

RENATO DE MELO MENDES

**EFEITO DO HIALURONATO DE SÓDIO NA  
CICATRIZAÇÃO DE ALVÉOLOS DE RATOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE – MG

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RENATO DE MELO MENDES

EFEITO DO HIALURONATO DE SÓDIO NA  
CICATRIZAÇÃO DE ALVÉOLOS DE RATOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE – MG


2006

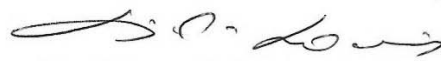
**“Efeito do hialuronato de sódio na cicatrização de alvéolos de ratos”.**

**Dissertação defendida em 20/10/2006**

**Resultado:** *Aprovado*

**Banca Examinadora:**

  
**Prof. Gregory Thomas Kitten**  
ICB/UFMG

  
**Prof. Luiz Orlando Ladeira**  
ICEX/UFMG

  
**Prof. Anderson José Ferreira**  
ICB/UFMG (Orientador)

  
**Profa. Gerluza Aparecida Borges Silva**  
ICB/UFMG (co-orientadora)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia e Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral ICB/UFMG, com apoio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq).

Dedico esta dissertação aos meus pais:  
Magda e José Raimundo, ao Miguel e aos  
meus orientadores Anderson e Gerluza.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por guiar meus caminhos em todos estes anos;

Aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram e ajudaram a enfrentar os desafios que a vida proporciona;

Aos meus orientadores Prof. Dr. Anderson José Ferreira e Profa. Dra. Gerluza Aparecida Borges Silva que empenharam ao máximo para a realização deste trabalho, e demonstram antes de tudo carinho e amizade. O mundo precisa de mais pessoas boas;

Ao Dr. Miguel Faria Lima, não só pelo convite a participar desta equipe de trabalho como também pelo incentivo à busca do conhecimento e aprimoramento profissional, durante todos estes anos;

Ao Prof. Dr. José Bento Alves, por sua contribuição ao desenvolvimento deste trabalho e do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento;

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliar, pelo auxílio na morfometria, sem o qual ainda estaria contando células e trabéculas;

Ao Prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia e à Mara Livia dos Santos pelo auxílio com as imagens histológicas;

À Cristiane Torres pelo auxílio com a imunohistoquímica.

Ao amigo Fabrício pela ajuda com a obtenção das imagens anatômicas;

À Mirelle por me ajudar nos momentos difíceis e entender minha ausência neste período;

A todos os amigos do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento: Aline, Bruno, Carol, Cíntia, Eric, Fred, Ivana, Maria Luísa, Pedro, Ludmila, Renata, Rodrigo, Stella, Thauana e especialmente a Francisco, Marina e Lorena pela grande contribuição nesta reta final do trabalho;

À Iraídes, pelo apoio durante todo o curso.

Aos amigos (alunos, funcionários e professores) do curso de pós-graduação em Biologia Celular;

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Processos de cicatrização alveolar.....	2
2. Indicadores do reparo ósseo.....	6
3. Hialuronana.....	10
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	17
1. Objetivo geral.....	17
2. Objetivos específicos.....	17
<b>III. METODOLOGIA</b> .....	18
1. Procedimento cirúrgico.....	18
2. Hialuronato de sódio.....	19
3. Carbopol.....	19
4. Análise macroscópica.....	20
5. Processamento histológico.....	21
6. Análise histológica e morfométrica.....	23
7. Análise estatística.....	26
8. Análise imunohistoquímica.....	26
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	30
1. Análise macroscópica.....	30
2. Histoquímica e análise morfométrica.....	31
3. Imunohistoquímica.....	58
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	63
<b>VI. CONCLUSÃO</b> .....	72
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	73
<b>ANEXO 1</b> .....	84



## RESUMO

O hialuronato de sódio (HNa) é um componente da matriz extracelular que desempenha importantes propriedades biológicas nos processos de morfogênese e cicatrização tecidual, por facilitar migração, adesão, proliferação e diferenciação celular. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do HNa na cicatrização de alvéolos de ratos, após exodontia dos primeiros molares superiores. Ratos Holtzman machos foram submetidos à exodontia dos primeiros molares superiores direitos (tratados com HNa 1%) e esquerdos (controles-coágulo). O HNa (~0,1ml) foi injetado dentro dos alvéolos imediatamente após a extração. Os animais foram sacrificados com 02, 07, 14 e 21 dias após a exodontia, e os alvéolos foram processados para análise histológica e morfométrica dos terços apicais e médios usando a técnica de coloração com o tricrômico de Masson. Para avaliar o efeito físico da injeção de um gel no alvéolo, um grupo adicional de ratos foi tratado com carbopol e sacrificado 07 dias após o tratamento. A expressão de proteína morfogenética do osso-2 (BMP-2) e osteopontina (OPN) foi analisada por imunohistoquímica aos 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias de cicatrização. Clinicamente, os resultados demonstraram que os alvéolos tratados com HNa apresentaram cicatrização mais avançada aos 21 dias após o tratamento. A análise morfométrica revelou que o tratamento com HNa induziu um aumento significativo na formação de trabéculas ósseas após 07, 14 (terço médio) e 21 dias, um menor número de células e um aumento no número de vasos após sete dias. A expressão de BMP-2 e de OPN nos alvéolos tratados com HNa foi mais precoce e pronunciada que nos alvéolos controles. Estes dados sugerem que o HNa acelera o processo de cicatrização de alvéolos de ratos.

## **ABSTRACT**

The sodium hyaluronate (HNa) is a component of extracellular matrix that plays important role in the morphogenesis process and tissue healing. Its actions involve stimulation of migration, adhesion, proliferation and cell differentiation. The aim of this study was to evaluate the effect of HNa in sockets healing of rats after upper first molars extraction. Male Holtzman rats were submitted to extraction of right (treated with 1% HNa) and left upper first molars (control-coagulum). HNa (~ 0.1 ml) was injected into the sockets immediately after the extraction. The animals were sacrificed at 02, 07, 14 and 21 days after tooth extraction and the sockets were processed to histological and morphometric analysis of the apical and middle thirds using Masson's trichrome staining. To evaluate the mechanical effect of gel injection into sockets, an additional group of rats was treated with carbopol and sacrificed 07 days after tooth extraction. Expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and osteopontin (OPN) was determined by immunohistochemistry at 01, 02, 03, 04, 05 and 07 days after tooth extraction. Clinically, the results demonstrated that HNa-treated sockets presented a more pronounced healing process after 21 days of treatment. Morphometric analyses showed that HNa treatment induced a significantly increase in the trabecular bone formation after 07, 14 (middle third) and 21 days, a decrease in cells counting and an increase in vessels counting after 07 days. BMP-2 and OPN expression was earlier and more pronounced in HNa-treated sockets compared with control sockets. These data suggest that HNa treatment stimulates the healing process in rat sockets.

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela I:</b> Parâmetros e escores utilizados para análise macroscópica do grau de cicatrização dos alvéolos de ratos.....	20
<b>Tabela II:</b> Distribuição dos animais em grupos experimentais, para análise histológica e morfométrica.....	23
<b>Tabela III:</b> Distribuição dos animais em grupos experimentais, para análise imunohistoquímica.....	27

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Hialuronana contendo repetidas unidades dissacarídicas.....	12
<b>Figura 2:</b> Imagem anatômica do primeiro molar superior.....	25
<b>Figura 3:</b> Divisão anatômica do alvéolo em terços apical, médio e cervical....	25
<b>Figura 4:</b> Grau de cicatrização macroscópica nos alvéolos controles e tratados, 21 dias após a exodontia.....	30
<b>Figura 5:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 02 dias.....	32
<b>Figura 6:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 02 dias.....	33
<b>Figura 7:</b> Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 02 dias após a exodontia.....	34
<b>Figura 8:</b> Número de vasos sanguíneos presentes no terço apical dos alvéolos controles e tratados, 02 dias após a exodontia.....	35
<b>Figura 9:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 07 dias.....	37
<b>Figura 10:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 07 dias.....	38
<b>Figura 11:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 07 dias.....	39
<b>Figura 12:</b> Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados, 07 dias após a exodontia.....	40
<b>Figura 13:</b> Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 07 dias após a exodontia.....	41

<b>Figura 14:</b> Número de vasos sanguíneos presentes nos alvéolos controles e tratados, 07 dias após a exodontia.....	42
<b>Figura 15:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 14 dias.....	44
<b>Figura 16:</b> Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados, 14 dias após a exodontia.....	45
<b>Figura 17:</b> Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 14 dias após a exodontia.....	46
<b>Figura 18:</b> Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 21 dias.....	48
<b>Figura 19:</b> Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados, 21 dias após a exodontia.....	49
<b>Figura 20:</b> Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 21 dias após a exodontia.....	50
<b>Figura 21:</b> Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados em função do tempo de cicatrização.....	52
<b>Figura 22:</b> Número de núcleos celulares nos alvéolos controles e tratados em função do tempo de cicatrização.....	53
<b>Figura 23:</b> Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados com carbopol, 07 dias após a exodontia.....	55
<b>Figura 24:</b> Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados com carbopol, 07 dias após a exodontia.....	56
<b>Figura 25:</b> Número de vasos sanguíneos presentes nos alvéolos controles e	

tratados com carbopol, 07 dias após a exodontia.....	57
<b>Figura 26:</b> Expressão de BMP-2 em alvéolos de ratos e em secções de cabeça de gambá, com seus respectivos controles negativos.....	59
<b>Figura 27:</b> Expressão de BMP-2 nos alvéolos controles e tratados, após 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias de cicatrização.....	60
<b>Figura 28:</b> Expressão de OPN em alvéolos de ratos e seu respectivo controle negativo.....	61
<b>Figura 29:</b> Expressão de OPN nos alvéolos controles e tratados, após 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias de cicatrização.....	62

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BMPs	proteínas morfogenéticas do osso
CAPES	coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CEBIO	centro de bioterismo
CETEA	comitê de ética em experimentação animal
DAB	diaminobenzidina
DP	doença periodontal
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPM	erro padrão da média
FGF	fator de crescimento de fibroblastos
FNT	formalina neutra tamponada
GAGs	glicosaminoglicanas
HNa	hialuronato de sódio
HYA	hialuronana
ICB	instituto de ciências biológicas
LP	ligamento periodontal
MEC	matriz extracelular
OPN	osteopontina
PBS	solução tampão de fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PRPq	pró-reitoria de pesquisa
RHAMM	receptores para mobilidade mediada por hialuronana
TGF- $\beta$	fator de crescimento de transformação $\beta$
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	fator de crescimento de endotélio vascular

## I. INTRODUÇÃO

A população brasileira com faixa etária entre 35 e 44 anos apresenta em média, 13,2 dentes perdidos, enquanto a população entre 65 e 74 anos apresenta cerca de 25,8 dentes perdidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). A perda precoce dos dentes tem como causas principais traumas (ANDREASEN & ANDREASEN, 1991), a doença cárie e a doença periodontal (DP) (FRAZÃO *et al.*, 2003). Medidas preventivas como a fluoretação da água e o melhor acesso da população às informações em relação à cárie dentária têm propiciado a redução da prevalência desta doença na população brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Entretanto, em virtude do declínio da ocorrência de cáries, aumenta a perspectiva da manutenção de um maior número de dentes na cavidade bucal, bem como do aumento da prevalência da DP (MENEGHIM *et al.*, 2002). Doença periodontal é uma condição inflamatória de origem bacteriana caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos periodontais: gengiva, ligamento periodontal (LP), cemento e osso alveolar. A evolução do processo inflamatório afeta os tecidos de suporte do dente, levando à perda óssea, com formação de bolsa periodontal e possibilidade de perda do elemento dentário (LINDHE, 1999). Nestes casos, a utilização de implantes tem se tornado uma alternativa de sucesso para reabilitar as áreas edêntulas. Entretanto, DP e ausência de dentes por um período prolongado acarretam em um processo de reabsorção óssea dos maxilares extremamente prejudicial à reconstituição da função dentária por meio dos implantes (BODIC *et al.*, 2005). Métodos de reconstrução óssea são pré-requisitos essenciais para a reabilitação funcional do sistema estomatognático, especialmente na correção de perdas traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula (WILTFANG *et al.*, 2004). A



recuperação da estrutura óssea perdida pode demandar a realização de cirurgias de enxerto ósseo ou inserção de biomateriais (AROSARENA & COLLINS, 2005; IZUKA *et al.*, 2005), processos lentos e onerosos para os pacientes. A busca por um material ideal para enxertia óssea permanece como um grande desafio (WONG & RABIE, 2005). Refinamentos nas técnicas de engenharia tecidual ao longo da década passada possibilitaram a regeneração óssea *in vivo*, em muitos modelos animais e a transmissão destas técnicas para aplicações ortopédicas. Enquanto esses avanços são promissores para uma eventual regeneração óssea guiada nos maxilares, muito ainda precisa ser aprendido sobre a interação de biomoléculas envolvidas na cicatrização óssea, e sobre o melhor método de administração destes fatores (AROSARENA & COLLINS, 2005). A compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de reparo ósseo é essencial para subsidiar os protocolos de tratamento, tanto da DP como de outros procedimentos que envolvam a regeneração óssea.

### **1. Processos de cicatrização alveolar**

O tecido ósseo pode ser formado através de dois processos de ossificação distintos. A diferenciação de células precursoras mesenquimais diretamente em osteoblastos, como observado no desenvolvimento dos ossos faciais, representa o processo de ossificação intramembranosa, enquanto o processo de ossificação sobre um modelo de cartilagem intermediária, presente no desenvolvimento de ossos longos, caracteriza o processo de ossificação endocondral (RENGACHARY, 2002; STREET *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003). No alvéolo dentário, cavidade óssea deixada após exodontias, observa-se

apenas ossificação intramembranosa (KANYAMA *et al.*, 2003), sem formação de cartilagem ou presença de condrócitos (SHYNG *et al.*, 1999).

A cicatrização normal do osso, após injúrias, é caracterizada por ações integradas de diferentes células e pode ser dividida em fases seqüenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas (SASAKI & WATANABE, 1995; SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), síntese de matriz extracelular (MEC), mineralização do osteóide, maturação e remodelação óssea (LALANI *et al.*, 2005). O reparo tecidual inicia-se com a hemostasia, responsável por bloquear a perda de sangue através de vasos rompidos (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

Após a extração de um dente, a formação de um coágulo sanguíneo no alvéolo dentário é um passo fundamental para as fases subseqüentes do reparo (YUGOSHI *et al.*, 2002). A formação da rede de fibrina auxilia inicialmente o influxo de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, característicos da resposta inflamatória aguda (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), bem como possibilita a invasão de fibroblastos e células endoteliais, presentes no LP remanescente (YUGOSHI *et al.*, 2002). O LP contém uma mistura de populações celulares incluindo progenitores para osteoblastos (DEVLIN & SLOAN, 2002), cementoblastos e fibroblastos, essenciais para remodelação e formação óssea inicial em processos de cicatrização alveolar (LEKIC *et al.*, 1997). Células osteoprogenitoras podem ser derivadas também da medula óssea (SHYNG *et al.*, 1999; DEVLIN & SLOAN, 2002) e periósteo (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; RASUBALA *et al.*, 2004).

Macrófagos e fibroblastos imaturos parecem ser atraídos para áreas com baixa concentração de oxigênio e altos níveis de lactato, presentes na ferida

alveolar em consequência do metabolismo das células inflamatórias (LALANI *et al.*, 2005). Macrófagos liberam um fator de crescimento chamado fator angiogênico dependente de macrófago, quimiotático para células endoteliais. Estas secretam o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) que apresenta importantes funções na angiogênese e vasculogênese (LALANI *et al.*, 2005), essenciais nos processos de cicatrização de feridas (SAVANI *et al.*, 2001). Novos fibroblastos, produzidos por diferenciação de células mesenquimais e mitoses de fibroblastos pré-existentes, sintetizam uma delicada matriz de colágeno que, junto com os capilares neoformados, caracteriza o tecido de granulação (YUGOSHI *et al.*, 2002). O coágulo é progressivamente reabsorvido quando é invadido por fibroblastos derivados do LP, que proliferam ativamente e migram em direção a ele, formando um tecido conjuntivo imaturo. Posteriormente, diferenciam-se em osteoblastos responsáveis por produzir novo tecido ósseo durante a cicatrização alveolar (TEÓFILO *et al.*, 2001). As fibras colágenas inicialmente depositadas formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de osso neoformado (SHYNG *et al.*, 1999). Osteoclastos atuam na remodelação óssea das margens do alvéolo e dos septos inter-radulares remanescentes, presentes após a extração de dentes multiradulares (LINDHE, 1999). Por fim, os eventos de cicatrização alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular (DEVLIN & SLOAN, 2002).

Análises histológicas do processo de cicatrização alveolar em ratos, dois dias após a extração dentária, demonstraram o alvéolo completamente preenchido com coágulo sanguíneo, além de remanescentes do LP (KANYAMA *et al.*, 2003). Vinte e quatro horas após, observaram-se numerosos macrófagos, capilares neoformados e fibroblastos, estes, claramente visíveis no LP

remanescente (PINTO *et al.*, 2001). Iniciou-se a reabsorção do septo ósseo interradicular por osteoclastos, um passo importante no processo de cicatrização alveolar (SHYNG *et al.*, 1999; KURIHASHI *et al.*, 2002), e proliferação do epitélio da mucosa oral nas bordas da ferida cirúrgica, com invaginação em direção ao interior do alvéolo (ZIED *et al.*, 2005). Após quatro dias de cicatrização, observou-se a migração de células endoteliais e fibroblastos para o tecido de granulação e a presença de numerosas células como osteoclastos e pré-osteoblastos na superfície do osso trabecular adjacente ao alvéolo (KANYAMA *et al.*, 2003). Outros autores relataram a presença de pequenas espículas ósseas após quatro dias de reparo, bem como aos sete dias (BOECK *et al.*, 1999). Ao final da primeira semana de cicatrização, ainda se observou a presença de coágulo sanguíneo. O alvéolo estava preenchido com tecido conjuntivo imaturo, rico em fibroblastos (YUGOSHI *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003) e exibindo pronunciada rede vascular (PINTO *et al.*, 2001). A formação de matriz óssea com numerosos osteoblastos nas bordas bem como a presença de pequenas espículas ósseas concentrou-se, aos sete dias, no terço apical do alvéolo. O epitélio da mucosa gengival apresentou solução de continuidade com a presença de linfócitos e macrófagos no conjuntivo subjacente (YUGOSHI *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003). Outros autores observaram a migração epitelial quase recobrando o alvéolo (PINTO *et al.*, 2001) ou obliterando-o completamente (ZIED *et al.*, 2005). Houve menor quantidade de infiltrado inflamatório do que em períodos iniciais de cicatrização (KURIHASHI *et al.*, 2002). Dez dias após a exodontia, o alvéolo exibiu grande quantidade de trabéculas ósseas e após quatorze dias de cicatrização, apresentou-se quase completamente preenchido por tecido ósseo que sofreu remodelação (KANYAMA *et al.*, 2003) e maturação

quase idêntica ao tecido ósseo pré-existente (KURIHASHI *et al.*, 2002). Outros autores relataram que o alvéolo encontra-se, neste período, igualmente ocupado por tecido conjuntivo e trabécula óssea (TEÓFILO *et al.*, 2001). Após quinze dias de reparo, a ferida estava recoberta com epitélio da mucosa gengival (BOECK *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2001) e a crista óssea encontrava-se completamente remodelada (ZIED *et al.*, 2005). Ao final da terceira semana de cicatrização, o alvéolo estava preenchido por uma rede de trabéculas ósseas espessas, circundando espaços medulares contendo tecido conjuntivo frouxo (TEÓFILO *et al.*, 2001). O preenchimento do alvéolo com trabéculas ósseas espessas e bem definidas, vinte e quatro dias após a extração, praticamente definiu o estágio final do processo de cicatrização (ZIED *et al.*, 2005). Apesar de estar completamente preenchido por trabéculas ósseas, a densidade óssea alveolar máxima foi alcançada aparentemente no trigésimo dia pós-operatório (LAMANO CARVALHO *et al.*, 1997).

## **2. Indicadores do reparo ósseo**

Fatores de crescimento são proteínas que servem como agentes de sinalização para as células e influenciam funções como divisão celular, síntese de matriz e diferenciação tecidual. Podem, portanto, desempenhar importante papel na formação óssea e de cartilagem, cicatrização de fraturas e reparo de tecidos músculo-esqueléticos (LIEBERMAN *et al.*, 2002). Alguns fatores de crescimento, tais como fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e VEGF são expressos de modo temporal nos processos de cicatrização tecidual e, provavelmente, devem estar envolvidos na sinalização, controle e indução

durante o processo de reparo ósseo (STREET *et al.*, 2002). O PDGF pode estimular a proliferação de fibroblastos periodontais e sua migração em direção ao coágulo em estágios iniciais da cicatrização alveolar (TEÓFILO *et al.*, 2001), enquanto TGF- $\beta$  parece ter um papel importante na diferenciação dos fibroblastos em osteoblastos (SASAKI & WATANABE, 1995). Além dos fatores de crescimento, a expressão de algumas macromoléculas da MEC como colágeno, fibronectina, osteopontina (OPN), dentre outras, tem sido referenciada como aspecto indicativo do processo de reparo ósseo (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

### *Colágeno*

A produção de componentes da MEC tem sido amplamente investigada durante a cicatrização de fraturas e desenvolvimento de ossos longos. Os colágenos são seus principais componentes e parecem desempenhar papel crítico durante a cicatrização óssea por facilitar a formação de espículas ósseas iniciais (BOULETREAU *et al.*, 2002). Os colágenos tipo I, II, IV, IX e X são expressos na fase de proliferação como componentes essenciais da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). Durante os processos de cicatrização, fibroblastos secretam uma matriz rica em colágeno tipo I, que juntamente com outras proteínas como OPN, osteocalcina, osteonectina e fibronectina compõem a matriz orgânica do tecido ósseo (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

### *Osteopontina*

Proteínas da matriz não-colagenosas representam a segunda principal classe de componentes da MEC do tecido ósseo e incluem osteonectina,

osteocalcina e OPN (BOULETREAU *et al.*, 2002). Após a extração dentária, células progenitoras presentes no alvéolo, passam por vários estágios de maturação expressando sequencialmente osteonectina, OPN e osteocalcina (DEVLIN & SLOAN, 2002). Tais proteínas compõem a matriz orgânica do tecido ósseo (SHYNG *et al.*, 1999) e parecem induzir a maturação dos componentes da MEC, por meio da mineralização da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). Osteopontina é observada em fibroblastos, pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos (PERRIEN *et al.*, 2002) e osteoclastos (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000). Após o início da formação da matriz óssea, é produzida e secretada por osteoblastos, portanto, sua expressão coincide com a proliferação e diferenciação de células osteoblásticas durante a formação óssea (PERRIEN *et al.*, 2002), sendo considerada um marcador de maturação de células tronco osteogênicas (SHYNG *et al.*, 1999). Acredita-se que promova adesão e quimiotaxia para osteoblastos (BOULETREAU *et al.*, 2002) e osteoclastos (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; PERRIEN *et al.*, 2002). Sua expressão no processo de cicatrização alveolar em ratos foi demonstrada aos três dias de cicatrização, e com forte evidenciação após quatro e cinco dias de reparo, simultaneamente com a neoformação óssea, o que pode indicar um papel regulatório na mineralização. O modelo de marcação foi similar em seis e sete dias, mas observou-se pouca marcação no oitavo dia e quase nenhuma após dez dias de cicatrização (SHYNG *et al.*, 1999).

### *Proteínas morfogenéticas do osso*

Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são membros da superfamília de TGF- $\beta$ , tendo sido descritos, até o momento, trinta subtipos desta

molécula (LIEBERMAN *et al.*, 2002), altamente conservada entre as espécies (AROSARENA & COLLINS, 2005). São os mais potentes fatores de crescimento ósseo conhecidos (AROSARENA & COLLINS, 2005) e apresentam propriedades mitogênicas e morfogenéticas (LIEBERMAN *et al.*, 2002). Este efeito, em fibroblastos e osteoblastos, induz a síntese de componentes da MEC como colágeno e fibras elásticas, além de proteínas da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). A expressão inicial de BMP-2 estimula a diferenciação de células mesenquimais progenitoras em células osteoprogenitoras que, mais adiante, diferenciam-se em pré-osteoblastos e osteoblastos maduros (WONG & RABIE, 2005; SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). A utilização de BMP-2 parece acelerar o reparo ósseo em modelos de cicatrização de fraturas (LIEBERMAN *et al.*, 2002; RASUBALA *et al.*, 2004) e de defeitos ósseos em mandíbula (AROSARENA & COLLINS, 2005), enquanto a ausência de sua expressão causa transdução insuficiente de sinal e menor síntese de proteínas da matriz óssea (SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). Pode ser utilizado como marcador do processo de cicatrização, correlacionado com diferentes estágios de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos (RASUBALA *et al.*, 2004; WILTFANG *et al.*, 2004).

