), demonstrating that these effects cannot be analyzed separately.

Densitometry values, expressed in grayscale, were superior and equivalent among each other in the following groups: naive, after one, 15, 30 and 60 days; simvastatin + scaffold, after 60 days; vehicle, after 30 and 60 days; scaffold during all periods; sham, after one, 15, 30 and 60 days; and simvastatin, after one day. The simvastatin groups after 15 and 30 days and the vehicle group after seven days were equivalent and

significantly inferior to other groups and periods. Other comparisons between means did not find significant differences (Figure 3A).

Due to possible simvastatin diffusion, in addition to the aforementioned comparisons, ANOVA3 testing was performed between groups, periods and defect location, since the right side had received treatment while the left side served only as a control to observe interaction. In this case, only groups with the presence of simvastatin (simvastatin + scaffold and simvastatin only) and the sham and naive groups were compared. The results found that there was no significant difference between the two sides, while the remaining characteristics repeated the findings revealed during ANOVA2 testing, except for the interaction between groups vs. sides, in which there was statistical significance ( $F=8.24$ ;  $p<0.0001$ ). In this case, the data can be observed more clearly using Tukey's test (Figure 3B).

## DISCUSSION

The discovery of the potential of simvastatin as a stimulant in the osteogenic process and the formation of new bone (Mundy et al. 1999) highlighted the importance of the search for pharmacological composites that could favorably regulate intrinsic growth factors, such as TGF $\beta$ 1 (Liu et al. 2008), BMP-2 (Mundy et al. 1999; Sugiyama et al. 2000; Maeda et al. 2001 and 2004; Ohnaka et al. 2001) and VEGF (Maeda et al. 2001), and combined them with substitute osteoconductors to promote the formation of new bone; as, until then, the majority of drugs available and utilized for the treatment of bone tissue disease, such as bisphosphonates, estrogen and calcitonin inhibited the process of bone reabsorption by reducing bone turnover (Cremers & Papoulos 2011). Therefore, the objective of this study was to combine simvastatin with a PLGA+HA scaffold to blend their osteoinductor and osteoconductor properties.

Mineralization of bone defects was evaluated and, when the densitometry of the groups during the period from one to 60 days was compared, the treatment with scaffold was similar to the naive group, indicating that the PLGA+HA scaffold performs effectively as an osteoconductor for bone formation, confirming previous studies that pointed to the potential of PLGA scaffolds either acting singly (Gómez et al. 2006; Lansman et al. 2006) or together with HA (Sui et al. 2007). However, densitometry, in this case, is possibly influenced by the radiopacity of HA present in the scaffold, which is slowly resorbed (Legeros & Craig 1993). In this case, a histological analysis would provide the qualitative formation of tissue present in this group.

The use of simvastatin, either alone or combined with the scaffold, provided results that were similar to the sham group, or in other words, simvastatin did not stimulate bone formation. Similarly, Stein et al., in 2005, found that increased bone growth was associated with a PLGA carrier, as well as revealing exacerbated inflammatory presence. The authors evaluated varying dosages of simvastatin (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, or 2.2 mg) in methylcellulose gel, injected under the periosteum of the jaw of rats, and found that when the dose was reduced from 2.2mg to 0.5mg, the inflammatory process did not affect bone growth potential after 24 days. Thylin et al., in 2002, applied methylcellulose gel containing 2.2mg of simvastatin under the periosteum of the skullcap of mice and revealed apposition after 44 days, as well as the presence of inflammation and skin lesions. Nyan et al. in 2007, used 1.0 mg of simvastatin combined with calcium sulfate in produced defects in the skullcap of rats and observed tissue inflammation around the defect area from the 1<sup>st</sup> to the 5<sup>th</sup> week after treatment, without significant bone formation during this period. However, when the inflammation was concluded, there was significant bone formation in the simvastatin associated with calcium sulfate after eight weeks. It is important to remember that the resolvability of the inflammatory process represents the beginning of the repair, however, in the results of these studies, it was decided to observe the behavior of the animal groups during bone formation, and particularly when bone formation began, and not only during its formation in the final 60 day period.

The repair process begins with a phase of acute inflammatory reaction to heal cell proliferation, deposition of extracellular matrix, mineralization and bone remodeling (Ho et al. 2011). One day following surgery, the naive, sham, scaffold and simvastatin groups were equivalent, and superior to the simvastatin + scaffold and vehicle groups, verifying the immediate reflex to the surgery and the presence of acute inflammation. In the densitometry analysis during the period of between one and seven days, a general reduction in bone density was observed. This, while not being significant, is a reflex of the action of the clastic cells, as this period is characterized by the presence of chronic infiltrated inflammation which leads to cleaning of the area and the chemotaxis of osteogenic cells through the liberation of pro-inflammatory cytokines and growth factors, which encourage revascularization and bone formation of the area which suffered tissue injury. This same finding was observed in the naive group, in which no bone defect had been created, showing that an injury to soft tissue and surgical stress led to, in the animal, a reduction in bone mineralization around the trauma. After

15 days, there was an equivalent increase in bone density in the scaffold, naive and sham groups that was significantly superior to the other groups, reflecting the beginning of bone mineralization, as the simvastatin group was significantly inferior to the simvastatin + scaffold and vehicle groups, as a result of a delay to the commencement of bone mineralization. During the periods of 15 days and after, other than for the simvastatin after 30 days, all of the groups exhibited progressive bone growth in the defect region. In the 30 day period, the naive, sham, vehicle and scaffold groups, which were already partially degraded by this phase, were equivalent, and significantly superior to the solely simvastatin and simvastatin combined with scaffold groups. However, in the 60 day period, mineralization continued in all groups which, at this time, were statistically equivalent among themselves and superior to the 30 day period. These findings are similar to the study by Nyan et al. in 2007, which observed a delay in bone formation in the simvastatin group, the result of an intense inflammatory process which was resolved after 5 weeks, and after 8 weeks, bone growth in biomaterial associated to simvastatin was, significantly, superior to isolated biomaterial in the same period.

In this study it could be seen that the sham group presented a reduction in bone density between 30 and 60 days which, while not being significant, could be an indicator of the bone remodeling process that occurred after repair and formation of bone callus. This result is predicted by the mineralization process which begins with approximately 15 days of bone repair, reaching its peak with the formation of bone calo and posterior bone remodeling.

One of the pleiotropic effects of simvastatin is its anti-inflammatory action, which has been verified by a number of *in vitro* and *in vivo* studies. This action is dependent on the inhibition of the mevalonate cascade (reducing not just cholesterol production but also the synthesis of isoprenoids) and, consequently, inhibition of cascade of leukocyte adhesion to endothelial cells and interference in the expression of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  in these cells (Inoue et al. 2000; Romano et al. 2000, Weitz-Schmidt 2002), and in the synthesis of NO, NF $\kappa$ B and C-reactive protein (Zelvyte et al. 2002). There were also proposed independent effects associated with this cascade, by the inhibition of receptor binding LFA-1 (associated with lymphocyte function), which is highly specific for ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), inhibiting cell adhesion necessary for leucodiapedesis (Weitz-Schmidt 2001). Similarly, Yamashita et al. in 2008, observed that simvastatin blocked the suppressor effect of TNF $\alpha$ , allowing the osteogenic process to proceed.

However, a high dosage of simvastatin induces an inflammatory process around the area of application. The justification for this behavior by the simvastatin is a result of its cytotoxicity due to the drastic reduction in cholesterol production in the region, which is an important substance for maintaining the integrity of the cell membranes (Whang et al. 2005). In the present study, in order to evaluate if the intensity and duration of the inflammatory process influenced bone repair, samples were taken of tissue adjacent to the bone defect region and TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  dosage was performed. The simvastatin and the scaffold resulted in increased expression of these cytokines. The levels of TNF $\alpha$  increased in the presence of simvastatin in relation to the naive group, however, in the group where simvastatin was associated with scaffold, the quantity of TNF $\alpha$  was similar to naive. The expression of IL1 $\beta$  was significantly higher in the scaffold group when compared with other groups in the 1 day period, including when the scaffold was combined with simvastatin. The tendency that these cytokines diminish with the advance of the repair was corroborated. Based on these findings, it is suggested that the scaffold may gradually modulate the solubilization of the simvastatin, reducing the associated inflammatory process. These results, combined with densitometry, justify the delay in the mineralization of the simvastatin group, which does not occur until 30 days after surgery. Mukai et al. in 2007, found that TNF $\alpha$  suppresses the expression of BMP-2 and of osteogenic markers such as Runx2, osteocalcin and alkaline phosphatase.

Simvastatin, following oral administration, undergoes extensive metabolism on its first passage through the liver, the main location for its activity, with subsequent excretion in bile. For this reason the availability of the drug in general circulation is low (less than 5%). This pharmacokinetic characteristic leads to the drug's limited availability in the tissues (Wu et al. 2008). When administered locally, simvastatin is in direct contact with tissues, being partly spread between the adjacent tissues and partly absorbed by blood circulation. Nyan et al. in 2009, suggested the possible paracrine effect of simvastatin, observing considerable bone formation in the bone defect contralateral to a defect filled with 0.1 mg of simvastatin and beta tricalcium phosphate. In this way, it was questioned whether its local application had an osteogenic effect on tissue adjacent to the repair and, to obtain an answer, groups and time periods from the right side, which received treatment, were compared with groups and time periods from the left side, which received only the produced bone defect. It was observed that there was no significant difference between the densitometry of the groups and the



negative control, except for the simvastatin combined with scaffold group, where the right side was significantly superior to the left side. These results suggest that the scaffold absorbs the majority of the simvastatin (in contrast to the isolated simvastatin group), reducing the quantity of the drug free for diffusion in the contralateral defect and systemic absorption.

Simvastatin, similar to other growth factors, requires a carrier to control its slow, gradual liberation (Park 2009), permitting the induction of osteogenic stimulation over prolonged periods, modulating the inflammatory process in a favorable manner. In this study, it is likely that a high initial diffusion of simvastatin among tissue occurred, which was unfavorable to the repair process as it exacerbated the inflammatory reaction. This may be due to the concentration of the drug or its incorporation in the carrier. A histological evaluation of tissue may contribute to the confirmation of tests carried out, qualitatively evaluating the repair area.

This study found that simvastatin and PLGA+HA scaffolds, combined or not, when employed in manufactured 5mm bone defects in the skullcaps of rats led to bone formation similar to control groups up to 60 days following repair and caused an increase in the expression of inflammatory cytokines in adjacent tissue.

### **Acknowledgements**

This study was supported by FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos and by CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, RHAÉ Program.

The authors declare that no conflict of interest exists.

## REFERENCES

- Buser, D., Dula, K., Hess, D., Hirt, H. P. & Belser, U. C. (2000) Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. *Periodontology* 2000, 19, 151-63.
- Calixtro, J. C., Castro-Lima, C. E. V., Frederico, L., Castro-Lima, R. P. S. & Anbinder A. L. (2011) The influence of local administration of simvastatin in calvarial bone healing in rats. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 39, 215-220.
- Chiapasco, M., Casentini, P. & Zaniboni, M. (2009) Bone augmentation procedures in implant dentistry. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 24, 237-259.
- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A. J; & Nör, J. E. (2008) Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics*, 34, 962-9.
- Cremers S. & Papapoulos S. (2001) Pharmacology of bisphosphonates. *Bone*, 49, 42-9.
- Deckers, M. M., Van Bezooijen, R. L., Van Der Horst, G., Hoogendam, J., Van Der Bent, C., Papapoulos, S. E. & Löwik, C. W. (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, 143, 1545-53.
- Gómez, G., Korkiakoski, S., González, M. M., Lansman, S., Ella, V., Salo, T., Kellomaki, M., Ashammakhi, N. & Arnaud, E. (2006) Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17, 935-942.
- Hammerle, C. H. & Karring, T. (1998) Guided bone regeneration at oral implant sites. *Periodontology* 2000, 17, 151-75.
- Ho, M., Chiang, C., Liu, Y., Kuo, M. Y., Lin, S., Lai, J. & Lee, B. (2011) Highly efficient release of lovastatin from poly(lactic-co-glycolic

acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 1343-51.

Inoue, I., Goto, S., Mizotani, K., Awata, T., Mastunaga, T., Kawai, S., Nakajima T., Hokari, S; Komoda, T. & Katayama S. (2000) Lipophilic HMG-CoA reductase inhibitor has an anti-inflammatory effect: Reduction of mRNA levels for interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, cyclooxygenase-2, and p22phox by regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) in primary endothelial cells. *Life Science*, 67, 863–876.

