

Leonardo Nogueira de Miranda Pereira Pinto

**Efeito da sinvastatina associada a fosfato de cálcio bifásico
no reparo de defeitos ósseos**

Brasília
2016

Leonardo Nogueira de Miranda Pereira Pinto

**Efeito da sinvastatina associada a fosfato de cálcio bifásico
no reparo de defeitos ósseos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a conclusão do curso de Graduação em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Vieira Cortez

Brasília
2016

AGRADECIMENTOS

Inicialmente à Deus, que me deu forças e me carregou no colo por muitos momentos, como na parábola “Pegadas na Areia” de Mary Stevenson. E que continue a me proporcionar momentos de engrandecimento de sabedoria.

Aos meus pais, que apesar de me acharem muito desprendido, fizeram o melhor trabalho de me ensinar a andar com minhas próprias pernas, me deram princípios, e com muito trabalho, me proporcionam uma vida sem privações.

À todos professores que compõem a cadeira docente do curso de odontologia da Universidade de Brasília por terem a vocação de ensinar, a paciência e compreensão com meu tempo para aprender. Em especial aos professores Wagner Duarte, André Cortez, Sérgio Bruzadelli, Junia Ferrari, Leandro Hilgert, Cristine Miron, Patrícia Pereira, Suzeli Porto, Ivanir Greco e Roberto Cruz com quem pude trabalhar mais de perto ou apenas pontuaram ensinamentos valiosos que levarei para o resto da minha vida profissional e pessoal.

À Professora Aline Úrsula por quem tenho enorme gratidão. Com certeza Deus a usou como instrumento para operar em minha vida. Não somente ao me orientar durante todo o curso quanto a matérias, me ajudar em momentos inoportunos e difíceis para minha saúde, mas por me ensinar que professor pode ser aquele que instrui dando confiança e liberdade para evoluir.

Ao Professor Orientador André Cortez pela atenção, confiança em me aceitar no último momento de orientação, e apoio com o trabalho de conclusão de curso, além de todo ensinamento dado ao longo do nosso convívio.

Aos mentores Haroldo Habe, Giancarlo Lettieri, José Miranda e Elder Carneiro por terem me aceitado como aprendiz e dedicado tempo e atenção a fim de me ensinar na clínica. Em especial à mentora Professora Dircilei Nascimento, que além disso, ainda me ajudou neste trabalho, sempre sendo muito solícita e atenciosa.

Aos amigos especiais de nem tão longa data, mas eternizados em mim; Marina Moraes, Artur Rocci, Larissa Montes e Marcos Starling. Presentes nos últimos anos que antecedem esta data, seguindo ao meu lado com muito carinho e amor. Antigos colegas de crossfit, atuais verdadeiros amigos.

Aos amigos de ensino médio Alison Farias, Caio Fernandes, Carlos Eduardo, Daniel Silva, Fábio Gurgel, Gabriel Teperino, Guilherme Morici, Henrique Rocha, Matheus Taveira, Múcio Botelho, Pedro Felipe, Rômulo Valente, Wilson Coelho e Yago Arantes por terem me ajudado desde então a me formar como pessoa, me ajudarem em momentos difíceis no terceiro ano, e ainda a passar de ano. Com arrependimento de não ter sido mais presente nos últimos anos, eu agradeço pela importância que eles tiveram e tem na minha vida. Obrigado hoje e sempre.

Aos meus amigos de infância Rodolfo Marques, Rubens Porto, Matheus Martins, Lucas Marcolini, Maurício Capovilla, Pedro Muller, Yuri Lacerda, Hiro Ferreira, Ana Soares, Carolina Rodriguez, Ana Carolina Rosignoli e Ana Orefice que sempre estiveram ao meu lado para brincar, brigar, comer, beber e chorar. Para quem eu dedico a frase "Family is much more than

blood” por serem a família que eu escolhi viver ao lado, obrigado hoje e sempre.

Aos colegas e amigos que a odontologia me trouxe, por terem me ajudado a lembrar das datas das provas, seminários, prazos de entrega, materiais, estudos, e principalmente por suas amizades. Em especial ao Brenner Copolla, Mariana Bezerra, Gabriela Domenico, Adilton Júnior, Christian Toledo, Richard Lima, Gabriel Guillen, Ana Karla Pereira, Géssika Pacheco, Helora Freitas, Thaís Alves, Kamilla França, Ana Flávia, Thiago Barroso.

Aos parceiros de atendimento Paulo Vítor Braz, Adilton Júnior e Thiago Carvalho, por não só me auxiliarem, mas me aceitarem com todo meu jeito peculiar de ser, às vezes desorganizados, as vezes esquecido, e ainda me oferecerem muito aprendizado durante nossos momentos clínicos, e assim me proporcionarem alcançar melhores resultados com meus pacientes.

Aos colegas que a odontologia trouxe e viraram família, Paulo Vítor Braz e Camila Jreige. Não só me ajudaram a me formar, como me ensinaram a ser uma pessoa melhor. Não poderia ser uma pessoa mais grata a essas duas pessoas que aqui coloco com tal importância por rezar que estejam sempre ao meu lado.

À minha melhor amiga e companheira Leiliane Motta por todo carinho, apoio e amor. Aturar minhas manias, identificar minhas angústias e me erguer nas minhas quedas, são alguns dos exemplos que a representa na minha vida nesse último ano de graduação, e por isso dedico aqui uma parcela desta minha conquista a ela. Obrigado hoje e sempre.

À todos aqueles que fizeram parte desta minha caminhada de forma direta ou indireta, o meu muito obrigado.

EPÍGRAFE

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã,
portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e
principalmente viver”.

Dalai Lama

RESUMO

PINTO, Leonardo. Efeito da sinvastatina associada a fosfato de cálcio bifásico no reparo de defeitos ósseos. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

As estatinas são drogas amplamente utilizadas no controle da colesterolemia. No entanto, tem sido demonstrado que essas drogas, especificamente a sinvastatina, têm um efeito na estimulação da formação óssea. O objetivo desse estudo foi analisar a formação óssea pela combinação da sinvastatina ao fosfato de cálcio bifásico (FCB), um substituto ósseo sintético osseocondutor. Dois defeitos ósseos foram criados com uma trefina de 5mm de diâmetro na calvária de 15 ratos Wistar. Os defeitos foram divididos em 5 grupos de acordo com o material utilizado para seu preenchimento, resultando em 6 defeitos por grupo: grupo 1, sem preenchimento; grupo 2, preenchimento com esponja de colágeno; grupo 3, preenchimento com esponja de colágeno combinado a 0,1mg de sinvastatina; grupo 4, preenchimento com FCB somente; grupo 5, preenchimento com FCB combinado a 0,1 mg de sinvastatina. Após 2 meses, os animais foram sacrificados, as calvárias submetidas a preparo histológico convencional, os cortes histológicos foram preparados e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), e as análises histológica e histomorfométrica foram realizadas. Os defeitos do grupo 1 se encontravam preenchidos por uma camada fina de tecido fibroso sem formação de tecido ósseo. Nos defeitos dos grupos 2 e 3 também foi encontrada uma camada de tecido

fibroso, mais espessa que no grupo 1, mas sem significativa formação de tecido mineralizado. Nos defeitos dos grupos 4 e 5, observaram-se áreas de formação de matriz óssea, principalmente ao redor das partículas do FCB, com alta densidade celular. A análise histométrica demonstrou que a área de osso formado no grupo 5 foi 1,56 vezes maior do que o grupo 4. Apesar da sinvastatina não ter potencial significativo de induzir uma formação óssea sozinho, a combinação da sinvastatina ao FCB resultou significativamente em maior formação de matriz óssea possivelmente por ter propriedades osseointegradora da sinvastatina e osseointegradora do substituto ósseo, quando comparado à propriedade somente osseointegradora do FCB, demonstrando uma capacidade promissora de diminuição no tempo de formação óssea em humanos.

ABSTRACT

PINTO, Leonardo. Effect of simvastatin associated with biphasic calcium phosphate in the regeneration of bone defects. 2016. Undergraduate Course Final Monograph (Undergraduate Course in Dentistry) – Department of Dentistry, School of Health Sciences, University of Brasília.

Statins are drugs widely used to control the cholesterol levels in blood. However, it has been demonstrated that drugs, specifically simvastatin, has an effect in stimulating bone regeneration. The purpose of this study was to analyze the bone regeneration by combine the simvastatin with calcium phosphate (CP), which is a synthetic bone grafting. Two critical-sized bone defects were created by using trephine bur with 5mm of diameter at the calvarial bone of 15 Wistar rats. The defects were divided in 5 groups according to the filler material, resulting in 6 defects per group: group 1, no treatment; group 2, collagen sponge; group 3, collagen sponge with 0.1mg of simvastatin; group 4, only calcium phosphate; group 5, calcium phosphate with 0.1mg of simvastatin. After two months the animals were euthanized, their calvarial bone was histologically processed. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), for later microscopic and histomorphometrical analyses. Group 1 defects had only a thin layer of fibrous tissue, with no bone formation. At groups 2 and 3 was also a fibrous tissue, greater than group 1, but no significant bone formation. Nevertheless, at groups 4 and 5 a newly bone-like tissue was observed in close proximity to the CP particles, with high cell density. The histomorphometrical analyses demonstrated that the matrix area of bone formation at

group 5 was 1,56 times greater than that found at group 4. Despite the simvastatin does not stimulate new bone formation by itself, the combination of simvastatin and CP resulted in higher osteogenesis due to combine osseoinductive and osseoconductive properties, when compared with CP osseoconductive properties alone, showing a promising capacity of lower the time for new bone formation in humans.

SUMÁRIO

Artigo Científico.....	16
Folha de Título.....	18
Resumo.....	19
Abstract.....	21
Introdução.....	23
Metodologia.....	26
Resultados.....	32
Discussão.....	37
Considerações finais.....	43
Referências Bibliográficas.....	43
Apêndice.....	46
Anexos.....	56
Normas da revista.....	56

ARTIGO CIENTÍFICO

Este trabalho de Conclusão de Curso é baseado no artigo científico:

Pinto, Leonardo Nogueira de Miranda Pereira; Souza, Dircilei Nascimento; Duarte, Wagner Rodrigues; Cortez, André Luís Vieira. Efeito da sinvastatina associada a fosfato de cálcio bifásico no reparo de defeitos ósseos.