#### *Fator de crescimento endotelial vascular*

Angiogênese ou formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes é um processo essencial para regeneração tecidual (KUMAR *et al.*, 2004) e formação óssea (KANYAMA *et al.*, 2003; WONG & RABIE, 2005). Para formar novos vasos, as células endoteliais têm que quebrar suas junções com as células adjacentes, migrar, proliferar e finalmente restabelecer suas



junções intercelulares, levando à formação de novos capilares (TAKAHASHI *et al.*, 2005). O VEGF induz um aumento na permeabilidade vascular e atua como um potente fator angiogênico *in vivo*, ao estimular a diferenciação e proliferação de células endoteliais e a vasculogênese (BOULETREAU *et al.*, 2002; LALANI *et al.*, 2005). A família dos VEGFs é constituída dos seguintes fatores: VEGF, VEGF-B, VEGF-C, além do fator de crescimento placentário (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000). Uma vez que o suporte sanguíneo é restabelecido, a diferenciação endotelial é interrompida e o processo osteogênico iniciado (PACICCA *et al.*, 2003). A neoformação vascular acarreta em um aumento da população de células mesenquimais (WONG & RABIE, 2005) e de precursores de osteoblastos e osteoclastos para a região de injúria (GIAVARESI *et al.*, 2005). Osteoblastos são células com alta demanda metabólica e requerem um suprimento vascular adequado (GIAVARESI *et al.*, 2005), portanto, o VEGF influencia diretamente a neoformação óssea em processos de cicatrização (PACICCA *et al.*, 2003). Áreas de neoformação óssea apresentam expressão ativa de VEGF em células mesenquimais precursoras, sugerindo uma coordenação espacial íntima entre as áreas de revascularização e de formação óssea (PACICCA *et al.*, 2003). Estudos de vasculogênese indicam sua importância em angiogênese inicial, enquanto sua inibição interrompe o reparo de fraturas femorais e defeitos ósseos corticais experimentais (STREET *et al.*, 2002).

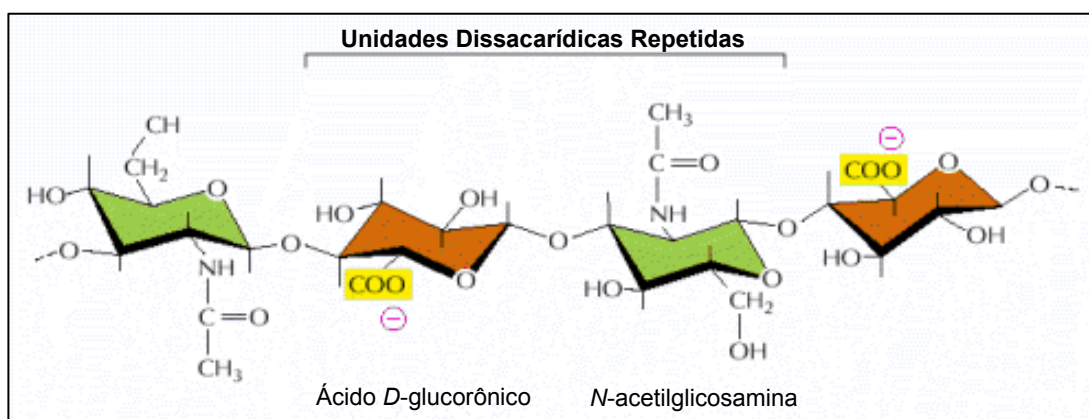
### **3. Hialuronana**

Por um longo período, acreditava-se que a MEC, produzida por quase todos os organismos multicelulares, servia apenas como uma estrutura inerte para estabilizar a estrutura física dos tecidos (ALBERTS *et al.*, 2004). Entretanto,

sabe-se hoje que ela influencia a migração, proliferação, adesão, forma e função das células com as quais faz contato (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000). Duas classes principais de macromoléculas extracelulares compõem a matriz: as glicosaminoglicanas (GAGs) e as proteínas fibrosas, incluindo o colágeno, a elastina, a fibronectina e a laminina. Glicosaminoglicanas são cadeias polissacarídicas não-ramificadas compostas de unidades dissacarídicas, nas quais um dos dois açúcares é sempre um amino açúcar (*N*-acetilglucosamina ou *N*-acetilgalactosamina), enquanto o segundo açúcar é, normalmente, um ácido urônico (glucorônico ou idurônico). São classificadas de acordo com seus açúcares, o tipo de ligação entre eles e o número e localização dos grupos sulfato em quatro grupos principais: sulfato de condroitina e dermatana, sulfato de heparan, sulfato de queratana e hialuronana (ALBERTS *et al.*, 2004).

A hialuronana (HYA), também chamada de hialuronato ou ácido hialurônico (ASLAN *et al.*, 2006), foi isolada inicialmente em 1934 (MEYER & PALMER, 1934) e teve sua estrutura primária descrita em 1955 (LINKER *et al.*, 1955). É uma GAG de alto peso molecular ( $10^4$ - $10^7$ Da), consistindo de repetidas unidades dissacarídicas não-sulfatadas de *N*-acetilglucosamina e ácido *D*-glucorônico (MOSELEY *et al.*, 2002, PRINCE, 2004) (Fig. 1). Difere das demais GAGs as quais apresentam unidades sulfatadas e cadeias relativamente curtas (ALBERTS *et al.*, 2004) com cerca de 15-20 KDa (FRASER *et al.*, 1997). É sintetizada dentro da célula e liberada diretamente na superfície celular por um complexo enzimático embebido na membrana plasmática (ALBERTS *et al.*, 2004). Possui um sítio para a ligação de proteoglicanas, permitindo a formação de malhas moleculares complexas. Deste modo, é capaz de funcionar como um esqueleto central da MEC (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000).

A HYA é amplamente distribuída em tecidos como pele (JUHLIN, 1997), fluidos das junções sinoviais, revestimentos dos tendões (ENGSTRÖM-LAURENT, 1997; FRASER *et al.*, 1997), olhos e na maioria dos líquidos corpóreos (MOSELEY *et al.*, 2002; PRINCE, 2004), além de estar presente em todas as MECs. Possui a mesma estrutura em todas as espécies (LAURENT & FRASER, 1992). A viscosidade da solução de HYA 1% com peso molecular de  $3-4 \times 10^6$ Da é cerca de 500.000 vezes maior que a água (FRASER *et al.*, 1997), sugerindo que possa ser um lubrificante biológico ideal (MOSELEY *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Hialuronana contendo repetidas unidades dissacarídicas de N-acetilglicosamina e ácido D-glucorônico (ALBERTS *et al.*, 2004).

#### *Papel da HYA nos processos de cicatrização e reparo ósseo*

Hialuronana é um dos componentes da MEC que atuam na morfogênese tecidual, migração, adesão e diferenciação celular (ASLAN *et al.*, 2006; DECHERT *et al.*, 2006). Células em migração e proliferação no desenvolvimento de embriões e em processos de regeneração encontram-se frequentemente envolvidas por uma matriz rica em HYA (TOOLE, 1997; SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000). A ausência de formação de cicatrizes em fetos,

após injúrias, pode ser decorrente da grande concentração de HYA (JUHLIN, 1997). Tem sido sugerido que em processos de cicatrização e morfogênese, uma vez que a formação esteja completa, sua concentração é reduzida (TOOLE, 1997; PILLONI & BERNARD, 1998; DECHERT *et al.*, 2006), sendo substituída por GAGs sulfatadas (GERDIN & HÄLLGREN, 1997). Hialuronana exerce influência no comportamento celular pela interação direta com receptores de superfície celular (TURLEY *et al.*, 1991; DECHERT *et al.*, 2006), especialmente CD44 (LESLEY *et al.*, 2000; SUGAHARA *et al.*, 2003; LESLEY *et al.*, 2004) e receptores para mobilidade mediada por HYA (RHAMM) (TOOLE, 1997; SAVANI *et al.*, 2001; TURLEY *et al.*, 2002; NEDVETZKI *et al.*, 2004; GHATAK *et al.*, 2005), via ativação de proteínas quinases (ZHANG *et al.*, 1998; BOURGUIGNON *et al.*, 2002; SLEVIN *et al.*, 2002; GHATAK *et al.*, 2005). RHAMM, descrito inicialmente em 1992 (HARDWICK *et al.*, 1992), é expresso em superfície celular, citoplasma, núcleo e citoesqueleto (NEDVETZKI *et al.*, 2004). A transdução do sinal, após ligação à HYA, acarreta rearranjos estruturais do citoesqueleto (TOOLE *et al.*, 2002; BOURGUIGNON *et al.*, 2002). O bloqueio específico destes receptores indica que RHAMM regula a migração de células endoteliais, enquanto CD44 é o principal determinante de sua proliferação (SAVANI *et al.*, 2001), fornecendo evidências de seu envolvimento na angiogênese (SAVANI *et al.*, 2001; SLEVIN *et al.*, 2002; GIAVARESI *et al.*, 2005). A interação entre CD44 e HYA é implicada na adesão primária de leucócitos ao endotélio, em sítios de inflamação (LESLEY *et al.*, 2004). CD44 e RHAMM desempenham também, papel crítico na migração e proliferação de células normais e tumorais (ANNABI *et al.*, 2004; NEDVETZKI *et al.*, 2004; GHATAK *et al.*, 2005). Tem-se observado o aumento na produção de HYA em numerosas situações patofisiológicas (TAKAHASHI *et al.*, 2005) como

artrites (ENGSTRÖM-LAURENT, 1997; YINGSUNG *et al.*, 2003; NEDVETZKI *et al.*, 2004) e tumores (TOOLE *et al.*, 2002; SIMPSON *et al.*, 2002).

As propriedades biológicas da HYA sugerem que ela seja importante nos processos de cicatrização de feridas (DECHERT *et al.*, 2006). Em feridas crônicas, observa-se a liberação excessiva de radicais superóxidos ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxil ( $OH^-$ ), a partir de leucócitos polimorfonucleares. Apesar do papel benéfico que estes radicais desempenham em matar patógenos microbianos, podem ser prejudiciais aos tecidos do hospedeiro por inativar antioxidantes enzimáticos e causar danos indiscriminados aos constituintes celulares, tais como DNA, lipídeos e proteínas, e a componentes da MEC, alterando o metabolismo celular. O alto peso molecular da HYA é um fator chave em sua habilidade de atuar como antioxidante, por competir diretamente com sítios de ligação celulares e moleculares para fixação de radicais livres (MOSELEY *et al.*, 2002). A aplicação tópica de HYA em feridas dérmicas, além da remoção de radicais livres, tem como benefícios a hidratação da ferida e o bloqueio do excesso de hialuronidase que possa estar presente (DECHERT *et al.*, 2006). Como resultado da ação de hialuronidases e radicais livres, a HYA é seccionada em fragmentos menores (LIU *et al.*, 1999; TAKAHASHI *et al.*, 2005). O tamanho da cadeia de HYA influencia sua ligação aos receptores celulares, alterando a proliferação e migração celular (LESLEY *et al.*, 2000; SLEVIN *et al.*, 2002; SUGAHARA *et al.*, 2003).

Durante os processos de reparo ósseo, a HYA pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do ambiente local, em virtude de suas propriedades físico-químicas (SASAKI & WATANABE, 1995), além de mediar a adesão de osteoclastos à superfície óssea (PRINCE, 2004), acelerar a

revascularização (GIAVARESI *et al.*, 2005) e a formação óssea *in vitro* (PILLONI & BERNARD, 1998) e *in vivo* (SASAKI & WATANABE, 1995). Sua habilidade de ocupar grandes volumes da MEC faz com que atue como preenchedor de espaço (PILLONI & BERNARD, 1998). Em um modelo de formação óssea intramembranosa *in vitro*, utilizando culturas com células mesenquimais de calvária de ratos, a HYA preveniu inicialmente a agregação celular, e sob estas condições, ocorreram intensa migração e divisão celular (PILLONI & BERNARD, 1998). Após 48 horas, os primeiros fibroblastos formados e as células mesenquimais indiferenciadas ainda presentes, secretaram hialuronidase, responsável pela remoção natural da HYA. Os elementos celulares apresentaram, neste momento, a quantidade necessária de HYA para a formação de pontes de ligação entre a HYA e seus receptores celulares, um mecanismo importante na agregação celular (PILLONI & BERNARD, 1998).

Géis à base de HYA têm sido utilizados em modelos de defeitos ósseos, isoladamente, ou como carreadores para BMP-2 (ITOH *et al.*, 2001; AROSARENA & COLLINS, 2005), matriz óssea desmineralizada (COLNOT *et al.*, 2005), compósitos de hidroxiapatita (BAKOS *et al.*, 1999) e enxertos ósseos (GIAVARESI *et al.*, 2005; ASLAN *et al.*, 2006), além do tratamento de osteoartrites (BARBUCCI *et al.*, 2002). Quando introduzidos no defeito ósseo, aumentam consideravelmente a eficácia de terapias celulares por facilitarem a migração e diferenciação celular (GRIGOLO *et al.*, 2001; LISIGNOLI *et al.*, 2002; AROSARENA & COLLINS, 2005). A HYA exibe grande potencial osteocondutor (LIU *et al.*, 1999), entretanto, não são observadas propriedades osteoindutoras, já que o implante ectópico deste polímero não resulta em neoformação óssea (AROSARENA & COLLINS, 2005). Sua utilização apresenta boa

biocompatibilidade (BAKOS *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 1999), não tendo apresentado qualquer evidência de reação tecidual ou inflamação (BARBUCCI *et al.*, 2002).

Um dos objetivos finais de terapias cirúrgicas ortopédicas é obter menor período de cicatrização e maturação ósseas (GIAVARESI *et al.*, 2005). Nos processos pós-cirúrgicos na área de odontologia, busca-se também, a utilização de procedimentos que minimizem o processo de cicatrização. Os eventos de cicatrização após extração dentária podem servir como modelo experimental para estudar a cascata de reparo ósseo, nas fases de inflamação, revascularização, deposição de MEC, osteoindução, osteocondução e remodelação óssea (KURIHASHI *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003; TEÓFILO *et al.*, 2004). Entender o mecanismo molecular de cada fase pode resultar em novas estratégias para reconstrução óssea alveolar e aceleração do processo de osteointegração ao redor de implantes dentários, além de otimizar a cicatrização óssea (KANYAMA *et al.*, 2003). Vários trabalhos têm avaliado o reparo ósseo frente à inserção de diferentes drogas e biomateriais nos alvéolos dentários, imediatamente após a remoção dos dentes (BOECK *et al.*, 1999; SHYNG *et al.*, 1999; WILTFANG *et al.*, 2004). Biocompatibilidade e capacidade de absorção pelo organismo são aspectos essenciais a serem considerados na seleção dos materiais potencialmente condutores e indutores de osteogênese. Atendendo a estes critérios e baseado no sucesso de terapias anteriores em outras especialidades médicas, é possível que a HYA possa atuar como agente osteocondutor nos alvéolos dentários. Diminuir o tempo de cicatrização alveolar ou maturação de enxertos ósseos poderia auxiliar no restabelecimento da função mastigatória de forma mais confortável e menos dispendiosa para os pacientes.

## **II. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do hialuronato de sódio (HNa) no reparo de alvéolos de ratos, após exodontia dos primeiros molares superiores.

### **2. Objetivos específicos**

1. Avaliar clinicamente o grau de cicatrização da área operada, 21 dias após a exodontia.
2. Avaliar histologicamente, por meio de análises qualitativas e morfométricas, o reparo alveolar nos períodos de 02, 07, 14 e 21 dias.
3. Correlacionar o grau de cicatrização (avaliação macroscópica) com as análises histológicas.
4. Analisar, por meio de imunohistoquímica, a expressão temporal de BMP-2 e OPN, durante o processo de cicatrização alveolar, nos períodos de 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias.



### III. METODOLOGIA

#### 1. Procedimento cirúrgico

Foram utilizados ratos Holtzman machos, com idade média de 04 meses e peso variando entre 300 e 360g, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Durante o período experimental, os animais foram mantidos em biotério apropriado, acondicionados em gaiolas plásticas contendo um número máximo de 04 animais, sob temperatura ambiente e controle de luz automática (07h-19h). Os animais receberam ração para animais de laboratório e água *ad libitum*. O projeto de pesquisa foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG onde foi aprovado sob o número 142/04 (ANEXO 01).

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular de uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (0,1ml/100g), utilizado como relaxante muscular, e cloridrato de Ketamina 10% (0,1ml/100g), anestésico geral. Utilizando-se um instrumento de Hollembach para sindesmotomia e uma pinça dente de rato para luxação, foram extraídos os dentes primeiros molares superiores direitos e esquerdos. Após confirmação da integridade dos dentes removidos e dos alvéolos, foi injetado aproximadamente 0,1ml de gel de HNa 1% nos alvéolos direitos, de modo que todo o alvéolo fosse preenchido com o gel. Nenhuma solução foi injetada nos alvéolos esquerdos, ou seja, foram naturalmente preenchidos com coágulo (alvéolo controle). Não foi realizado nenhum procedimento de sutura após a exodontia. Em seguida, os animais foram identificados e posicionados nas gaiolas plásticas deitados sobre o

lado direito para evitar que o gel escorresse e pudesse ter contato com o alvéolo esquerdo. A anestesia geral teve duração de 05 horas em média, evitando assim, uma eventual remoção do gel pela alimentação durante este período. Os animais receberam ração triturada e umedecida, além de água *ad libitum* nas primeiras 48 horas após a cirurgia e, após este período, dieta normal até a data do sacrifício. Os animais foram sacrificados por decapitação e as maxilas foram imediatamente fixadas por imersão em formalina neutra tamponada (FNT) 10%, à temperatura ambiente.

## **2. Hialuronato de sódio**

O HNa foi obtido junto à farmácia universitária da Faculdade de Farmácia da UFMG. Comercialmente, apresenta-se em sua fórmula solúvel como gel ( $C_{14}H_{20}NNaO_{11}$ ) $_n$ .Na. A análise do produto (fabricante NIKKOL - lote galena 7041201510), fornecida pelo distribuidor Galena, descreve-o como um líquido viscoso incolor, com pH 6,1, presença de metais pesados e arsênio menor que 2ppm, conteúdo de proteína 0,0%, ácido glucorônico 5,2mg/ml e ácido hialurônico 1,1%. O HNa é um polímero, por isso verifica-se a letra "n" na fórmula molecular e não há peso molecular definido.

## **3. Carbopol**

O carbopol também foi obtido junto à farmácia universitária da Faculdade de Farmácia da UFMG. A solução estoque consistiu de gel de carbopol 1%, composto de: carbopol 1% (espessante aniônico); propilenoglicol 5% (umectante); nipagin 0,2% (conservante antifúngico); ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1% (quelante); AMP 95 0,6% (corretor de pH-

base); solução imidazolinidil uréia 40% - 0,3% (conservante antibacteriano); água destilada qsp (veículo). A solução estoque foi diluída em água destilada de forma a se obter uma solução final de gel de carbopol 0,5%.

#### 4. Análise macroscópica

Após fixação por um período de 48 horas, foi realizado o registro fotográfico dos alvéolos tratados (n=6) e controles (n=6) dos animais sacrificados vinte e um dias após a exodontia, com auxílio de uma câmera digital Sony (Cybershot DSC-P93). As imagens foram recortadas com auxílio do programa Corel Photo-Paint 12 e examinadas por 04 cirurgiões-dentistas, calibrados para a análise. Nenhum examinador recebeu qualquer informação sobre o tratamento dos alvéolos e o período de cicatrização. Foi solicitado que os profissionais indicassem em cada imagem, dispostas aleatoriamente, o grau de cicatrização do alvéolo, definido como: tecido de granulação, pouco cicatrizado, cicatrização moderada e cicatrizado. Foram conferidos, respectivamente, os escores 0, 1, 5 e 7 (Tab. I).

**Tabela I:** Parâmetros e escores utilizados para análise macroscópica do grau de cicatrização dos alvéolos de ratos.

<b>Grau de Cicatrização</b>	<b>Escore</b>
Tecido de granulação	0
Pouco cicatrizado	1
Cicatrização moderada	5
Cicatrizado	7

## 5. Processamento histológico

Após a fixação, as maxilas foram imersas em água corrente para remoção do excesso de fixador e neutralização do ácido fórmico através de quatro banhos de 15 minutos. Em seguida, foram desmineralizadas em solução de EDTA 10% (pH entre 7,2 e 7,4), por um período de aproximadamente 40 dias, sendo renovada duas vezes por semana. Após a desmineralização, as maxilas foram divididas ao longo do plano sagital mediano para separar os alvéolos esquerdos dos direitos e tiveram os excessos de tecido removidos. As amostras foram imersas em água corrente para remoção do excesso de EDTA, em quatro banhos de 15 minutos, mais um período de 12 horas, previamente às seguintes etapas de inclusão:

- a) Fase de desidratação: imersão das amostras em séries crescentes de álcool etílico (70% I e II, 80% I e II, 90%, 95%, absoluto I, II e III) por um período de 30 minutos em cada banho.
- b) Fase de diafanização: imersão das amostras em três banhos de xilol por um período de 20 minutos cada.
- c) Fase de infiltração: imersão das amostras em três banhos de parafina a 58°C, sendo o primeiro de 30 minutos e os demais de 40 minutos cada.
- d) Fase de inclusão: as amostras foram incluídas em parafina fluidificada contida em moldes pré-definidos e posicionadas de modo que os alvéolos pudessem ser cortados longitudinalmente.

Foram obtidos de cada amostra, cerca de cento e vinte cortes semi-seriados de 6µm de espessura, montados em lâminas histológicas previamente tratadas com silano 3%. As lâminas foram armazenadas para processamento em tricrômico de Masson ou imunohistoquímica.

### *Coloração com Tricrômico de Masson*

Cinco lâminas de cada amostra, contendo a área de interesse, foram processadas para coloração com tricrômico de Masson, segundo as seguintes etapas:

- imersão em xilol (I) por 30 minutos
- imersão em xilol (II) por 15 minutos
- imersão em xilol (III) por 15 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 90% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 80% por 2 minutos
- imersão em álcool etílico a 70% por 2 minutos
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto
- lavagem em água corrente por 20 minutos
- imersão em solução de tricrômico de Masson por 8 minutos
- 03 mergulhos rápidos em água corrente
- imersão em álcool etílico a 90% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico a 95% por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (I) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (II) por 1 minuto
- imersão em álcool etílico absoluto (III) por 1 minuto
- imersão em xilol (I) por 2 minutos
- imersão em xilol (II) por 2 minutos

- imersão em xilol (III) por 10 minutos

Após a coloração, lamínulas de 24x50mm foram montadas sobre os cortes, utilizando-se bálsamo do Canadá como agente de união.

## 6. Análise histológica e morfométrica

Para análise histológica e morfométrica, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais. Os animais do grupo I foram sacrificados 02 dias após o tratamento e os animais dos grupos II, III e IV, sacrificados respectivamente com 07, 14 e 21 dias após o tratamento. Para verificar o efeito físico da injeção do HNa no alvéolo, foi constituído um quinto grupo (grupo V), tratado com gel de carbopol 0,5% e sacrificado 07 dias após o tratamento (Tab. II).