Lansman, S., Paakko, P., Ryhanen, J., Kellomaki, M., Waris, E., Tormala, P., Waris, T. & Ashmmakhi, N. (2006) Poly-L/D-lactide (PLDLA) fibrous implants: histological evaluation in the subcuts of experimental design. *Journal of Craniofacial Surgery*, 17, 1121-28.

Legeros, R. Z & Craig R.G. (1993) Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *Journal of Bone Mineralization Research*, 8, 583-96.

Lima, C. E. V. C., Calixtro, J. C. & Anbinder, A. L. (2011) Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. *Brazilian Oral Research*, 25, 42-8.

Liu, C., Wu, Z., Sun, H. (2009) The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-b1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. *International Journal of Oral Science*, 1, 90-98.

Maciel-Oliveira, N., Bradaschia-Correa, V. & Arana-Chavez V. E. (2011) Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics*, 112, 170-9.

Maeda, T., Matsunuma, A., Kawane, T. & Horiuchi, N. (2001) Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3–E1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280, 874–877.

Maeda, T., Matsunuma, A., Kurahashi, I., Yanagawa, T., Yoshida, H. & Horiuchi, N. (2004) Induction of osteoblast differentiation indices by

statins in MC3T3-E1 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92, 458–471.

McAllister, B. S. & Haghghat, K. (2007) Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*, 78, 377–396.

Messias, A. D, Aragones, A, Duek, E. A. R. (2009) PLGA-Hydroxyapatite composite scaffolds for osteoblast-like cells. *Key Engineering Materials*, 396, 461-464.

Mukai T, Otsuka F, Otani H, Yamashita M, Takasugi K, Inagaki K, Yamamura M, Makino H. (2007) TNF-alpha inhibits BMP-induced osteoblast differentiation through activating SAPK/JNK signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 18, 1004-10.

Mundy, G., Garrett, R. & Harris, S. (1999) Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 286, 1946–1949.

Nyan, M., Sato, D., Kihara, H., Maschida, T. & Ohya, K. (2009) Effects of the combination with tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clinical of Oral Implants Research*, 20, 280-287.

Nyan, M., Sato, D., Oda, M., Machida, T., Kobayashi, H., Nakamura, T. (2007) Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *Journal of Pharmacological Sciences*, 104, 384-6.

Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., Iwamoto, Y. & Takayanagi, R. (2001) Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 287, 337–342.

Ozeç, I., Kiliç, E., Gümüş, C. & Göze, F. (2007) Effect of local simvastatin application on mandibular defects. *Journal of Craniofacial Surgery*, 18, 546-50.

Park, J. B. (2009) The use of simvastatin in bone regeneration. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 14, 485-8.

Romano, M., Diomedè, L., Sironi, M., Massimiliano, L., Sottocorno, M., Polentarutti, N., Guglielmotti, A., Albani D., Bruno, A., Fruscella, P.,

- Salmona, M., Vecchi, A., Pinza, M. & Mantovani, A. (2000) Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Laboratory Investigation*, 80, 1095–1100.
- Sakai, V. T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K. G., Machado, M. A. A. M., Shi, S., Santos, C.F., Nor, J. E. (2010) SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *Journal of Dental Research*, 89, 791-6.
- Stein, D., Lee, Y., Schmidt, M. J., Killpack, B., Genrich, M. A. & Narayana, N. (2005) Local simvastatin effects on mandibular growth and inflammation. *Journal Periodontology*, 76, 1861-70.
- Sugiyama, O., Dong, S. A., Sam, P. K., Brian, T. F., Gamradt, S., Nancy, Q. L., Irvin, S. Y., Chen, S. Y. & Lieberman, J. R. (2005) Lentivirus-Mediated Gene Transfer Induces Long-Term Transgene Expression of BMP-2 in Vitro and New Bone Formation in Vivo. *Molecular Therapy*, 11, 390-398.
- Sui, G., Yang, X., Mei, F., Hu, X., Cheng, G., Deng, X. & Ryu, S. (2007) Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research*, 82, 445–454.
- Thylin, M. R., McConnell, J. C., Schmid, M. J., Reckling, R. R., Ojha, J. & Bhattacharyya, I. (2002) Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. *Journal of Periodontology*, 73, 1141-8.
- Weitz-Schmidt, G. (2001) Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Natural Medicine*, 7, 687–692.
- Weitz-Schmidt, G. (2002) Statins as anti-inflammatory agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23, 482-6.
- Whang, K. M., McDonald, J., Khan, A. & Satsangi, N. (2005) A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: synthesis and in vitro release. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 74, 237–46.

Wu, Z., Liu, C., Zang, G. & Sun, H. (2008) The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. *International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, 37, 170-6.

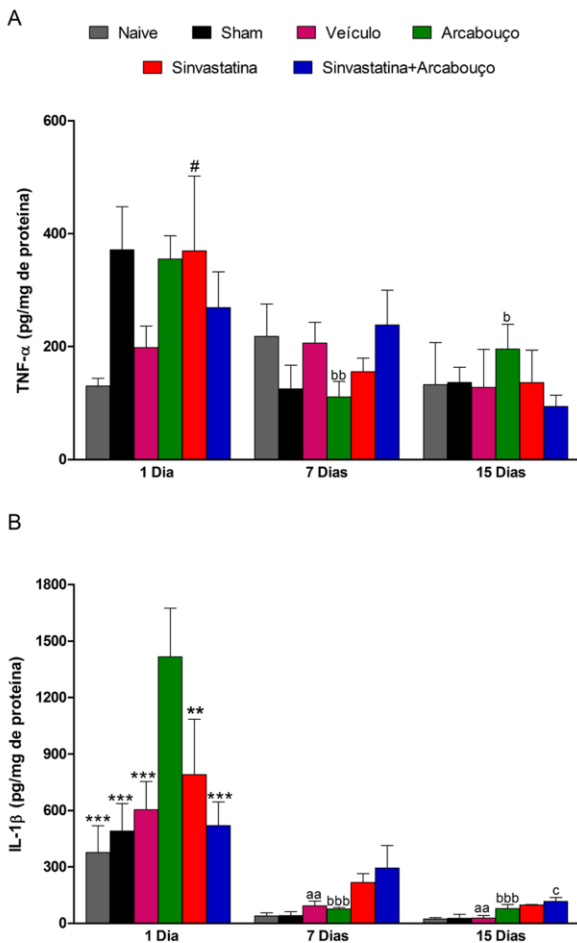
Yamashita, M., Otsuka, F., Mukai, T., Otani, H., Inagaki, K., Miyoshi, T., Goto, J., Yamamura M. & Makino, H. (2008) Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Endocrinology*, 196, 601-613.

Zelvyte, I., Dominaitiene, R., Crisby, M. & Janclauskiene, S. (2002) Modulation of inflammatory mediators and PPAR $\gamma$  and NF $\kappa$ B expression by pravastatin in response to lipoproteins in human monocytes *in vitro*. *Pharmacological Research*, 45, 147-154.

Zhang, J., Dricu, A. & Sjövall, J. (1997) Studies on the relationships between 7  $\alpha$ -hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 18, 241-9.

## FIGURES

### Figure 1



**Figure 1:** Evaluation of the levels of TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  in soft tissue in naive, sham, vehicle, scaffold, simvastatin and simvastatin + scaffold, after one, seven and 15 days. Values represented by mean of 6 animals per group; vertical lines indicate standard deviation. (A) There was significant difference between the simvastatin and naive groups for

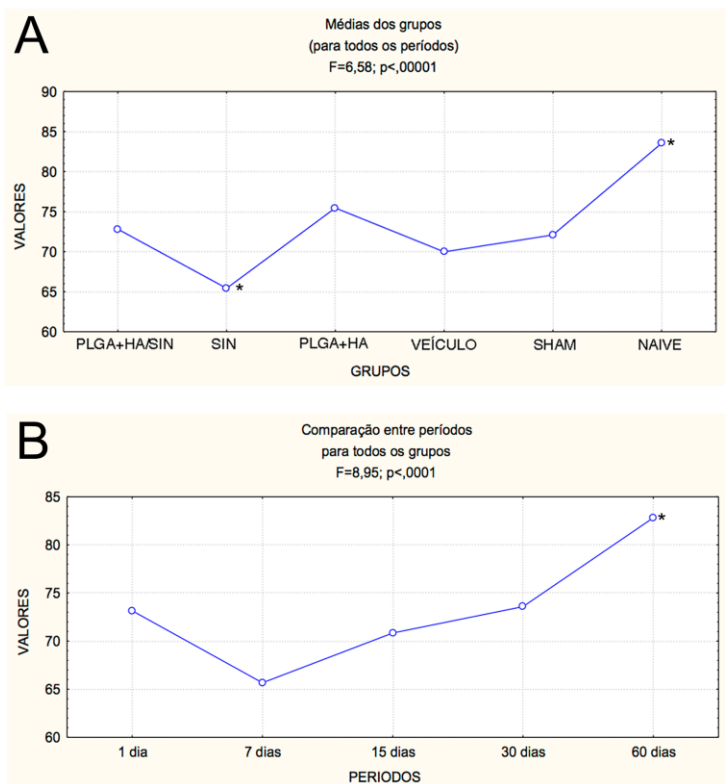
TNF $\alpha$ , #  $p < 0.05$ . In comparison between time periods, there was significant difference between the scaffold group after one day vs. the scaffold group after 15 days, b  $p < 0.05$ ; and between the scaffold group after one day vs. the scaffold group after seven days, bb  $p < 0.01$ . **(B)** For IL1 $\beta$  levels, there was significant difference between the scaffold group and all the other groups, \*\*  $p < 0.01$  and \*\*\*  $p < 0.001$ . In comparison between periods, there was significant difference between the scaffold group after one day vs. the scaffold group after seven/15 days, bbb  $p < 0.001$ ; between vehicle after one day vs. vehicle after seven/15 days, aa  $p < 0.01$ ; and, between simvastatin+scaffold after one day vs. simvastatin+scaffold after 15 days, c  $p < 0.05$ .

**Table 1** – Distribution of groups in relation to experimental periods and methodologies.

<b>Group</b>	<b>Materials</b>	<b>1 day (n=6)</b>	<b>7 days (n=6)</b>	<b>15 days (n=6)</b>	<b>30 days (n=6)</b>	<b>60 days (n=6)</b>
<b>A</b>	PLGA+HA/SIN	A1	A2	A3	A4	A5
<b>B</b>	SIN	B1	B2	B3	B4	B5
<b>C</b>	PLGA+HA	C1	C2	C3	C4	C5
<b>D</b>	Vehicle	D1	D2	D3	D4	D5
<b>E</b>	“False Operated” ( <i>Sham</i> )	E1	E2	E3	E4	E5
<b>F</b>	“Control” ( <i>Naive</i> )	F1	F2	F3	F4	F5

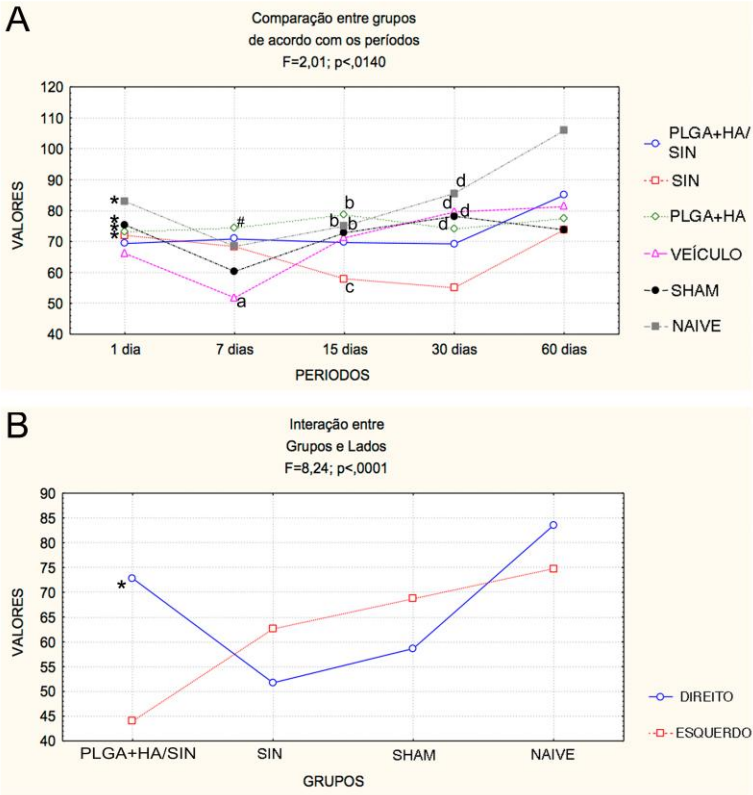


Figure 2



**Figure 2:** Densitometry analysis. Graphs **A** and **B**, show individual densitometry comparisons by Tukey test. Of the differences between the groups, in **A**: the simvastatin group displayed a significantly inferior result to the naive and scaffold groups (\* $p < 0.0001$ ); naive was equivalent to scaffold and superior to all other groups (\* $p < 0.0001$ ); the other comparisons were equivalent. Of the differences between time periods, in **B**: the period of 60 days was, significantly superior to other time periods (\* $p < 0.0001$ ), which were equivalent.

