

Carlos Eduardo Pinto de Alcântara

**USO DO ÁCIDO HIALURÔNICO COMO UMA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA
PARA O REPARO ÓSSEO DE ALVÉOLOS DENTAIS HUMANOS: um ensaio
clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida**

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2016

Carlos Eduardo Pinto de Alcântara

**USO DO ÁCIDO HIALURÔNICO COMO UMA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA
PARA O REPARO ÓSSEO DE ALVÉOLOS DENTAIS HUMANOS: um ensaio
clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia - Área de concentração: Estomatologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

A347u
2016
T

Alcântara, Carlos Eduardo Pinto de.
 Uso do ácido hialurônico como uma estratégia terapêutica para o reparo ósseo de alvéolos dentais humanos: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida / Carlos Eduardo Pinto de Alcântara. – 2016.

 67 f. : il.

 Orientador: Prof. Dr. Anderson José Ferreira.
 Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Gerais, Faculdade de Odontologia.

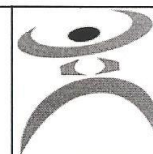
 1. Ácido Hialurônico. 2. Alvéolo Dental. 3. Substitutos Ósseos. 4. Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico. I. Ferreira, Anderson José. II. Mesquita, Ricardo Alves. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV Título.

BLACK – D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

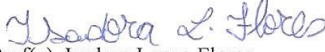
Uso do ácido hialurônico como uma estratégia terapêutica para o reparo ósseo em humanos: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida

CARLOS EDUARDO PINTO DE ALCÂNTARA


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração ESTOMATOLOGIA.

Aprovada em 27 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

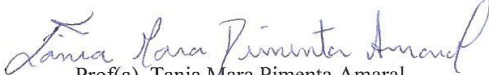

Prof(a). Anderson José Ferreira - Orientador
UFMG


Prof(a). Isadora Luana Flores
UFJF/GV


Prof(a). Ricardo Alves de Mesquita
UFMG


Prof(a). Marcos Augusto de Sá
ICB/UFMG


Prof(a). Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda
Centro Universitário Newton de Paiva

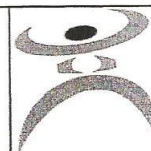

Prof(a). Tania Mara Pimenta Amaral
UFMG

Belo Horizonte, 27 de junho de 2016.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



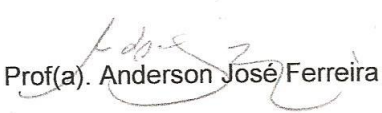
ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO CARLOS EDUARDO PINTO DE ALCÂNTARA

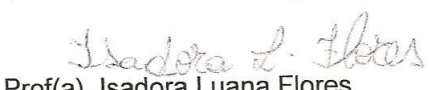
Aos 27 dias de junho de 2016, às 14:00 horas, na sala 3418 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos professores Anderson José Ferreira (Orientador) – FO/UFMG, Isadora Luana Flores – UFJF/GV, Ricardo Alves de Mesquita – FO/UFMG, Marcos Augusto de Sá – ICB/UFMG, Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda – Centro Universitário Newton de Paiva e Tania Mara Pimenta Amaral – FO/UFMG para julgamento da tese intitulada **Uso do ácido hialurônico como uma estratégia terapêutica para o reparo ósseo em humanos: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida**. O Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Banca Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da banca, a Banca Examinadora considerou a tese:


Aprovado

Reprovado

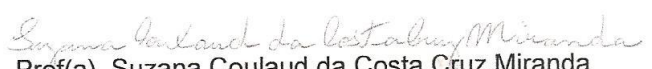
Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Banca. Belo Horizonte, 27 de junho de 2016.

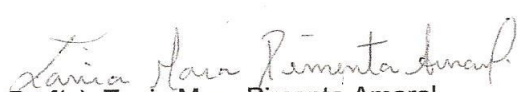

Prof(a). Anderson José Ferreira


Prof(a). Isadora Luana Flores


Prof(a). Ricardo Alves de Mesquita


Prof(a). Marcos Augusto de Sá


Prof(a). Suzana Coulaud da Costa Cruz Miranda


Prof(a). Tania Mara Pimenta Amaral

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus e à minha família.

Obrigado por acreditarem no meu potencial, estarem sempre presentes

e torcerem pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para abraçar mais uma oportunidade de crescimento profissional e concluir esta etapa importante para formação acadêmica.

Ao Professor Dr. Anderson José Ferreira, por ter sido meu orientador. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, palavras de apoio e por ter aberto as portas do seu laboratório no ICB e aceitado a proposta de me orientar na faculdade de Odontologia e compartilhado sua experiência profissional.

Ao Professor Dr. Ricardo Alves Mesquita pela amizade e por ter sido um grande mestre, compartilhando sua experiência profissional como clínico e docente pesquisador ao longo do curso. Agradeço por ter aberto as portas do seu laboratório e ser meu co-orientador além de ter me recebido tão bem na Faculdade de Odontologia da UFMG durante o curso.

Aos colegas do doutorado Luiz Felipe Cardoso Lehman, Maurício Augusto Aquino Castro, Paulo Antônio Martins Junior e Marcos Augusto Sá, pela amizade, colaboração nas etapas do projeto, pelos ensinamentos compartilhados e por todos os momentos que passamos no curso. Vocês foram importantíssimos nesta caminhada.