**Tabela II:** Distribuição dos animais em grupos experimentais, para análise histológica e morfométrica.

Grupo	Tratamento		Dia do sacrifício (após a exodontia)
	Alvéolo Esquerdo	Alvéolo Direito	
I	Nenhum (n=5)	HNa (n=5)	02
II	Nenhum (n=6)	HNa (n=6)	07
III	Nenhum (n=6)	HNa (n=3)	14
IV	Nenhum (n=3)	HNa (n=3)	21
V	Nenhum (n=5)	Carbopol (n=5)	07

Foram selecionados quatro cortes alternados de cada amostra, corados com Tricrômico de Masson e que apresentavam alvéolo bem delineado. Os dentes primeiros molares superiores de ratos apresentam geralmente quatro

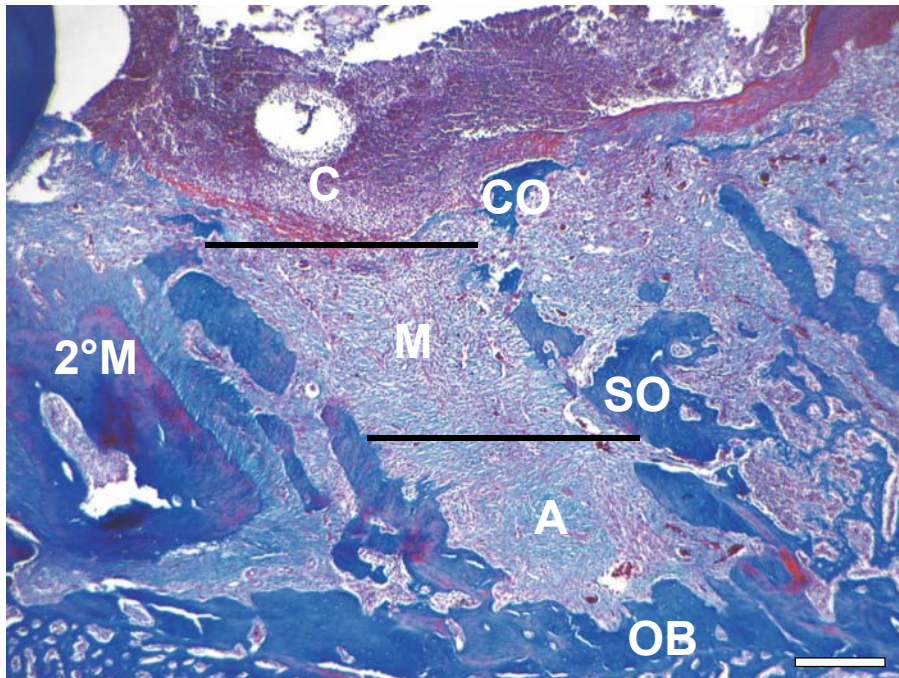
ou cinco raízes, sendo duas distais, uma ou duas mediais e uma mesial (Fig. 2). Foram estudados os alvéolos correspondentes a uma das raízes distais, divididos anatomicamente em três terços: apical, médio e cervical. O terço apical compreende a metade inferior da região entre a base do alvéolo (osso basal) e a crista óssea. O terço médio compreende a metade superior da mesma região, enquanto o terço cervical se localiza na porção superior à crista óssea (Fig. 3).

Foram obtidas, de cada alvéolo, doze imagens aleatórias do terço apical e doze do terço médio, visualizadas através da objetiva de 40X e digitalizadas através da microcâmera JVC TK-1270/ RGB, perfazendo um total aproximado de  $6,4 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  de tecido analisado, por terço. A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foi previamente descrita na literatura (CALIARI, 1997).

Para análise morfométrica, foram considerados os seguintes parâmetros: percentual de trabéculas ósseas presentes, em relação à área analisada; número de núcleos celulares e de vasos sanguíneos. A área ocupada pelas trabéculas ósseas foi obtida através do programa KS300 (Carl Zeiss). Os pixels das trabéculas ósseas foram selecionados através da imagem real com subsequente criação de uma imagem binária e obtenção da área em  $\mu\text{m}^2$ . Os núcleos de todos os tipos celulares presentes foram contados através da seleção dos pixels e da criação de outra imagem binária (MALTOS *et al.*, 2004). O número de vasos sanguíneos foi quantificado manualmente.



**Figura 2:** Imagem anatômica do primeiro molar superior. (Barra = 3mm).



**Figura 3:** Divisão anatômica do alvéolo em terços apical, médio e cervical. (A: terço apical; M: terço médio; C: terço cervical; 2°M: segundo molar superior; OB: osso basal; SO - septo ósseo; CO: crista óssea). (Barra = 400µm) Tricrômico de Masson.



Os dados finais dos alvéolos controles aos 07 dias foram constituídos pela combinação de dados provenientes de alvéolos controles dos animais dos grupos II e V, perfazendo um total de 11 animais. Esta conduta foi realizada tendo em vista que os valores obtidos para todos os parâmetros estudados nestes subgrupos eram bastante similares, sem qualquer diferença estatística, em decorrência de ambos terem sido preenchidos apenas com coágulo.

Foram excluídas as amostras que apresentavam restos radiculares, inclusão e coloração inadequadas, ausência de integridade dos cortes histológicos ou alvéolos mal delineados.

## **7. Análise estatística**

Os dados obtidos na análise macroscópica e na morfometria foram expressos como média  $\pm$  EPM e analisados pelo teste T de Student ou pelo Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, quando apropriado, e com o auxílio do programa GraphPad Prism 4. Foram considerados significantes valores com  $p < 0,05$ .

## **8. Análise imunohistoquímica**

Para análise imunohistoquímica, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais tratados com HNa, e sacrificados com 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias após o tratamento (Tab. III).

**Tabela III:** Distribuição dos animais em grupos experimentais, para análise imunohistoquímica.

Grupo	Tratamento		Dia do sacrifício (após a exodontia)
	Alvéolo Esquerdo	Alvéolo Direito	
VI	Nenhum (n=1)	HNa (n=1)	01
VII	Nenhum (n=2)	HNa (n=2)	02
VIII	Nenhum (n=2)	HNa (n=2)	03
IX	Nenhum (n=2)	HNa (n=2)	04
X	Nenhum (n=2)	HNa (n=2)	05
XI	Nenhum (n=2)	HNa (n=2)	07

Foram selecionados cerca de dois cortes por alvéolo, controles e tratados, dos períodos de 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias, para processamento com cada anticorpo estudado. Os cortes selecionados foram desparafinizados em três banhos de xilol, sendo o primeiro por 30 minutos a 58°C, o segundo por 15 à temperatura ambiente e o terceiro por 05 minutos. Em seguida, foram hidratados através de imersão em seqüências decrescentes de álcool etílico (absoluto I, II e III, 95%, 80%) por um período de 05 minutos em cada banho. Para remoção do pigmento formólico, utilizou-se imersão por 10 minutos em solução de hidróxido de amônio 10% em etanol a 95% e lavagem em seis banhos de 05 minutos em água destilada.

Para neutralização da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de 05 minutos em peróxido de hidrogênio 10 volumes e por um banho de 15 minutos em peróxido de hidrogênio 30 volumes 10% em metanol, sendo posteriormente lavados em três banhos de 05 minutos em água destilada, seguidos por três banhos de 05 minutos em solução tampão fosfato (PBS). Foram incubados em câmara úmida com PBS contendo BSA 2% e Tween 20 0,1%, por

01 hora à temperatura ambiente, para bloqueio dos sítios de ligação não-específicos.

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários policlonais (cabra anti-rato) anti-BMP-2 (sc-6895 - Santa Cruz Biotecnologia) ou anti-OPN (sc-10593 - Santa Cruz Biotecnologia), ambos na diluição de 1:50. Foi utilizada solução de PBS contendo BSA 0,2% e Tween 20 0,01%, para diluição dos anticorpos.

Após 21 horas de incubação em câmara úmida a 4°C, os cortes foram imersos em três banhos de 10 minutos em PBS. Em seguida, foram incubados por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente, com anticorpo secundário anti-cabra conjugado com biotina (K0690 - LSAB / DAKO®). Os cortes foram novamente imersos em três banhos de 10 minutos em PBS e, em seguida, foram incubados com conjugado streptoavidina/peroxidase por 30 minutos. Após imersão em três banhos de PBS por 10 minutos, a reação foi revelada através de imersão por 02 minutos e meio em solução cromógena contendo 14mg de diaminobenzidina (DAB) (D-5637 -Sigma®), diluída em 110ml de PBS, à qual foi adicionado 1,2ml de peróxido de hidrogênio 10 volumes. O bloqueio da reação de revelação foi realizado com PBS por 05 minutos, seguido de água corrente por mais 05 minutos. A contra-coloração foi realizada com solução de hematoxilina de Mayer por 01 minuto. Os cortes foram imersos rapidamente em água corrente e em solução de hidróxido de amônio 10%, e lavadas em água destilada por 05 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em séries crescentes de álcool etílico (70%, 90%, absoluto I, II e III) e imersos em três banhos de 05

minutos em xilol. Lamínulas foram montadas sobre os cortes, utilizando-se bálsamo do Canadá como agente de união.

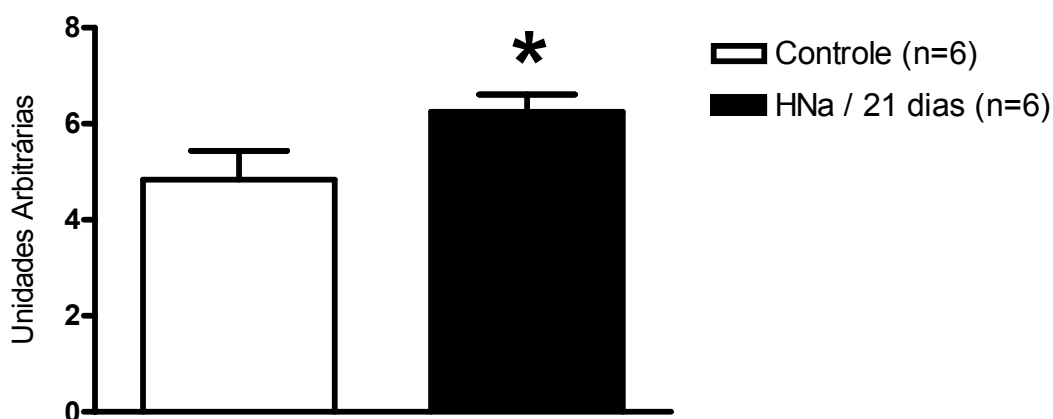
Controles negativos foram realizados através da aplicação de PBS no lugar dos anticorpos primários. Secções de cabeças de gambá, no período pós-natal de 05 dias foram utilizadas como controle positivo para o BMP-2.

A intensidade de marcação imunohistoquímica foi analisada qualitativamente e conferido os escores zero (reação negativa), um (reação positiva) e dois (reação fortemente positiva).

## IV. RESULTADOS

### 1. Análise macroscópica

A avaliação do grau de cicatrização macroscópica vinte e um dias após a exodontia demonstrou que os alvéolos tratados apresentaram cicatrização estatisticamente maior que os controles ( $6,25 \pm 0,36$  vs  $4,83 \pm 0,60$  unidades arbitrárias nos alvéolos controles, Fig. 4), e que ambos ainda não atingiram o parâmetro clínico de término de cicatrização.



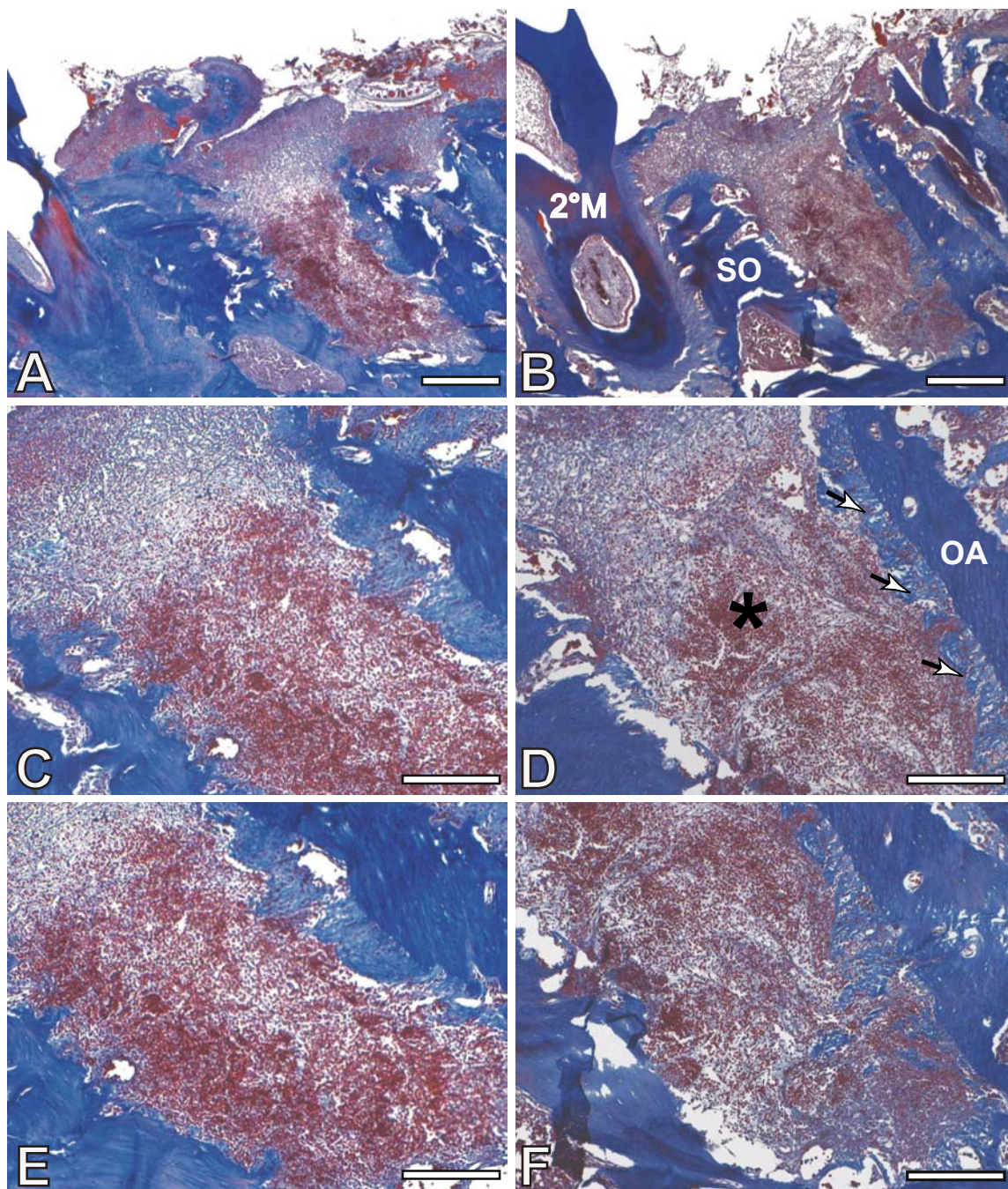
**Figura 4:** Grau de cicatrização macroscópica nos alvéolos controles e tratados, 21 dias após a exodontia. \*  $p < 0,05$  (teste t de Student).

## 2. Histoquímica e análise morfométrica

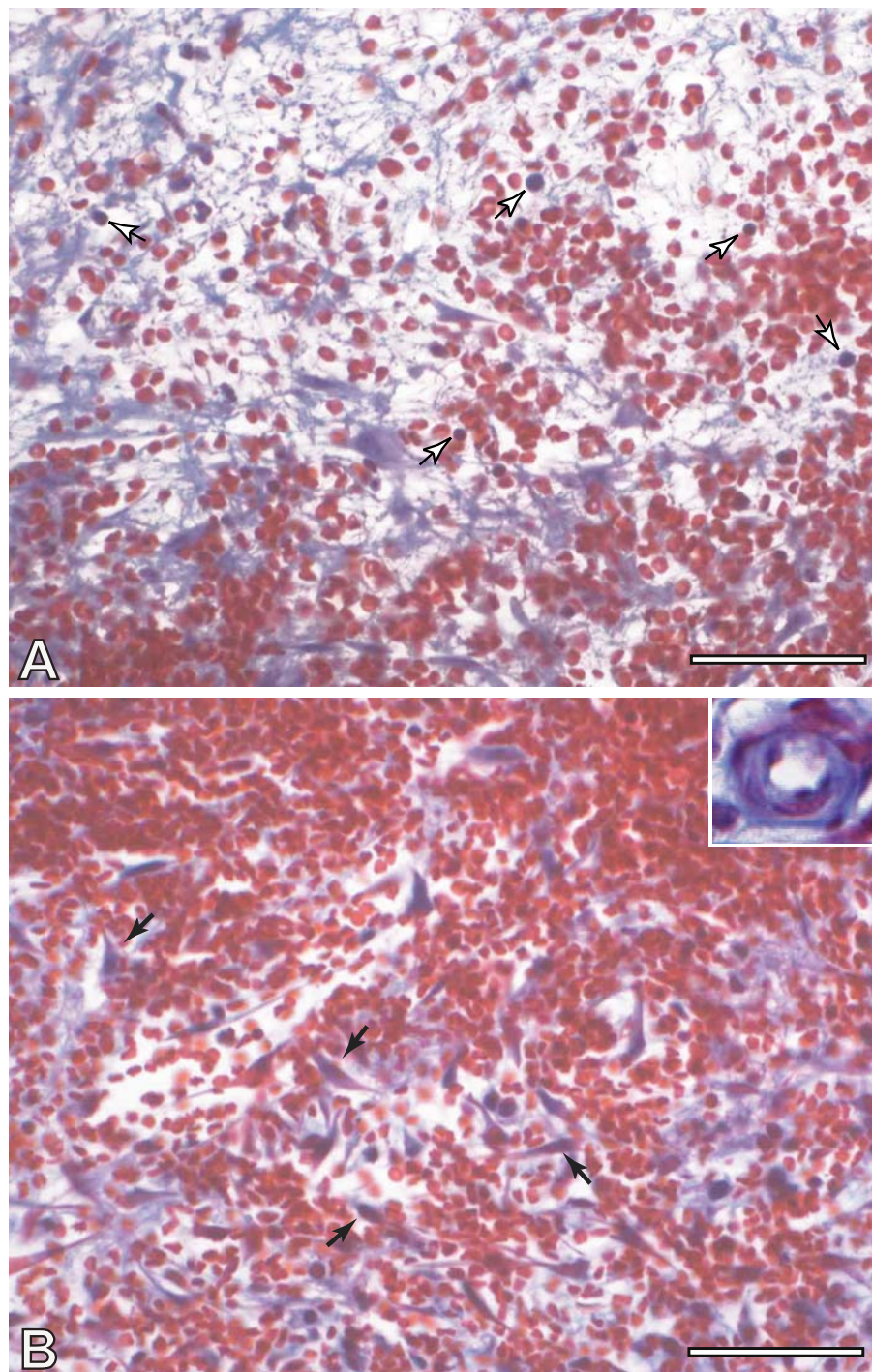
### *02 dias*

Não houve diferença histológica entre os alvéolos controles e tratados, neste período de cicatrização. Os terços apicais e médios apresentaram-se preenchidos por coágulo sanguíneo, entremeado pela rede de fibrina. Restos do LP foram observados aderidos às superfícies ósseas das paredes laterais dos alvéolos (Fig. 5A-F). Células inflamatórias estavam presentes em todo o alvéolo, com maior frequência nos terços médio e cervical. Neste período, já foi possível a visualização de fibroblastos recém-migrados para a área de cicatrização, mais evidentes no terço apical, além da presença de poucos vasos sanguíneos neoformados (Fig. 6A-B).

A avaliação morfométrica do número de núcleos celulares demonstrou não haver diferença significativa nos alvéolos tratados em relação aos controles, tanto no terço apical ( $12690 \pm 1163$  vs  $12590 \pm 563$  núcleos celulares nos alvéolos controles, Fig. 7A) quanto no terço médio ( $11310 \pm 1390$  vs  $10440 \pm 1020$  núcleos celulares nos alvéolos controles, Fig. 7B). O número de vasos sanguíneos neoformados foi maior no terço apical dos alvéolos tratados ( $3,00 \pm 1,41$  vs  $0,40 \pm 0,40$  vasos nos alvéolos controles, Fig. 8), entretanto, sem diferença significativa. Não foi observado nenhum vaso sanguíneo nos terços médios tanto nos alvéolos tratados quanto nos controles.

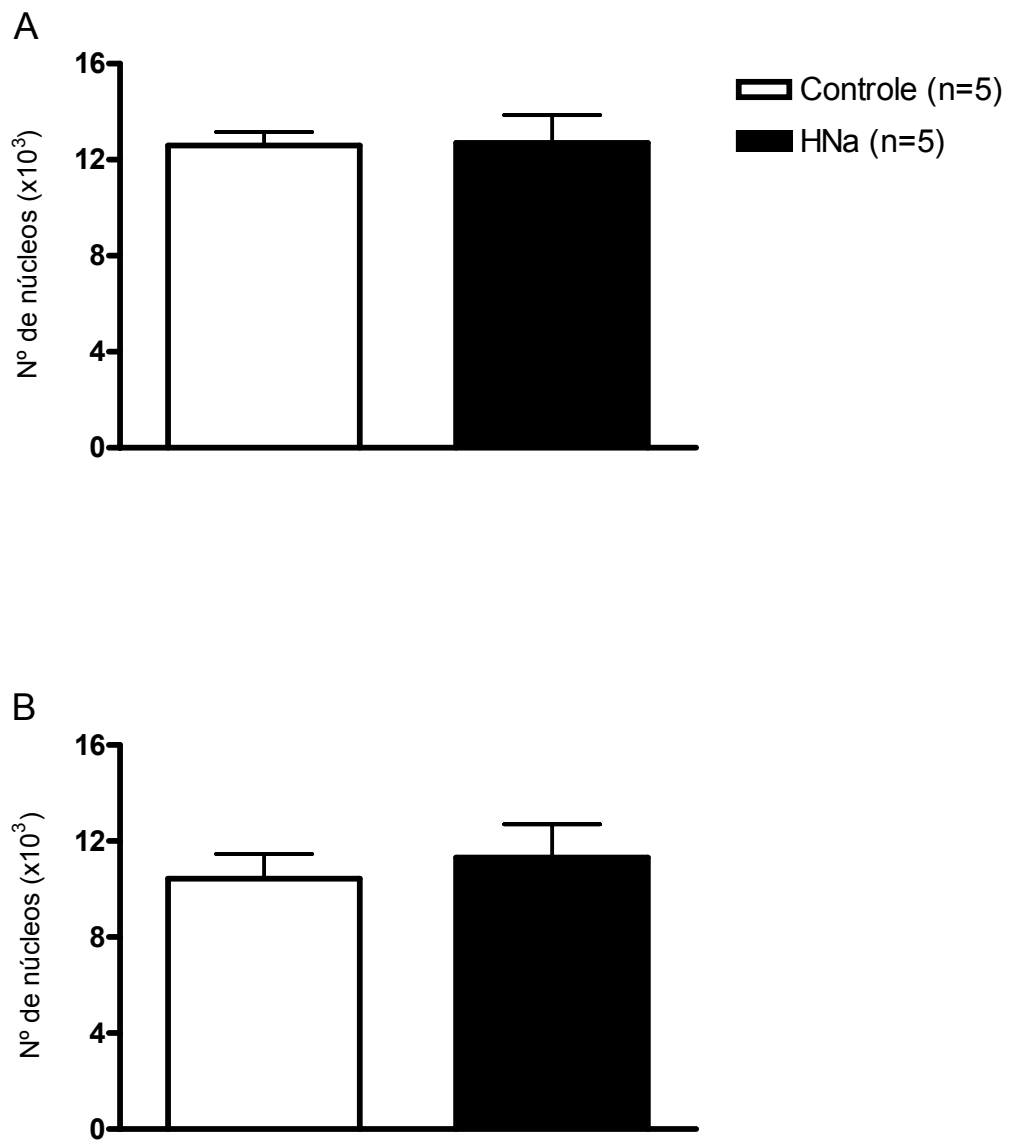


**Figura 5:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 02 dias após a exodontia. As imagens panorâmicas em (A) controle e (B) tratado, revelam o aspecto similar da cicatrização neste período. Em maior aumento, observa-se no 1/3 médio dos alvéolos (C) controles e (D) tratados, a presença de coágulo sanguíneo (\*) e remanescentes do ligamento periodontal (setas). O mesmo aspecto pode ser observado no 1/3 apical dos alvéolos (E) controles e (F) tratados. (2°M: segundo molar superior; SO: septo ósseo; OA: osso alveolar) (Barras A-B = 400µm; C-F = 200µm) Tricrômico de Masson.