**Figure 3**



**Figure 3** – Densitometry analysis. Graph **A** shows an analysis of the comparison between the experimental groups, in accordance with groups and time periods analyzed using ANOVA 2 testing. In this comparison, it was observed after one day that the naive, sham, scaffold and simvastatin groups were equivalent and superior to the simvastatin + scaffold and the vehicle group (\*p<0.01); after seven days, the scaffold group was significantly superior to all the other groups (#p<0.01) while the vehicle group was inferior to the other groups (a p<0.01). After 15 days, the scaffold, naive and sham groups were equivalent and, significantly, superior to the other groups (b p<0.01), and, simvastatin was, significantly, inferior to the other groups (c p<0.01). After 30 days, the naive, vehicle, sham and scaffold groups (d p<0.01), were equivalent and significantly superior to the simvastatin only and the simvastatin combined with scaffold groups. After 60 days, all the groups were

statistically equivalent among themselves. Graph **B** shows the results of the three criteria variance analysis test (ANOVA3), for comparison between experimental groups, in accordance with groups, periods and sides analyzed. In this comparison, the simvastatin + scaffold on the right side group was significantly superior to the simvastatin + scaffold on the left side group (\*  $p < 0.01$ ).



# CAPÍTULO IV

---



## BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ASAHARA, T; KALKKA, C; ISNER, J. M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. **Gene Therapy**, v.7, p.451-457, 2000.

BODEN, S. D. Bioactive factors for bone tissue engineering. **Clin Orthop**. v.84, p.367-71, 1999.

BOULER, J. M; LEGEROS, R. Z; DACULSI, G. Biphasic calcium phosphates: influence of three synthesis parameters on the HA/beta-TCP ratio. **J Biomed Mater Res**, v.51, p.680-4, 2000.

BUSER, D; DULA, K; HESS, D; HIRT, H. P; BELSER, U. C. Localized ridge augmentation with autografts and barriers membranes. **Periodontol 2000**, v.19, p.151-63, 2000.

CASAGRANDE, L; CORDEIRO, M. M; NÖR, S. A; NÖR, J. E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontol**, v.99:1-7, 2011.

CHIAPASCO, M; CASENTINI, P; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.24, p.237-259, 2009.

CORDEIRO, M. M; DONG, Z; KANEKO, T; ZHANG, Z; MIYAZAWA, M; SHI, S; SMITH, A. J; NÖR, J. E. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. **J Endod**, v.34, p.962-9, 2008.

DECKERS, M. M; VAN BEZOOIJEN, R. L; VAN DER HORST, G; HOOGENDAM, J; VAN DER BENT, C; PAPAPOULOS, S. E; LÖWIK, C. W. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. **Endocrinology**, v.143, p.1545-53, 2002.

DOLL, B; SFEIR, C; WINN, S; HUARD, J; HOLLINGER, J. Critical aspects of tissue-engineered therapy for bone re- generation. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v.11, p.173-79, 2001.

DORAIRAJAN, A; REDDY, RM; KRIKLER, S. Outcome of acetabular revision using an uncemented hydroxiapatite-coated component: two- to five-year results and review. **J Arthroplasty**, v.20, p.209-12, 2005.

DRAGOO, J. L; CHOI, J. Y; LIEBERMAN, J. R; HUANG, J; ZUK, P. A; ZHANG, J; HEDRICK, M. H; BENHAIM, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. **J Orthop Res**, v.21, p.622-9, 2003.

DUBUC, G; CHAMBERLAND, A; WASSEF, H; DAVIGNON, J; SEIDAH, N. G; BERNIER, L; PRAT, A. Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, p.1454-9. 2004.

EBERLI, D; FREITAS, F. L; ATALA, A; YOO, J. J. Composite scaffolds for the engineering of hollow organs and tissues. **Methods**, v.47, p.109-15, 2009.

FASSBENDER, K; SIMONS, M; BERGMANN, C; STROICK, M; LUTJOHANN, D; KELLER, P; RUNZ H; KUHL, S; BERTSCH, T; VON BERGMANN, K; HENNERICI, M; BEYREUTHER, K; HARTMANN, T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease amyloid peptides A 42 and A 40 in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.5856-5861, 2001.

GÓMEZ, G; KORKIAKOSKI, S; GONZÁLEZ, M. M; LANSMAN, S; ELLA, V; SALO, T; KELLOMAKI, M; ASHAMMAKHI, N; ARNAUD, E. Effect of FGF and polylactide scaffolds on calvarial bone healing with growth factor on biodegradable polymer. **J Craniofacial Surg**, v.17, p.935-942, 2006.

HAMMERLE, C. H. & KARRING, T. Guided bone regeneration at oral implant sites. **Periodontol 2000**, v.17, p.151-75, 1998.

HO, M; CHIANG, C; LIU, Y; KUO, M. Y; LIN, S; LAI, J; LEE, B. Highly efficient release of lovastatin from poly(lactide-co-glycolic acid) nanoparticles enhances bone repair in rats. **J Orthopaedic Res**, v.28, p.1343-51, 2011.

ISHIHARA, K; ARAI, H; NAKABAYASHI, N; MORITA, S; FURUYA, K. Adhesive bone cement containing hydroxiapatite particle as bone compatible filler. **J Biomed Mater Res**, v.26, p.937-42, 1992.



JADHAV, S. B; JAIN, G. K. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. **J Pharm Pharmacol**, v.58, p.3-18, 2006.

JANSEN, J. A; VEHOFF, J. W. M; RUHE, P. Q; KROEZE-DEUTMAN, H; KUBOKI, Y; TAKITA, H; HEDBERG, E. L; MIKOS, A. G. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. **J Control Release**, v.101, p.127-136, 2005.

KAO, R. T; MURAKAMI, S; BEIRNE, O. R. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. **Periodontology** 2000, v.50, p.127-153, 2009.

KIM, S. E; THANH THUY, T. T; LEE, J. H; RO, J. Y; BAE, Y. A; KONG, Y; AHN, J. Y; LEE, D. S; OH, Y. M; LEE, S. D; LEE, Y. S. Simvastatin inhibits induction of matrix metalloproteinase-9 in rat alveolar macrophages exposed to cigarette smoke extract. **Exp Mol Med**, v.30; p.277-87, 2009.

KOJRO, E; GIMPL, G; LAMMICH, S; MARZ, W; FAHRENHOLZ, F. Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the  $\alpha$ -secretase ADAM 10. **Proc Natl Acad Sci**, v.98, p.5815–5820, 2001.

KUREISHI, Y; LUO, Z; SHIOJIMA, I; BIALIK, A; FULTON, D; LEFER, D. J; SESSA, W. C; WALSH, K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat Med**, v.6, p.1004–1010, 2000.

KWAK, B; MULHAUPT, F; MYIT, S; MACH, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nat Med**, v.6, p.1399 –1402, 2000.

LACOSTE, L; LAM, J. Y; HUNG, J; LETCHACOVSKI, G; SOLYMOSS, C. B; WATERS, D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombotic potential with cholesterol reduction. **Circulation**, v.92, p.3172–3177, 1995.

LANSMAN, S; PAAKKO, P; RYHANEN, J; KELLOMAKI, M; WARIS, E; TORMALA, P; WARIS, T; ASHMMAKHI, N. Poly-L/D-lactide (PLDLA) fibrous implants: histological evaluation in the

subcuts of experimental design. **J Craniofacial Surg**, v.17, p.1121-28, 2006.

LIMA, C. E. V. C; CALIXTRO, J. C; ANBINER, A. L. Influence of the association between simvastatin and demineralized bovine bone matrix on bone repair in rats. **Braz Oral Res**, v.25, p.42-8, 2011.

LIN, Z; DUAN, Z; GUO, X; LI, J; LU, H; ZHENG, Q; QUAN, D; YANG, S. Bone induction by biomimetic PLGA-(PEG-ASP)<sub>n</sub> copolymer loaded with a novel synthetic BMP-2-related peptide in vitro and in vivo. **J Control Release**, v.144, p.190-195, 2011.

LING-LING, E; LU-LU, X; XIA, W; DONG-SHENG, W; YAN, L; JIA-ZHU, W; HONG-CHEN, L. The interactions between rASCs, rhBMP-2 and  $\beta$ -TCP play an important role in bone tissue engineering. **Tissue engineering Part A**, v.16, p.2927-40, 2010.

LIU, C; WU, Z; SUN, H. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-b1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. **Int J Oral Sci**, v.1, p.90-98, 2009.

LOPES, M. A; MONTEIRO, F. J; SANTOS, J. D. Glass-reinforced hydroxiapatite composites: fracture toughness and hardness dependence on microstructural characteristics. **Biomaterials**, v.20, p.2085-90, 1999.

MA, B; CLARKE, S. A; BROOKS, R. A; RUSHTON, N. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. **Acta Biomater**, v.4, p.149-55, 2008.

MACIEL-OLIVEIRA, N; BRADASCHIA-CORREA, V; ARANA-CHAVEZ V. E. Early alveolar bone regeneration in rats after topical administration of simvastatin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112, p.170-9, 2011.

MAEDA, T; KAWANE, T; HORIUCHI, N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. **Endocrinology**, v.144, p.681-92, 2003.

MAEDA, T; MATSUNUMA, A; KAWANE, T; HORIUCHI, N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in

MC3T3–E1 cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.280, p.874–877, 2001.

MAEDA, T; MATSUNUMA, A; KURAHASHI, I; YANAGAWA, T; YOSHIDA, H; HORIUCHI, N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **J Cell Biochem**, v.92, p.458–471, 2004.

MCALLISTER, B. S. & HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. **J Periodontol**, v.78, p.377–396, 2007.

MESSIAS, A. D; ARAGONES, A. & DUEK, E. A. R. PLGA-Hydroxyapatite composite scaffolds for osteoblast-like cells. **Key Eng Materials**, v.396, p.461-464, 2009.

MOON, H; KIM, S. E; YUN, Y. P; HWANG, Y; BANG, J. B; PARK, J; KWON, I. K. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation by scavenging reactive oxygen species. **Exp Mol Med**, v.43, p.605-612, 2011.

MORRIS, M. S; LEE, Y; LAVIN, M. T; GIANNINI, P. J; SCHMID, M. J; MARX, D. B; REINHARDT, R. A. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies. **J Periodontol**, v.79, p.1465-73, 2008.

MUNDY, G; GARRETT, R; HARRIS, S. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, v.286, p.1946–1949, 1999.

NAKA, T; SAKODA, T; DOI, T; AKAGAMI, T; TSUJINO, T; MASUYAMA, T; OHYANAGI, M. Mechanical stretch induced interleukin-18 expression through angiotensin subtype 1 receptor and endothelin-1 in cardiomyocytes. **Prep Biochem Biotechnol**, v.38, p.201-12, 2008.

NEVINS, M. L; REYNOLDS, M. A. Tissue engineering with recombinant human platelet-derived growth factor BB for implant site development. **Continuing education**, v.32, p.18-28, 2011.

NYAN, M; SATO, D; KIHARA, H; MASCHIDA, T; OHYA, K. Effects of the combination with tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. **Clin Oral Impl Res**, v.20, p.280-287, 2009.

NYAN, M; SATO, D; ODA, M; MACHIDA, T; KOBAYASHI, H; NAKAMURA, T. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. **J Pharmacol Sci**, v.104, p.384-6, 2007.

OHNAKA, K; SHIMODA, S; NAWATA, H; SHIMOKAWA, H; KAIBUCHI, K; IWAMOTO, Y; TAKAYANAGI, R. Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**, v.287, p.337-342, 2001.

OZEÇ, I; KILIÇ, E; GÜMÜS, C; GÖZE, F. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. **J Craniofac Surg**, v.18, p.546-50, 2007.