Apresentado sob as normas de publicação da **REVISTA PERIODONTIA do SOBRAPE**

FOLHA DE TÍTULO

Efeito da sinvastatina associada a fosfato de cálcio bifásico no reparo de defeitos ósseos

Effect of simvastatin associated with biphasic calcium phosphate in the regeneration of bone defects

Leonardo Nogueira de Miranda Pereira Pinto¹

Dircilei Nascimento de Sousa²

Wagner Rodrigues Duarte³

André Luís Vieira Cortez⁴

¹ Aluno de Graduação em Odontologia da Universidade de Brasília.

² Aluna de Doutorado em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

³ Professor Adjunto de Periodontia da Universidade de Brasília.

⁴ Professor Adjunto de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Universidade de Brasília.

Correspondência: Prof. Dr. Andre Luís Vieira Cortez

Campus Universitário Darcy Ribeiro - UnB - Faculdade de Ciências da Saúde - Departamento de Odontologia - 70910-900 - Asa Norte - Brasília - DF

E-mail: andrecortez@hotmail.com / Telefone: (61) 31071803

Resumo

Efeito da sinvastatina associada a fosfato de cálcio bifásico no reparo de defeitos ósseos

Resumo

As estatinas são drogas amplamente utilizadas no controle da colesterolemia. No entanto, tem sido demonstrado que essas drogas, especificamente a sinvastatina, têm um efeito na estimulação da formação óssea. O objetivo desse estudo foi analisar a formação óssea pela combinação da sinvastatina ao fosfato de cálcio bifásico (FCB), um substituto ósseo sintético osseocondutor. Dois defeitos ósseos foram criados com uma trefina de 5mm de diâmetro na calvária de 15 ratos Wistar. Os defeitos foram divididos em 5 grupos de acordo com o material utilizado para seu preenchimento, resultando em 6 defeitos por grupo: grupo 1, sem preenchimento; grupo 2, preenchimento com esponja de colágeno; grupo 3 preenchimento com esponja de colágeno combinado a 0,1mg de sinvastatina; grupo 4, preenchimento com FCB somente; grupo 5, preenchimento com FCB combinado a 0,1 mg de sinvastatina. Após 2 meses, os animais foram sacrificados, as calvárias submetidas a preparo histológico convencional, os cortes histológicos foram preparados e corados com Hematoxilina-Eosina (HE), e as análises histológica e histomorfométrica foram realizadas. Os defeitos do grupo 1 se encontravam preenchidos por uma camada fina de tecido fibroso, sem formação de tecido ósseo. Nos defeitos dos grupos 2 e 3 também foi encontrado uma camada de tecido fibroso, mais espessa que no grupo 1, mas sem significativa formação de tecido mineralizado. Nos defeitos dos grupos 4 e 5,

observaram-se áreas de formação de matriz óssea, principalmente ao redor das partículas do FCB, com alta densidade celular. A análise histométrica demonstrou que a área de osso formado no grupo 5 foi 1,56 vezes maior do que o grupo 4. Apesar da sinvastatina não ter potencial significativo de induzir uma formação óssea sozinho, a combinação da sinvastatina ao FCB resultou significativamente em maior formação de matriz óssea possivelmente por ter propriedades osseoindutora da sinvastatina e osseocondutora do substituto ósseo, quando comparado à propriedade somente osseocondutora do FCB, demonstrando uma capacidade promissora de diminuição no tempo de formação óssea em humanos.

Palavras-chave

Sinvastatina; Osteogênese; Fosfato de Cálcio; Defeito Ósseo.

Abstract

Effect of simvastatin associated with biphasic calcium phosphate in the regeneration of bone defects

Abstract

Statins are drugs widely used to control the cholesterol levels in blood. However, it has been demonstrated that drugs, specifically simvastatin, has an effect in stimulating bone regeneration. The purpose of this study was to analyze the bone regeneration by combine the simvastatin with calcium phosphate (CP), which is a synthetic bone grafting. Two critical-sized bone defects were created by using trephine bur with 5mm of diameter at the calvarial bone of 15 Wistar rats. The defects were divided in 5 groups according to the filler material, resulting in 6 defects per group: group 1, no treatment; group 2, collagen sponge; group 3, collagen sponge with 0.1mg of simvastatin; group 4, only calcium phosphate; group 5, calcium phosphate with 0.1mg of simvastatin. After two months the animals were euthanized, their calvarial bone was histologically processed. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin, for later microscopic and histomorphometrical analyses. Group 1 defects had only a thin layer of fibrous tissue, with no bone formation. At groups 2 and 3 was also a fibrous tissue, greater than group 1, but no significant bone formation. Nevertheless, at groups 4 and 5 a newly bone-like tissue was observed in close proximity to the CP particles, with high cell density. The histomorphometrical analyses demonstrated that the matrix area of bone formation at group 5 was 1,56 times greater than that found at group 4. Despite the simvastatin does not stimulate new bone formation alone, the combination of simvastatin and CP resulted in higher osteogenesis due to combine osseoinductive and

osseointegrative properties, when compared with CP osseointegrative properties alone, showing a promising capacity of lower time for new bone formation in humans.

Keywords

Simvastatin; Osteogenesis; Calcium Phosphates; Bone Defects.

Introdução

As mudanças estruturais nos ossos da face, em especial maxila e mandíbula, são amplamente relatado após o acometimento destes a fatores externos como as doenças periodontais, extrações dentais, traumas faciais, e outras doenças que tendem a degenerá-los, tanto em altura como em largura (Covani et al., 2004; Araújo et al., 2005).

Com avanço tecnológico e científico diferentes tipos de tratamentos foram desenvolvidos com o objetivo de regenerar o osso perdido em áreas de defeitos ósseos ou periodontais (Garret et al., 1996; Bartold et al., 2000; Van Steenberghe et al., 2000). Dentre eles, materiais e/ou drogas osteocondutoras (permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície), osteogênicas (capazes de estimular a formação de osso diretamente, a partir de osteoblastos) ou osteoindutoras (capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local) (Urist et al., 1965; Urist et al., 1984; Masters et al., 1988).

O osso autógeno é ainda o padrão ouro para material base de enxerto ósseo, devido a sua alta capacidade osteogênica, ser osteocondutor e ainda osteoindutor. Totalmente biocompatível e rico em proteínas essenciais para diferenciação de osteoblastos, como proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), que possui propriedade angiogênica (Khan et al., 2005; Miron et al., 2013). Porém, apresenta certas desvantagens quanto ao seu potencial de reabsorção, dificuldade de adaptação na área receptora e ainda a necessidade de uma área doadora que aumenta o trauma cirúrgico (Nyan et al., 2009; Nyan et al., 2010).

Um substituto ósseo deve ser biocompatível, apresentar quimiotaxia para angiogênese, promover osteocondução, e ser

substituído em sua grande maioria por osso em quantidade e qualidade semelhante ao original (Boyne et al., 1980; Artzi et al., 2005; Jensen et al., 2006).

A literatura identifica vários medicamentos que possuem ação sobre o metabolismo ósseo, sendo os três principais: a calcitonina, os bisfosfonatos e as estatinas, sendo a sinvastatina a principal delas (Mundy et al., 1999). A sinvastatina atua no metabolismo ósseo, principalmente, quando utilizada de forma local, aumentando a atividade da fosfatase alcalina e também a expressão de osteocalcina, VEGF, TGF- β 1 e BMP-2 (maior efeito anabólico ósseo dentre as BMPs), sugerindo, assim, estimular a formação óssea com característica osteoindutora (Maeda et al., 2001; Baek et al., 2005; Ayukawa et al., 2009; Zhang et al., 2012).

O efeito osteoindutor da sinvastatina está relacionado com sua aplicação local, sendo necessário um carreador que impossibilite sua dispersão pela corrente sanguínea, atuando no sítio aplicado. O seu efeito é mais favorável ao crescimento ósseo em doses reduzidas de 0,5mg, que em tais concentrações reduz ainda a inflamação para níveis mais favoráveis (Stein et al., 2005; Lee et al., 2008). Maiores concentrações de sinvastatina podem acarretar efeito contrário ao desejado. Esta droga não possui efeito algum sobre o metabolismo ósseo quando utilizado para o controle da colesterolemia, pois seriam necessárias doses altíssimas para uma distribuição da droga no tecido ósseo a fim de um efeito osteoindutor. Tais doses são muito mais elevadas do que as necessárias para reduzir os níveis de colesterol e estão associadas à toxicidade sistêmica (Sousa et al., 2014).

Carreadores, como o fosfato de cálcio bifásico (alfa-tricálcio fosfato), são capazes de liberar a droga gradualmente. Nessas circunstâncias, a dose ideal da sinvastatina para estimular o máximo de regeneração do tecido ósseo, sem induzir uma inflamação em calvária de ratos, é de 0,1mg (Nyan et al., 2009). Além disso, esses materiais à base de fosfato de cálcio bifásico

têm sido amplamente utilizados como osteocondutores, devido sua excelente biocompatibilidade (Saito et al., 2006; Verron et al., 2010). Entre os materiais mais utilizados o BoneCeramic® (Straumann) é um material à base de fosfato de cálcio bifásico totalmente sintético, composto 60% por hidroxiapatita (HA) e 40% por fosfato β -tricálcio (β -TCP). A vantagem dessa composição é de que enquanto o β -TCP é reabsorvido de forma mais rápida, permitindo a aposição de tecido ósseo imaturo, o componente HA é reabsorvido de forma mais lenta, permitindo a manutenção prolongada do espaço para uma formação tardia de osso dentro do defeito ósseo (Jensen et al., 2007). Apesar do BoneCeramic® ter efeitos positivos quanto sua propriedade osteocondutora, ele carece de capacidade osteoindutora. Entretanto, o BoneCeramic® é um bom carreador para ser associado a substâncias com atividade osteoindutoras, melhorando assim o potencial regenerador do material (Kolk et al., 2012).

Com o objetivo de analisar o efeito da sinvastatina associada ao fosfato de cálcio bifásico BoneCeramic®, no presente estudo, categorizado como do tipo experimental em animais, foi questionado o resultado da associação entre o BoneCeramic® com a sinvastatina na formação de osso em modelos de defeitos ósseos, localizados na calvária de ratos (Stavropoulos et al., 2000), quando comparado com o uso do BoneCeramic® isoladamente.