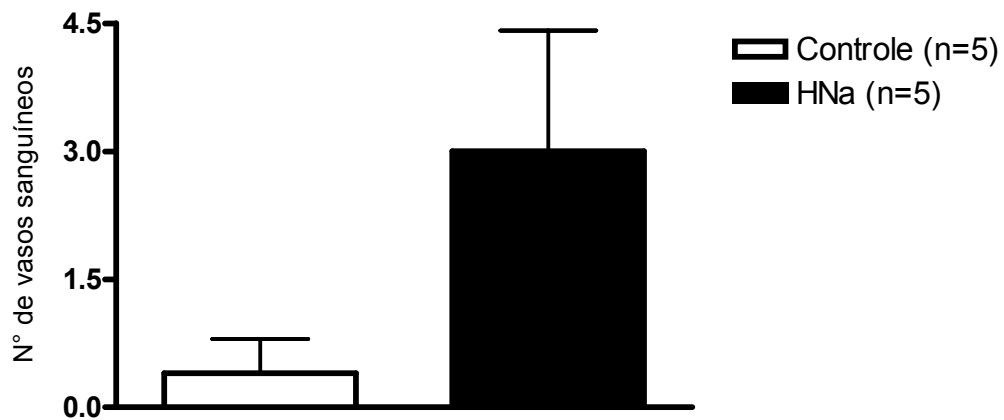


**Figura 6:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 02 dias após a exodontia, em alvéolos controles e tratados com HNa. Notar a presença de células inflamatórias (setas brancas) e de fibroblastos (setas pretas) no (A) terço médio e (B) terço apical. (Detalhe: vaso sanguíneo). (Barras A-B = 50µm) Tricrômico de Masson.





**Figura 7:** Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 02 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio.



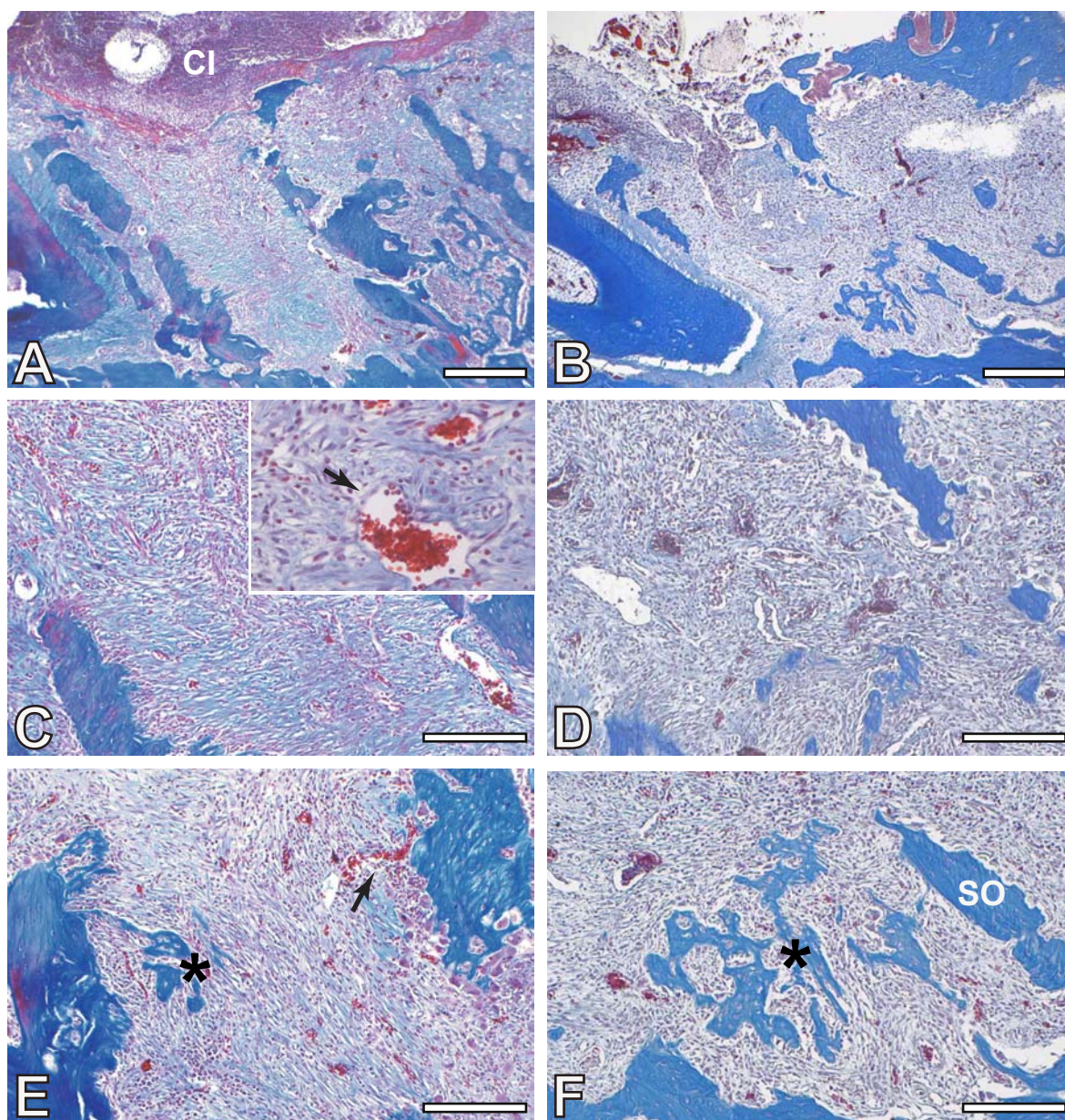
**Figura 8:** Número de vasos sanguíneos presentes no terço apical dos alvéolos controles e tratados, 02 dias após a exodontia.

#### *07 dias*

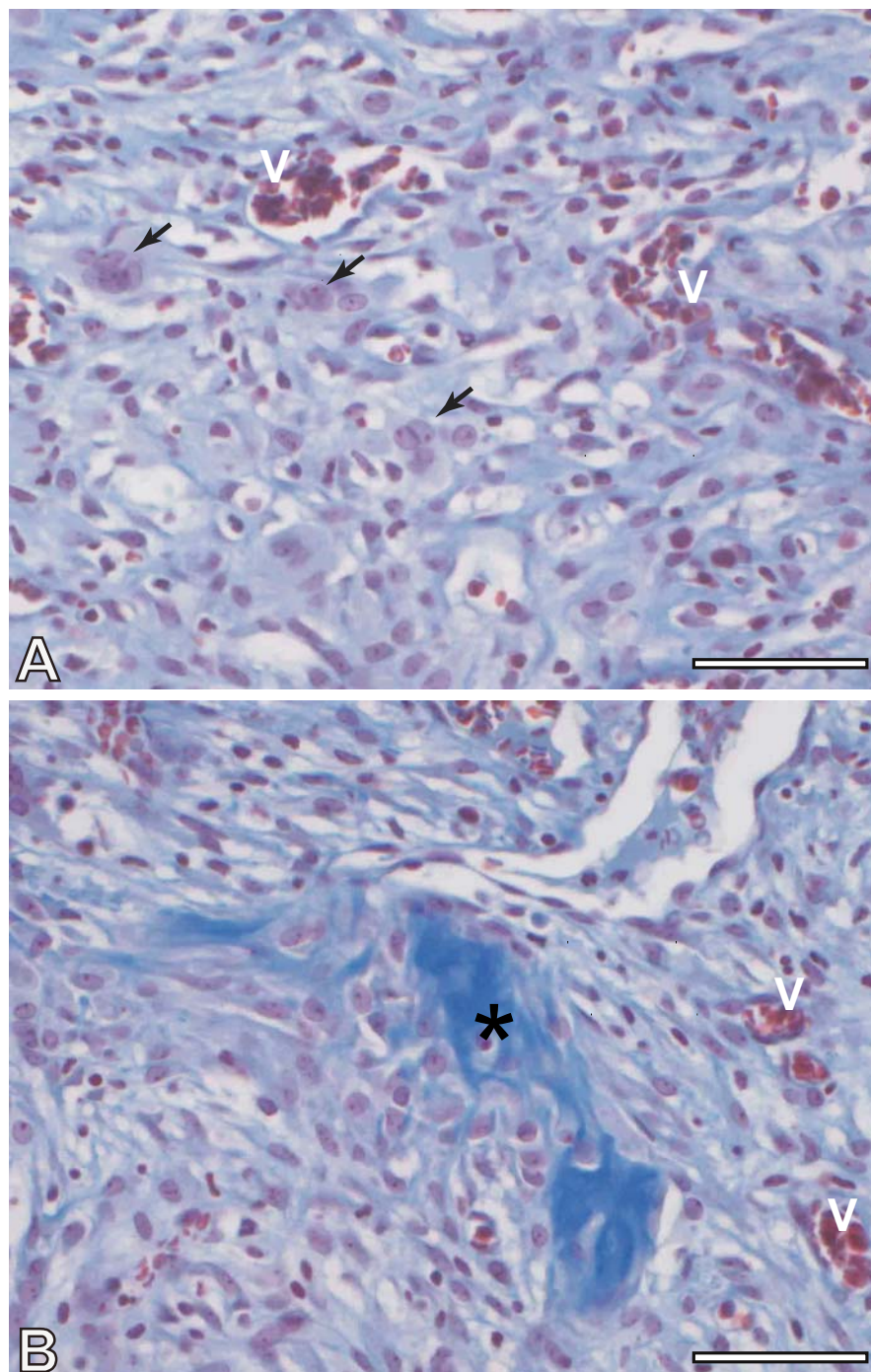
Os alvéolos controles e tratados encontraram-se preenchidos por tecido conjuntivo bastante celular, em toda a extensão da cavidade. Verificou-se a migração do epitélio da mucosa oral em direção à ferida cirúrgica. Pôde-se observar a presença de células inflamatórias, abundantes no terço cervical e a proliferação de vasos sanguíneos ao longo do alvéolo (Fig. 9A-F). A formação de estreitas trabéculas ósseas, envoltas por osteoblastos, concentrou-se principalmente na porção central do terço apical e em maior quantidade nos alvéolos tratados (Fig. 9A-F e 11A-B). No terço médio dos alvéolos controles verificou-se a presença de aglomerados de células, possivelmente da linhagem osteogênica, próximos a vasos sanguíneos em proliferação, enquanto que nos

alvéolos tratados observou-se o início de deposição de matriz óssea (Fig. 10A-B). Tanto nos alvéolos controles como nos tratados visualizou-se osteoclastos reabsorvendo os septos ósseos inter-radiculares (Fig. 11C).

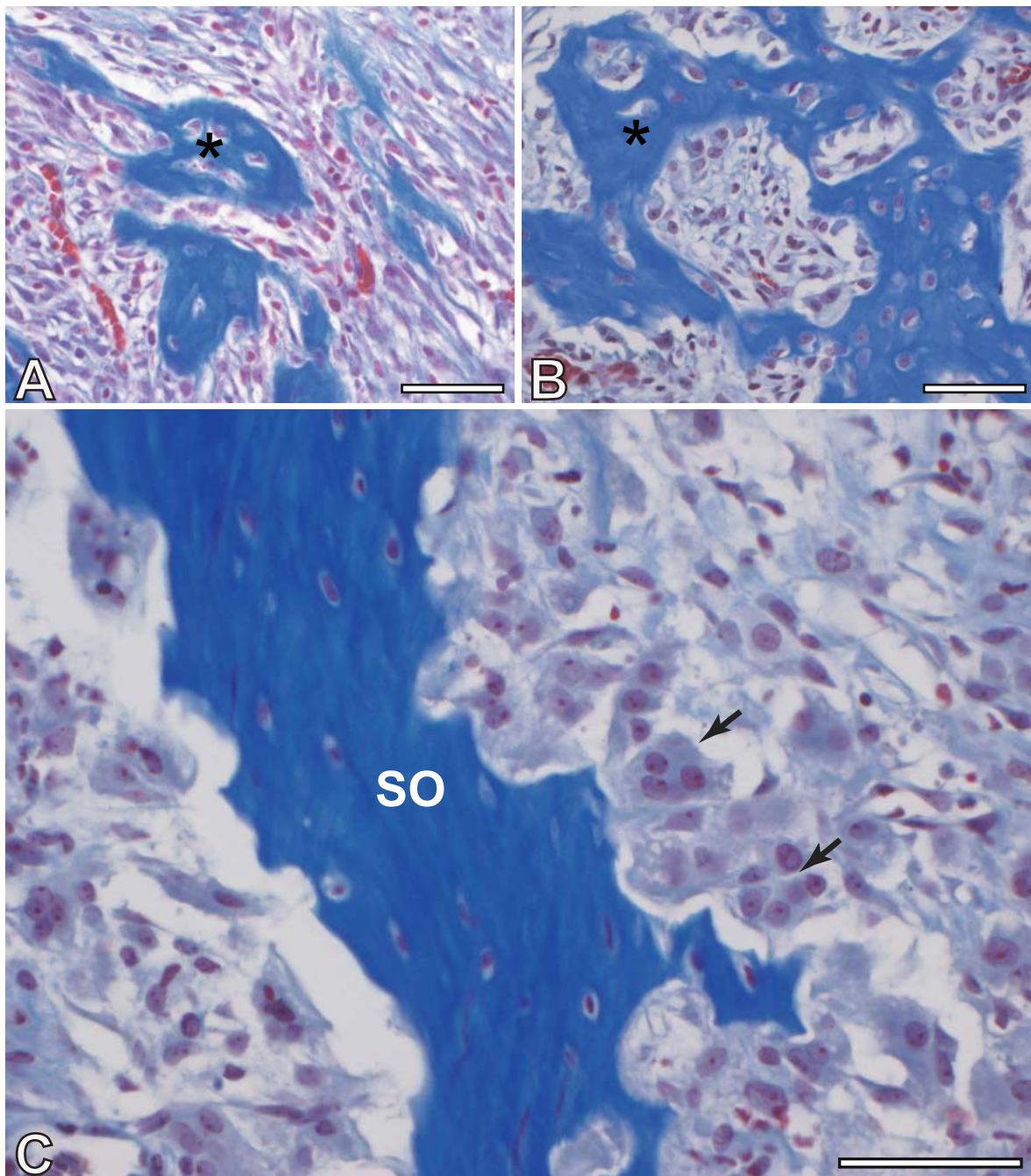
A análise morfométrica demonstrou que o percentual de trabéculas ósseas, em relação à área total, foi significativamente maior nos alvéolos tratados, tanto no terço apical ( $13,21 \pm 4,66$  vs  $2,58 \pm 1,36\%$  de trabéculas nos alvéolos controles, Fig. 12A) quanto no terço médio ( $4,14 \pm 1,36$  vs  $0,95 \pm 0,58\%$  de trabéculas nos alvéolos controles, Fig. 12B). Quanto ao número de núcleos celulares, os alvéolos tratados apresentaram quantidade significativamente menor nos terços apical ( $6930 \pm 624$  vs  $8623 \pm 510$  núcleos nos alvéolos controles, Fig. 13A) e médio ( $6555 \pm 529$  vs  $8169 \pm 545$  núcleos nos alvéolos controles, Fig. 13B). O número de vasos sanguíneos presentes nos alvéolos tratados, foi maior no terço apical ( $35,7 \pm 4,1$  vs  $30,4 \pm 2,5$  vasos nos alvéolos controles, Fig. 14A), assim como no terço médio ( $42,7 \pm 5,0$  vs  $30,6 \pm 3,2$  vasos nos alvéolos controles, Fig. 14B), entretanto, demonstrou diferença significativa apenas no terço médio.



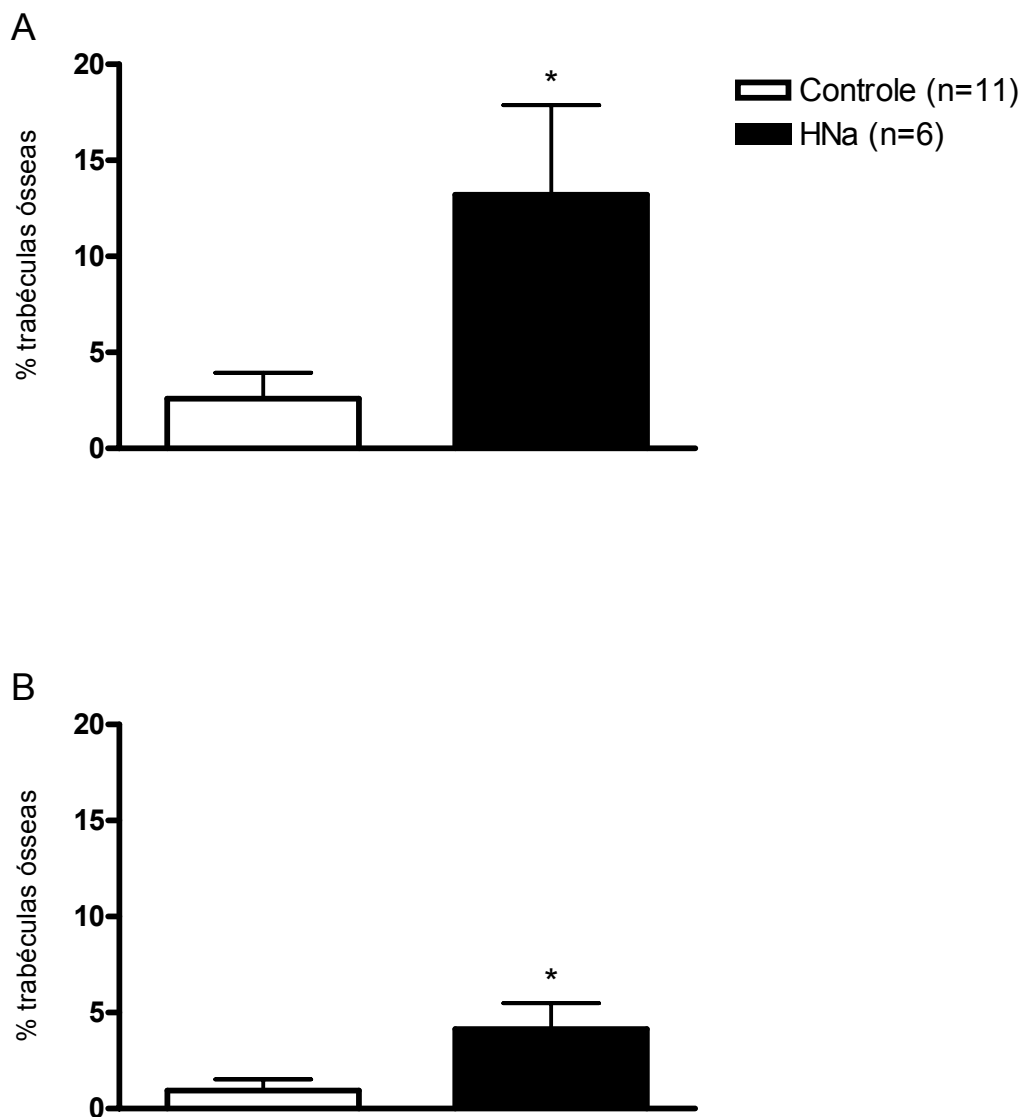
**Figura 9:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 07 dias após a exodontia, em alvéolos controles e tratados com HNa. Notar nas imagens panorâmicas, do alvéolo (A) controle e (B) tratado a presença de tecido conjuntivo em toda a extensão da cavidade. Em maior aumento, nos terços (C) médio e (E) apical dos alvéolos controles e dos alvéolos tratados (D e F) pode-se observar a presença de vasos sanguíneos em proliferação (setas). As trabéculas ósseas (\*) foram mais evidentes no 1/3 apical dos alvéolos tratados (F). (CI: células inflamatórias; SO: restos de septo ósseo) (Barras A-B = 400 $\mu$ m; C-F = 200 $\mu$ m) Tricrômico de Masson.



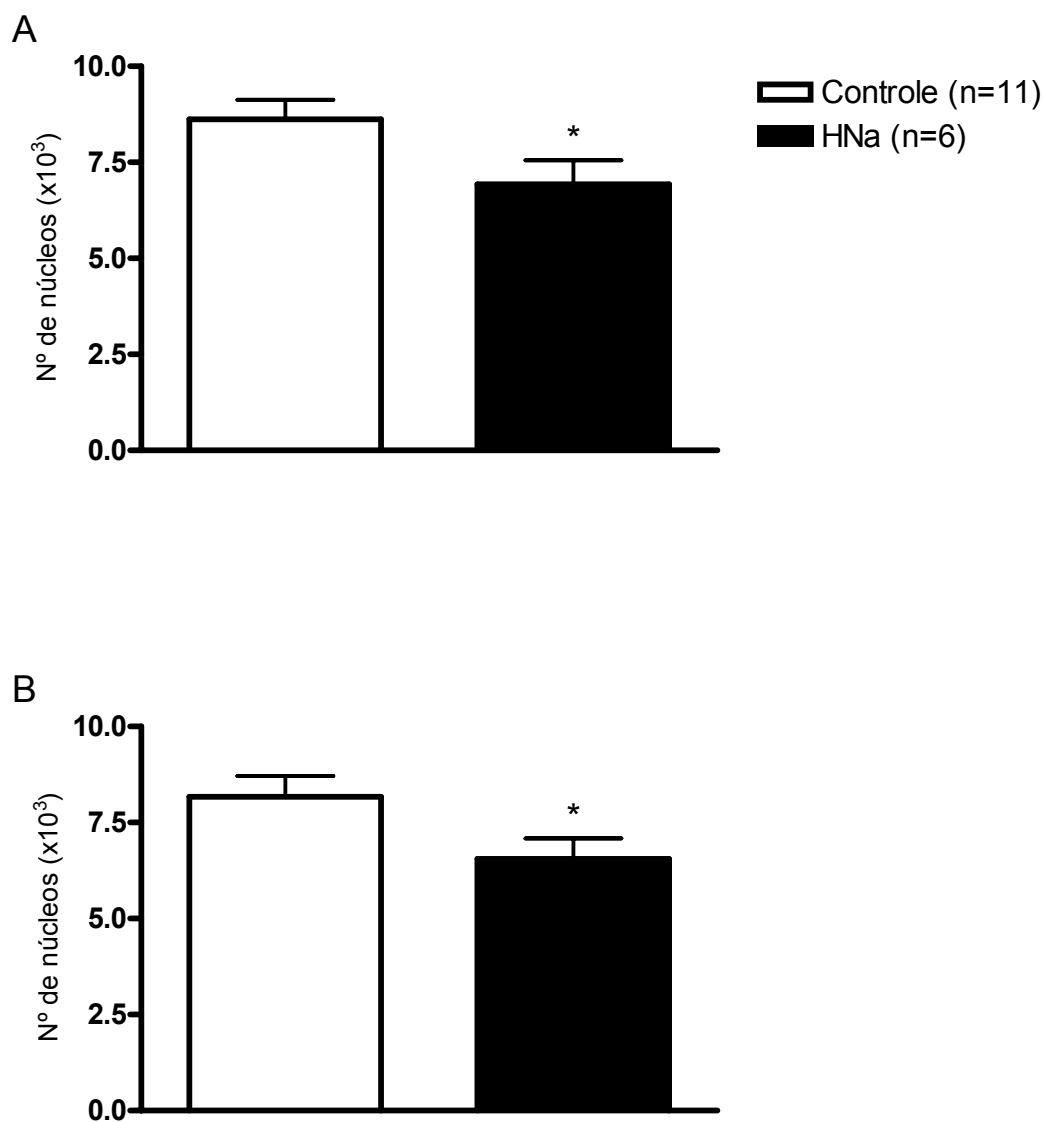
**Figura 10:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 07 dias após a exodontia, nos terços médios dos alvéolos controles e tratados com HNa. Notar a presença de aglomerados de células (setas), possivelmente da linhagem osteogênica (setas), nos alvéolos (A) controles e início de deposição de matriz óssea (\*) nos (B) tratados. (V: vasos sanguíneos) (Barras A-B = 50µm) Tricrômico de Masson.



**Figura 11:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 07 dias após a exodontia, em alvéolos controles e tratados com HNa. As trabéculas ósseas (\*) apresentam-se menos evidentes no 1/3 apical dos alvéolos (A) controles em comparação com os (B) tratados. O processo de reabsorção dos septos ósseos (SO) pelos osteoclastos (setas), foi observado tanto nos controles como nos tratados (C). (Barras A-C = 50 $\mu$ m) Tricrômico de Masson.