PARK, J. B. The use of simvastatin in bone regeneration. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.14, p.485-8, 2009.

PHILLIPS, J. E; GERSBACHA, C. A; GARCIA, A. J. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. **Biomaterials**, v.28, p.211-229, 2007.

RIOS, H. F; LIN, Z; OH, B; PARK, C. H; GIANNOBILE, W. V. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. **J Periodontol**, v.82, p.1223-37, 2011.

SAITO, E; KANG, H; TABOAS, J. M; DIGGS, A; FLANAGAN, C. L; HOLLISTER, S. J. Experimental and computational characterization of designed and fabricated 50:50 PLGA porous scaffolds for human trabecular bone applications. **J Mater Sci Mater Med**, v.21, p.2371-83, 2010.

SAKAI, V. T; ZHANG, Z; DONG, Z; NEIVA, K. G; MACHADO, M. A. A. M; SHI, S, SANTOS, C.F; NÖR, J. E. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. **J Dent Res**, v.89, p.791-6, 2010.

SAKODA, K; YAMAMOTO, M; NEGISHI, Y; LIAO, J. K; NODE, K; IZUMI, Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **J Dent Res**, v.85, p.520-3, 2006.

SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v.289, p.1498–500, 2000.

STAAL, A; FRITH, J. C; FRENCH, M. H; SWARTZ, J; GUNGOR, T; HARRITY, T. W; TAMASI, J; ROGERS, M. J; FEYEN, J. H. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. **J Bone Miner Res**, v.18, p.88-96, 2003.

STEIN, D; LEE, Y; SCHMID, M. J; KILLPACK, B; GENRICH, M. A; NARAYANA, N. Local simvastatin effects on mandibular growth and inflammation. **J Periodontol**, v.76, p.1861-70, 2005.

SUGIYAMA, M; KODAMA, T; KONISHI, K; ABE, K; ASAMI, S; OIKAWA, S. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein 2 in human osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.271, p.688–692, 2000.

SUGIYAMA, O; DONG, S. A; SAM, P. K; BRIAN, T. F; GAMRADT, S; NANCY, Q. L; IRVIN, S. Y; CHEN, S. Y; LIEBERMAN, J. R. Lentivirus-Mediated Gene Transfer Induces Long-Term Transgene Expression of BMP-2 in Vitro and New Bone Formation in Vivo. **Mol Therapy**, v.11, p.390-398, 2005.

SUI, G; YANG, X; MEI, F; HU, X; CHEN, G; DENG, X; RYU, S. Poly-L-lactic acid/hydroxyapatite hybrid membrane for bone tissue regeneration. **J Biomed Mater Res**, v.82, p.445–454, 2007.

TAKENAKA, M; HIRADE, K; TANABE, K; AKAMATSU, S; DOHI, S; MATSUNO, H; KOZAWA, O. Simvastatin stimulates VEGF release via p44/p42 MAP kinase in vascular smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Comm**, v.301, p.198-203, 2003.

THYLIN, M. R; MCCONNELL, J. C; SCHMID, M. J; RECKLING, R. R; OJHA, J; BHATTACHARYYA, I. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. **J Periodontol**, v.73, p.1141-8, 2002.

UNGER, R. E; GHANAATI, S; ORTH, C; SARTORIS, A; BARBECK, M; HALSTENBERG, S; MOTTA, A; MIGLIARESI, C; KIRKPATRICK, C. J. The rapid anastomosis between prevascularized

networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells on the host vasculature. **Biomaterials**, v.31, p.6959-67, 2010.

WALTER, D. H; ZEIHNER, A. M; DIMMELER, S. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. **Coron Artery Dis**, v.15, p.235-242, 2004.

WANG, P. S; SOLOMON, D. H; MOGUN, H; AVORN, J. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. **JAMA**, v.283, p.3211-3216, 2000.

WEITZ-SCHMIDT, G. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. **Nat Med**, v.7, p.687-692, 2001.

WHANG, K. M; MCDONALD, J; KHAN, A; SATSANGI, N. A novel osteotropic biomaterial OG-PLG: synthesis and in vitro release. **J Biomed Mater Res A**, v.74, p.237-46, 2005.

WU, Z; LIU, C; ZANG, G; SUN, H. The effect of simvastatin on remodeling of the alveolar bone following tooth extraction. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.37, p.170-6, 2008.

YAMASHITA, M; OTSUKA, F; MUKAI, T; OTANI, H; INAGAKI, K; MIYOSHI, T; GOTO, J; YAMAMURA M; MAKINO, H. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. **J Endocrinol**, v.196, p.601-613, 2008.

ZHANG, J; DRICU, A; SJÖVALL, J. Studies on the relationships between 7 alpha-hydroxylation and the ability of 25- and 27-hydroxycholesterol to suppress the activity of HMG-CoA reductase. **Biochim Biophys Acta**, v.18, p.241-9, 1997.

ZHENG, H; GUO, Z; MA, Q; JIA, H; DANG, G. Cbfa1/osf2 Transduced Bone Marrow Stromal Cells Facilitate Bone Formation In Vitro and In Vivo. **Calc Tissue Int**, v.74, p.194-203, 2004.

# CAPÍTULO V

---





## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Metodologia Expandida

#### **Considerações éticas**

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sob o número de protocolo PP00689 que pode ser visualizado no Apêndice C.

A necessidade do uso dos animais nesse protocolo foi imprescindível por não haver alternativas para a avaliação de reação inflamatória e reparo ósseo, tornando-se crucial a necessidade do uso dos animais para o objetivo científico deste protocolo. Somente após serem identificados os mecanismos básicos da fisiopatologia da inflamação e do reparo ósseo em animais de laboratório, torna-se possível o estudo de outras espécies em seu habitat natural e seres humanos, ressaltando-se o fato de que haverá maior variabilidade de resposta à inflamação e ao reparo.

A escolha do rato como modelo experimental deve-se ao fato deste ser um mamífero cuja morfofisiologia está bem estudada, bem como exibe comportamento característico conforme descrito na literatura, semelhante à de outros mamíferos. Portanto, não existem recursos alternativos para responder às relevantes questões propostas na dissertação, sendo imprescindível a utilização dos animais. É importante ressaltar que sempre que possível tentamos minimizar o número de animais a serem utilizados.

A realização dos procedimentos para a indução do defeito ósseo e o tratamento com o arcabouço associado à sinvastatina, bem como as avaliações seguintes foram realizadas por pesquisadores bem treinados e, desta forma, atentos a qualquer sinal de alteração comportamental e ou sofrimento dos animais durante o período de experimentação. As gaiolas foram mantidas limpas, os animais bem alimentados e a manipulação foi realizada de forma rápida e precisa, a fim de evitar estresse adicional. O estado geral de alimentação, limpeza e locomoção dos animais foi controlado diariamente. A utilização de anti-inflamatórios nestes modelos não é recomendada tendo em vista que pode interferir na resposta ao tratamento testado e, deste modo, prejudicar a interpretação de dados.

#### **Seleção da amostra**

Neste estudo foram utilizados 180 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) adultos (20 – 24 semanas) pesando aproximadamente 180g, considerando o planejamento estatístico para determinação do tamanho da amostra (Tabela 1). Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da UFSC e os experimentos foram realizados no Biotério Setorial do Laboratório de Neurobiologia da Dor e da Inflamação (LANDI) da UFSC e mantidos em gaiolas coletivas para quatro ratos, sob condições similares, em sala com 22°C +/- 2°C, 60% +/- 5% de umidade e em ciclo claro/escuro de 12/12h, sendo que suas gaiolas foram identificadas pelo nome do pesquisador responsável, massa corporal do animal, data da cirurgia e do sacrifício, conforme o grupo e o período. Os ratos foram alimentados (*ad libitum*) com dieta sólida padrão e água. Os experimentos foram realizados após um período de 3 dias de aclimação.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos em relação aos períodos experimentais e às metodologias realizadas.

<b>Grupo</b>	<b>Materiais</b>	<b>1 dia (n=6)</b>	<b>7 dias (n=6)</b>	<b>15 dias (n=6)</b>	<b>30 dias (n=6)</b>	<b>60 dias (n=6)</b>
<b>A</b>	PLGA+HA/SIN	A1	A2	A3	A4	A5
<b>B</b>	SIN	B1	B2	B3	B4	B5
<b>C</b>	PLGA+HA	C1	C2	C3	C4	C5
<b>D</b>	Veículo	D1	D2	D3	D4	D5
<b>E</b>	“Falso Operado” ( <i>Sham</i> )	E1	E2	E3	E4	E5
<b>F</b>	“Controle” ( <i>Naïve</i> )	F1	F2	F3	F4	F5

### **Obtenção e preparo do arcabouço de PLGA+HA**

Os arcabouços foram produzidos com copolímero de ácido polilático coglicólico associado a hidroxiapatita (PLGA+HA), obtidos pela técnica de evaporação de solvente. O copolímero de ácido polilático coglicólico (PLGA) (Resomer, Evonik Ind., Essen - Alemanha), na proporção 82:18 (m:m), foi dissolvido em clorofórmio PA (ChCl<sub>3</sub> – Synth – LabSynth, Diadema, Brasil) (10% m/v) em temperatura ambiente. Após a dissolução completa do polímero, foram adicionadas partículas de sacarose (Microbiology – Merck, Darmstadt Alemanha) (75% m/v) com granulação inferior a 500 µm, bem como as partículas 50 µm de hidroxiapatita (30% m/v) (Genphos Genius, Baumer, Mogi Mirim, Brasil). Essa solução foi vertida em moldes cilíndricos de 5 mm

de diâmetro. Após a evaporação de solvente à temperatura ambiente, a sacarose foi removida usando-se álcool polivinílico PS ((C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). A peça foi seccionada com disco diamantado para obtenção de amostras com espessura de 1 mm para adaptação no defeito ósseo criado na calvária dos ratos (Figura 1 A-C). Depois de prontos, foram embalados e submetidos a esterilização com radiação gama.

### **Preparo da sinvastatina**

A sinvastatina foi solubilizada na concentração de 6 mg/ml numa solução 1:1 de álcool etílico (Álcool Etilico P.A., Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro) e PBS (pH7,4), e desta solução “mãe” foram removidos 33 µl e adicionados 17 µl de PBS para obter em 50 µl da solução 0,2 mg de sinvastatina (4 mg/ml) que foram aplicados durante o experimento aos arcabouços de PLGA+HA previamente à sua implantação, ou diretamente em solução no grupo em que foi testada isoladamente sobre o defeito ósseo (Figura 2). A solução aquosa foi utilizada no prazo de 24h após a sua preparação, pois não é recomendado armazenar a solução aquosa por mais de um dia. Um grupo recebeu somente o veículo para avaliar possíveis interferências da solução tamponada.

### **Intervenção cirúrgica**

Para a realização da intervenção cirúrgica, os ratos foram distribuídos aleatoriamente segundo o período experimental e os materiais a serem implantados (Tabela 1 e Figura 3).

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação 90 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia –SP, Brasil) e 20 mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia –SP, Brasil). A parte dorsal do crânio foi tricotomizada e preparada assepticamente com algodão embebido em solução de iodopovidine (Povidine, Johnson & Johnson, São José dos Campos –SP, Brasil), com o animal posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em três pontos fixos com o auxílio de uma mesa de estereotaxia (Figuras 4 A-C).

Foi utilizada técnica cirúrgica descrita previamente (THYLIN, et al., 2002; NYAN, et al., 2007 e 2009; CALIXTRO, et al., 2011; LIMA, et al., 2011), que consistiu de uma incisão cutânea e muscular de 15 a 20 mm de comprimento na porção posterior da calvária ao longo da sutura sagital com auxílio de cabo de bisturi e lâmina nº 15 (Swann-Morton<sup>®</sup> Surgical Blades, Inglaterra), e a pele e o tecido subcutâneo

foram refletidos (Figuras 4D-E). Em seguida os tecidos subjacentes foram divulsionados com o auxílio de uma tesoura pequena com extremidade romba e pinça de dissecação até a exposição do perióstio (Figura 4F), que foi incisado e permitiu a exposição do osso parietal (Figura 4G).