METODOLOGIA

O protocolo experimental UNBDoc 44299/2012 foi aprovado pelo comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), da Universidade de Brasília. Foram respeitados todos os princípios elaborados pela Declaração dos Direitos dos Animais proposto por Russel WMS e Burch RL (Russel et al., 1959). O experimento norteou-se de acordo com todos os cuidados necessários para evitar o sofrimento de cada animal (Zimmermann et al., 1983).

Foram utilizados 15 ratos Wistar (espécie *rattus norvegicus albinus*), fêmeas, com 2 meses de idade, média de 300 gramas de peso. Os animais foram alojados em grupos de cinco por caixa, mantidos em condições padronizadas com água e ração *ad libitum*, temperatura ambiente e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas, obedecendo aos critérios de acordo com as normas estabelecidas pelo CEUA. Os experimentos e avaliações foram realizados no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina. Dois diferentes carreadores para Sinvastatina foram testados: o BoneCeramic® e a esponja de colágeno.

Preparo do BoneCeramic®

Trata-se de um substituto ósseo 100% sintético com capacidade para estimular formação de osso já bem estabelecido. Sua excelente propriedade humectante e característica estrutural facilitam a sua manipulação e aplicação, se adequando à forma e tamanho do defeito ósseo. Este biomaterial funciona como uma estrutura de suporte para adesão ao osso do sítio, e sua boa estabilidade estrutural é mantida graças à lenta reabsorção da hidróxiapatita, que mantém o volume próximo ao volume de material enxertado por um maior período, permitindo a aposição de tecido ósseo e substituição por quase toda sua extensão. Oferece ainda um índice de porosidade de 90%, possibilitando um ótimo espaço para angiogênese, migração celular e adesão óssea.

Esonja de colágeno Porosa - CollaTape®

Material que serve como agente hemostático de colágeno de origem bovina, absorvível, que promove agregação plaquetária. Comercialmente é representada pelos nomes CollaTape®, Colla Cote® e CollaPLug®. Relatado benefícios como otimização da cicatrização do tecido palatino após cirurgias periodontais, hemostasia das áreas doadoras de tecido gengival³¹. Isto é consequência de sua composição, que cataliza o reparo por participar diretamente do processo de formação do tecido conjuntivo e promover uma função de proteção ao sítio cirúrgico (Stein et al., 2005).

Preparação da Solução de Sinvastatina

A solução de Sinvastatina foi preparada e aplicada nos defeitos ósseos. A concentração ideal para o carreador cerâmico em questão foi de 0,1mg. (Stavropoulos et al., 2015). Uma solução contendo 0,1mg de sinvastatina diluída em 15µl de etanol (Farmogral, Brasília-DF, Brasil) foi aplicada em cada defeito criado nas calvárias, de forma descrita a seguir. Dois carreadores diferentes foram utilizados para sinvastatina: Straumann BoneCeramic® (400-700µm - Institut Straumann AG, Basel, Switzerland) e a esponja de colágeno CollaTape® (Zimmer Dental, Carlsbad, CA, USA).

Para a definição das medidas foi realizado um teste piloto utilizando um bloco de silicón de condensação, onde se criou um defeito com uma trefina de 5mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, PR, Brasil) igual a que se utilizou para se criar os defeitos ósseos. A quantidade de BoneCeramic® suficiente para preencher completamente o espaço foi pesado em uma balança de semi-precisão. Com uma micropipeta de 20µl, foi testada a quantidade exata de água sobre a membrana de CollaTape® cortado idealmente e posicionado no defeito, e foi averiguado que eram necessários 15µl de solução para preencher o defeito. Desta forma, foi solicitada a manipulação em farmácia específica (Farmogral®, Brasília, DF, Brasil) de uma solução de sinvastatina contendo 0,1mg em cada 15µl de etanol (Nyan et al., 2009). Os defeitos ósseos tratados com BoneCeramic® e sinvastatina receberam 14mg do carreador embebido com 15µl de solução de sinvastatina. Os defeitos ósseos tratados com CollaTape® e sinvastatina receberam uma esponja de colágeno do diâmetro e altura exatos do defeito ósseo, embebida com 15µl de solução de sinvastatina.

Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram anestesiados com injeção intramuscular contendo ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg). Uma incisão linear em pele e perióstio foi feita no centro da calvária dos ratos, no sentido sagital, e após o devido descolamento e exposição da calota craniana, foram feitos dois defeitos ósseos com uma broca tipo trefina de 5mm de diâmetro, obtidos bilateralmente no osso parietal, sob constante irrigação com solução salina³⁴. A ferida, ao final do procedimento, foi suturada com fio de sutura mononylon 5.0 (Etichon®, Cincinnati, OH, USA). No período de 24 horas pós-cirúrgico, foi administrado ácido acetilsalicílico (Aspirina®) via oral 150mg/kg de 4 em 4 horas, pela técnica de gavagem, para controle da dor.

Um total de 30 defeitos foram criados em 15 animais, e divididos em 5 grupos, de acordo com o material de preenchimento escolhido:

Grupo 1 - Grupo Coágulo: Composto por cinco defeitos em cinco ratos, estes defeitos eram formados e suturados apenas com o coágulo sanguíneo, considerado grupo controle negativo. (Figura 1-A)

Grupo 2 - Grupo CollaTape®: Composto por cinco defeitos localizados do lado esquerdo da calvária de cinco ratos. Uma membrana de colágeno CollaTape® cortada e adaptada no formato do defeito, sem efeito para regeneração óssea. Tido como principal grupo controle por não conter nem osteocondutor nem sinvastatina. Os defeitos destes grupos localizavam-se adjacentes aos defeitos do grupo 3. (Figura 1-B)

Grupo 3 - Grupo ColaTape® mais Sinvastatina: Composto por cinco defeitos localizados no lado direito da calvária de cinco ratos. Uma membrana de colágeno ColaTape® cortada e ajustada ao defeito e embebida com 15µl de solução de sinvastatina. Tido como grupo controle positivo contendo apenas a sinvastatina, porém sem um carreador osteocondutor. (Figura 1-B)

Grupo 4 - Grupo BoneCeramic®: Composto por cinco defeitos, localizado no lado esquerdo da calvária de cinco ratos. Os quais eram preenchidos com 14mg de BoneCeramic® era considerado o controle positivo contendo o carreador osteocondutor, sem sinvastatina que é a partícula teste. (Figura 1-C)

Grupo 5 - Grupo BoneCeramic® mais Sinvastatina: Composto por cinco defeitos localizados no lado direito das calvárias de cinco ratos, sempre adjacentes aos defeitos do grupo 1. Eram preenchidos com 14mg de BoneCeramic® embebidos com 15µl de solução de sinvastatina, tido como grupo experimental principal. (Figura 1-D)

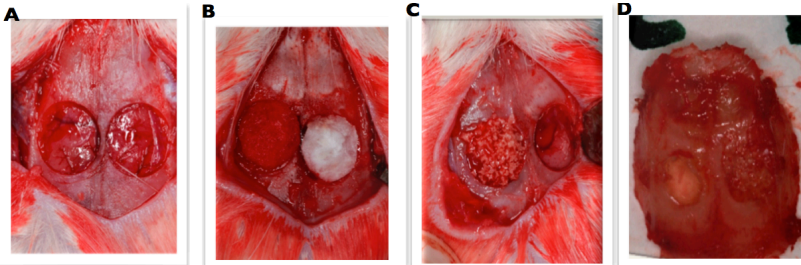


Figura 1 - Cirurgia para confecção dos defeitos e inserção dos materiais. (A) Defeitos bilaterais foram criados. (B) Preenchimento do defeito esquerdo com CollaTape® e simvastatina e do defeito direito com CollaTape®. (C) Preenchimento do defeito esquerdo com BoneCeramic® e simvastatina. (D) Calvária do rato retirado para confecção das amostras após 60 dias do procedimento cirúrgico.

Preparo Histológico

Após 60 dias do ato operatório, a eutanásia foi realizada por decaptação, seguida da secção do crânio, divulsão e retirada dos tecidos moles para preparo das peças, para descalcificação e preparo das lâminas (Figura 2).



Figura 2 - Exposição e retirada dos tecidos moles para preparo da amostra.

Os espécimes foram fixados em formol neutro a 10% durante 24 horas e lavadas em água corrente por mais 24 horas. Após a fixação, foram submetidas à descalcificação em uma solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20%, por 30 dias. Depois de descalcificados, os ossos parietais foram longitudinalmente divididos na metade, onde cada metade continha um defeito tratado. Foram incorporados separadamente em parafina de acordo com o protocolo padrão. Realizou-se cortes semisseriados com espessura de 5µm no sentido longitudinal das peças, com a ressalva de obtenção dos cortes mais centrais dos defeitos, objetivando espécimes com 5mm de diâmetro para avaliação. Todas as secções foram coloradas com hematoxilina e eosina para análise microscópica e histomorfométrica.

Análise histológica e histomorfométrica

Durante o preparo histológico, todas as lâminas foram codificadas isoladamente de forma que, durante as análises histomorfométrica e histológica descritiva, o examinador desconhecesse a qual grupo pertencia o corte histológico analisado. Posteriormente, foram submetidas às avaliações microscópicas de luz binocular (Zeiss, Jena, Alemanha) por dois examinadores calibrados, com ampliações de 20x e 200x. As secções mais centrais de cada defeito foram selecionadas para análise. Os valores de porcentagem obtidos dos cortes de cada calvária foram utilizados para fins estatísticos. Os valores dos percentuais de osso neoformado (ON), os percentuais de tecido conjuntivo (TC) e os percentuais do biomaterial (BC) foram observados e calculados.

A análise histomorfométrica foi realizada com o software ImageScope® (Leica Biosystems, São Paulo-SP, Brasil) e a área de osso neoformado foi calculada de acordo com um método previamente descrito (Mukozawa et al., 2011) : A área total a ser analisada corresponde à toda área do defeito cirúrgico original e delimitada, incluindo todo o tecido presente entre as duas extremidades do defeito ósseo cirúrgico. A área do novo tecido ósseo foi mensurada em milímetros quadrados e calculada como uma porcentagem da área total. O resultado dessas porcentagens foi submetido à análise estatística para verificação da diferença entre os grupos.