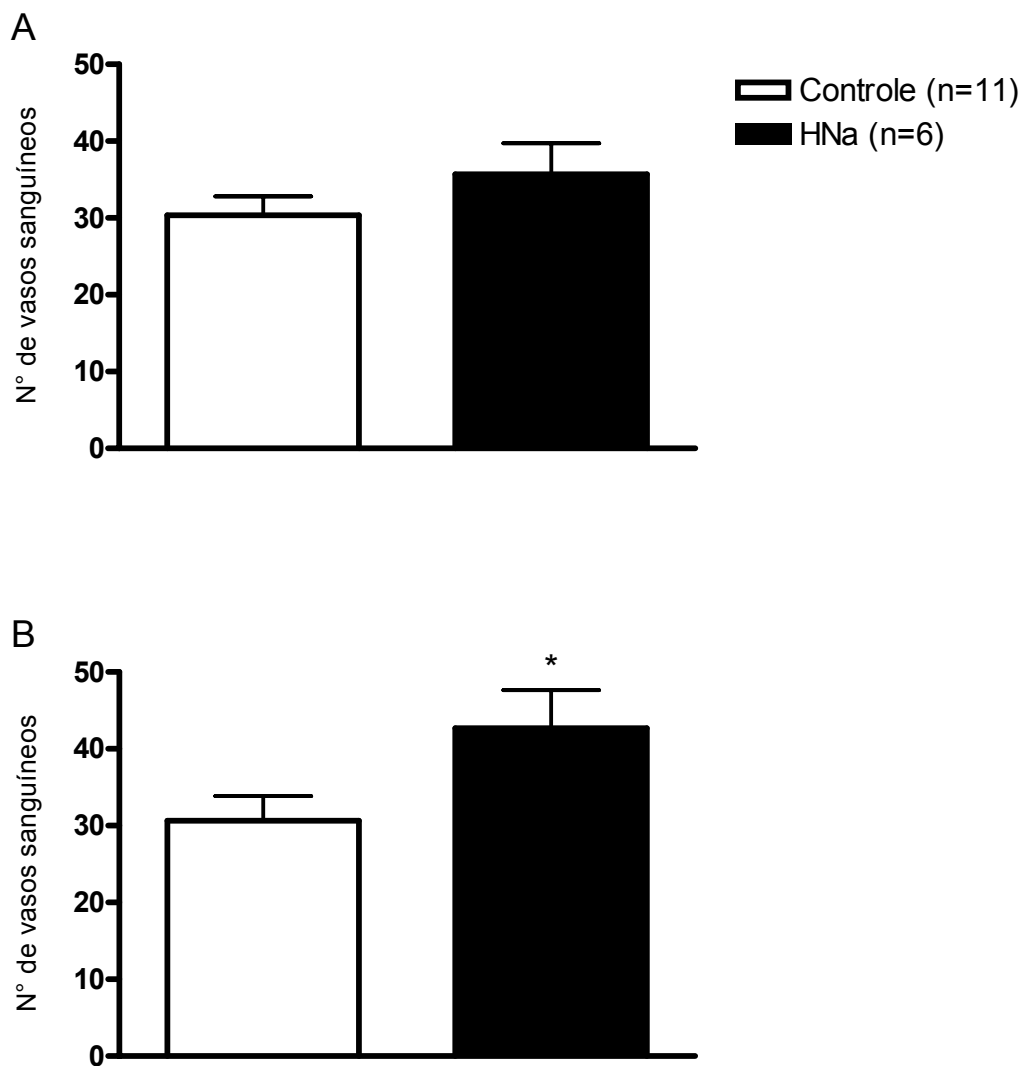


**Figura 12:** Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados, 07 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio. \*  $p < 0,05$  (teste t de Student).



**Figura 13:** Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 07 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio. \*  $p < 0,05$  (teste t de Student).



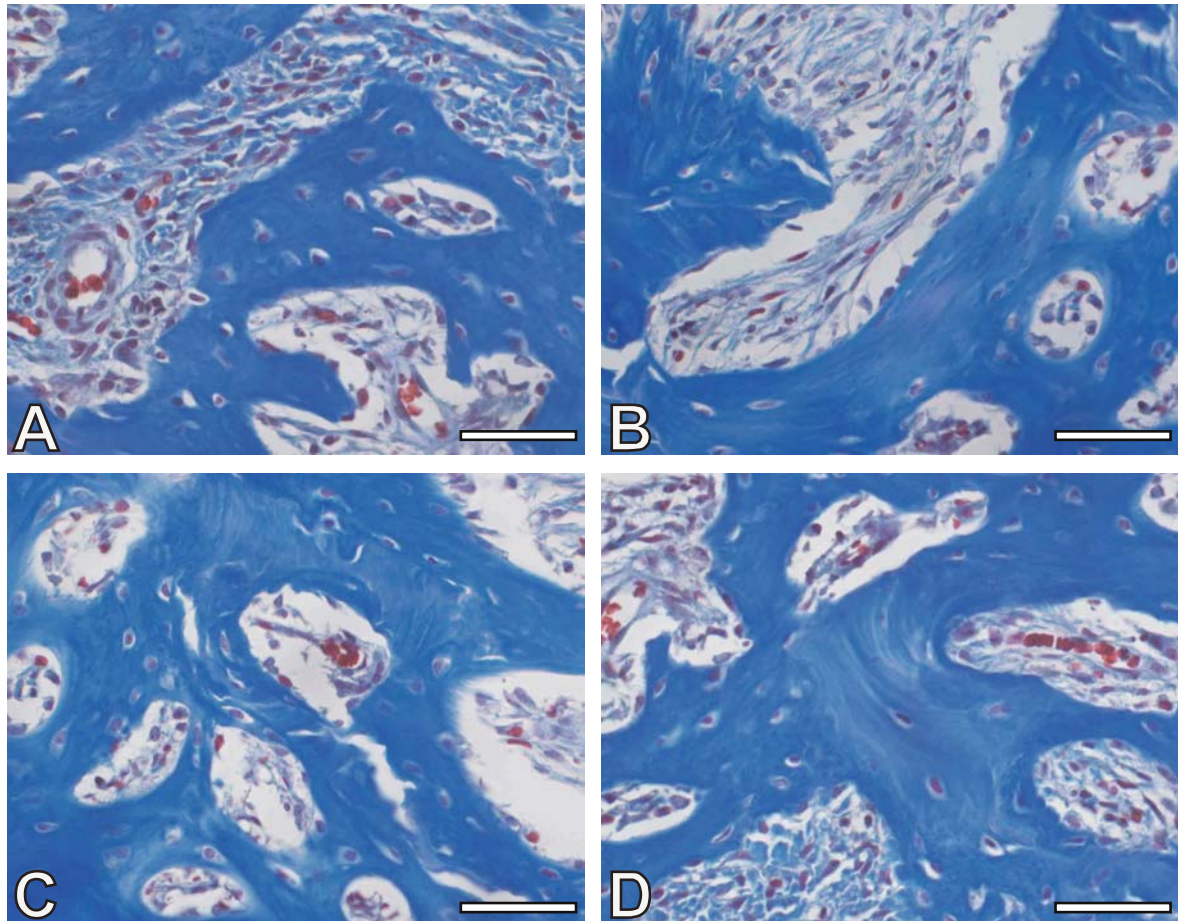


**Figura 14:** Número de vasos sanguíneos presentes nos alvéolos controles e tratados, 07 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio. \*  $p < 0,05$  (teste t de Student).

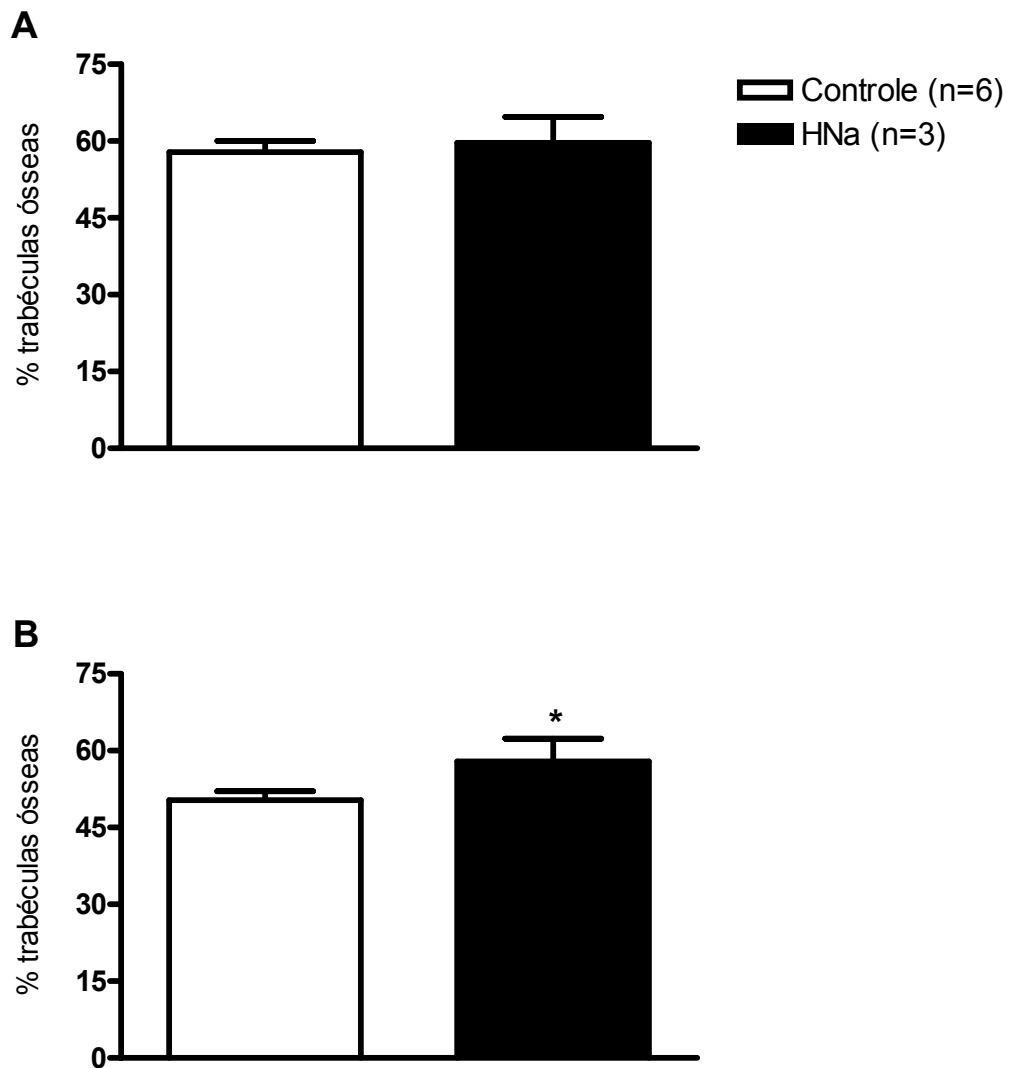
*14 dias*

Os terços apical e médio dos alvéolos controles e tratados estavam preenchidos por trabéculas ósseas, em sua maioria, imaturas, sendo que os terços médios apresentaram espaços medulares maiores que os apicais. Os alvéolos tratados mostraram trabéculas com nível de organização mais avançado que os controles, com osteócitos mais alinhados (Fig. 15A-D).

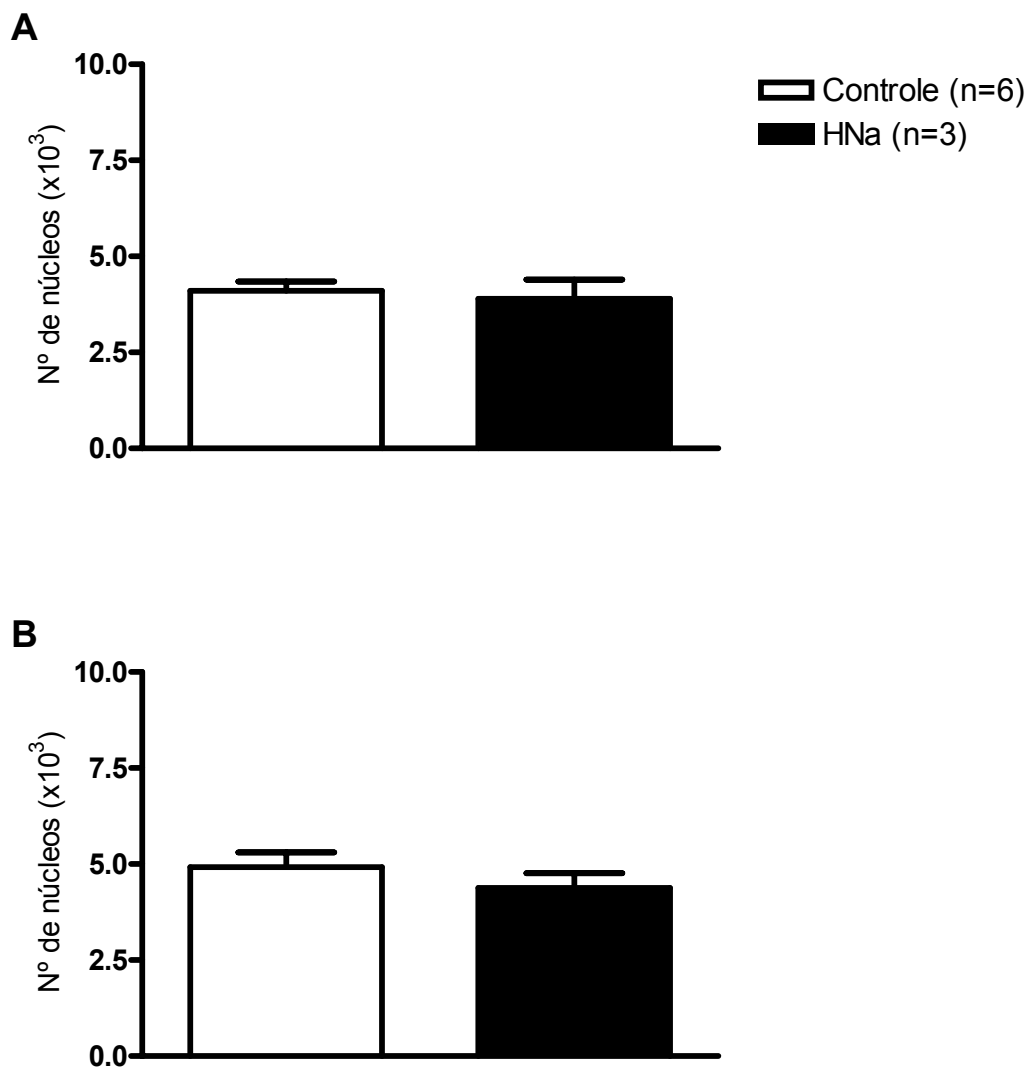
A análise morfométrica demonstrou que o percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos tratados, foi semelhante aos controles no terço apical ( $59,64 \pm 5,05$  vs  $57,84 \pm 2,18\%$  de trabéculas nos alvéolos controles, Fig. 16A) e significativamente maior no terço médio ( $57,89 \pm 4,44$  vs  $50,34 \pm 1,74\%$  de trabéculas nos alvéolos controles, Fig. 16B). Os alvéolos tratados apresentaram menor quantidade de núcleos celulares tanto no terço apical ( $3899 \pm 498$  vs  $4103 \pm 242$  núcleos nos alvéolos controles, Fig. 17A) quanto no médio ( $4381 \pm 382$  vs  $4920 \pm 387$  núcleos nos alvéolos controles, Fig. 17B), mas sem diferença estatística.



**Figura 15:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 14 dias após a exodontia, em alvéolos controles e tratados com HNa. Notar a presença de espaços medulares maiores nos terços médios dos alvéolos (A) controles e (B) tratados, um pouco menores nos terços apicais tanto dos (C) controles quanto dos (D) tratados. (Barras A-D = 50µm) Tricrômico de Masson.



**Figura 16:** Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados, 14 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio. \*  $p < 0,05$  (teste t de Student).

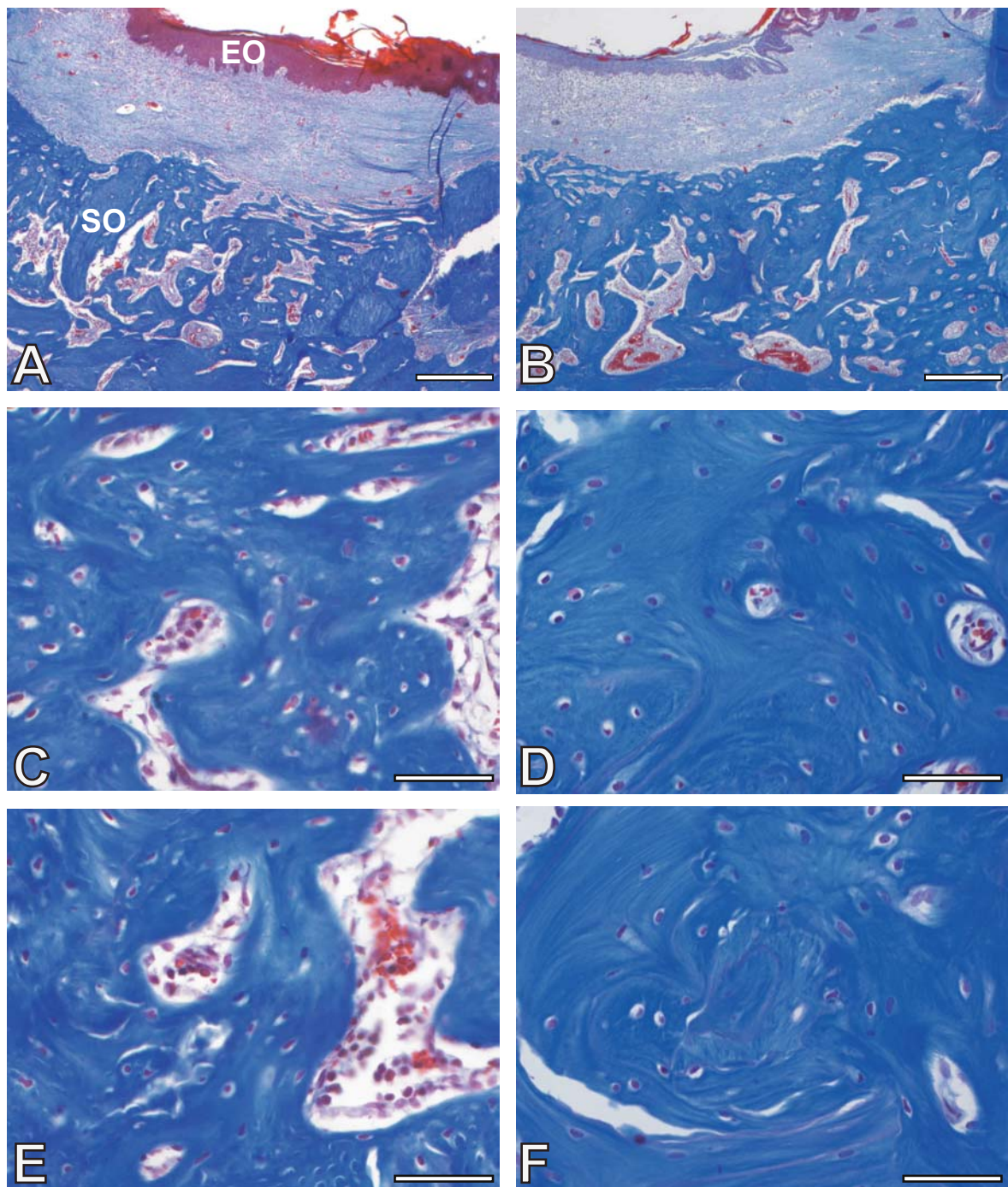


**Figura 17:** Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 14 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio.

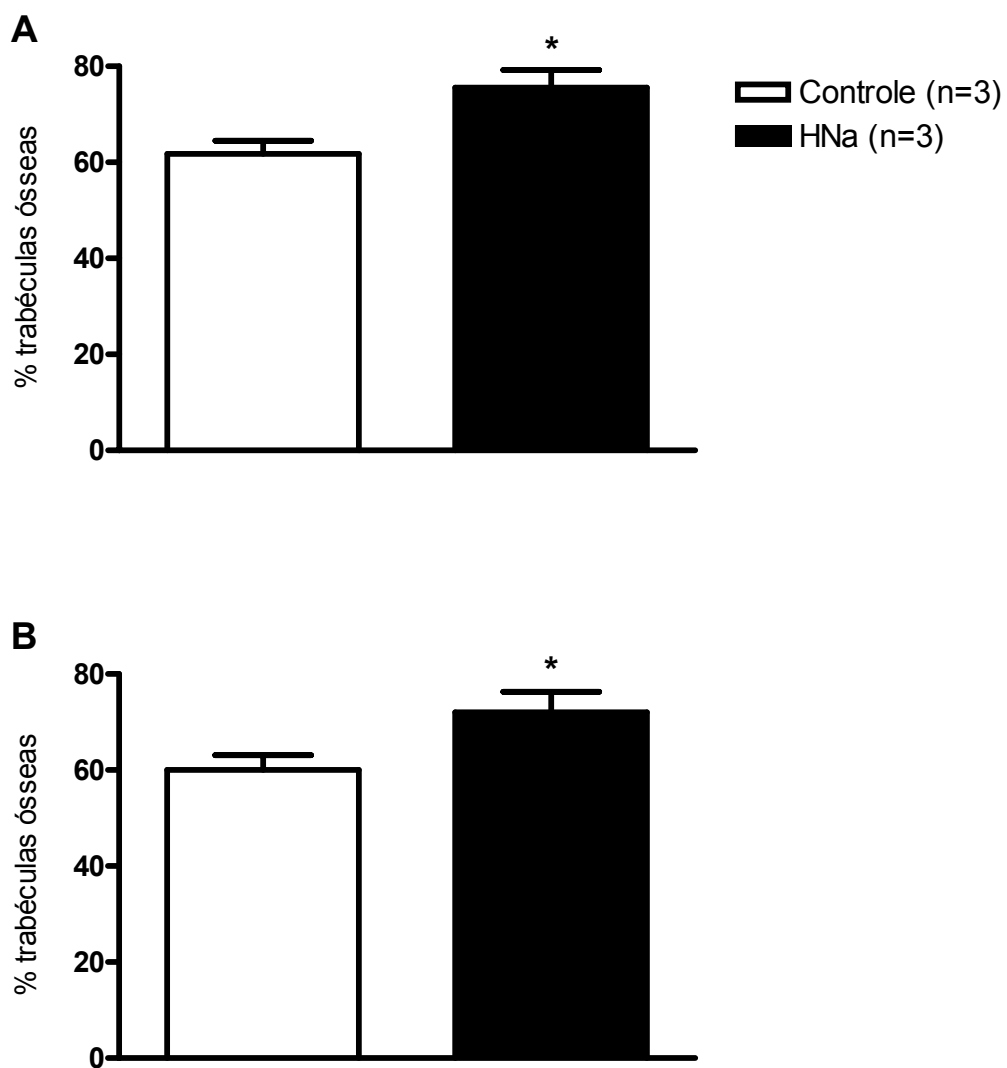
*21 dias*

Pôde-se verificar o preenchimento dos terços médio e apical dos alvéolos com trabéculas ósseas espessas contendo espaços medulares reduzidos, enquanto os terços cervicais estavam preenchidos por tecido conjuntivo. Observou-se também, o remanescente do septo ósseo remodelado e integrado às trabéculas ósseas, além do epitélio oral queratinizado recobrimdo a área de cicatrização. As trabéculas presentes nos alvéolos tratados mostraram-se mais bem delineadas e com menor número de osteócitos que nos controles (Fig. 18A-F).

A análise morfométrica demonstrou que o percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos tratados foi significativamente maior que nos controles, tanto no terço apical ( $75,56 \pm 3,69$  vs  $61,79 \pm 2,73\%$  de trabéculas nos alvéolos controles, Fig. 19A) como no médio ( $72,05 \pm 4,23$  vs  $60,02 \pm 3,06\%$  de trabéculas nos alvéolos controles, Fig. 19B). Os alvéolos tratados apresentaram menor quantidade de núcleos celulares no terço apical ( $2998 \pm 210$  vs  $3309 \pm 358$  núcleos nos alvéolos controles, Fig. 20A), sem diferença estatística, e quantidade semelhante no terço no médio ( $3550 \pm 317$  vs  $3599 \pm 674$  núcleos nos alvéolos controles, Fig. 20B).