Dois defeitos ósseos foram realizados, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital (lado direito e lado esquerdo) (Figuras 4H-I). Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm externo de diâmetro (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba - Paraná) montada em contra-ângulo com redução de 20:1 (W&H, Alemanha), acoplado em motor para implante com 500 rpm (W&H, Alemanha), sob irrigação constante de solução salina para prevenir o superaquecimento das paredes ósseas. Esse procedimento foi realizado cuidadosamente para evitar danos à dura-máter (Figuras 4J-K). Em todos os animais, os grupos experimentais (PLGA+HA/SIN, PLGA+HA, SIN, e Veículo) foram implantados no defeito do lado direito e o lado esquerdo serviu como controle interno (“Falso Operado”) para observar se a sinvastatina utilizada no preenchimento do defeito no lado direito influenciou o reparo do lado contralateral (Figuras 4L-M). O grupo *naïve* serviu de parâmetro para comparação, por ser a condição natural (Figura 3). O perióstio e o tecido subcutâneo foram reposicionados e suturados com fio de sutura Vicril 4.0 (Ethicon, Johnson&Johnson, SP, Brasil) e o tecido cutâneo com fio Nylon 5.0 (Ethicon, Johnson&Johnson, SP, Brasil) (Figuras 4N-O).

Todos os animais receberam analgésico dipirona 50 mg/kg após o procedimento cirúrgico e diariamente, por três dias consecutivos, no período matutino. Os animais foram também avaliados diariamente para a observação do estado de saúde e do processo de reparo verificando qualquer sinal clínico de inflamação e ou infecção (vermelhidão, edema, crosta).

### **Remoção das amostras**

Decorridos 1, 7, 15, 30, 60 dias de pós-operatório amostras do tecido sobre a área do defeito ósseo foram removidas para análise de citocinas. Imediatamente após, a região sobre os ossos parietais foi dissecada e foram coletadas as amostras ósseas, com brocas trefinas de 10 mm de diâmetro.

### **Quantificação dos níveis de citocina tecidual pelo teste imunoenzimático (ELISA)**

Para investigar a concentração de citocinas pró-inflamatórias presente na área adjacente ao defeito ósseo, o tecido mole localizado sobre a região dos defeitos foi removido, pesado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização (Figura 5A-D).

Os tecidos, transportados e mantidos constantemente em gelo (Figura 6A), foram cortados em porções menores (Figura 6B) e foram homogeneizados em processador de tecidos (Figura 6C) (Ultra-Turrax IKA T18 basic, IKA®, Alemanha), em volume fixo de 1,6 ml de solução tampão para citocinas de PBS contendo Tween 20 (0,05%), EDTA 10 mM, cloreto de benzametônio 0,1 mM, 0,5% de BSA, 0,4 M de NaCl, aprotinina 2 ng/ml, e PMSF 0,1 mM (Figuras 6D-H). O homogenato foi transferido para eppendorfs de 2 ml, centrifugados a 10.000 rpm por 10min, a  $4^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante obtido foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises (Figuras 6I-L). A quantificação das proteínas totais nos tecidos avaliados foi determinada por meio do método colorimétrico descrito por Bradford, em 1976, utilizando-se o corante *Coomassie Brilliant Blue G250*. As concentrações de proteína foram determinadas a partir da curva padrão de albumina (0,05 – 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Em seguida, as amostras foram diluídas a uma mesma concentração protéica e os pontos da curva plaqueados em duplicata, com 10  $\mu\text{L}$  por poço. Após este procedimento, foram acrescentados 190  $\mu\text{L}$  de *Coomassie Brilliant Blue G250*, diluído em 10 vezes, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm, obtendo-se, então, a concentração de proteína tecidual. Aliquotas de 100  $\mu\text{l}$  das amostras foram utilizadas para mensurar os níveis de TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , utilizando kits de ensaio imunoenzimático para citocina antirato (R&D System, Inc., Minneapolis, USA), de acordo com as instruções do produto.

Este ensaio foi realizado nas amostras previamente homogeneizadas, provenientes dos diferentes grupos experimentais. Placas com 96 poços foram sensibilizadas com 100  $\mu\text{L}$  de anticorpo monoclonal antirato TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (anticorpo de captura diluído a 4 ng/ml em reagente diluente, solução de PBS com 1% de BSA, pH 7,2-7,4) e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão para lavagem (*Wash Buffer* 0,05% Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4). Posteriormente, para evitar ligações inespecíficas, a placa foi bloqueada com 300  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4; filtrado à 0,2  $\mu\text{m}$ ) e incubada por 1h em temperatura ambiente. Findo este prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  por poço dos padrões diluídos previamente em

reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, filtrado à 0,2 µm) e as alíquotas das amostras, enquanto que em dois poços foi colocado somente o reagente de diluição para caracterização do branco. As placas foram cobertas com papel laminado para proteger da luz e incubadas por 2h em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4). Após as lavagens, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção (Anticorpo antirato IL1β e ou TNFα Biotinilados) diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7,2 – 7,4, filtrado à 0,2 µm) na concentração estabelecida, cobertos com papel laminado e incubados por 2h em temperatura ambiente. Os poços foram lavados novamente como descrito acima. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de Streptoavidina-HRP (1:250) por poço, e as placas foram cobertas com papel laminado e incubadas por 30 min, a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados novamente e, a solução de substrato (mistura dos reagentes de cores A - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e B - Tetrametilbenzidina) foi adicionada na diluição de 1:1 por poço, seguido de incubação por 30 min a temperatura ambiente, evitando-se contato direto da placa com a luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 30% por poço sob agitação lenta. A leitura da densidade ótica foi feita em leitor de ELISA (Apollo LB 912; Berthold Technologies, EUA), utilizando-se filtro de 450 nm e posteriormente de 550 nm, sendo este resultado subtraído do primeiro (Figuras 6M-N).

### **Processamento e análise radiográfica**

Após a remoção das amostras de tecido mole, os tecidos foram dissecados para permitir a exposição dos ossos parietais. As amostras de tecido ósseo foram removidas com o auxílio de uma trefina de 10 mm de diâmetro (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba-PR, Brasil), e fixadas em solução de glutaraldeído 10% para análises posteriores (Figura 7 A-I).

Para a avaliação radiográfica, as amostras foram posicionadas paralelamente à superfície do sensor radiográfico digital (Digora Optime, Soredex, Alemanha) de maneira padronizada para todas as amostras. As radiografias foram realizadas em equipamento de raios X (Gendex 765DC -Gendex Dental Systems, Inglaterra) sob as seguintes condições: 8mA; 70KVp; distância focal de 30cm; 0,32s de exposição. As imagens radiográficas foram obtidas e salvas sob a extensão BMP, utilizando o próprio *software* fornecido pelo *Digora Optime*.

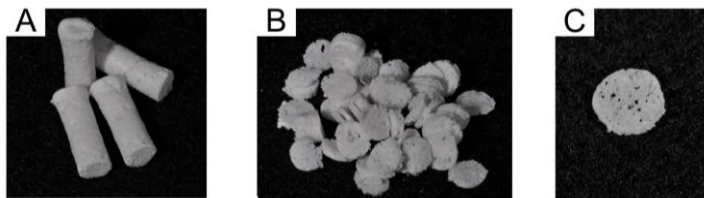
A densitometria óssea no local das amostras foi determinada pela análise dos tons de cinza, variando de 0 a 255 em toda a área da amostra, calculada utilizando o *software ImageJ64* (National Institute of

*Health*, Bethesda, MD, USA) que forneceu a média e o desvio padrão dos tons de cinza nessas regiões pré-determinadas por meio da linha de histograma. As imagens foram analisadas duas vezes pelo mesmo observador, previamente calibrado.

### **Análise estatística**

Uma análise descritiva das observações foi realizada para todas as amostras e para todos os grupos estudados, apresentados como média e desvio padrão para cada grupo. A comparação entre os grupos e a análise estatística dos dados obtidos das observações foram realizadas por meio da análise de variância de 2 vias (ANOVA2) e 3 vias (ANOVA3), seguida pelos de Tukey e Benferroni. Os níveis de significância foram determinados em 5% ( $p < 0.05$ ).

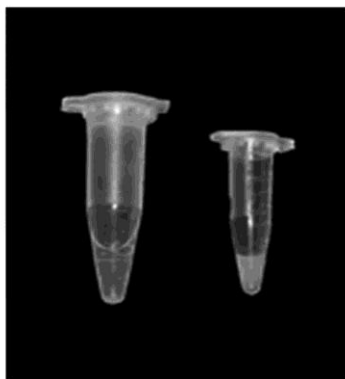
## APÊNDICE B - Figuras da metodologia expandida

**Figura 1****Figura 1** – Manipulação dos arcabouços de PLGA+HA.

A – Arcabouços prontos após a evaporação dos solventes e remoção da sacarose, inicialmente com o formato dos moldes cilíndricos de 5 mm de diâmetro por 2 cm de comprimento;

B – Arcabouços seccionados por discos diamantados em peça de mão, sob refrigeração constante para evitar aquecimento;

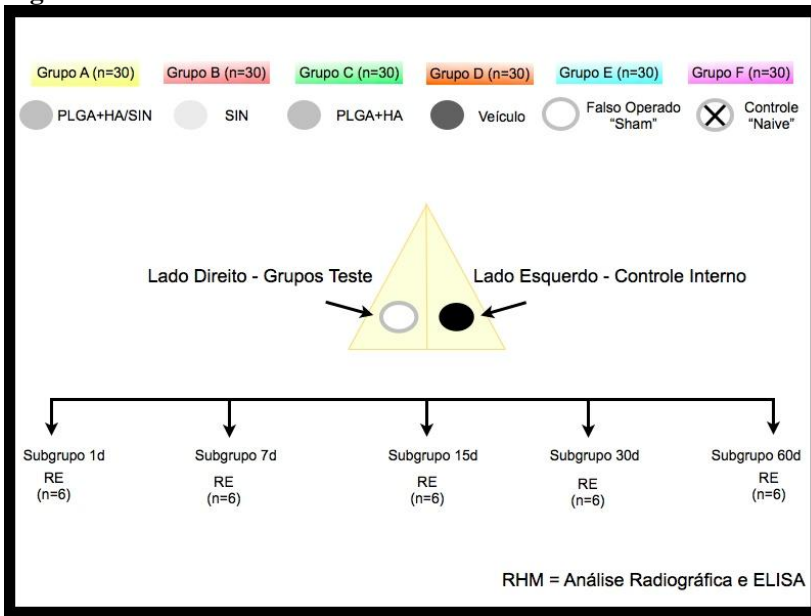
C – Arcabouço pronto para ser embalado e esterilizado por radiação gama.

**Figura 2**

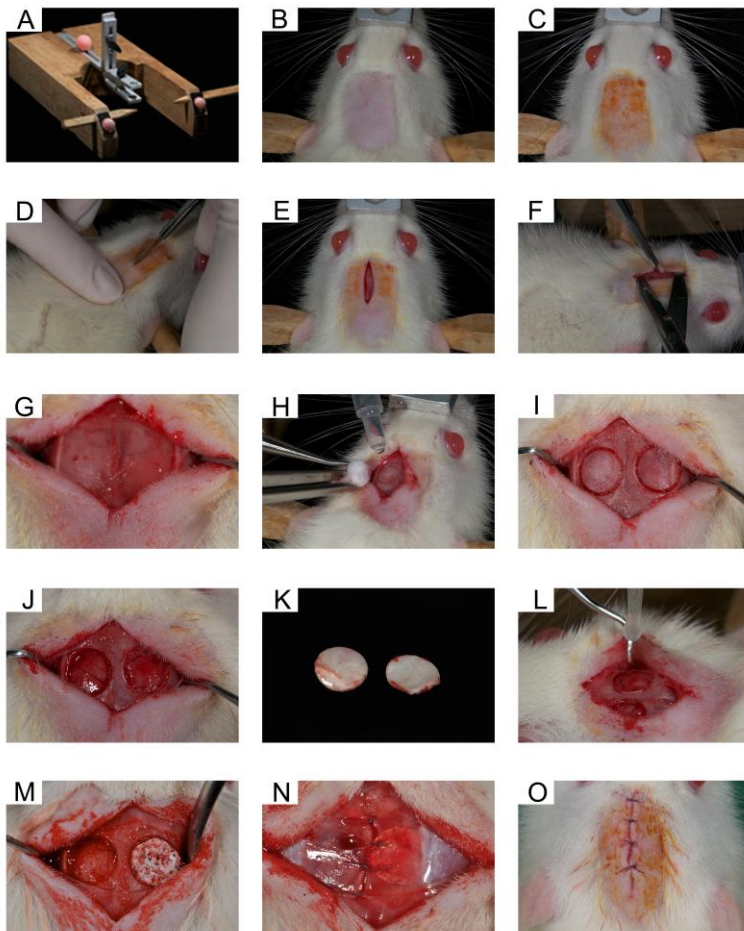
**Figura 2** – Eppendorf direito contendo solução “mãe” de sinvastatina solubilizada a 6 mg/ml em solução 1:1 de álcool etílico e, eppendorf esquerdo contendo a solução de trabalho a 4 mg/ml.