Após a delimitação da área total do defeito ósseo, foi delimitado o tecido ósseo neoformado e o espaço ocupado pelas partículas do biomaterial ainda presente, utilizando-se o software ImageScope. A manipulação do programa de imagem foi realizada por um examinador calibrado. Primeiramente, foi realizado o treinamento do examinador em conjunto com um professor doutor na área de patologia bucal. Após a análise do examinador, uma segunda análise foi realizada por dois outros examinadores.

Análise estatística

Os resultados foram reportados em termos de média desvio erro padrão. Os grupos foram comparados em relação aos valores da área de matriz óssea pelo uso de análise de variância (ANOVA), utilizando o método de Fisher *least significant difference* (LSD) para as comparações múltiplas post-hoc. O valor $p < 0,05$ foi estabelecido como o critério para a significância estatística. A análise estatística foi realizada usando-se SAS 9.3.

RESULTADOS

Análises Histológicas

A Figura 3 apresenta uma visão geral de todo o defeito após o período cicatricional de todos os grupos, sob uma ampliação baixa (20x). No grupo 1 (grupo coágulo), não há evidência de osso neoformado (Figura 3-A). O grupo 2, que foi tratado apenas com esponja de colágeno CollaTape®, também não teve evidência de osso neoformado, e apresentou uma camada de tecido fibroso aparentemente mais espesso que aquele observado no grupo 1 (Figura 3-B), entretanto, o grupo 3, que foi tratado com esponja de colágeno CollaTape® mais sinvastatina, apresentou a presença de uma camada de tecido fibroso ainda mais espessa que nos grupos 1 e 2, mas ainda assim sem presença de osso neoformado em volume significativo (Figura 3-C). No grupo 4, que foi tratado somente com BoneCeramic®, foi observado um tecido colorado de forma similar ao osso original das bordas dos defeitos, sugerindo osso neoformado calcificado (Figura 3-D). O tecido neoformado observado no grupo 5, que foi tratado com BoneCeramic® embebido em sinvastatina, foi muito mais evidente quando comparado a todos os outros grupos, incluindo o grupo 4 (Figura 3-E). No grupo 5, toda a extensão do defeito foi preenchida por um tecido com espessura similar do osso das bordas do defeito. Em ambos os grupos 4 e 5 espaços deixados pelas partículas de BoneCeramic® de lenta absorção foram deixados após a descalcificação (Figura 5 - asteriscos).

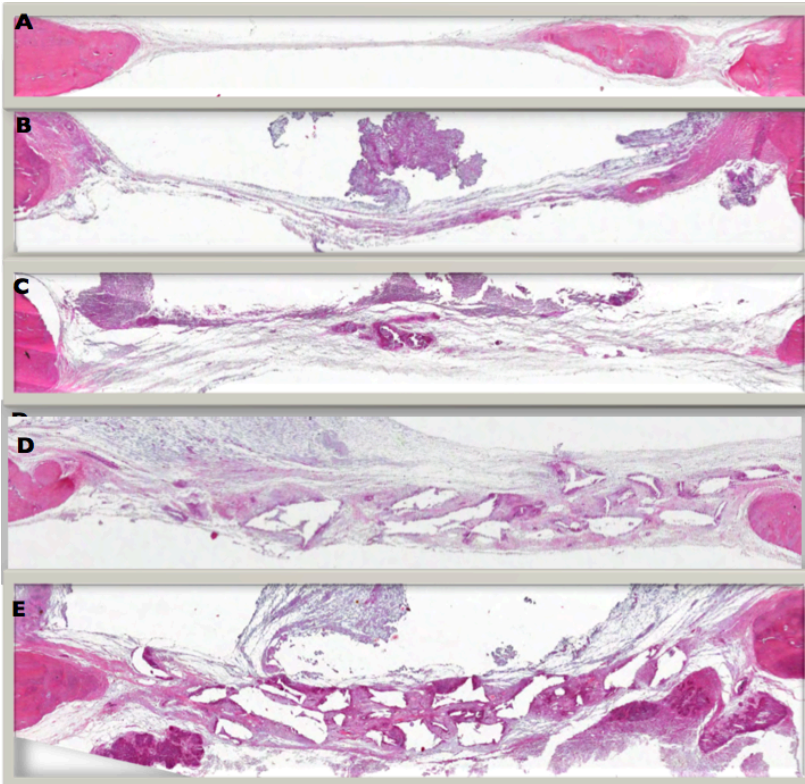


Figura 3 - Imagens obtidas com o escaner Aperio ePathology, para análise digitalizada com o software ScanScope. Notar espessura do material de preenchimento. (A) Defeito sem preenchimento. (B) Defeito preenchido com CollaTape®. (C) Defeito preenchido com CollaTape® combinado com sinvastatina. (D) Defeito preenchido com BoneCeramic®. (E) Defeito preenchido com BoneCeramic® combinado com sinvastatina.

No grupo 4, observamos uma série de células cuboidais localizadas ao redor da superfície das partículas de BoneCeramic® (espaços deixados pelas partículas após a desmineralização), (Figura 5 - asteriscos), com características morfológicas de osteoblastos (Figura 5 - A - setas). Essas células estavam cercadas por uma matriz óssea, e em algumas áreas havia a presença de várias camadas de células osteoblásticas. A localização das células na superfície das partículas de BoneCeramic®, a matriz óssea cercando essas células e suas características morfológicas indicam que essas células são osteoblastos em atividade de produção de matriz óssea. Entre as ilhas de partículas de BoneCeramic® junto à matriz óssea e camadas de células descritas, também era observado um tecido conectivo rico em fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 5 - A - círculo azul). No grupo 5, um tecido novo similar a osso foi observado nas proximidades das partículas de BoneCeramic® (espaços deixados pelas partículas após a desmineralização). Isso também foi encontrado no grupo 4, entretanto, no grupo 5, a coloração deste tecido era mais intensa e a quantidade de tecido ósseo era visualmente maior que no grupo 4 (Figura 5 - B - setas). Quando comparado ao grupo 4, um maior número de células cuboidais alinhadas às superfícies de partículas de BoneCeramic® era observada no grupo 5, e em várias regiões também era observada a presença de diversas camadas de osteoblastos (Figura 5 - B - setas). Camadas mais espessas de matriz óssea ao redor das células osteoblásticas, sugerindo maior atividade de síntese de matriz. Um tecido conectivo entre as ilhas de matriz óssea neoformada, similar ao grupo 4, foi encontrada, com presença de vários fibroblastos e vasos sanguíneos (Figura 5 - B - círculo azul).

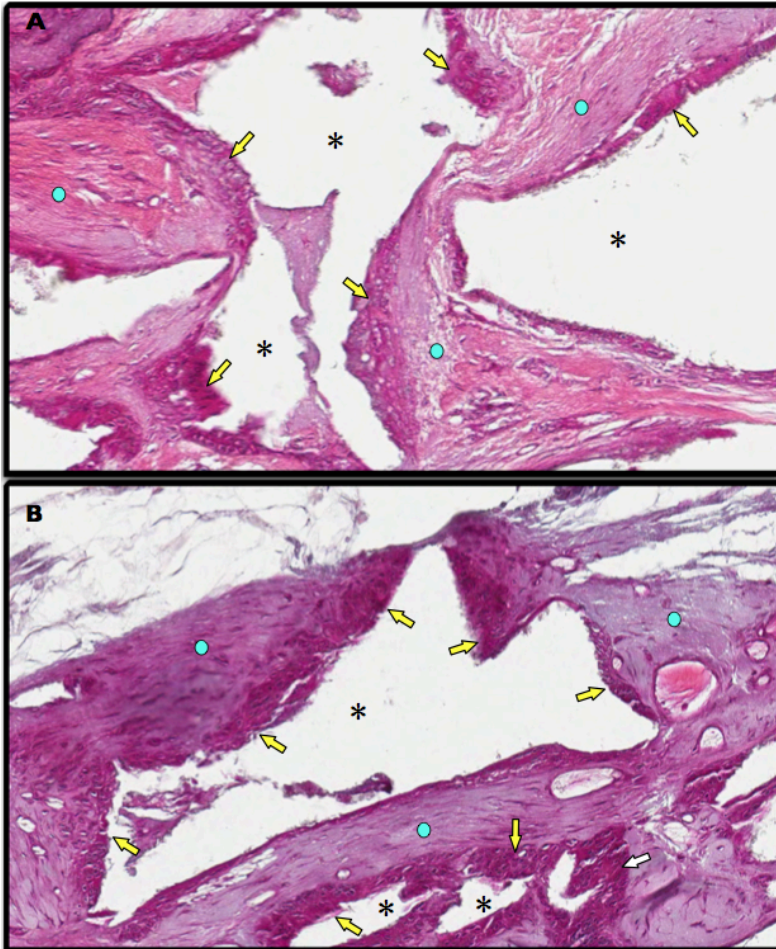


Figura 5 - Aumento em 200x de cortes histológicos, onde há lacunas do BoneCeramic® (asteriscos), desmineralizado com o processamento histológico. (A) Lâmina de BoneCeramic® sem sinvastatina, demonstrando neoformação de tecido ósseo ao redor das partículas do BoneCeramic® (setas) e tecido conjuntivo (bolas). (B) Lâmina de BoneCeramic® com sinvastatina, demonstrando neoformação óssea em maior quantidade ao redor das partículas do BoneCeramic® (setas) e tecido conjuntivo (bolas), que apresenta um aspecto diferente do tecido conjuntivo da figura A.

Análises Histomorfométricas

A área de tecido ósseo neoformado (AON) foi maior no grupo 5 (BCS), quando comparado com todos os outros grupos. Os valores de AON foi maior no grupo 5 (BCS), grupo 4 (BC) e grupo 3 (CTS), quando comparado com o grupo 1 (grupo controle). O valor de AON do grupo 5 (BCS) foi significativamente maior que o encontrado no grupo 4 (BC), porém o valor de AON do grupo 3 (CTS) não foi significativamente maior que o grupo 1 (grupo controle), assim como o valor de AON do grupo 2 (CT) não foi significativamente maior que o grupo 1 (grupo controle). Consequentemente, o valor de AON do grupo 3 (CTS) não foi significativamente maior que do grupo 2 (CT) (Figura 6, Tabela 1).