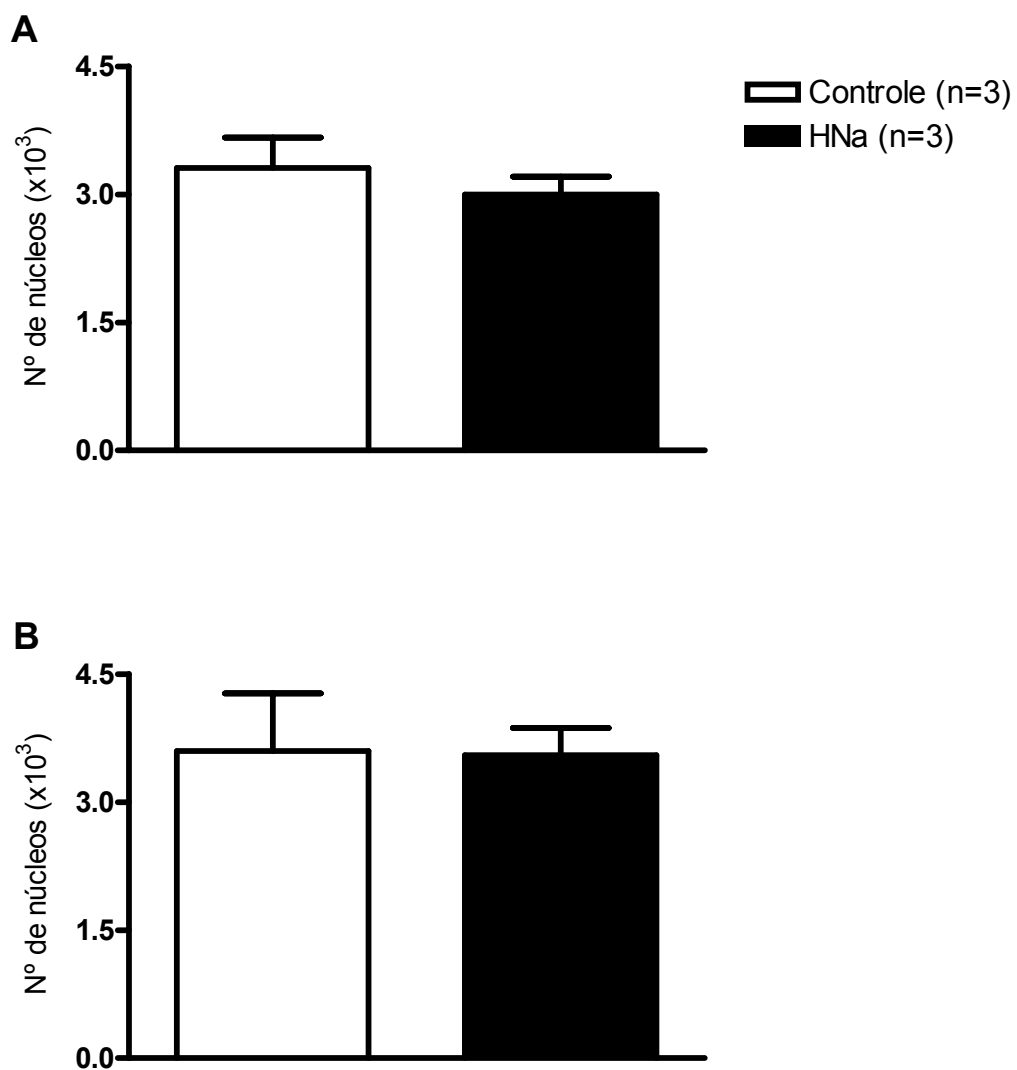


**Figura 18:** Aspecto histológico da cicatrização alveolar, 21 dias após a exodontia. As imagens panorâmicas em (A) controle e (B) tratado, revelam o preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular. Em maior aumento, observa-se no 1/3 médio dos alvéolos (C) controles e (D) tratados, a presença de trabéculas ósseas espessas e com espaços medulares reduzidos. O mesmo aspecto pode ser observado no 1/3 apical dos alvéolos (E) controles e (F) tratados. (SO: remanescente do septo ósseo; EO: epitélio oral) (Barras A-B = 400 $\mu$ m; C-F = 50 $\mu$ m) Tricrômico de Masson.



**Figura 19:** Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados, 21 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio. \*  $p < 0,05$  (teste t de Student).



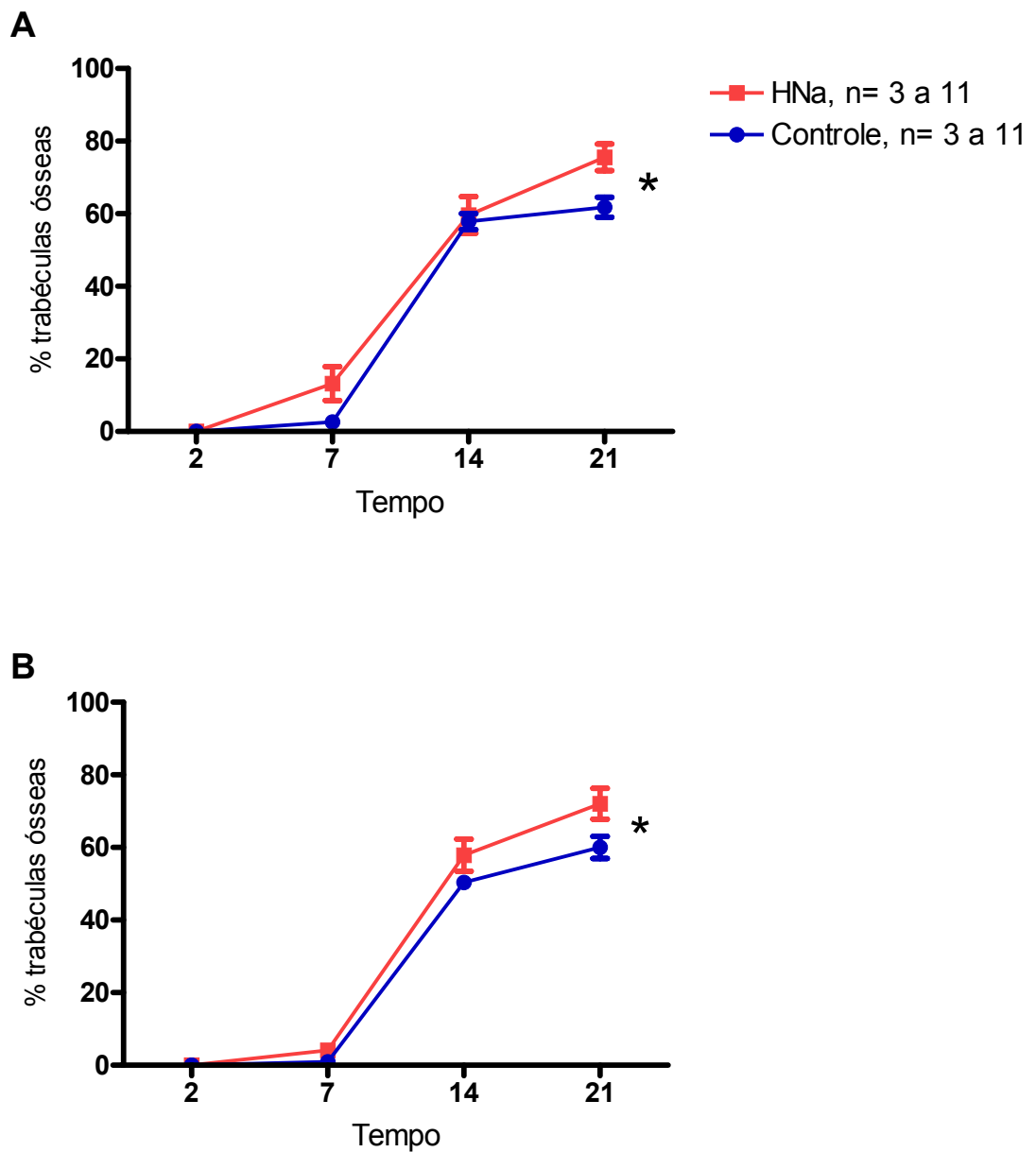


**Figura 20:** Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados, 21 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio.

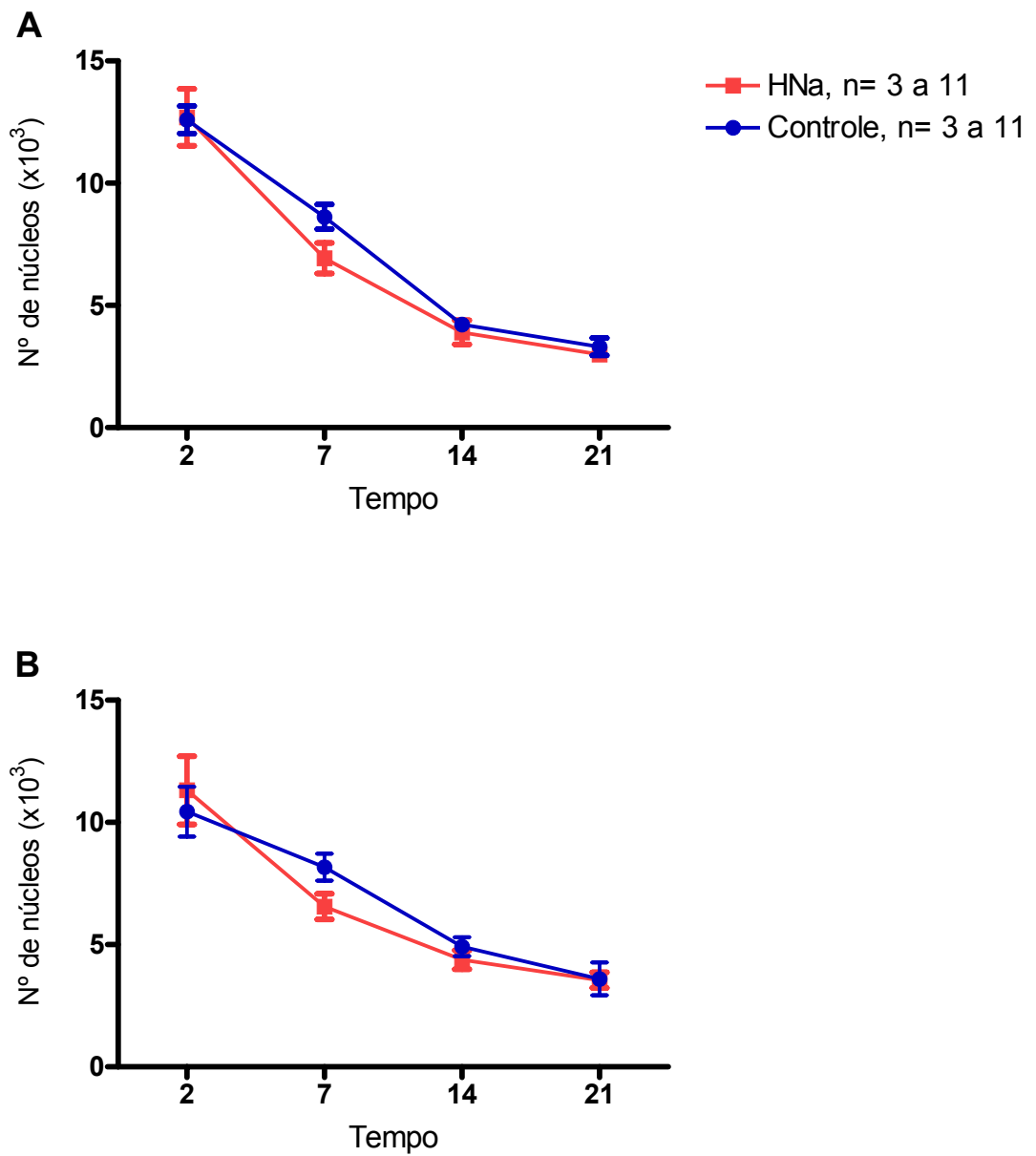
*Formação de trabéculas e número de núcleos celulares em função do tempo*

Ao analisar a cicatrização dos alvéolos controles e tratados no período entre dois e vinte e um dias, observou-se que ambos apresentaram uma curva ascendente de formação de trabéculas ósseas, mais acelerada entre sete e quatorze dias, e desacelerada entre quatorze e vinte e um dias. A formação de trabéculas foi significativamente maior nos alvéolos tratados, em relação aos controles, tanto no terço apical como no médio (Fig. 21A-B).

Quanto ao número de núcleos celulares, os alvéolos controles e tratados apresentaram uma curva descendente à medida que foram cicatrizando. A curva apresentou-se mais acentuada entre dois e quatorze dias, e desacelerada entre quatorze e vinte e um dias, sem diferença estatística entre os alvéolos controles e tratados (Fig. 22A-B).



**Figura 21:** Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados em função do tempo de cicatrização, nos terços (A) apical e (B) médio. \*  $p < 0,05$  (Two-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

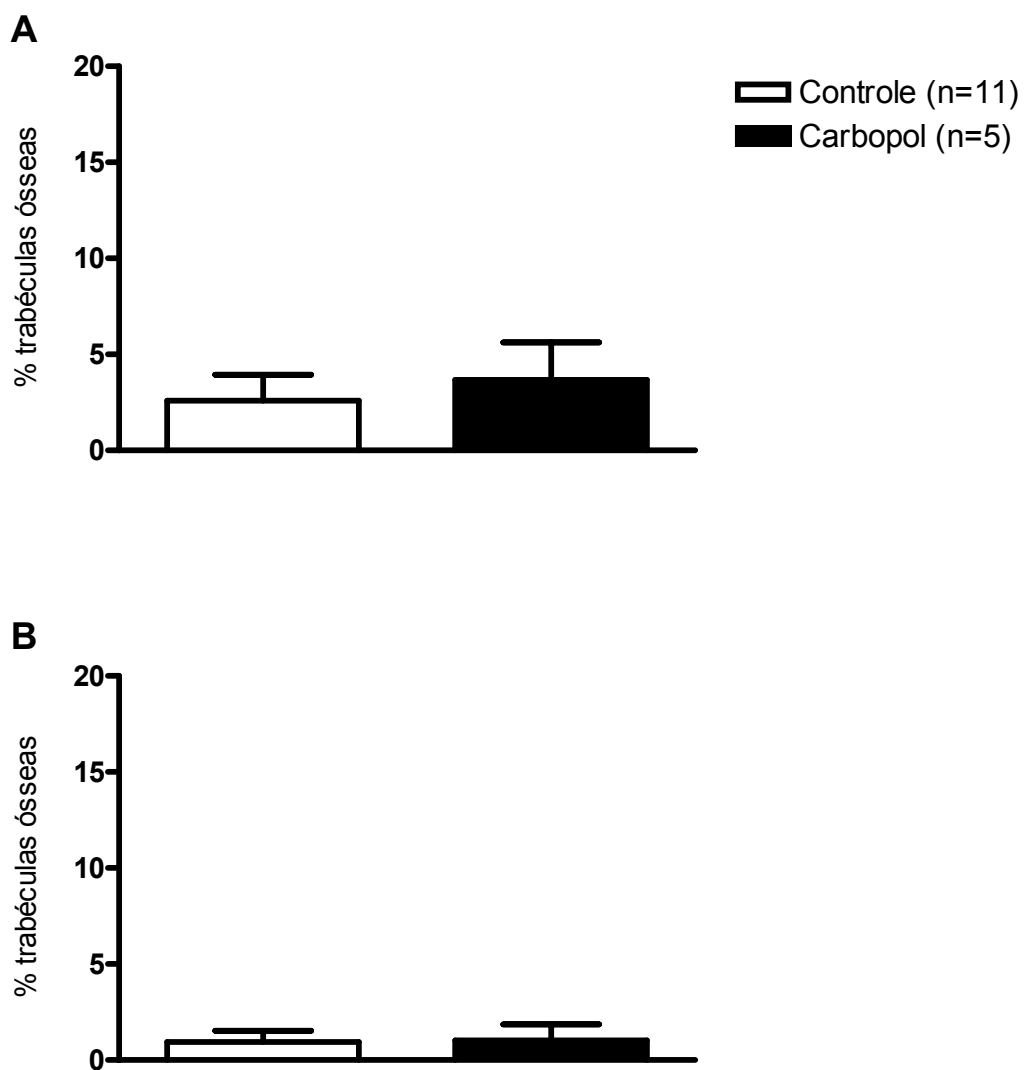


**Figura 22:** Número de núcleos celulares nos alvéolos controles e tratados em função do tempo de cicatrização, nos terços (A) apical e (B) médio.

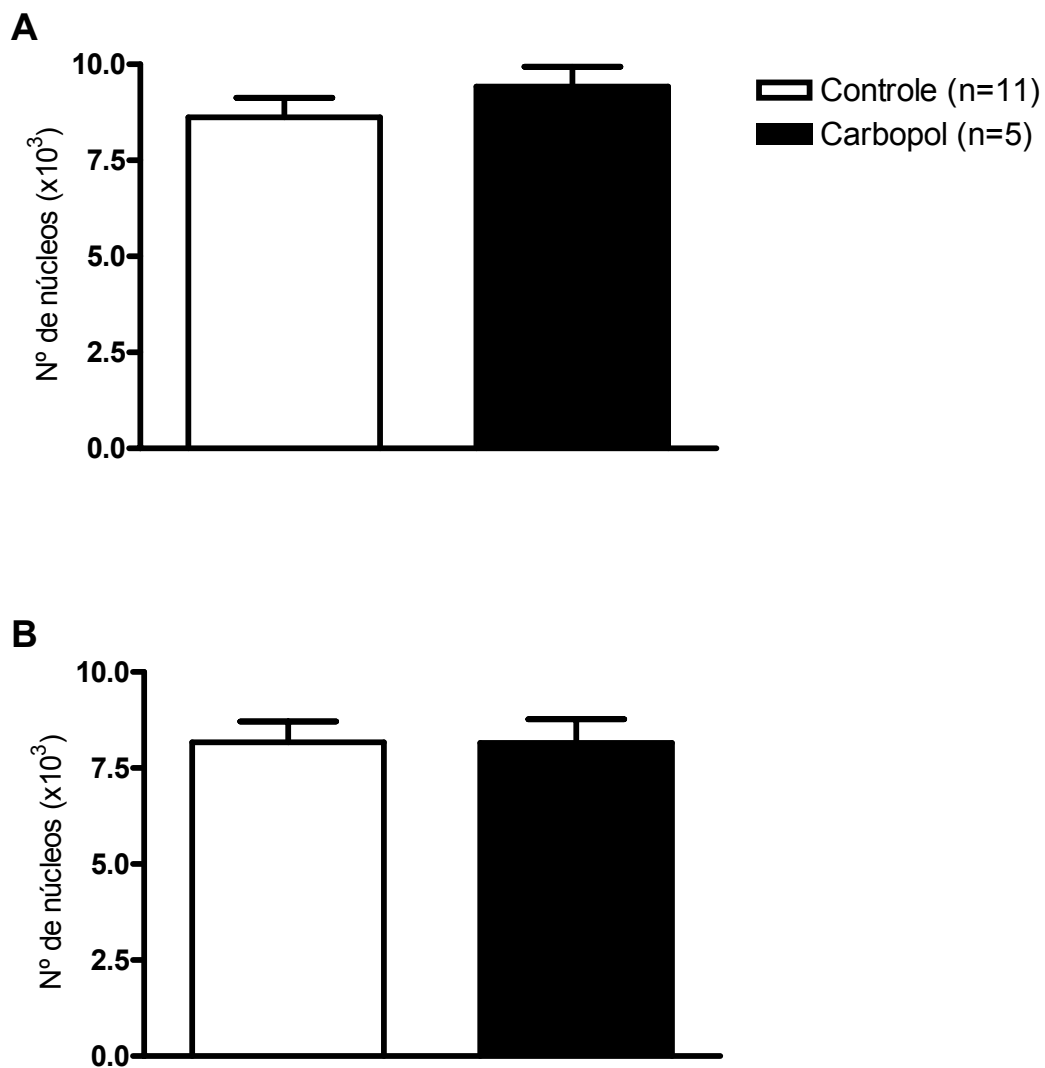
*Carbopol*

Não houve diferença histológica entre os alvéolos tratados com carbopol e os controles, após sete dias de cicatrização.

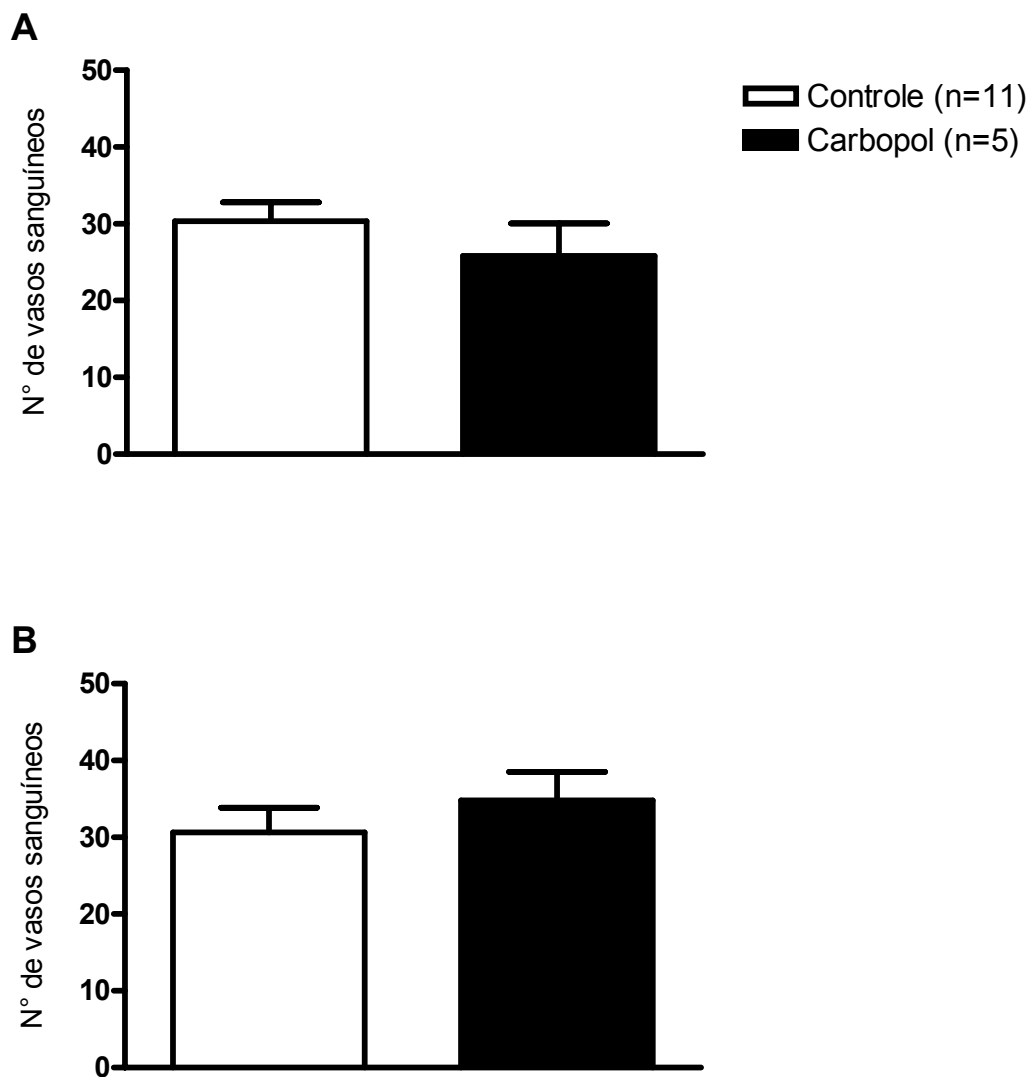
A análise morfométrica demonstrou não haver diferença estatística em nenhum dos parâmetros avaliados. O percentual de trabéculas ósseas no terço apical dos alvéolos tratados foi de  $3,67 \pm 1,94$  vs  $2,58 \pm 1,36\%$  de trabéculas nos alvéolos controles (Fig. 23A), e no terço médio, de  $1,03 \pm 0,83$  vs  $0,95 \pm 0,58\%$  de trabéculas nos alvéolos controles (Fig. 23B). O número de núcleos celulares no terço apical dos alvéolos tratados foi de  $9422 \pm 513$  vs  $8623 \pm 510$  núcleos nos alvéolos controles (Fig. 24A), e no terço médio, de  $8151 \pm 622$  vs  $8169 \pm 545$  núcleos nos alvéolos controles (Fig. 24B). O número de vasos sanguíneos presentes no terço apical dos alvéolos tratados foi de  $25,8 \pm 4,3$  vs  $30,4 \pm 2,5$  vasos nos alvéolos controles (Fig. 25A), e no terço médio, de  $34,8 \pm 3,7$  vs  $30,6 \pm 3,2$  vasos nos alvéolos controles (Fig. 25B).