Figura 3



**Figura 3** – Distribuição dos grupos em relação aos períodos experimentais e às metodologias realizadas.

**Figura 4****Figura 4** – Intervenção cirúrgica experimental.

A – Mesa de estereotaxia;

B – Animais com a parte dorsal do crânio tricotomizada e posicionados sobre a mesa cirúrgica, em decúbito ventral, com a cabeça imobilizada em três pontos fixos, com o auxílio da mesa de estereotaxia;

C – Área operatória preparada assepticamente;

D e E – Incisão cutânea e muscular;

F – Tecidos adjacentes divulsionados;

G – Incisão e descolamento do periósteo permitindo a exposição dos ossos parietais. O grupo *naïve* recebeu apenas este procedimento cirúrgico, seguindo para a sutura dos tecidos;

H e I – Nos demais grupos, sob irrigação constante com solução salina, foram realizados dois defeitos ósseos, um em cada osso parietal, laterais à sutura sagital. Os defeitos foram realizados com o auxílio de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro externo;

J – Tecidos ósseos internos à trefina removidos. Pode-se visualizar parte do crânio, seus vasos sanguíneos e a duramáter expostas pelo defeito ósseo. Esta imagem também ilustra o tratamento realizado no grupo *sham*;

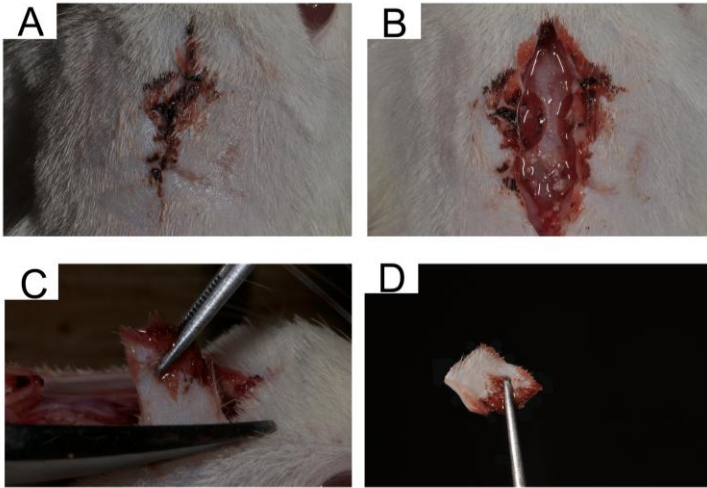
K – Fragmentos circulares dos tecidos ósseos removidos;

L – Aplicação de sinvastatina (grupo sinvastatina isolado), sobre o defeito realizado no lado direito da calota craniana. Da mesma maneira foi aplicado o veículo sobre o defeito;

M – Adaptação do arcabouço sobre o defeito realizado no lado direito. No grupo sinvastatina + arcabouço a sinvastatina foi aplicada ao arcabouço sobre uma placa de Petri e, em seguida, posicionados sobre o defeito ósseo;

N – Sutura do periósteo. É possível observar, por transparência, a adaptação do arcabouço após esta sutura;

O – Sutura dos tecidos subcutâneos e cutâneos. A ferida cirúrgica foi limpa e o iodopovidine foi aplicado novamente.

**FIGURA 5**

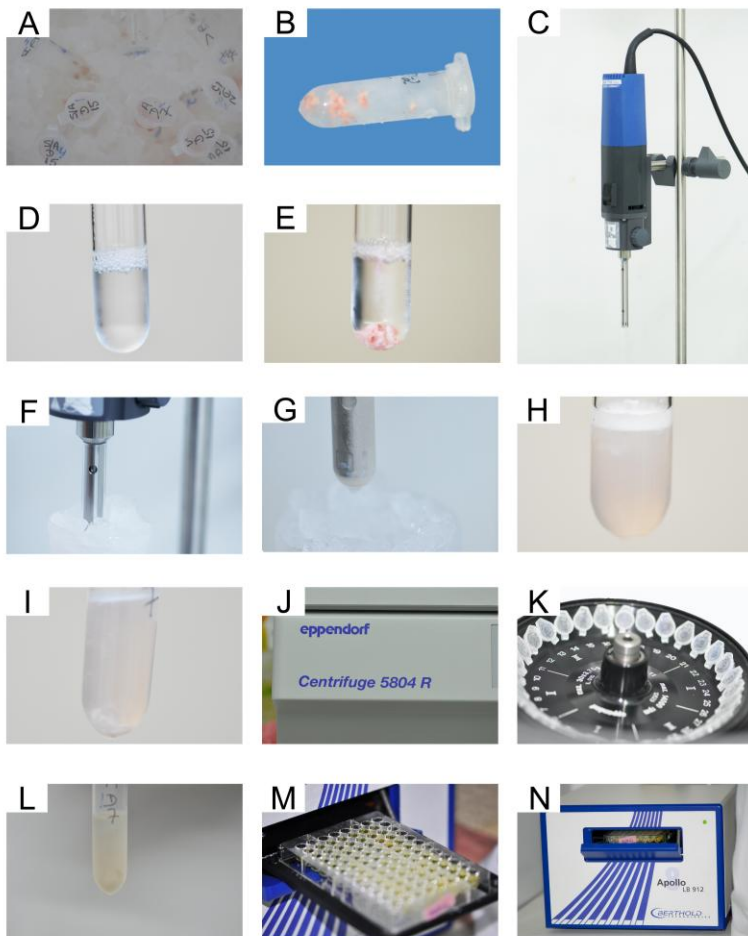
**FIGURA 5** – Remoção das amostras dos tecidos moles adjacentes ao defeito ósseo.

A – Primeiro dia de pós-operatório do grupo *sham*;

B – Tecido incidado. É possível observar a presença de líquido do exudato inflamatório após a incisão;

C – Remoção dos tecidos moles adjacentes ao defeito ósseo;

D – Fragmento removido.

**Figura 6****Figura 6** – Ensaio imunoenzimático para dosagem de citocinas.

A – Os tecidos foram transportados e mantidos, constantemente, em recipiente contendo gelo;

B – Fragmentação dos tecidos, para facilitar a homogeneização;

C – Os tecidos foram homogeneizados em processador de tecidos Ultra-Turrax IKA T18 basic;

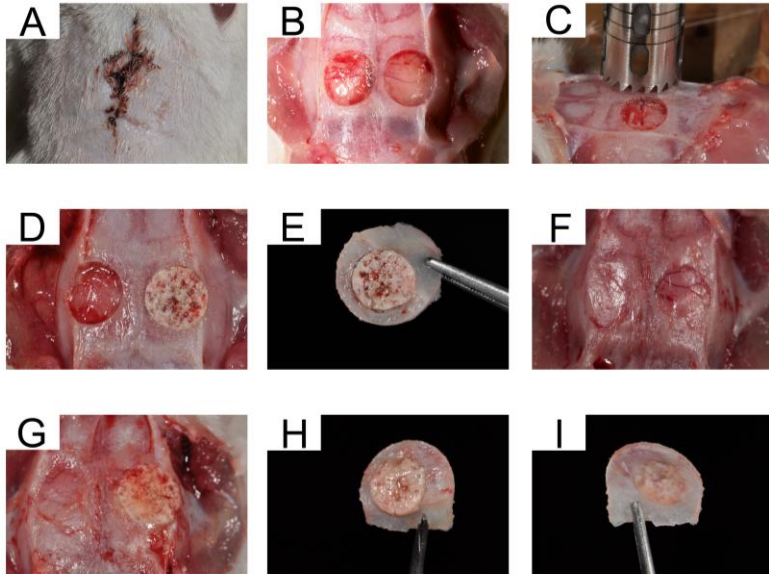
D – As amostras foram homogeneizadas em 1,6 ml de solução tampão para citocinas;

E – Amostras imersas em solução tampão;

F e G – Homogeneização dos tecidos imersos em cuba contendo gelo;

H – Homogenato pronto;  
 I – Homogenatos acondicionados em eppendorfs de 1,5 ml;  
 J e K – Centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min, à 4°C;  
 L – O sobrenadante obtido foi armazenado a -80°C para as análises;  
 M e N – Leitura da densidade óptica utilizando-se filtros de 450 e 550 nm.

**FIGURA 7**



**FIGURA 7** – Remoção das amostras para análise radiográfica.

A – Primeiro dia de pós-operatório do grupo *sham*;  
 B – Calota craniana exposta (grupo *sham*);  
 C – Posicionamento da trefina;  
 D – Calota craniana exposta (grupo arcabouço 1 dia);  
 E – Amostra removida;  
 F – Calota craniana exposta (grupo sinvastatina 60 dias);  
 G – Calota craniana exposta (grupo sinvastatina + PLGA+HA 60 dias);  
 H – Amostra removida, vista superior;  
 I – Amostra removida, vista inferior.

## APÊNDICE C – Parecer do Comitê de Ética UFSC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

Florianópolis, 04 de Novembro de 2011.

Trata o presente parecer da avaliação dos protocolos **PP00689**, para utilização de animais em pesquisa a serem desenvolvidos sob a Coordenação da Professora **Dra Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro**, Departamento de Ciências Morfológicas, CCB-UFSC.

**PP00689- ANÁLISE DO USO DE SINVASTATINA E DE ARCABOUÇOS DE PLGA+HA NO REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS CRIADOS NA CALOTA CRANIANA DE RATOS.**

**Modelo experimental:** o modelo induz experimentalmente defeito ósseo sobre o osso parietal de ratos, visando avaliar a capacidade osteoindutora da sinvastatina introduzida em arcabouços produzidos de copolímero de poli(ácido lático-co-glicólico; PLGA) associado a hidroxiapatita (HA) que são implantados na área defeituosa. Além disso, são determinados parâmetros reações inflamatórias e alterações sistêmicas associadas aos implantes.

**Equipe:** Dra Eliane Maria Goldfeder (pesquisadora) – Professora do Departamento de Ciências Morfológicas, CCB-UFSC; Isis Carvalho Encarnação - aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC.

**Animais:** 300 ratos Wistar adultos (14 semanas) pesando aproximadamente 180g.

**Protocolo Experimental:**

**1) Indução do defeito ósseo:** os animais serão anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de cetamina e cloridrato de xilazina (100 e 20mg/kg), respectivamente. A parte dorsal do crânio será tricotomizada e preparada assepticamente. Uma incisão de 10 a 20 mm de comprimento será realizada no tecido mole do crânio ao longo da sutura sagital expondo o osso parietal. Dois defeitos ósseos serão realizados, um em cada osso parietal. Laterais à sutura sagital (lado direito e lado esquerdo). Os defeitos serão realizados com o uso de uma broca trefina de 5 mm de diâmetro. Esse procedimento será realizado cuidadosamente para evitar danos à dura-máter. Em todos os animais, os grupos experimentais (PLGA+HA/SIN, PLGA+HA ou SIN; com n=12 por grupo) serão implantados no defeito do lado direito e o lado esquerdo servirá como controle interno ("Falso Operado"; com n=12). O grupo "Controle" servirá de parâmetro para comparação, por ser a condição natural (n=12). A distância da linha de incisão aos defeitos será de no mínimo 3 mm. O periósteo e o tecido subcutâneo serão recolocados em posição com fio de sutura Vicril 4-0 e o tecido cutâneo com fio seda 4-0.

**2) Pós-operatório:** todos os animais receberão analgésico dipirona 50mg/kg e antibióticoterapia com tetraciclina 400mg/kg intraperitoneais, após o procedimento cirúrgico e diariamente, por três dias consecutivos, no período matutino. Os animais serão também avaliados diariamente para a observação do estado de saúde e do processo de reparo para avaliar qualquer sinal clínico de inflamação (vermelhidão, edema, crosta), e serão também fotografados e os dados armazenados.

**3) Remoção das amostras:** decorridos 12h e 7, 15, 30, 60 dias os animais serão anestesiados e receberão perfusão de 0,9% de solução salina seguida de solução de paraformaldeído a 4% (pH 7,4) através da aorta ascendente. A pele será dissecada e os locais com os defeitos serão removidos com o tecido ósseo circundante e com o tecido mole adjacente.

Nestes mesmos tempos, serão coletados via arterial caudal 1 ml de sangue dos animais antes do procedimento de remoção das amostras, para a realização de hemograma completo.