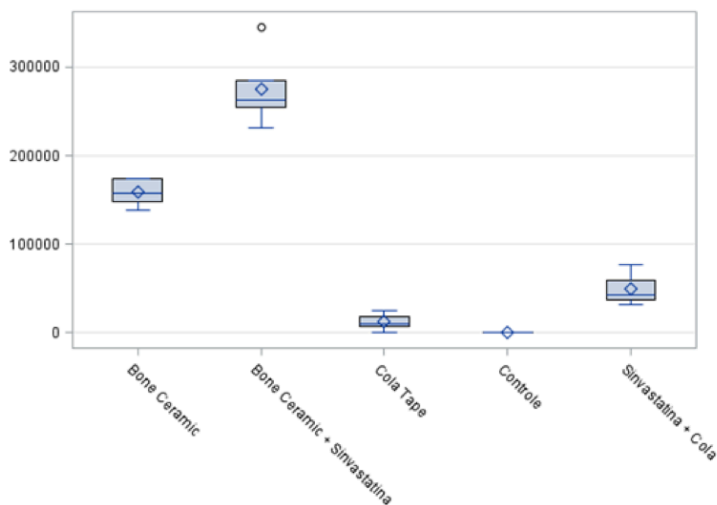


Figura 6 -Gráfico comparando a quantidade de matriz óssea formada entre os grupos em μm quadrados. Estão representados nas colunas, da esquerda para a direita, os grupos 4 (Bone Ceramic[®]), 5 (BoneCeramic[®] com sinvastatina), 2 (CollaTape[®]), 1 (controle) e 3 (CollaTape[®]).

Tabela 1 - Valores médios de área de matriz mineralizada e o desvio-padrão (\pm) do seu respectivo grupo

	Controle (1)	CollaTape® (2)	Collatape® + Sinvastatina (3)	BoneCeramic® (4)	BoneCeramic® + Sinvastatina (5)
Parâmetro	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)
Matriz Mineralizada	0,00 \pm 0,00	12150,56 \pm 9709,67	49838,40 \pm 18327,80	158602,76 \pm 15716,37	275840,50 \pm 43141,86

Análise estatística foi realizada por ANOVA, comparação post-hoc usando o método de Fisher least significant difference (LSD).

DISCUSSÃO

Os estudos que descreveram a aplicação da sinvastatina para a formação de osso em diferentes defeitos ósseos tem sido encorajantes (Ayukawa et al., 2009; Rojbani et al., 2011; Rosselli et al., 2014), e seu efeito sobre o metabolismo ósseo deve ter um grande potencial para a medicina e odontologia.

Ayukawa et al., 2009, identificaram o aumento da expressão de fosfatase alcalina (marcador da diferenciação de osteoblastos maduros) e mRNA de proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2 - é uma proteína que estimula a proliferação de osteoblastos, maturação e formação de nova matriz óssea), enquanto a expressão de RANKL estava suprimida. Indicando uma indução de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos a partir do BMP-2 e fosfatase alcalina aumentados, e uma supressão dos osteoclastos a partir da diminuição do RANKL.

Neste estudo, a sinvastatina foi aplicada junto a dois tipos diferentes de carreadores em defeitos preparados na calvária de ratos e o seu impacto na neoformação óssea foi avaliado. Assim como diversos estudos já reportados, os resultados demonstraram que o uso desta droga, de fato, resulta numa maior neoformação óssea quando aplicado no defeito ósseo

criado nos ossos parietais dos animais utilizados (Figura 6). Os resultados sugerem que a sinvastatina tem um potencial osteoindutor, sendo promissor em procedimentos de reconstrução óssea.

Mundy et al. 1999 foram os primeiros a reportarem que a sinvastatina tem efeito sobre o metabolismo ósseo para a formação de osso. Cerca de 30.000 compostos naturais foram testados em cultura de células ósseas com o objetivo de avaliar aquelas que pudessem aumentar a produção de BMP-2. Observaram que a Lovastatina, a Fluvastatina, a Mevastatina e a Sinvastatina aumentaram a expressão de mRNA da BMP-2 resultando numa produção de BMP-2 duas vezes maior, principalmente a sinvastatina. Devido a BMP-2 ter a capacidade de iniciar todos os mecanismos moleculares requeridos para indução da formação óssea, incluindo a ordem de migração (quimiotaxia), proliferação e diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos funcionais, é extremamente importante ter o conhecimento que a sinvastatina pode estimular sua produção (Pauly et al., 2009).

As estatinas ainda possuem uma capacidade de aumentar a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Verificando em 2009, um estudo *in vitro* descreveu a capacidade das estatinas hidrofóbicas como atorvastatina, cerivastatina e sinvastatina de aumentar consideravelmente a expressão de VEGF mRNA em células osteoblásticas, estimulando assim a angiogênese no local, processo desejado para cicatrização de defeitos ósseos (Maeda et al., 2009).

Mais recentemente, outros estudos feitos *in vitro* e *in vivo* também demonstraram os efeitos positivos da sinvastatina sobre o tecido ósseo, especialmente quando aplicado localmente (Seto et al., 2008; Mukozawa et al., 2011). De acordo com esses estudos, a sinvastatina pode ser aplicada localmente em concentrações ideais para formação óssea sem maiores efeitos colaterais. Portanto, no presente estudo, o efeito osteoindutor da

sinvastatina também foi avaliado quando aplicada localmente com um carreador osteocondutor, à base de cerâmica (BoneCeramic®).

Diversos estudos focaram em determinar a concentração ideal para seu melhor potencial osteoindutor. Stein et al., em 2005 demonstraram que 0,1mg de sinvastatina em gel de metilcelulose em uma membrana de ácido polilático resultou em mínima inflamação local, mas não estimulou formação óssea (Stein et al., 2005). Por outro lado, outros estudos demonstraram que a dose ideal de 0,1mg de sinvastatina induziram em máxima regeneração óssea com o mínimo de inflamação, principalmente quando associados a um biomaterial osteocondutor de natureza cerâmica por possuir a capacidade de liberar a droga gradualmente por um longo período de tempo, além de potencial quimiotaxia, promove espaços dentre os quais a células osteoprogenitoras são recrutadas e migram (Nyan et al., 2009; Nyan et al., 2010) Os componetes desta combinação de sinvastatina e um material osteocondutor cerâmico são biodegradáveis sem gerar resposta imune ou inflamatória, e sem produção de produtos tóxicos, assim permite uma baixa resposta inflamatória que não inibe o processo de reparo (Nyan et al., 2010; Rojbani et al., 2011). Desta forma, a concentração de 0,1mg de sinvastatina pode ser considerada como a concentração ideal para seu potencial osteoindutor, aplicada localmente, quando associada com um carreador cerâmico. Portanto, em nosso estudo, definimos essa concentração de sinvastatina e observamos (Figura 6) maior indução de formação óssea quando comparados aos demais grupos. Outros estudos reportaram que concentrações maiores de sinvastatina (ex. 2,2mg) acarretaram em níveis inflamatórios maiores dos tecidos moles adjacentes ao defeito, sem que houvesse maior ganho de formação de tecido ósseo, enquanto que doses bem menores de sinvastatina (0,01mg) não possuem capacidade osteoindutora alguma (Nyan et al., 2009). Foi verificado também, clinicamente,

a presença de resposta inflamatória leve nos tecidos adjacentes ao sítio cirúrgico, nos grupos tratados com sinvastatina (grupos 3 e 5), que desapareceu aproximadamente 10 dias após o trauma cirúrgico. Este resultado é coerente ao resultado de outros estudos, que reportaram resposta inflamatória similar, sanada após 10 dias de recuperação (Nyan et al., 2009; Rojbani et al., 2011). Portanto, a inflamação observada neste estudo foi considerada de pouca importância, pois ela não afetou de forma negativa a neoformação óssea, ao contrário, os defeitos tratados com sinvastatina na concentração de 0,1mg exibiram maior formação de tecido ósseo.

É bem estabelecida e conhecida as boas propriedades osteocondutoras do material BoneCeramic®, desta forma, ele já é amplamente utilizado como material de enxerto para substituto ósseo, inclusive no meio clínico (Jensen et al., 2007; Cordaro et al., 2008). Já a esponja de colágeno CollaTape® não é o material ideal para se utilizar como substituto ósseo por ele não possuir propriedades osteocondutoras nem mesmo osteoindutoras ou osteogênicas. Ela é rapidamente reabsorvida, cerca de 7 dias, e não é capaz de manter o espaço necessário para formação de novo osso, de forma a permitir a invasão de tecido mole em defeitos críticos (al-Khateeb et al., 1996). Isto ficou evidente no presente estudo, uma vez que o grupo 2 foi incapaz de induzir ou conduzir neoformação óssea ou até mesmo de induzir tecido com espessura similar ao das bordas do defeito. Apesar disso, o CollaTape® foi utilizado como carreador para sinvastatina, para verificar se a presença da droga conseguiria superar as deficiências da esponja de colágeno, e até mesmo para servir como um carreador inerte para verificar a capacidade osteoindutora isolada que a sinvastatina poderia possuir. De acordo com nossos resultados, um material com capacidade de lenta absorção e manutenção do espaço por maior tempo é ideal para ser utilizado como carreador da sinvastatina, propriedades nos quais a CollaTape® deixou a desejar. Desta forma, como o

BoneCeramic® possui essas propriedades, ele se provou ser o carreador ideal para sinvastatina, além de que sua propriedade osteocondutora, que, somada com a propriedade osteoindutora da sinvastatina, obtém melhor resultado para neoformação óssea.

Um estudo encontrou uma formação óssea significativa num período de oito semanas de regeneração, quando uma esponja de colágeno embebida com 2,5mg de sinvastatina foi colocada em um defeito ósseo de 5mm no osso nasal de coelhos (Mukozawa et al., 2011). Este resultado sugere que a esponja de colágeno pode ser um bom carreador para a sinvastatina, permitindo-a agir no local, enquanto a própria esponja de colágeno não for reabsorvida. Porém, no nosso estudo a esponja de colágeno usada resultou numa formação óssea mínima, diferentemente do resultado de Mukozawa et al. Esta diferença pode ser atribuída a diversas diferenças metodológicas entre os estudos, uma vez que Mukozawa tratou os defeitos com sinvastatina numa concentração de 2,5mg dissolvida em água (diferentemente ao utilizado pelo presente estudo que foi 0,1mg dissolvida em etanol). Além disso, as esponjas de colágeno utilizadas nos diferentes estudos possuíam composições diferentes. Enquanto a CollaTape® é composta de colágeno tipo 1, obtida do tecido de tendão bovino, a esponja de colágeno utilizada por estes autores. era composta 85% a 95% de colágeno tipo 1 e 5% a 15% de colágeno tipo 3. Apesar de que os resultados deles demonstraram que essa esponja de colágeno utilizada sozinha já teria a capacidade de induzir alguma formação óssea, o que não é o caso da CollaTape® como encontrado em nosso estudo (Ahn et al., 2011). Desta forma, todas as diferenças mencionadas entre os dois estudos devem explicar o conflito de resultados encontrados.