**Figura 23:** Percentual de trabéculas ósseas nos alvéolos controles e tratados com carbopol, 07 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio.



**Figura 24:** Número de núcleos celulares presentes nos alvéolos controles e tratados com carbopol, 07 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio.



**Figura 25:** Número de vasos sanguíneos presentes nos alvéolos controles e tratados com carbopol, 07 dias após a exodontia, nos terços (A) apical e (B) médio.



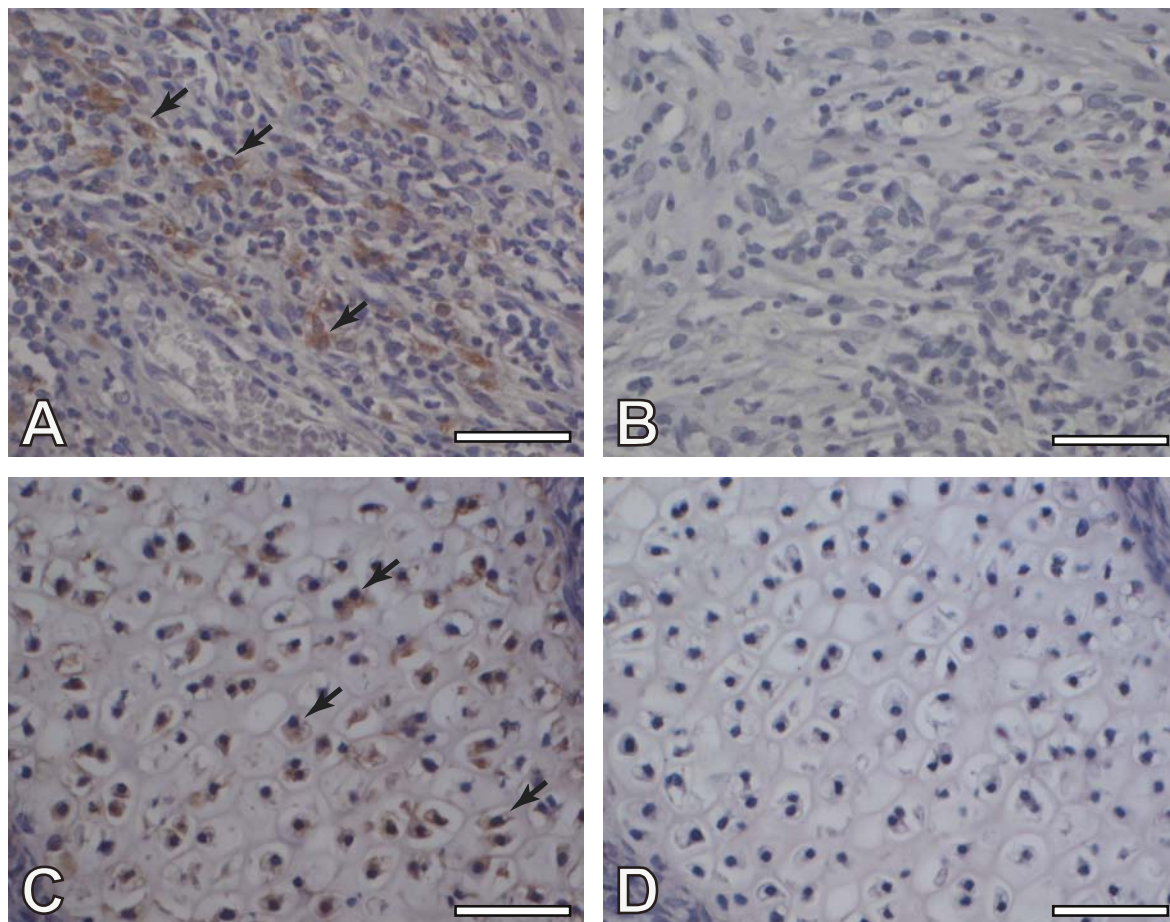
### 3. Imunohistoquímica

#### *BMP-2*

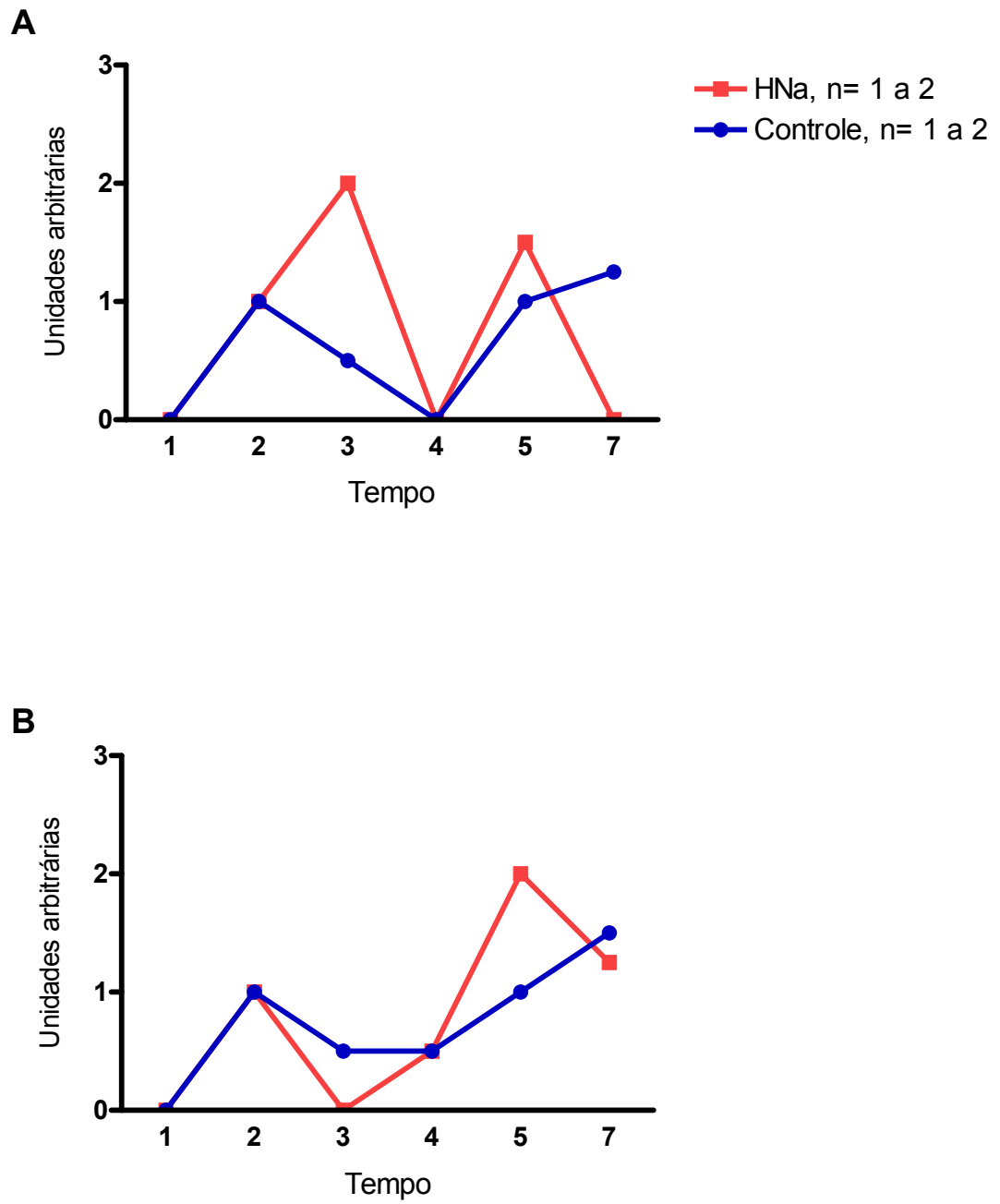
A análise da imunoexpressão de BMP-2 entre um e sete dias de cicatrização demonstrou que os alvéolos controles e tratados apresentaram dois picos de expressão. Ambos apresentaram início de expressão a partir de dois dias de cicatrização, sendo que a intensidade foi mais acentuada nos tratados. O segundo pico de expressão dos alvéolos tratados foi aos cinco dias de cicatrização, mais intenso e precoce em relação aos controles, cujo pico foi aos sete dias (Fig. 26A-B e 27A-B).

#### *OPN*

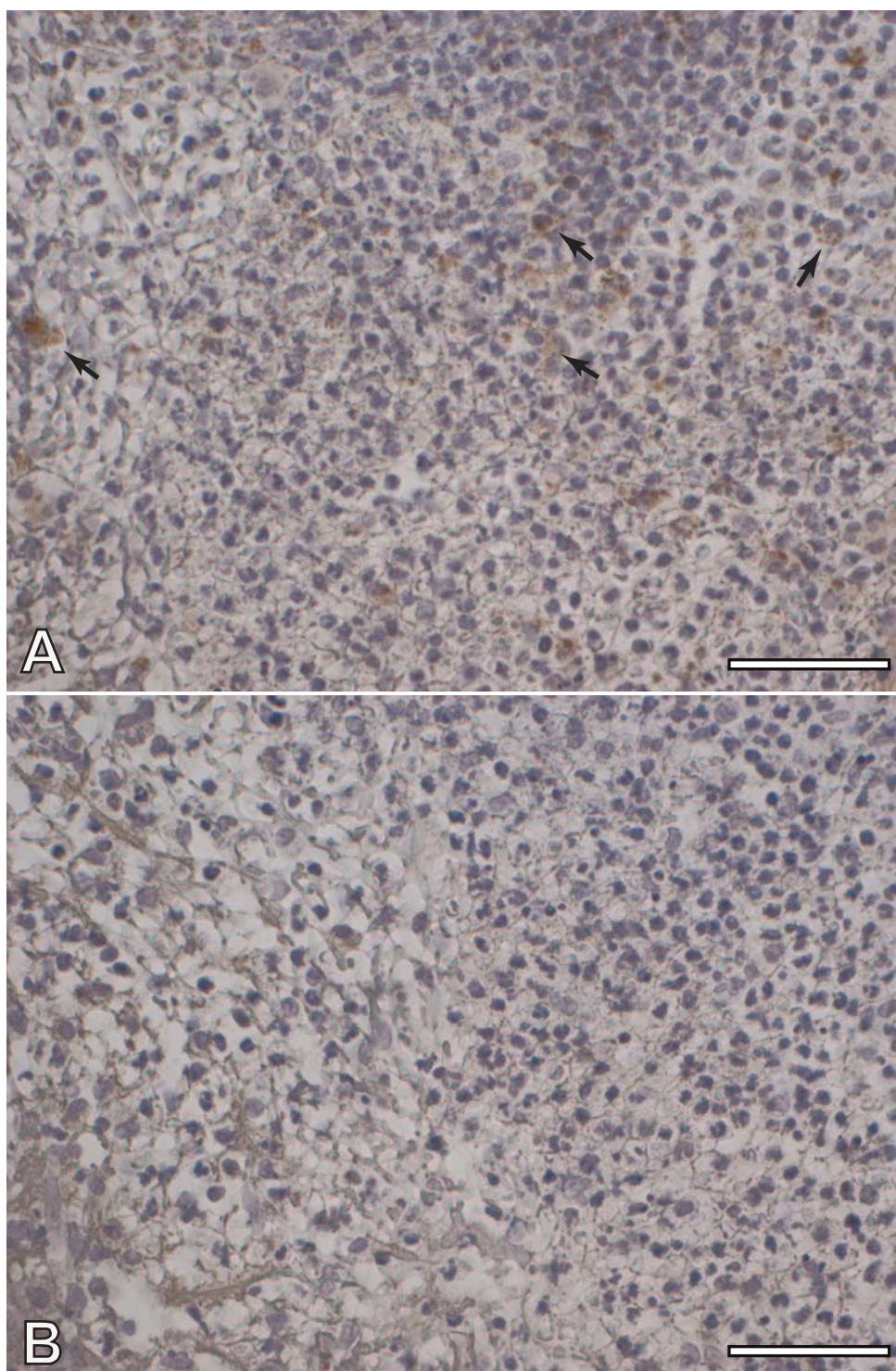
A análise da imunoexpressão de OPN entre um e sete dias de cicatrização demonstrou, no terço apical, que os alvéolos tratados e controles apresentaram início de expressão a partir de três dias de cicatrização. Verificou-se que a intensidade da imunomarcção, neste terço, foi mais acentuada nos alvéolos tratados. No terço médio, o pico de expressão também foi evidente aos três dias de cicatrização nos alvéolos tratados, mas com intensidade semelhante aos controles (Fig. 28 A-B e 29A-B).



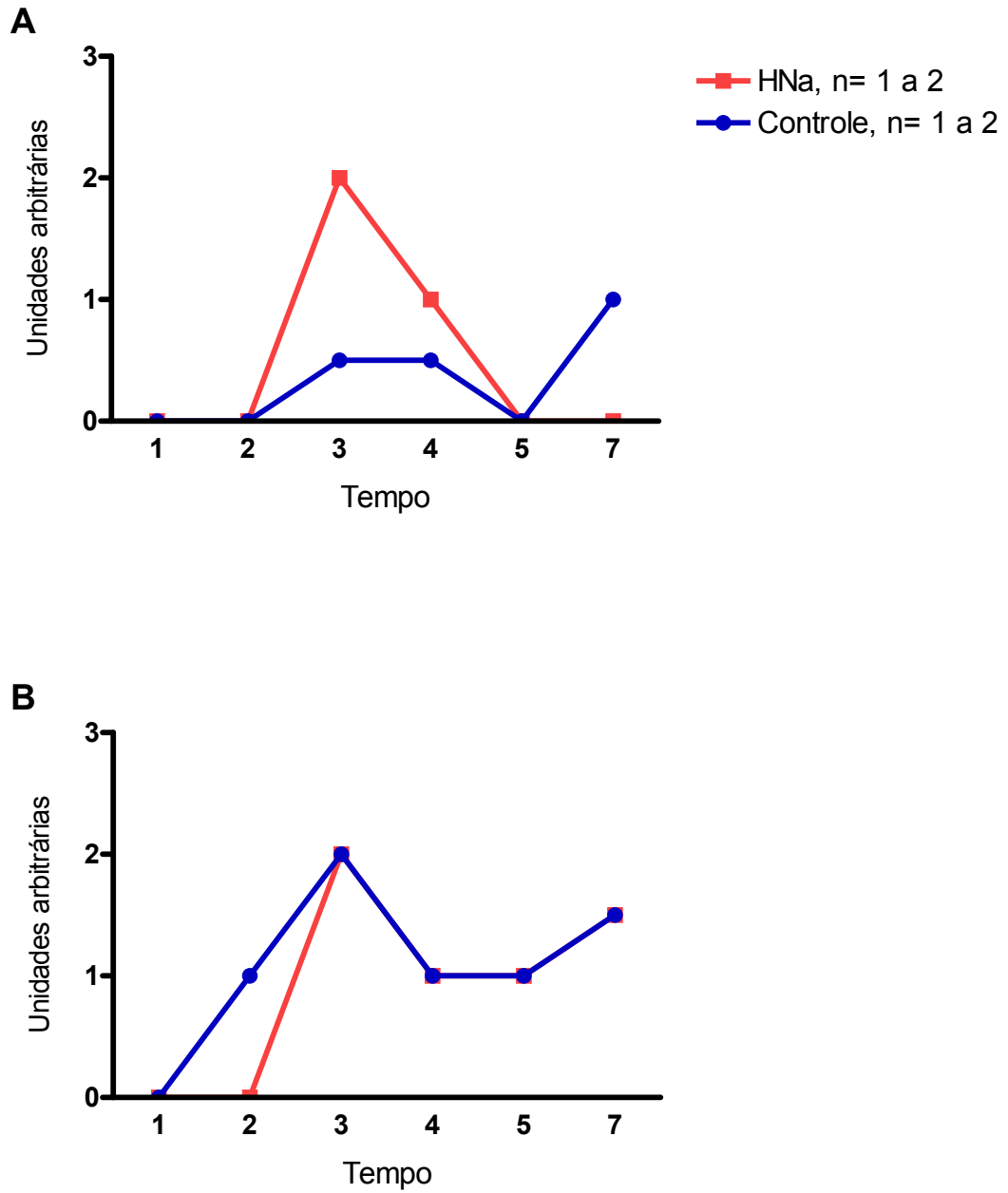
**Figura 26:** Expressão de BMP-2 (setas) em alvéolos de ratos (A) e em secções de cabeça de gambá (C), com seus respectivos controles negativos (B, alvéolo de rato e D, cabeça de gambá). (Barras A-D = 50 $\mu$ m).



**Figura 27:** Expressão de BMP-2 nos alvéolos controles e tratados, após 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias de cicatrização, nos terços (A) apical e (B) médio.



**Figura 28:** Expressão de OPN (setas) em alvéolos de ratos (A) e seu respectivo controle negativo (B). (Barras A-B = 50µm).



**Figura 29:** Expressão de OPN nos alvéolos controles e tratados, após 01, 02, 03, 04, 05 e 07 dias de cicatrização, nos terços (A) apical e (B) médio.

## V. DISCUSSÃO

Reconhecidamente, o alvéolo de extração dentária tem sido um modelo de estudo bastante utilizado em pesquisas para a avaliação de possíveis fatores que possam interferir no processo de reparo, acelerando-o ou retardando-o (BOECK *et al.*, 1999; PINTO *et al.*, 2001; KURIHASHI *et al.*, 2002; YUGOSHI *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003; TEÓFILO, *et al.*, 2004; ZIED *et al.*, 2005). No presente trabalho, analisou-se o efeito do HNa na cicatrização de alvéolos de ratos, após exodontia dos primeiros molares superiores, através de análises histológicas, morfométricas e imunohistoquímicas. Apesar de vários estudos demonstrarem que a HYA facilita a revascularização (SAVANI *et al.*, 2001; GIAVARESI *et al.*, 2005) e cicatrização em modelos de reparo ósseo (SASAKI & WATANABE, 1995; LIU *et al.*, 1999; LISIGNOLI *et al.*, 2002; ASLAN *et al.*, 2006), pouco tem sido descrito em relação aos seus efeitos na cicatrização de alvéolos e em odontologia. Diminuir o tempo de cicatrização alveolar poderia proporcionar o restabelecimento da função mastigatória por meio de implantes dentários de forma mais confortável para os pacientes.

As cadeias de HYA formam géis a concentrações muito baixas. As altas densidades de cargas negativas atraem cátions, principalmente  $\text{Na}^+$  (ALBERTS *et al.*, 2004). Portanto, apresentam-se comercialmente principalmente na forma de gel de hialuronato de sódio.

Vários trabalhos têm associado os efeitos da HYA ao tamanho de sua cadeia (LESLEY *et al.*, 2000; SLEVIN *et al.*, 2002; SUGAHARA *et al.*, 2003; TAKAHASHI *et al.*, 2005). Neste estudo, foi utilizado HNa de alto peso molecular, no intuito de avaliar os efeitos de um produto de baixo custo, acessível ao público em geral. Entretanto, vale lembrar que em processos inflamatórios verifica-se a

presença de hialuronidases (DECHERT *et al.*, 2006), que seccionam sua cadeia em fragmentos menores (LIU *et al.*, 1999; MOSELEY *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 2005). Assim, mesmo tendo utilizado HNa de alto peso molecular, o processo inflamatório presente nas fases iniciais da cicatrização alveolar provavelmente acarretou sua segmentação.

O efeito prolongado do período de anestesia alcançado em nossos experimentos, de cerca de cinco horas, possibilitou a permanência do gel de HNa na cavidade com mínimas interferências de fatores físicos, durante este período. Alguns autores relataram que a HYA acelera a cicatrização por facilitar a migração, diferenciação e proliferação celular nos períodos iniciais do processo de reparo (SASAKI & WATANABE, 1995; PILLONI & BERNARD, 1998; LIU *et al.*, 1999; ASLAN *et al.*, 2006). Por este motivo, o HNa foi aplicado em dose única e logo após a exodontia.

Os eventos de cicatrização alveolar, descritos neste trabalho, foram semelhantes ao relatado na literatura. Verifica-se inicialmente, a formação do coágulo sanguíneo que vai sendo substituído por um tecido conjuntivo altamente vascularizado. A deposição de uma matriz óssea pelos osteoblastos culmina na formação de espessas trabéculas ósseas que preenchem o alvéolo (PINTO *et al.*, 2001; TEÓFILO *et al.*, 2001; DEVLIN & SLOAN, 2002). As células osteoprogenitoras podem ser derivadas do LP (DEVLIN & SLOAN, 2002) e perióstio (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000; RASUBALA *et al.*, 2004). Porém, a presença de aglomerados celulares, possivelmente de linhagens osteoblástica, verificadas no terço médio dos alvéolos controles, próximos aos vasos sanguíneos, indica que também possam ser derivadas dos vasos (SHYNG *et al.*, 1999; DEVLIN & SLOAN, 2002). Os osteoclastos visualizados nos septos ósseos

atuam na remodelação óssea tanto dos septos quanto das margens do alvéolo (LINDHE, 1999; SHYNG *et al.*, 1999; KURIHASHI *et al.*, 2002).

Nossos resultados demonstraram que os alvéolos tratados com HNa apresentaram maior formação de trabéculas ósseas após sete, quatorze (terço médio) e vinte e um dias. Verificou-se também a presença de um maior número de vasos sanguíneos e menor número de núcleos celulares após sete dias de cicatrização.

Após as exodontias, os animais apresentaram interrupção espontânea do sangramento, o que justificou a não realização de sutura, procedimento semelhante ao adotado por outros autores (KURIHASHI *et al.*, 2002). O coágulo presente no início do processo de cicatrização (LINDHE, 1999; YUGOSHI *et al.*, 2002), é formado pela ruptura de vasos sanguíneos do LP e forame apical (BRANDÃO *et al.*, 2002). A rede de fibrina auxilia o influxo de células inflamatórias (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), presentes principalmente nos terços médio e cervical, bem como facilita a migração de fibroblastos (YUGOSHI *et al.*, 2002), visualizados com maior frequência no terço apical dos alvéolos. O LP contém uma mistura de populações celulares incluindo células osteoprogenitoras (DEVLIN & SLOAN, 2002), fibroblastos (LEKIC *et al.*, 1997; YUGOSHI *et al.*, 2002) e células endoteliais (YUGOSHI *et al.*, 2002). A presença de fibroblastos recém-migrados para a área de cicatrização, além da presença de poucos vasos sanguíneos neoformados, caracteriza a fase proliferativa da cicatrização (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000). Os fibroblastos sintetizam grande quantidade de fibras colágenas e substância fundamental amorfa (BRANDÃO *et al.*, 2002), que formam uma trama preliminar na qual ocorre a deposição de matriz óssea (SHYNG *et al.*, 1999; BOULETREAU *et al.*, 2002). O tecido conjuntivo pôde ser



visualizado através da coloração por tricrômico de Masson (FILHO, 1981), tanto nos alvéolos controles como nos tratados.

A diferença entre a quantidade de trabéculas presentes nos terços médio e apical, descrita neste trabalho, corrobora com os achados de outros autores que verificaram uma maior deposição nos terços apicais, aos sete dias de cicatrização (YUGOSHI *et al.*, 2002; KANYAMA *et al.*, 2003). A presença de maior quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos nos terços apicais, observado no início do processo de cicatrização (dois dias de reparo), justifica uma cicatrização mais avançada desta região do alvéolo. O íntimo contato do terço cervical com o meio bucal, através da solução de continuidade epitelial presente nos períodos iniciais da cicatrização, pode resultar em sua contaminação e contribuir para discrepâncias nos resultados obtidos nesta região (BRANDÃO *et al.*, 2002). Por isso, foram analisados morfometricamente apenas os terços apicais e médios.