**4) Análises:** exame de raios X do tecido ósseo da região operada; análise histológica e imunistoquímica da região operada; análise por microscopia eletrônica; análise de citocinas teciduais por ELISA.

**Eutanásia:** dessangramento sob anestesia.

Observa-se que o protocolo será executado de modo adequado e cuidadoso. O número de animais por grupo (N=12) é adequado e respaldado por cálculo estatístico. O estudo proposto tem

relevância científica e os protocolos atendem as normas de utilização de animais para pesquisa. Portanto, sou de parecer **FAVORÁVEL** à aprovação do protocolo CEUA/PP00689.



**Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00689

**Título**

ANÁLISE DO USO DE SINVASTATINA E DE ARCABOUÇOS DE PLGA+HA NO REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS CRIADOS NA CALOTA CRANIANA DE RATOS

**Data de Entrada**

22/06/2011

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

04/11/2011

**Considerações**

Ofício nº 177/CEUA/PRPE/2011

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro, Departamento de Ciências Morfológicas - CCB

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade a CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO com modificações, por 24 meses para a utilização de trezentos ratos (Rattus Norvegicus).
- Esta comissão considerou a dose anestésica muito alta e determina que seja modificada para 90 mg de cetamina e 10 mg de xilazina, por kilo de peso animal.
- Procedência do animal: Biotério Central.

Por ocasião do término do período de credenciamento, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais com estas metodologias aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.

Atenciosamente,

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)****Data 10/02/2014**

Data 10/11/2011

**Parecer(es):**

**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC  
PRESIDENTE**

[Abrir Solicitação](#)[Criar Relatório](#)[Parecer\\_1\\_PP00689.pdf](#)

## ANEXOS

ANEXO A – Normas do periódico Journal of Clinical Periodontology para publicação de artigos.

### Author Guidelines

**Content of Author Guidelines:** 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance **Relevant Documents:** [Sample Manuscript](#), [Copyright Transfer Agreement](#) **Useful Websites:** [Submission Site](#), [Articles published in Journal of Clinical Periodontology](#), [Author Services](#), [Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

**1. GENERAL** *Journal of Clinical Periodontology* publishes original contributions of high scientific merit in the fields of periodontology and implant dentistry. Its scope encompasses the physiology and pathology of the periodontium, the tissue integration of dental implants, the biology and the modulation of periodontal and alveolar bone healing and regeneration, diagnosis, epidemiology, prevention and therapy of periodontal disease, the clinical aspects of tooth replacement with dental implants, and the comprehensive rehabilitation of the periodontal patient. Review articles by experts on new developments in basic and applied periodontal science and associated dental disciplines, advances in periodontal or implant techniques and procedures, and case reports which illustrate important new information are also welcome. Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Clinical Periodontology*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell's Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

### **2. ETHICAL GUIDELINES**

*Journal of Clinical Periodontology* adheres to the below ethical guidelines for publication and research. **2.1. Authorship and Acknowledgements** Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all

authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements. Please note that it is a requirement to include email addresses for all co-authors at submission. If any of the email-addresses supplied are incorrect the corresponding author will be contacted by the journal administrator. **Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

**2.2. Ethical Approvals** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used. **2.3 Clinical Trials** Clinical

trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material. *Journal of Clinical Periodontology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

**2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations** Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

**2.5 Conflict of Interest and Sources of Funding** Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Sources of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Sources of Funding](#) and [www.icmje.org/#conflicts](http://www.icmje.org/#conflicts) for generally accepted definitions.

**2.6 Appeal of Decision** Under exception circumstances, authors may appeal the editorial decision. Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by e-mailing the editorial office at [cpeedoffice@wiley.com](mailto:cpeedoffice@wiley.com) with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

**2.7 Permissions** If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

**2.8 Copyright Assignment** Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been

published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher. Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the exclusive licence to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the exclusive licence is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless licence has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed [Copyright Transfer Agreement](#) (CTA) must be sent to the Editorial Office before any manuscript can be published. Authors must send the completed CTA upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the CTA at submission.

The CTA should be sent to:

Journal of Clinical Periodontology Editorial Office Wiley-  
Blackwell John Wiley & Sons Ltd 9600 Garsington  
Road Oxford OX4 2DQ UK

Or by email to: [cpeedoffice@wiley.com](mailto:cpeedoffice@wiley.com)

For questions concerning copyright, please visit [Wiley-Blackwell's Copyright FAQ](#).

**2.9 OnlineOpen** OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions,

see [http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms) Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder> Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### 3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Journal Admin, Rosie Ledger, at [cpeedoffice@wiley.com](mailto:cpeedoffice@wiley.com).

**3.1. Getting Started** Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jcpe>

- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as a new user.
  - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will automatically send you your user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Corresponding Author Center'.

**3.2. Submitting Your Manuscript**

- After you have logged into your 'Corresponding Author Center', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Upload your manuscript main document complete with title page, statement concerning source(s) of

funding and conflict(s) of interest, abstract, clinical relevance section, references, tables and figure legends as “main document”. Upload figures as 'figures'. For clinical trials a Consort Checklist will be required, and it should be uploaded as “supplementary file for review”. If any unpublished papers are referenced in the reference list, a digital version of the referenced paper should also be uploaded as “supplementary file for review”. - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button. - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button. • Review your submission (in HTML and PDF format). Notice that all documents uploaded as supplementary files for review will not be viewable in the HTML and PDF format. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

**3.3. Manuscript Files Accepted** Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, clinical reference, main text, references, acknowledgement, statement of source of funding and any potential conflict of interest, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference any figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

**3.4. Blinded Review** All manuscripts submitted to *Journal of Clinical Periodontology* will be reviewed by two or more experts in the field. Papers that do not conform to the general aims and scope of the journal will, however, be returned immediately without review. *Journal of Clinical Periodontology* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

**3.5. Suggest a Reviewer** *Journal of Clinical Periodontology* attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the name and current email address of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the editor will choose one or two reviewers as well.

**3.6. Suspension of Submission**

**Mid-way in the Submission Process** You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

**3.7. E-mail Confirmation of Submission** After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

**3.8. Manuscript Status** You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

**3.9. Submission of Revised Manuscripts** To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

**3.10 Resubmissions** If your manuscript was given the decision of reject and resubmit, you might choose to submit an amended version of your manuscript. This should be submitted as a new submission following the guidelines above under 3.2. In addition you should upload comments to the previous review as “supplementary files for review”.

#### **4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED**

*Journal of Clinical Periodontology* publishes original research articles, reviews, clinical innovation reports and case reports. The latter will be published only if they provide new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician. It is expected that any manuscript submitted represents unpublished original research. **Original Research Articles** must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field. **Clinical Innovation Reports** are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and



clinical practice standards. **Case Reports** illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered. **Reviews** are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references.

## **5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE**

**5.1. Format Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals/editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** *Journal of Clinical Periodontology* adheres to the conventions outlined in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Medical and Scientific Editors and Authors. Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. **5.2. Structure** All articles submitted to *Journal of Clinical Periodontology* should include Title Page, Abstract, and References. In addition, *Journal of Clinical Periodontology* requires that all articles include a section on Clinical Relevance and disclose Source of Funding and Conflict of Interests. Figures, Figure Legends and Tables should be included where appropriate. All manuscripts should emphasize clarity and brevity. Authors should pay special attention to the presentation of their findings so that they may be communicated clearly. Technical jargon should be avoided as much as possible and be clearly explained where its use is

unavoidable. **Title Page:** The title must be concise and contain no more than 100 characters including spaces. The title page should include a running title of no more than 40 characters; 5-10 key words, complete names of institutions for each author, and the name, address, telephone number, fax number and e-mail address for the corresponding author. **Conflict of Interest and Source of Funding:** Authors are required to disclose all sources of institutional, private and corporate financial support for their study. Suppliers of materials (for free or at a discount from current rates) should be named in the source of funding and their location (town, state/county, country) included. Other suppliers will be identified in the text. If no funding has been available other than that of the author's institution, this should be specified upon submission. Authors are also required to disclose any potential conflict of interest. These include financial interests (for example patent, ownership, stock ownership, consultancies, speaker's fee,) or provision of study materials by their manufacturer for free or at a discount from current rates. Author's conflict of interest (or information specifying the absence of conflicts of interest) and the sources of funding for the research will be published under a separate heading entitled "Conflict of Interest and Source of Funding Statement". See Editor-in-Chief Maurizio Tonetti's [Editorial on Conflict of Interest and Source of Funding](#) and [www.icmje.org/#conflicts](http://www.icmje.org/#conflicts) for generally accepted definitions.

**Abstract:** is limited to 200 words in length and should not contain abbreviations or references. The abstract should be organized according to the content of the paper. For Original Research Articles the abstract should be organized with aim, materials and methods, results and conclusions. For clinical trials, it is encouraged that the abstract finish with the clinical trial registration number on a free public database such as [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov).

**Clinical Relevance:** This section is aimed at giving clinicians a reading light to put the present research in perspective. It should be no more than 100 words and should not be a repetition of the abstract. It should provide a clear and concise explanation of the rationale for the study, of what was known before and of how the present results advance knowledge of this field. If appropriate, it may also contain suggestions for clinical practice. It should be structured with the following headings: scientific rationale for study, principal findings, and practical implications. Authors should pay particular attention to this text as it will be published in a highlighted box within their manuscript; ideally, reading this section should leave clinicians wishing to learn more about the topic and encourage them to read the full article. **Acknowledgements:** Under acknowledgements

please specify contributors to the article other than the authors accredited. **5.3. Original Research Articles** These must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles will be published under the heading of clinical periodontology, implant dentistry or pre-clinical sciences and must conform to the highest international standards in the field. The word limit for original research articles is 3500 words, and up to 7 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below). **Main Text of Original Research Articles** should be organized with Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion. The background and hypotheses underlying the study, as well as its main conclusions, should be clearly explained. Please see Sample Manuscript.

**Introduction:** should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are not appropriate. It should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation. **Material and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This includes antibodies and the constructs used to make transgenic animals, although not the animals themselves. *(a) Clinical trials* should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material. If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A. *Journal of Clinical Periodontology* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. *(b) Statistical Analysis:* As papers frequently provide insufficient detail as to the performed statistical analyses, please describe with adequate detail. For clinical trials intention to treat analyses are encouraged (the reasons for choosing other types of analysis should be highlighted in the submission letter and

clarified in the manuscript). (c) **DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations**: Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly. (d) **Experimental Subjects**: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used. **Results**: should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. **Discussion**: may usefully start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the abstract or of the results section should be avoided. The discussion section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references. The discussion may usefully be structured with the following points in mind (modified from the proposal by [Richard Horton \(2002\), The Hidden Research Paper, The Journal of the American Medical Association, 287, 2775-2778](#)). Not all points will apply to all studies and its use is optional, but we believe it will improve the discussion section to keep these points in mind. Summary of key finding \* Primary outcome measure(s) \*

Secondary outcome measure(s) \* Results as they relate to a prior hypothesis Strengths and Limitations of the Study \* Study Question \* Study Design \* Data Collection \* Analysis \* Interpretation \* Possible effects of bias on outcomes Interpretation and Implications in the Context of the Totality of Evidence \* Is there a systematic review to refer to? \* If not, could one be reasonably done here and now? \* What this study adds to the available evidence \* Effects on patient care and health policy \* Possible mechanisms Controversies Raised by This Study Future Research Directions \* For this particular research collaboration \* Underlying mechanisms \* Clinical research

**5.4. Clinical Innovation Reports** These are suited to describe significant improvements in clinical practice such as the report of a novel surgical technique, a breakthrough in technology or practical approaches to recognized clinical challenges. They should conform to the highest scientific and clinical practice standards.

The word limit for clinical innovation reports is 3000 words, and up to 12 items (figures and tables) may be included. Additional items can be included as supplementary files online (please see 5.9 below).

The main text of Clinical Innovation Reports should be organized with Introduction, Clinical Innovation Report, Discussion and Conclusion.

**5.5. Case Reports** Case reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable but their merit needs to provide high priority for publication in the Journal. On rare occasions, completed cases displaying non-obvious solutions to significant clinical challenges will be considered.

The main text of Case Reports should be organized with Introduction, Case report, Discussion and Conclusion.