Sinvastatina é uma droga hidrofóbica, e por isso, assim como em outro estudo (Rojbani et al., 2011), utilizamos o etanol como solvente. Por isso dissolver a sinvastatina em etanol facilita sua

aplicação em sítios pequenos, quando comparado com a metilcelulose contendo sinvastatina (Morris et al., 2008). Entretanto, Tanigo et al., 2010, discutiram que a incorporação da sinvastatina em uma gelatina biodegradável de hidrogel favorece sua liberação com menor ou nenhuma inflamação. De fato, a solução de sinvastatina dissolvida em etanol, utilizada neste estudo, facilitou a sua combinação com as partículas de BoneCeramic[®], que era, desta forma, melhor embebida com a solução. As propriedades osteocondutoras do BoneCeramic[®] foram demonstradas pelos resultados encontrados tanto nos grupos 4 e 5, onde os defeitos exibiram melhor neoformação óssea e o defeito foi preenchido totalmente por um tecido novo com espessura similar às das bordas do defeito, o que não foi encontrado nos defeitos que não foram tratados com BoneCeramic[®]. A combinação de BoneCeramic[®] com sinvastatina potencializou a capacidade de formação de tecido ósseo do BoneCeramic[®], possivelmente pelo carreador possuir componentes que permitem a liberação da sinvastatina de forma gradual, e espaços que permitem a quimiotaxia de células mesenquimais a partir de angiogênese local, combinado com as propriedades da sinvastatina de aumento da expressão de BMP-2, fosfatase alcalina e VEGF e supressão de RANKL. Por isso, admitimos a hipótese de que a adição de 0,1mg de sinvastatina ao BoneCeramic[®] resultou em um material de enxerto ósseo com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Assim, essa combinação pode ser útil como uma alternativa de material de enxerto para o osso autógeno, quando o uso deste é inviável, e ainda tem um grande potencial de aplicação em vários tipos de defeitos ósseos no cenário clínico. Mais estudos são necessários para testar essa combinação em outros tipos de defeitos ósseos até ser utilizado no meio clínico em seres humanos. Mais estudos devem ser feitos para avaliar a qualidade desse novo osso formado, com marcadores específicos de maturação do tecido ósseo em formação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

BoneCeramic[®] é um carreador adequado para a sinvastatina, e esta combinação induziu à maiores quantidades de neoformação óssea estatisticamente significante, quando comparado com BoneCeramic[®] isolado ou com carreador à base de esponja colágeno, potencialmente promissor em futuras indicações clínicas no tratamento de defeitos ósseos em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Covani U, Bortolaia C, Barone A, Sbordone L. Bucco-lingual crestal bone changes after immediate and delayed implant placement. *J Periodontol.* 2004 Dec;75(12):1605-12. PMID: 15732861.
2. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol.* 2005 Feb;32(2):212-8. PMID: 15691354.
3. Garret, S. Periodontol Regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996;1:626-630.
4. Bartold, P. M. et al. Tissue Engineering: A new paradigm of periodontal regeneration based on molecular and biology cell. *Periodontol.* 2000. 2000;24:253- 269.
5. Van Steenberghe, D. et al. The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin. Oral Impl Res.*, v. 11, n. 3, p. 210-216, 2000.
6. Urist, M. R. et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81(2):371-5.
7. Urist, M. R. Bone. Formation by autoinduction. *Science* 150:893, 1965.

8. MASTERS, D. H. Implants. Bone and bone substitutes. *CDA J.* 1988;16(1):56-65.
9. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005 Jan-Feb;13(1):77-86. PMID: 15712985.
10. Miron RJ, Gruber R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D. Impact of bone harvesting techniques on cell viability and the release of growth factors of autografts. *Clin Implant Dent Relat. Res* 2013 Aug;15(4):481-9. PMID: 22375920.
11. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Mar;20(3):280-7. PMID: 19397639.
12. Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, Kasugai S. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Apr;93(1):65-73. PMID: 20024970.
13. Boyne P. J, JAMES R. A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J. Oral Surg.* 1980;38(8):613-616.
14. Artzi Z. et al. The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32(2):193-199.
15. Jensen, S.S. et al. Bone Healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in mandibles of minipigs. *Clin. Oral Impl. Res.* 17, 2006; 237-243.
16. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G I. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science.* 1999 Dec;286(5446):1946-9. PMID: 10583956.
17. Pauly S, Back D, Kaeppler K, Haas N, Schmidmaier G, Wildemann B. Influence of statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012, 13:208

18. Maeda T. et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 280:874-877.
19. Baek, K, H et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 438-44.
20. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Mar;107(3):336-42. PMID: 18801677.
21. Zhang Y, Zhang R, Li Y, He G, Zhang D, Zhang F. Simvastatin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol Biol Rep.* 2012 Jan;39(1):285-93. PMID: 21553056.
22. Stein, D et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol.* 2005 November ; 76(11): 1861–1870.
23. Lee, Y. et al. *Biomaterials.* 2008 April; 29(12): 1940–1949. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.045.
24. Sousa DN, Santana WM, Ferreira VM, Duarte WR. Behavioural and cognitive effects of simvastatin dose used in stimulation of bone regeneration in rats. *Acta Cir. Bras.* 2014 Mar;29(3):151-7. PMID: 24626726.
25. Saito A, Suzuki Y, Kitamura M, Ogata S, Yoshihara Y, Masuda S, Ohtsuki C, Tanihara M. Repair of 20-mm long rabbit radial bone defects using BMP-derived peptide combined with an α -tricalcium phosphate scaffold. *J Biomed Mater Res A.* 2006 Jun;77(4):700-6. PMID: 16550532.
26. Verron E, Khairoun I, Guicheux J, Bouler JM. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discov Today.* 2010 Jul;15(13-14):547-52. PMID: 20546919.
27. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: A histological and histomorphometric study in the

- mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Dec;18(6): 752- 60. PMID: 17888014.
28. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Belssmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2012 Dec;40(8):706-18. PMID: 22297272.
 29. Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000.* 2015 Jun;68(1):55-65. PMID: 25867979.
 30. Russel WMS, Burch RL. *The principles of humane Experimental Technique.* London: Methuer; 1959
 31. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious Animals (Pain. 1983;16: 109-10)
 32. al-Khateeb TL, Marouf HA, Anwar MM. Modified bovine type I collagen membrane as a wound graft material in oral surgery (an experimental study). *J Ir Dent Assoc.*1996;42(3):46-50. PMID: 9242117.
 33. Stein, D et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol.* 2005 November ; 76(11): 1861–1870.
 34. Stavropoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. Pre-clinical in vivo models for the screening of bone biomaterials for oral/craniofacial indications: focus on small-animal models. *Periodontol 2000.* 2015 Jun;68(1):55-65. PMID: 25867979.
 35. Mukozawa A, Ueki K, Marukawa K, Okabe K, Moroi A, Nakagawa K. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Nov;22(11): 1327-35. doi: 10.1111/j.1600- 0501.2010.02135.x. Epub 2011 Jul 6. PMID: 21732983
 36. Melo LGN, Nagata MJH, Bosco AF, Ribeiro LLG, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin Oral Implants Res.* 2005 Dec;16(6):683–91. PMID: 16307575.

37. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Mar;107(3):336-42. PMID: 18801677.
38. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A.* 2011 Sep;98(4):488-98. PMID: 21681941.
39. Rosselli JE, Martins DM, Martins JL, Oliveira CR, Fagundes DJ, Taha MO. The effect of simvastatin on the regeneration of surgical cavities in the femurs of rabbits. *Acta Cir. Bras.* 2014 Feb;29(2):87-92. PMID: 24604311.
40. Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.* 2008 Jun;43(3):261-7. PMID: 18447852.
41. Mukozawa A, Ueki K, Marukawa K, Okabe K, Moroi A, Nakagawa K. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Nov;22(11):1327-35. PMID: 21732983.
42. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: A histological and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2007 Dec;18(6):752-60. PMID: 17888014.
43. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Sereno G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann BoneCeramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):796-03. PMID: 18705811.
44. Ahn JJ, Cho SA, Byrne G, Kim JH, Shin HI. New bone formation following sinus membrane elevation without bone grafting: histologic findings in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011 Jan-Feb;26(1):83-90. PMID: 21365042.

45. Morris MS, Lee Y, Lavin MT, Giannini PJ, Schmid MJ, Marx DB, Reinhardt RA. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8):1465-73. PMID: 18672997.
46. Tanigo T, Takaoka R, Tabata Y. Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J Control Release*. 2010 Apr;143(2):201-6. PMID: 20060429.

APÊNDICE

Figuras e Tabelas

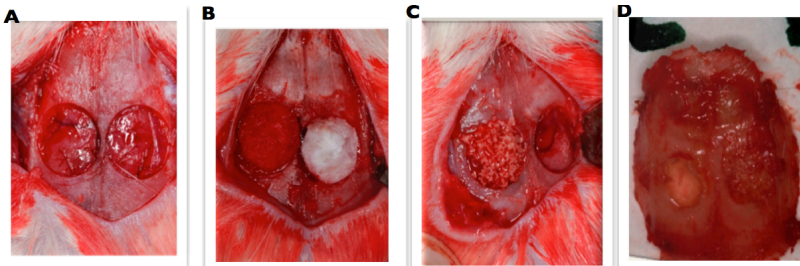


Figura 1 - Cirurgia para confecção dos defeitos e inserção dos materiais. (A) Defeitos bilaterais foram criados. (B) Preenchimento do defeito esquerdo com CollaTape® e sinvastatina e do defeito direito com CollaTape®. (C) Preenchimento do defeito esquerdo com BoneCeramic® e sinvastatina. (D) Calvária do rato retirado para confecção das amostras após 60 dias da primeira cirurgia.