O percentual de trabéculas ósseas aferido nos alvéolos controles, difere dos dados obtidos por outros autores que relataram um volume de 9,5% na porção mediana do terço apical; 17,4% na porção mediana do terço médio; e 12,4% na porção mediana do terço cervical (YUGOSHI *et al.*, 2002). Tais resultados divergem provavelmente devido a diferenças metodológicas. No presente estudo, além de dividir a região entre o osso basal e a crista óssea em apenas dois terços, conforme descrito por outros autores (TEÓFILO *et al.*, 2004), foram analisados apenas os cortes que apresentavam o alvéolo bem delineado. Este critério foi adotado tanto para os alvéolos controles como para os tratados, a fim de facilitar a distinção entre as trabéculas neoformadas e as presentes na base do septo ósseo.

Aos sete dias, observou-se tanto nos alvéolos tratados como nos controles, pronunciada rede vascular. A formação dos vasos sanguíneos é um processo essencial para o início de deposição óssea (KANYAMA *et al.*, 2003; GIAVARESI *et al.*, 2005; WONG & RABIE, 2005). Uma vez que o suporte sanguíneo é restabelecido, inicia-se o processo osteogênico (PACICCA *et al.*, 2003; LALANI *et al.*, 2005). A presença de maior quantidade de vasos sanguíneos nos terços médios dos alvéolos tratados indica que possam estar num processo de cicatrização mais avançada que os controles. Após a deposição inicial de matriz orgânica pelos osteoblastos, observa-se uma grande diminuição do número de fibroblastos e vasos sanguíneos (BRANDÃO *et al.*, 2002). Portanto, o menor número de vasos nos terços apicais dos alvéolos tratados, comparados aos terços médios dos mesmos, confirma mais uma vez, uma cicatrização mais avançada desta região do alvéolo.

A análise do número de núcleos celulares em função do tempo de cicatrização, entre dois e vinte e um dias, demonstrou uma diminuição tempo-dependente do número de núcleos. Neste sentido, o menor número de núcleos observados nos alvéolos tratados, sete dias após a exodontia também indica um processo de cicatrização mais avançado. Com quatorze e vinte e um dias, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao número de núcleos celulares, uma vez que os alvéolos destes grupos encontravam-se preenchidos predominantemente por trabéculas ósseas.

Aos quatorze dias de cicatrização, os alvéolos controles e tratados estavam preenchidos por trabéculas ósseas imaturas, semelhante ao descrito por outros autores (KANYAMA *et al.*, 2003). As imagens histológicas sugerindo a presença de trabéculas com nível de organização mais avançado nos alvéolos

tratados foram confirmadas pelos dados da morfometria que demonstraram maior percentual de trabéculas nos tratados (terço médio). O percentual de trabéculas ósseas aferido nos alvéolos controles, novamente difere dos dados obtidos por outros autores que relataram um volume de 24,2% na porção mediana do terço apical; 36,2% na porção mediana do terço médio; e 32,4% na porção mediana do terço cervical (YUGOSHI *et al.*, 2002).

Vários autores relataram que aos vinte e um dias de cicatrização, o processo de reparo alveolar está quase completo (BRANDÃO *et al.*, 2002; ZIED *et al.*, 2005), justificando a escolha dos períodos de dois, sete, quatorze e vinte e um dias para avaliação histológica e morfométrica. O maior percentual de trabéculas nos alvéolos tratados, aos vinte e um dias, indica que a cicatrização ainda não está completa, apesar da diminuição na inclinação da curva de cicatrização sugerir que possa estar próximo do período final do reparo.

A avaliação do grau de cicatrização macroscópica vinte e um dias após a exodontia demonstrou que os alvéolos tratados apresentaram cicatrização estatisticamente maior que os controles, em concordância com a formação de maior quantidade de trabéculas, sugerindo que o HNa apresenta um potencial terapêutico na clínica odontológica naqueles casos que se pretende um reparo ósseo mais acelerado. Entretanto, outros estudos são necessários para avaliar a qualidade deste osso formado sob o efeito condutor do HNa.

Vários trabalhos utilizando inserção de biomateriais em modelos de alvéolos de ratos lançam mão dos alvéolos homólogos como controles, preenchidos apenas por coágulo (BOECK *et al.*, 1999; BRANDÃO *et al.*, 2002). O presente trabalho comparou os alvéolos tratados com os homólogos (controles), preenchidos apenas com coágulo, em todos os períodos analisados. Para avaliar

o efeito físico da injeção do gel de HNa no alvéolo, uma vez que o gel poderia resultar na remoção do coágulo, importante para o processo de reparo (LINDHE, 1999), utilizou-se um gel de carbopol. Para isto, o período de sete dias de cicatrização foi escolhido por apresentar diferenças mais nítidas entre os controles e tratados. Os resultados demonstraram não haver diferença estatística entre os alvéolos controles, preenchidos com coágulo, e aqueles tratados com carbopol, sugerindo que o efeito físico da injeção de um gel na cavidade alveolar, não resulta em retardo ou aceleração, após sete dias de cicatrização.

A literatura sugere que os eventos celulares envolvidos no processo de cicatrização alveolar são regulados por fatores de crescimento (SHYNG *et al.*, 1999; TEÓFILO *et al.*, 2001; LALANI *et al.*, 2005). Neste estudo correlacionou-se a intensidade e expressão temporal de BMP-2 e OPN, nos terços apical e médio dos alvéolos controles e tratados com HNa.

A análise da imunexpressão de BMP-2 entre um e sete dias de cicatrização demonstrou que os alvéolos controles e tratados apresentaram dois picos de expressão. BMP-2 estimula a diferenciação de células mesenquimais em osteoprogenitoras que, mais adiante, diferenciam-se em pré-osteoblastos e osteoblastos maduros (LIEBERMAN *et al.*, 2002; WONG & RABIE, 2005; SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005), além de induzir a síntese de colágeno em fibroblastos, e a síntese de proteínas da matriz óssea em osteoblastos (SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). A maior intensidade observada no terço apical dos alvéolos tratados, pode ter resultado numa deposição mais rápida e precoce das fibras colágenas. Da mesma forma, verificou-se que o segundo pico de expressão foi mais intenso e precoce nos alvéolos tratados em relação aos controles (cinco dias vs sete dias, nos controles). A ausência de expressão de

BMP-2 no terço apical dos alvéolos tratados aos sete dias, indica que provavelmente já houve diferenciação dos osteoblastos, com subsequente deposição de matriz óssea, enquanto nos controles, ainda se observa diferenciação. Estes dados sugerem uma cicatrização mais acelerada nos alvéolos tratados, já que BMP-2 acelera o reparo ósseo (RASUBALA *et al.*, 2004; AROSARENA & COLLINS, 2005; LIEBERMAN *et al.*, 2002). Os dados da morfometria corroboram esta hipótese.

A análise da imunexpressão de OPN entre um e sete dias de cicatrização demonstrou, no terço apical, que os alvéolos tratados e controles apresentaram início de expressão aos três dias de cicatrização, semelhante ao relatado por outros autores (SHYNG *et al.*, 1999), e posterior à expressão de BMP-2. Sua expressão corresponde à proliferação e diferenciação de células osteoblásticas durante a formação óssea (PERRIEN *et al.*, 2002). OPN é observada em fibroblastos, pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos (PERRIEN *et al.*, 2002) e osteoclastos (SIQUEIRA JR. & DANTAS, 2000), e induz a mineralização da matriz óssea (SHYNG *et al.*, 1999; SCHULTZE-MOSGAU *et al.*, 2005). A intensidade da imunomarcação, mais acentuada no terço apical dos alvéolos tratados pode ter contribuído para a formação de maior quantidade de trabéculas ósseas, dados confirmados pela morfometria. Estes achados sugerem um processo de reparo mais acelerado nos alvéolos tratados.

A regeneração da perda ou dano tecidual requer que células reparativas sofram migração, adesão, proliferação e diferenciação de maneira que resultem na síntese de um novo tecido (LIU *et al.*, 1999). As propriedades físico-químicas da HYA permitem que ela facilite o processo de reparo (SASAKI & WATANABE, 1995; PILLONI & BERNARD, 1998; LIU *et al.*, 1999; ASLAN *et al.*,

2006), acarretando num menor período de cicatrização, o que foi verificado nos alvéolos tratados. Assim, nossos dados estão de acordo com estudos prévios sobre os efeitos osteocondutores da HYA em diversos modelos experimentais de defeitos ósseos (SASAKI & WATANABE, 1995; LIU *et al.*, 1999; LISIGNOLI *et al.*, 2002; AROSARENA & COLLINS, 2005, ASLAN *et al.*, 2006).

## **VI. CONCLUSÃO**

Os dados obtidos neste trabalho, sugerem que o HNa acelera o processo de cicatrização de alvéolos de ratos, após exodontia dos primeiros molares superiores.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Trad. VEIGA, A. B. G. Porto Alegre: Artmed, 4.ed. 1463 p., 2004.

ANDREASEN, J.O.; ANDREASEN, F. M. *Traumatismo dentário: soluções clínicas*. Trad. Frieda Werebe. São Paulo: Panamericana, 168p., 1991.

ANNABI, B.; THIBEAULT, S.; MOUMDJIAN, R.; BÉLIVEAUN, R. Hyaluronan cell surface binding is induced by type I collagen and regulated by caveolae in glioma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 21, p. 21888-21896, 2004.

AROSARENA, O. A., COLLINS, W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngology: Head and Neck Surgery*, v. 132, p. 592-597, 2005.

ASLAN, M.; SIMSEK, G.; DAYI, E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *Journal of Biomaterials Applications*, v. 20, p. 209-219, 2006.

BAKOS, D.; SOLDÁN, M.; HERNÁNDEZ-FUENTES, I. Hydroxyapatite-collagen-hyaluronic acid composite. *Biomaterials*, v. 20, p. 191-195, 1999.

BARBUCCI, R.; LAMPONI, S.; BORZACCHIELLO, A.; AMBROSIO, L.; FINI, M.; TORRICELLI, P.; GIARDINO, R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*, p. 4503-4513, 2002.

BODIC, F.; HAMEL, L.; LEROUXEL, E.; BASLÉ, M. F.; CHAPPARD, D. Bone loss and teeth. *Join Bone Spine*, v. 72, n. 3, p. 215-221, 2005.



BOECK, E. M.; PANSANI, C. A.; OKAMOTO, T.; GOISSIS, G.; BOECK NETO, R. J.; MARCANTONIO JÚNIOR, E. Implante de hidroxiapatita em alvéolos dentais: estudo histopatológico em ratos. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, v. 28, n. 1, p. 83-96, 1999.

BOULETREAU, P. J.; WARREN, S. M.; LONGAKER, M. T. The molecular biology of distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 30, p. 1-11, 2002.

BOURGUIGNON, L. Y. W.; SINGLETON, P. A.; ZHU, H.; ZHOU, B. Hyaluronan promotes signaling interaction between CD44 and the transforming growth factor  $\beta$  receptor I in metastatic breast tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 42, p. 39703-39712, 2002.

BRANDÃO, A. C.; BRENTGANI, L. G.; NOVAES JR., A. B.; GRISI, M. F. M.; SOUZA, S. L. S.; TABA JR., M.; SALATA, L. A. Histomorphometric analysis of rat alveolar wound healing with hydroxyapatite alone or associated to BMPs. *Brazilian Dental Journal*, v. 13, n. 3, p. 147-154, 2002.

CALIARI, M.V. *Princípios Básicos de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes*. Belo Horizonte: UFMG, 149p., 1997.

COLNOT, C.; ROMERO, D. M.; HUANG, S.; HELMS, J. A. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v. 435, p. 69-78, 2005.

DECHERT, T. A.; DUCALE, A. E.; WARD, S. I.; YAGER, D. R. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound repair and regeneration*, v. 14, p. 252-258, 2006.

DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 31, p. 641-645, 2002.

ENGSTRÖM-LAURENT, A. Hyaluronan in joint disease. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, p. 57-60, 1997.

FILHO, G. G. *Técnica histológica – manual*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz – Centro de Microscopia Eletrônica, 70p., 1981.

FRASER, J. R. E.; LAURENT, T. C.; LAURENT, U. B. G. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, p. 27-33, 1997.

FRAZÃO, P.; ANTUNES, J. L. F.; NARVAI, P. C. Perda dentária precoce em adultos de 35 a 44 anos de idade - Estado de São Paulo, Brasil, 1998. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, n. 1, p. 49-57, 2003.

GERDIN, B.; HÄLLGREN, R. Dynamic role of hyaluronan (HYA) in connective tissue activation and inflammation. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, p. 49-55, 1997.

GHATAK, S.; MISRA, S.; TOOLE, B. P. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 10, p. 8875-8883, 2005.

GIAVARESI, G.; TORRICELLI, P.; FORNASARI, P. M.; GIARDINO, R.; BARBUCCI, R.; LEONE, G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials*, v. 26, p. 3001-3008, 2005.

GRIGOLO, B.; ROSETI, L.; FIORINI, M.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; ALDINI, N. N.; GIARDINO, R.; FACCHINI, A. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaff®-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*, v. 22, p. 2417-2424, 2001.

HARDWICK, C.; HOARE, K.; OWENS, R.; HOHN, H. P.; HOOK, M.; MOORE, D.; CRIPPS, V.; AUSTEN, L.; NANCE, D. M.; TURLEY, E. A. Molecular cloning of a novel hyaluronan receptor. *The Journal of Cell Biology*, v. 117, n. 6, p. 1343-1350, 1992.

ITOH, S.; MATUBARA, M.; KAWAUCHI, T.; NAKAMURA, H.; YUKITAKE, S.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K. Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 12, p. 575-581, 2001.

IZUKA, T.; HÄFLIGER, J.; SETO, I.; RAHAL, A.; MERICSKE-STERN, R.; SMOLKA, K. Oral rehabilitation after mandibular reconstruction using an osteocutaneous fibula free flap with endosseous implants - factors affecting the functional outcome in patients with oral cancer. *Clinical of Oral Implants Research*, v. 16, n. 1, p. 69-79, 2005.

JUHLIN, L. Hyaluronan in skin. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, p. 61-66, 1997.

KANYAMA, M.; KUBOKI, T.; AKIYAMA, K.; NAWACHI, K.; MIYAUCHI, F. M.; YATANI, H.; KUBOTA, S.; NAKANISHI, T.; TAKIGAWA, M. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, v. 48, p. 723-730, 2003.

KUMAR, S.; WITZIG, T. E.; TIMM, M.; HAUG, J.; WELLIK, L.; KIMLINGER, T. K.; GREIPP, P. R.; RAJKUMAR, S. V. Bone marrow angiogenic ability and expression of angiogenic cytokines in myeloma: evidence favoring loss of marrow angiogenesis inhibitory activity with disease progression. *Blood*, v. 104, n. 4, p. 1159-1165, 2004.

KURIHASHI, T.; IWATA, H.; NASU, M. Experimental study on wound healing of alveolar bone sockets in the rat maxilla after x-ray irradiation. *Odontology*, v. 90, p. 35-42, 2002.

LALANI, Z.; WONG, M.; BREY, E. M.; MIKOS, A. G.; DUKE, P. J.; MILLER, M. J.; JOHNSTON, C.; MONTUFAR-SOLIS, D. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 63, p. 1500-1508, 2005.

LAMANO CARVALHO, T. L.; BOMBONATO, K. F.; BRENTGANI, L. G. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Brazilian Dental Journal*, v. 8, n. 1, p. 9-12, 1997.

LAURENT, T.C, FRASER, J.R.E. Hyaluronan. *Faseb Journal*, v. 6, p. 2397-2404, 1992.

LEKIC, P.; RUBBINO, I.; KRASNOSHTEIN, F.; CHEIFETZ, S.; McCULLOCH, C. A. G.; TENENBAUM, H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *The Anatomical Record*, v. 247, p. 329-340, 1997.

LESLEY, J.; HASCALL, V. C.; TAMMI, M.; HYMAN, R. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 35, p. 26967-26975, 2000.

LESLEY, J.; GÁL, I.; MAHONEY, D. J.; CORDELL, M. R.; RUGG, M. S.; HYMAN, R.; DAY, A. J.; MIKECZ, K. TSG-6 modulates the interaction between hyaluronan and cell surface CD44. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 24, p. 25745-25754, 2004.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone: biology and clinical applications. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 84, n. 6, p. 1032-1044, 2002.

LINDHE, Jan. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro: 3. ed., 720 p., 1999.

LINKER, A.; MEYER, K.; WEISSMANN, B. Enzymatic formation of monosaccharides from hyaluronate. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 213, p. 237-248, 1955.

LISIGNOLI, G.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; ALDINI, N. N.; TONEGUZZI, S.; FACCHINI, A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials*, v. 23, p. 1043-1051, 2002.

LIU, L.; THOMPSON, A. Y.; HEIDARAN, M. A.; POSER, J. W.; SPIRO, R. C. An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials*, v. 20, p. 1097-1108, 1999.

MALTOS, K.L.; MENEZES, G.B.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; SANTOS, J.M.; ALVES, D.L.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Archives of Oral Biology*, v. 49, n. 6, p. 443-450, 2004.

MENEGHIM, M. C.; PEREIRA, A. C.; SILVA, F. R. B. Prevalência de cárie radicular e condição periodontal em uma população idosa institucionalizada de Piracicaba - SP. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v. 16, n. 1, p. 50-56, 2002.

MEYER, K.; PALMER, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 107, p. 629-634, 1934.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais*. Brasília: Ministério da Saúde, 68 p., 2005.

MOSELEY, R.; LEAVER, M.; WALKER, M.; WADDINGTON, R. J.; PARSONS, D.; CHEN, W. Y. J.; EMBERY, G. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF®-11p75, AQUACEL® and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomaterials*, v.23, p. 2255-2264, 2002.

NEDVETZKI, S.; GONEN, E.; ASSAYAG, N.; REICH, R.; WILLIAMS, R. O.; THURMOND, R. L.; HUANG, J.; NEUDECKER, B. A.; WANG, F.; TURLEY, E. A.; NAOR, D. RHAMM, a receptor for hyaluronan-mediated motility, compensates for CD44 in inflamed CD44-knockout mice: a different interpretation of redundancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 52, p. 18081-18086, 2004.

PACICCA, D. M.; PATEL, N.; LEE, C.; SALISBURY, K.; LEHMANN, W.; CARVALHO, R.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone*, v. 33, p. 889-898, 2003.

PERRIEN, D. S.; BROWN, E. C.; ARONSON, J.; SKINNER, R. A.; MONTAGUE, D. C.; BADGER, T. M.; LUMPKIN JR., C. K. Immunohistochemical study of osteopontin expression during distraction osteogenesis in the rat. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, v. 50, n. 4, p. 567-574, 2002.

PILLONI, A.; BERNARD, G. W. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis *in vitro*. *Cell and Tissue Research*, v. 294, p. 323-333, 1998.

PINTO, J. R.; BOSCO, A. F.; OKAMOTO, T.; GUERRA, J. B.; PIZA, I. G. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats – a histological study. *Brazilian Dental Journal*, v. 12, n. 1, p. 3-9, 2001.

PRINCE, C. W. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BCM Musculoskeletal Disorders*, v. 5, n. 12, 2004.

RASUBALA, L.; YOSHIKAWA, H.; ISLAM, A. A. S.; NAGATA, K.; LIJIMA, T.; OHISHI, A. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 42, p. 315-322, 2004.

RENGACHARY, S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurgery Focus*, v. 13, p. 1-6, 2002.

SASAKI, T.; WATANABE, C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, v. 16, n. 1, p. 9-15, 1995.

SAVANI, R. C.; CAO, G.; POOLER, P. M.; ZAMAN, A.; ZHOU, Z.; DELISSER, H. M. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, n. 39, p. 36770-36778, 2001.

SCHULTZE-MOSGAU, S.; LEHNER, B.; RÖDEL, F.; WEHRHAN, F.; AMANN, K.; KOPP, J.; THORWARTH, M.; NKENKE, E.; GRABENBAUER, G. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor- $\beta_1$ , and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, v. 61, n. 4, p. 1189-1196, 2005.

SHYNG, Y. C.; DEVLIN, H.; RICCARDI, D.; SLOAN, P. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Archives of Oral Biology*, v. 44, p. 751-757, 1999.

SIQUEIRA Jr., J. F.; DANTAS, C. J. S. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 238 p., 2000.

SIMPSON, M. A.; WILSON, C. M.; FURCHT, L. T.; SPICER, A. P.; OEGEMA, T. R.; MCCARTHY, J. B. Manipulation of hyaluronan synthase expression in prostate adenocarcinoma cells alters pericellular matrix retention and adhesion to bone marrow endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 12, p. 10050-10057, 2002.

SLEVIN, M.; KUMAR, S.; GAFFNEY, J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell

mitogenic and wound healing responses. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 43, p. 41046-41059, 2002.

STREET, J.; BAO, M.; DEGUZMAN, L.; BUNTING, S.; PEALE, F. V.; FERRARA, N.; STEINMETZ, H.; HOFFEL, J.; CLELAND, J. L.; DAUGHERTY, A.; BRUGGEN, N. V.; REDMOND, H. P.; CARANO, R. A. D.; FILVAROFF, E. H. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 15, p. 9656-9661, 2002.

SUGAHARA, K. N.; MURAI, T.; NISHINAKAMURA, H.; KAWASHIMA, H.; SAYA, H.; MIYASAKA, M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 34, p. 32259-32265, 2003.

TAKAHASHI, Y.; LI, L.; KAMIRYO, M.; ASTERIOU, T.; MOUSTAKAS, A.; YAMASHITA, H.; HELDIN, P. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 25, p. 24195-24204, 2005.

TEÓFILO, J. M.; BRENTAGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Archives of Oral Biology*, v. 46, p. 375-379, 2001.

TEÓFILO, J. M.; BRENTAGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Archives of Oral Biology*, v. 49, p. 755-762, 2004.

TOOLE, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. *Journal of Internal Medicine*, v. 242, p. 35-40, 1997.



TOOLE, B. P.; WIGHT, T. N.; TAMMI, M. I. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 7, p. 4593-4596, 2002.

TURLEY, E. A.; AUSTEN, L.; VANDELIGT, K.; CLARY, C. Hyaluronan and a cell-associated hyaluronan binding protein regulate the locomotion of Ras-transformed cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 112, n. 5, p. 1041-1047, 1991.

TURLEY, E. A.; NOBLE, P. W.; BOURGUIGNON, L. Y. W. Signaling properties of hyaluronan receptors – minireview. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 7, p. 4589-4592, 2002.

WILTFANG, J.; KLOSS, F. R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZEMOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHLEGEL, K. A. Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects – an animal experiment. *Clinical Oral Implants Research*, v. 15, p. 187-193, 2004.

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Early healing pattern of statin-induced osteogenesis. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 43, p. 46-50, 2005.

YINGSUNG, W.; ZHUO, L.; MÖRGELIN, M.; YONEDA, M.; KIDA, D.; WATANABE, H.; ISHIGURO, N.; IWATA, H.; KIMATA, K. Molecular heterogeneity of the shap-hyaluronan complex – isolation and characterization of the complex synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 35, p. 32710-32718, 2003.

YUGOSHI, L. I.; SALA, M. A.; BRENTGANI, L. G.; LAMANO CARVALHO, T. L. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Brazilian Dental Journal*, v. 13, n. 2, p. 92-96, 2002.

ZHANG, S.; CHANG, M. C. Y.; ZYLKA, D.; TURLEY, S.; HARRISON, R.; TURLEY, E. A. The hyaluronan receptor RHAMM regulates extracellular-regulated kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 18, p. 11342-11348, 1998.

ZIED, I. C.; MILANEZI, L. A.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R. Estudo histológico do processo de reparo alveolar em ratos após exodontia e pressão com compressa de gaze embebida em solução de peróxido de hidrogênio. *Revista Odontológica de Araçatuba*, v. 26, n.1, p. 9-13, 2005.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **142/04** relativo ao projeto intitulado "**Avaliação morfológica e imunohistoquímica do potencial osteoindutor do ácido hialurônico em alvéolos de ratos**", que tem como responsável Gerluza Aparecida Borges Silva, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado em reunião de **15.12.2004**.

Este certificado expira-se em **15.12.2009**

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **142/04** related to the project entitled "**Immunohistochemical and morphological evaluation of osteoindutor potential of hyaluronic acid in sockets of rats**", under the supervision Gerluza Aparecida Borges Silva, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)** and was approved in **15.12.2004**.

This certificate expires in **15.12.2009**.

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2004

  
**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**  
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil  
Telefone: (31) 3499-4031 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)