**5.6. Reviews** Reviews are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field who are asked to comment on issues such as timeliness, general interest and balanced treatment of controversies, as well as on scientific accuracy. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged. The use of state-of-the-art evidence-based systematic approaches is expected. Reviews are frequently commissioned by the editors and, as such, authors are encouraged to submit a proposal to the Journal. Review proposals should include a full-page summary of the proposed contents with key references. The word limit for reviews is 4000 words. The main text of Reviews should be organized with Introduction, Review of Current Literature, Discussion and Conclusion.

**5.7. References** It is the policy of the Journal to encourage reference to the original papers rather than to literature reviews. Authors should therefore keep citations of reviews to the absolute minimum. We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp> Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp> Please note that all unpublished papers (submitted or in press) included in the reference list should be provided in a digital version at submission. The unpublished paper should be uploaded as a supplementary file for review.

Reference style (Harvard): References in the text should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Brown & Smith 1966). Three or more authors should always be referred to as, for example, Brown et al. 1966. A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors, (1975), p. 36. London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by first author's surname. b) The order of the items in each reference should be: (i) for journal references: name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers. (ii) for book references: name(s) of author(s), year, chapter title, title of book in italics, edition, volume, page number(s), town of publication, publisher. c) Authors' names should be arranged thus: Smith, A. B., Jones, D. E. & Robinson, F. C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Authors' names when repeated in the next reference are always spelled out in full. d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1967). e) The title of the paper should be included without quotation marks. f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining in typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript) and page numbers. Examples: Botticelli, D., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2004) Hard-tissue alterations following immediate implant placement in extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology* 10, 820-828. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00565.x Lindhe, J., Lang, N.P. & Karring, K. (2003) *Periodontology and Implant Dentistry*. 4th edition, p. 1014, Oxford. Blackwell Munksgaard. Bodansky, O. (1960) Enzymes in tumour growth with special reference to serum enzymes in cancer. In *Enzymes in Health and Disease*, eds. Greenberg, D. & Harper, H. A., pp. 269-278.

Springfield: Thomas. URL: Full reference details must be given along with the URL, i.e. authorship, year, title of document/report and URL. If this information is not available, the reference should be removed and only the web address cited in the text. Example: Smith A. (1999) Select Committee Report into Social Care in the Community [WWW document]. URL

<http://www.dhss.gov.uk/reports/report0394498.html> [accessed on 7 November 2003]

**5.8. Tables, Figures and Figure Legends** Tables: should be double-spaced with no vertical rulings, with a single bold ruling beneath the column titles. Units of measurements must be included in the column title. Figures: All figures should be planned to fit within either 1 column width (8.0 cm), 1.5 column widths (13.0 cm) or 2 column widths (17.0 cm), and must be suitable for photocopy reproduction from the printed version of the manuscript. Lettering on figures should be in a clear, sans serif typeface (e.g. Helvetica); if possible, the same typeface should be used for all figures in a paper. After reduction for publication, upper-case text and numbers should be at least 1.5-2.0 mm high (10 point Helvetica). After reduction symbols should be at least 2.0-3.0 mm high (10 point). All half-tone photographs should be submitted at final reproduction size. In general, multi-part figures should be arranged as they would appear in the final version. Each copy should be marked with the figure number and the corresponding author's name. Reduction to the scale that will be used on the page is not necessary, but any special requirements (such as the separation distance of stereo pairs) should be clearly specified. Unnecessary figures and parts (panels) of figures should be avoided: data presented in small tables or histograms, for instance, can generally be stated briefly in the text instead. Figures should not contain more than one panel unless the parts are logically connected; each panel of a multipart figure should be sized so that the whole figure can be reduced by the same amount and reproduced on the printed page at the smallest size at which essential details are visible. Figures should be on a white background, and should avoid excessive boxing, unnecessary colour, shading and/or decorative effects (e.g. 3-dimensional skyscraper histograms) and highly pixelated computer drawings. The vertical axis of histograms should not be truncated to exaggerate small differences. The line spacing should be wide enough to remain clear on reduction to the minimum acceptable printed size. Figures divided into parts should be labelled with a lower-case, boldface, roman letter, a, b, and so on, in the same typesize as used elsewhere in the figure. Lettering in figures should be in lower-case type, with the first letter capitalized. Units

should have a single space between the number and the unit, and follow SI nomenclature or the nomenclature common to a particular field. Thousands should be separated by thin spaces (1 000). Unusual units or abbreviations should be spelled out in full or defined in the legend. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. In general, visual cues (on the figures themselves) are preferred to verbal explanations in the legend (e.g. broken line, open red triangles etc.)

**Preparation of Electronic Figures for Publication** Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi. Detailed information on our digital illustration standards can be found at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>. Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>. **Permissions**: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

**Figure Legends:** should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used; they should not contain any details of methods. **5.9. Supplementary Material** Supplementary material, such as data sets or additional figures or tables that will not be published in the print edition of the Journal but which will be viewable in the online edition, can be uploaded as 'Supporting information for review and online publication only'. Please see <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppmat.asp> for further information on the submission of Supplementary Materials.

## 6. AFTER ACCEPTANCE



Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal. **6.1 Proof Corrections** The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html) . This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt. As changes to proofs are costly, we ask that you only correct typesetting errors. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

**6.2 Early View (Publication Prior to Print)** The Journal of Clinical Periodontology is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

**6.3 Production Tracking** Online production tracking is available for your article once it is accepted by registering with [Wiley-Blackwell's Author Services](#).

**7 ONLINEOPEN** OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to

ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

[http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen\\_Terms](http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms)

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: <https://onlinelibrary.wiley.com/onlineOpenOrder>

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

## ANEXO B – Produção científica durante o Mestrado.

**1. Artigos completos publicados**

- 1) ENCARNAÇÃO, IC, BULLEN CEM, LUNA, MP., PEREIRA-NETO, ARL., CORDERO, E. B.; CABRERA, AEB, MAGINI, RS. Aumento horizontal com osso xenógeno em bloco: alternativa viável ao uso de osso autógeno. **Implant News**, v. 8, p. 339-343, 2011.
- 2) LUNA, MP., ENCARNAÇÃO, IC, FERREIRA, RW, SOUZA, JGO, PEREIRA NETO, ARL., CORDERO, EB, Magini, RS. Estética e previsibilidade dos enxertos conjuntivos subepiteliais no recobrimento radicular. **Perionews**, v. 5, p. 279-286, 2011.
- 3) ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP; MOLINA, IC, CARDOSO, AC. Arco Dental Reduzido: Conceitos e Atualidades - Revisão da Literatura. **Dental Press Periodontol. Implant Dent**, 5(4):46-53, 2011.

**2. Artigos submetidos à avaliação para publicação**

- 1) MELO, EV; ENCARNAÇÃO, IC; DE SOUZA, JG; PEREIRA-NETO, AL; BENFATTI, CAM; BIANCHINI, MA. Single-tooth implants in the esthetic zone: a clinical and radiographical retrospective analysis and patient satisfaction. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**.

**3. Artigos em fase de elaboração**

- 1) ENCARNAÇÃO, IC; BOING, F; LUNA, MP; BENFATTI, CAM; BIANCHINI MA. Single-tooth implants in esthetic zone: patient satisfaction and oral health-related quality of life outcomes.
- 2) ANDRADE, PCAR; ENCARNAÇÃO, IC, CORDERO, EB; LUTHI, LF; BIANCHINI, MA. Do splinted adjacent implant-supported restorations decrease marginal bone loss?

**4. Produção de Anais**

- 1) ANDRADE, PCAR; ENCARNAÇÃO, IC; CORDERO, EB; SCHULDT-FILHO, G; XAVIER, CCF.; LUCCHIARI-JUNIOR, N; Bianchini, MA.; CARDOSO, A.C. Does implants crown union decrease marginal bone loss?. In: IADR/AADR/CADR 89th General Session, 2011, San Diego, California. **J Dent Res Issue**, 2011. v. 90.

- 2) ENCARNAÇÃO, IC; MELLO, EV; PEREIRA NETO, ARL.; BIANCHINI, MA.; BENFATTI, CAM.; CID, RMO; MOLINA, IC; ANDRADE, PCAR. Single-tooth implants in the esthetic zone: clinical retrospective analysis. In: IADR/AADR/CADR 89th General Session, 2011, San Diego, California. J Dent Res Issue, 2011. v. 90.
- 3) CID, CMO; MOLINA, IC; CORDERO, EB; BENFATTI, CAM.; ENCARNAÇÃO, IC; MELLO, EV; LUNA, MP.; BIANCHINI, MA. Bone loss around implant-supported fixed prosthesis in edentulous jaws. In: IADR/AADR/CADR 89th General Session, 2011, San Diego, California. J Dent Res Issue, 2011. v. 90.
- 4) ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP.; CID, RMO; MELLO, EV; DALAGO, HR; BENFATTI, CAM.; MAGINI, RS.; BIANCHINI, MA. Satisfação do paciente e o impacto da saúde oral na qualidade de vida após implantes unitários em dentes anteriores. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2011. v. 25. p. 255-255.
- 5) CID, RMO; DALAGO, HR; MELLO, EV; SCHULDT-FILHO, G; ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP.; MAGINI, RS.; BIANCHINI, MA. Avaliação clínica e radiográfica relacionados com a quantidade de mucosa ceratinizada em diferentes superfícies de implantes. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2011. v. 25. p. 256-256.
- 6) ENCARNAÇÃO, IC; PEREIRA NETO, ARL.; CRUZ, ACC; SIMÕES, CMO ; ARAGONEZ, A; SELLA, GC; CORDERO, EB; LUNA, MP. Análise do grau de proliferação e viabilidade de fibroblastos humanos gengivais cultivados sobre membranas absorvíveis. In: 27a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Proceedings of the 27aSBPqO Annual Meeting). São Paulo, 2010. v. 24. p. 283-283.

- 7) MELLO, EV; ENCARNAÇÃO, IC; PEREIRA NETO, ARL.; BIANCHINI, MA.; LUCCHIARI-JUNIOR, N; MOLINA, IC; XAVIER, CCF. Avaliação da satisfação de implantes unitários em região estética. In: 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Proceedings of the 27th SBPqO Annual Meeting). São Paulo, 2010. v. 24. p. 205-205.
- 8) CID, RMO; MOLINA, IC; CORDERO, EB.; BIANCHINI, MA.; ENCARNAÇÃO, I C; MELLO, EV; XAVIER, CCF.; SCHULDT-FILHO, G. Avaliação da taxa de sucesso e sobrevivência dos implantes suportando próteses totais com cantilever de até 20mm, Estudo retrospectivo. In: 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, 2010, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research (Proceedings of the 27th SBPqO Annual Meeting). São Paulo, 2010. v. 24. p. 354-354.

## **5. Apresentação de trabalhos**

- 1) ENCARNAÇÃO, IC; MELLO, EV; PEREIRA NETO, ARL.; BIANCHINI, MA.; BENFATTI, CAM.; CID, RMO; MOLINA, IC; ANDRADE, PCAR. Single-tooth implants in the esthetic zone: clinical retrospective analysis. In: IADR/AADR/CADR 89th General Session, 2011, San Diego, California. J Dent Res Issue, 2011. v. 90.
- 2) ENCARNAÇÃO, IC; LUNA, MP.; CID, RMO; MELLO, EV; DALAGO, HR; BENFATTI, CAM.; MAGINI, RS.; BIANCHINI, MA. Satisfação do paciente e o impacto da saúde oral na qualidade de vida após implantes unitários em dentes anteriores. In: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2011. v. 25. p. 255-255.
- 3) ENCARNAÇÃO, IC; PEREIRA NETO, ARL.; CRUZ, ACC; SIMÕES, CMO ; ARAGONEZ, A; SELLA, GC; CORDERO, EB; LUNA, MP. Análise do grau de proliferação e viabilidade de fibroblastos humanos gengivais cultivados sobre membranas absorvíveis. In: 27a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO, 2010, Águas de Lindóia.

Brazilian Oral Research (Proceedings of the 27aSBPqO Annual Meeting). São Paulo, 2010. v. 24. p. 283-283.

**5. Participação em eventos**

- 1) Congresso Internacional de Odontologia do Centenário da APCD, São Paulo – SP, 2011.
- 2) IN 2011- Latin American Osseointegration Congress, São Paulo – SP, 2011.
- 3) 28<sup>a</sup> Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, Águas de Lindóia – SP, 2011.
- 4) 3<sup>o</sup> Meeting Internacional de Implantodontia, Florianópolis – SC, 2010.
- 5) Curso Integrado de Excelência em Implantodontia Clínica - Mistura Fina, Florianópolis – SC, 2010.
- 6) 27<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO, Águas de Lindóia – SP, 2010.