Figura 2 - Exposição e retirada dos tecidos moles para preparo da amostra.

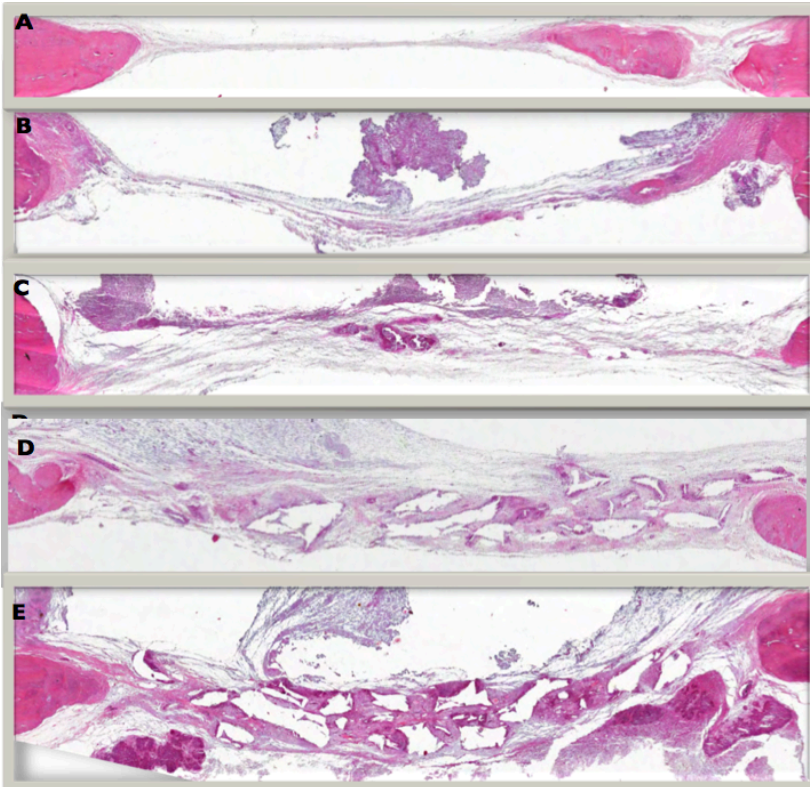


Figura 3 - Imagens obtidas com o escaner Aperio ePathology, para análise digitalizada com o software ScanScope. Notar espessura do material de preenchimento. (A) Defeito sem preenchimento. (B) Defeito preenchido com CollaTape®. (C) Defeito preenchido com CollaTape combinado com sinvastatina. (D) Defeito preenchido com BoneCeramic®. (E) Defeito preenchido com BoneCeramic combinado com sinvastatina.

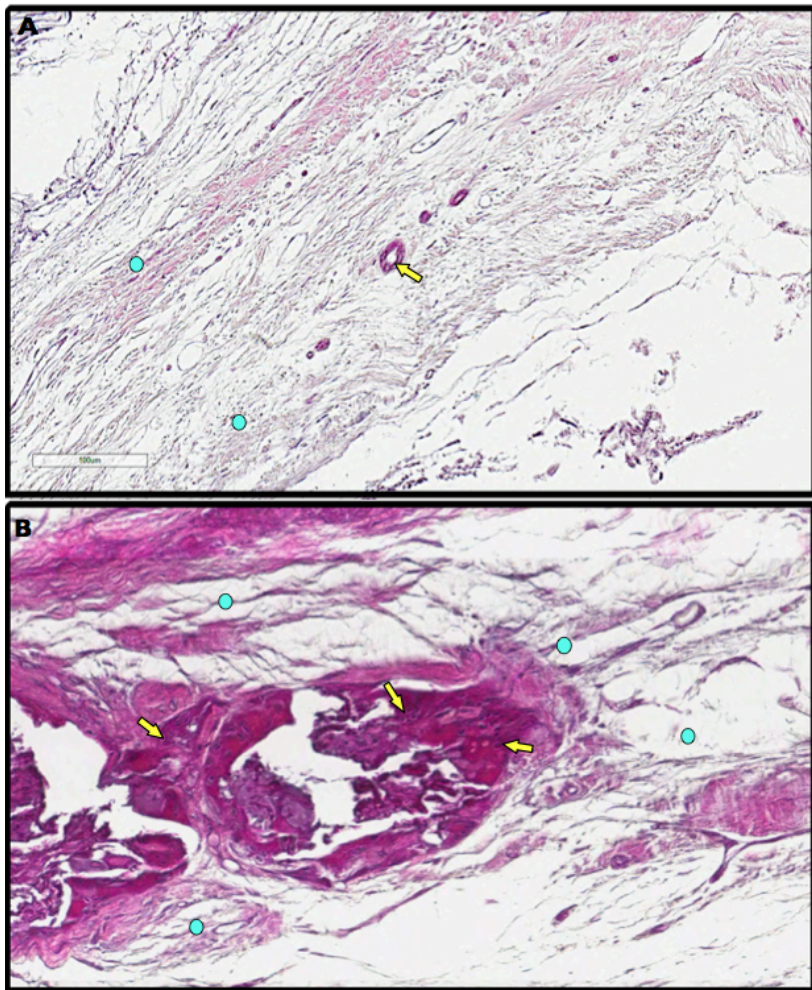


Figura 4 - Aumento em 200x. (A) Corte histológico do CollaTape® sem sinvastatina, demonstrando um tecido conjuntivo fibroso (bolas), sem evidências de formação óssea. (B) Corte histológico do CollaTape® com sinvastatina, demonstrando ilhotas de neoformação óssea (setas) no meio de tecido conjuntivo fibroso (bolas).

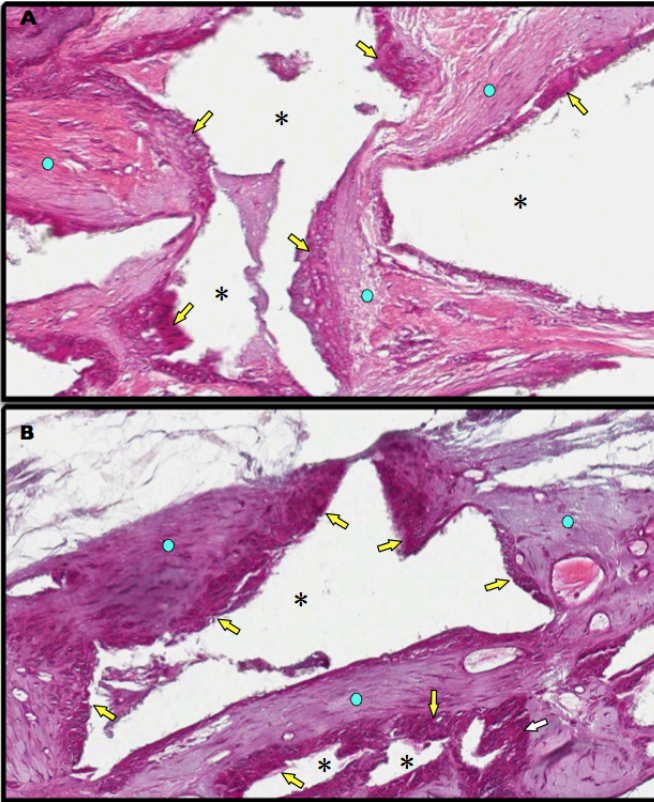


Figura 5 - Aumento em 200x de cortes histológicos, onde há lacunas do BoneCeramic® (asteriscos), desmineralizado com o processamento histológico. (A) Lâmina de BoneCeramic® sem sinvastatina, demonstrando neoformação de tecido ósseo ao redor das partículas do BoneCeramic® (setas) e tecido conjuntivo (bolas). (B) Lâmina de BoneCeramic® com sinvastatina, demonstrando neoformação óssea em maior quantidade ao redor das partículas do BoneCeramic® (setas) e tecido conjuntivo (bolas), que apresenta um aspecto diferente do tecido conjuntivo da figura A.

	Controle (1)	CollaTape® (2)	Collatape® + Sinvastatina (3)	BoneCeramic® (4)	BoneCeramic® + Sinvastatina (5)
Parâmetro	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)
Matriz Mineralizada	0,00 ± 0,00	12150,56 ± 9709,67	49838,40 ± 18327,80	158602,76 ± 15716,37	275840,50 ± 43141,86

Tabela 1 - Valores médios de área de matriz mineralizada ± o desvio padrão do seu respectivo grupo. Análise estatística foi realizada por ANOVA com comparação post-hoc usando o método de Fisher least significant difference (LSD).

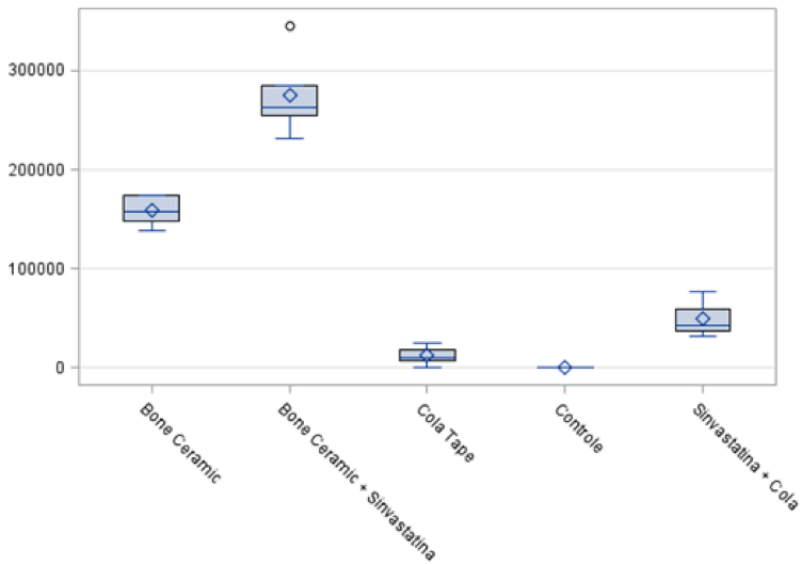


Figura 6 -Gráfico comparando a quantidade de matriz óssea formada entre os grupos em μm^2 . Estão representados nas colunas, da esquerda para a direita, os grupos 4 (Bone Ceramic[®]), 5 (BoneCeramic[®] com simvastatina), 2 (CollaTape[®]), 1 (controle) e 3 (CollaTape[®])

Anexos

NORMAS DA REVISTA

Normas gerais

Os artigos para a publicação na REVISTA PERIODONTIA da SOBRAPE deverão ser

inéditos e redigidos em português, inglês ou espanhol. Artigos originais de pesquisa terão prioridade para apreciação, mas, artigos de revisão e relatos de casos ou técnicas, de interesse na Periodontia, também poderão ser incluídos. A REVISTA PERIODONTIA reserva todos os direitos autorais do trabalho publicado. As informações contidas nos originais e publicadas na revista são de inteira responsabilidade do(s) autor(es), não refletindo necessariamente, a opinião do Corpo Editorial da revista ou a posição da SOBRAPE.

Envio do Material

Os arquivos abaixo indicados deverão ser submetidos para a Revista Periodontia pelo site www.sobrape.org.br.

- Artigo (Seguir o item “Apresentação do material”)- Declaração de conflito de interesses (Disponível no site – Formulários) - Lista de conferência pré-submissão (Disponível no site – Formulários)

Apresentação do material

Os artigos deverão ser digitados em Word para Windows, com fonte Arial, tamanho 12, justificado, em folhas de papel A4

numeradas consecutivamente. Deve ser usado espaço duplo com margem de 2,5 centímetros de todos os lados. As laudas deverão ter em média 1.600 toques (26 linhas de toques), perfazendo no máximo 20 páginas (excluindo gráficos, figuras e tabelas).

Seleção de artigos

A seleção dos artigos enviados à REVISTA PERIODONTIA será realizada pelo Conselho Editorial, que dispõe de autoridade para decidir sobre sua aceitação. No processo de revisão e aprovação, que será realizado em pares, serão avaliados: originalidade, relevância, metodologia e adequação às normas de publicação.

Considerações Éticas

Estudos que envolvam seres humanos deverão estar de acordo com a RESOLUÇÃO 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e terem sido aprovados pela Comissão de Ética da Unidade / Instituição em que foram realizados. As mesmas considerações são feitas para estudos em animais. O número de aprovação do comitê deverá estar presente no artigo.

Estudos clínicos

A Revista Periodontia estimula que os pesquisadores responsáveis por estudos clínicos façam os registros dos mesmos (www.clinicaltrials.gov).

Relatos de estudos clínicos randomizados devem contemplar os critérios disponíveis em:

<http://www.consort-statement.org/>

Estrutura do artigo

O trabalho deverá ser numerado (canto inferior direito) e dividido conforme os itens abaixo:

Primeira página (página 1):

- Página de título (Português e Inglês – para artigos redigidos em português; Espanhol e Inglês – para artigos redigidos em espanhol; Inglês – para artigos redigidos em inglês): deverá conter o título do artigo em negrito, o nome dos autores numerados de acordo com a filiação (instituição de origem, cidade, país), a principal titulação dos autores de forma resumida (sem nota de rodapé) e endereço do autor correspondente (contendo o endereço eletrônico – e-mail). As demais páginas devem ser na forma de texto contínuo.

Exemplo: Associação do PDGF e IGF na Regeneração Periodontal – Revisão de Literatura Fernando Hayashi¹, Fernando Peixoto¹, Chistiane Watanabe Yorioka¹, Francisco Emílio Pustiglioni² mestrando em Periodontia da FOUSP professor titular de Periodontia da FOUSP

Segunda página (página 2):

- Resumo: deve fornecer uma visão concisa e objetiva do trabalho, incluindo objetivos, material e métodos, resultados e as conclusões. Deve conter no máximo 250 palavras (incluindo pontos, vírgulas etc).- Palavras-chave: são palavras ou expressões que identificam o conteúdo do texto. Para sua escolha, deverá ser consultada a lista “Descritores em Ciências de Saúde – DECS”, da BIREME. Número de palavras-chave: máximo 6.

OBS: Para artigos redigidos em língua estrangeira, Espanhol ou Inglês, o item Resumo não configura item obrigatório.

Terceira página (página 3):

- Abstract e Keywords: cópia precisa e adequada do resumo e palavras-chave em Inglês. Deverá ser consultada a lista “Medical subject headings”. Disponível em www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html. Número de Keywords: máximo 6.

- Sugere-se para autores não-nativos que procurem assistência com a sua escrita utilizando instituições especializadas como American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com>)

Quarta e demais páginas (página 4 e demais):

- Introdução: é o sumário dos objetivos do estudo, de forma concisa, citando as referências mais pertinentes. Também deve apresentar as hipóteses em estudo e a justificativa do trabalho.- Material e Métodos: devem ser apresentados com suficientes detalhes que permitam confirmação das observações encontradas, indicando os testes estatísticos utilizados.

- Resultados: as informações importantes do trabalho devem ser enfatizadas e apresentadas em seqüência lógica no texto, nas figuras e tabelas, citando os testes estatísticos. As tabelas e figuras devem ser numeradas (algarismo arábico) e citadas durante a descrição do texto. Cada tabela deve conter sua respectiva legenda, citada acima, em espaço duplo, em página separada, no final do artigo depois das referências. As figuras também devem estar localizadas em páginas separadas, no final do texto, porém, as legendas devem estar localizadas a baixo.

- Discussão: os resultados devem ser comparados com outros trabalhos descritos na literatura, onde também podem ser feitas as considerações finais do trabalho.- Conclusão: deve responder: objetivamente aos questionamentos propostos.- Agradecimentos

(quando houver): a assistências técnicas, laboratórios, empresas e colegas participantes.

- Referências Bibliográficas: Essa seção será elaborada de acordo com as Normas Vancouver (disponíveis em: www.icmje.org), devendo ser numeradas seqüencialmente conforme aparição no texto. E, as abreviações das revistas devem estar em conformidade com o Index Medicus/ MEDLINE.

Todos os autores da obra devem ser mencionados. Exemplos – Normas Vancouver:

Artigo de Revista:

1. Lima RC, Escobar M, Wanderley Neto J, Torres LD, Elias DO, Mendonça JT et al. Revascularização do miocárdio sem circulação extracorpórea: resultados imediatos. Rev Bras Cir Cardiovasc 1993; 8: 171-176.

Instituição como Autor:

1. The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 116:41-42. Sem indicação de autoria: 1. Cancer in South Africa. [editorial]. S Af Med J 1994; 84-85.

Capítulo de Livro:

1. Mylek WY. Endothelium and its properties. In: Clark BL Jr, editor. New frontiers in surgery. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 55-64. Livro: 1. Nunes EJ, Gomes SC. Cirurgia das cardiopatias congênitas. 2a ed. São Paulo: Sarvier; 1961. p.701.

Tese:

1. Brasil LA. Uso da metilprednisolona como inibidor da resposta inflamatória sistêmica induzida pela circulação extracorpórea [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1999. 122p.Eventos:

1. Silva JH. Preparo intestinal transoperatório. In: 45° Congresso Brasileiro de Atualização em Coloproctologia; 1995; São Paulo. Anais. São Paulo: Sociedade Brasileira de Coloproctologia; 1995. p.27-9.1. Minna JD. Recent advances for potential clinical importance in the biology of lung cancer. In: Annual Meeting of the American Medical Association for Cancer Research; 1984 Sep 6- 10. Proceedings. Toronto: AMA; 1984;25:293-4.

Material eletrônico:Artigo de revista:1. Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Disponível em: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

Livros:1. Tichenor WS. Sinusitis: treatment plan that works for asthma and allergies too [monograph online]. New York: Health On the Net Foundation; 1996. [cited 1999 May 27]. Disponível em : URL: <http://www.sinuses.com>

Capítulo de livro:

1. Tichenor WS. Persistent sinusitis after surgery. In: Tichenor WS. Sinusitis: treatment plan that works for asthma and allergies too [monograph online]. New York: Health On the Net Foundation; 1996. [cited 1999 May 27]. Disponível em: URL: <http://www.sinuses.com/post surg.htm>

Tese:

1. Lourenço LG. Relação entre a contagem de microdensidade vasal tumoral e o prognóstico do adenocarcinoma gástrico

operado [tese online]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1999. [citado 1999 Jun 10]. Disponível em: URL:<http://www.epm.br/cirurgia/gastro/laercio>

Eventos:

1. Barata RB. Epidemiologia no século XXI: perspectivas para o Brasil. In: 4º Congresso Brasileiro de Epidemiologia [online].; 1998 Ago 1-5; Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: ABRASCO; 1998. [citado 1999 Jan 17]. Disponível em: URL: <http://www.abrasco.com.br/epirio98>

Informações adicionais podem ser obtidas no seguinte endereço eletrônico:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- Citações no texto: Ao longo do texto, deve ser empregado o sistema autor-data. Segundo as normas Vancouver, apenas a primeira letra do sobrenome do autor é grafada em maiúscula, sendo o ano da publicação apresentado entre parênteses. Trabalhos com até dois autores, tem ambos os sobrenomes mencionados no texto, separados por "&". Trabalhos com três ou mais autores, terão ao longo do texto mencionado apenas o primeiro seguido da expressão "et al".

Se um determinado conceito for suportado por vários estudos, para a citação desses, deverá ser empregada a ordem cronológica das publicações. Nesse caso, o ano de publicação é separado do autor por vírgula (",") e as diferentes publicações separadas entre si por ponto e vírgula (";").

- Declaração de conflitos de interesse e fomento: esse é um item obrigatório que deve ser conciso indicando: a) se houve apoio financeiro de qualquer natureza devendo-se nesse caso

mencionar nominalmente a agência de fomento e b) se há qualquer tipo de conflito de interesse relacionado à pesquisa em questão. Em casos negativos sugere-se o uso da frase

Os autores declaram a inexistência de conflito de interesse e apoio financeiro relacionados ao presente artigo.

- Figuras e Tabelas

As tabelas e figuras deverão ser apresentadas em folhas separadas após a secção: Referências Bibliográficas (uma tabela/figura por folha com a sua respectiva legenda). Figuras em formato digital (arquivo JPG ou TIFF): Resolução de 300 DPIs. As imagens serão publicadas em preto e branco. Caso haja interesse dos autores há possibilidade de impressão colorida das imagens, havendo custo adicional de responsabilidade dos autores.