À aluna de iniciação científica Mariana Saturnino de Noronha pela amizade e por ter colaborado nos experimentos e contribuído para etapas da pesquisa.

Ao Departamento de Odontologia da UFJF (Campus GV) por ter permitido conciliar o curso de Doutorado com a atividade docente neste período.

Ao Núcleo Avançado de Atendimento Ortodôntico e curso de Especialização da Faculdade de Odontologia da UFMG e por ter colaborado com a participação dos pacientes na pesquisa. Agradeço às secretárias, técnicas, ortodontistas e professores que disponibilizaram parte do seu tempo para contribuir com a execução da pesquisa.

Aos professores que aceitaram participar do exame de qualificação e da defesa da tese por enriquecerem este trabalho.

Aos Professores do Colegiado de Pós-Graduação da FO-UFMG, por todo aprendizado necessário ao meu crescimento profissional ao longo do Doutorado.

Aos técnicos do Laboratório de patologia Inês, Domênico e Daniela pela colaboração em experimentos laboratoriais.

Aos pacientes que participaram deste trabalho, pela disponibilidade e responsabilidade assumida para o desenvolvimento desta pesquisa, meu muito obrigado.

À minha mãe pelo amor, por ter incentivado a dar mais este passo na minha formação acadêmica, por ter sido carinhosa, atenciosa e por acreditar na minha competência.

À minha irmã pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

À minha namorada Luciana, agradeço o carinho, a compreensão e por estar sempre presente dando palavras de apoio aos desafios encontrados.

A todos os amigos e demais familiares, pelo apoio, carinho e por estarem sempre comigo.

Agradeço também às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

Uso do ácido hialurônico como uma estratégia terapêutica para o reparo ósseo de alvéolos dentais humanos: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida

RESUMO

O ácido hialurônico (AH), nas últimas décadas, tem sido amplamente estudado como um potente biomaterial na engenharia de tecidos, devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e participação em diversos processos biológicos relacionados à morfogênese e regeneração tecidual. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do AH no reparo ósseo de alvéolos dentais humanos. Trinta e dois primeiros pré-molares inferiores foram extraídos de 16 pacientes com média de 18,67 (DP = 7,95) anos de idade com indicação de exodontia bilateral. Imediatamente após as exodontias, um dos alvéolos foi preenchido aleatoriamente com gel contendo AH a 1%, enquanto o contralateral foi preenchido naturalmente com coágulo. Durante os intervalos pós-operatórios de 30 e 90 dias, os pacientes realizaram exames de tomografia computadorizada *cone beam* (TCCB). Foram capturadas imagens dos cinco cortes ortorradiais mais centrais de cada alvéolo. A intensidade de cinza foi mensurada para cada imagem e os resultados foram expressos como porcentagem média de formação de osso. A espessura vestibulo-lingual do processo alveolar foi mensurada e comparada entre os intervalos pós-operatórios para avaliar possíveis alterações dimensionais do alvéolo. Também foi avaliado o padrão do trabeculado ósseo alveolar através da dimensão fractal. A análise estatística envolveu análise descritiva e Testes T pareado e Wilcoxon ($p < 0,05$). Os alvéolos tratados apresentaram maior porcentagem de formação óssea e valores de dimensão fractal (58,17% e 1,098, respectivamente) em comparação com os controles (48,97% e 1,074, respectivamente) no período de 30 dias pós-operatório ($p < 0,05$). Com relação ao período de 90 dias, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas dimensões dos alvéolos entre os grupos ($p > 0,05$). Assim, estes dados indicam que o AH acelerou o reparo ósseo em alvéolos dentais humanos.

Palavras-chave: Ácido hialurônico. Alvéolo dental. Tomografia computadorizada cone beam. Reparo ósseo.

Use of hyaluronic acid as a therapeutic strategy for bone repair in human dental sockets: a split-mouth randomized triple-blind clinical trial

ABSTRACT

Hyaluronic Acid (HA), in the last decades, has become widely studied as a powerful biomaterial for tissue engineering, since its biocompatibility, biodegradability, and participation in several biological processes related to morphogenesis and tissue healing. The aim of this study was to evaluate the effects of HA on bone repair in human dental sockets. Thirty-two premolars were extracted from 16 patients with a mean age of 18.67 (SD = 7.95) years old with indication of bilateral extraction of lower first premolars. Immediately after the extractions, one socket was randomly filled with 1% HA gel, while the other side was naturally filled with blood clot. During the postoperative intervals of 30 and 90 days, the patients underwent cone beam computed tomography (CBCT). Five central parasagittal scan images were captured from each socket. The gray intensity was measured in each image and the results were expressed as mean percentage of bone formation. The buccolingual alveolar ridge width was also measured and dimensional changes were compared between the postoperative intervals. The pattern of the alveolar trabecular bone was evaluated through the fractal dimension. Statistical analyses included descriptive analysis and Wilcoxon and paired-t tests ($p < 0.05$). The treated sockets showed a higher percentage of bone formation and fractal dimension values (58.17% and 1.098, respectively) compared with controls (48.97% and 1.074, respectively) in the 30-day postoperative period ($p < 0.05$). After 90 days, there were no significant differences between the groups. Additionally, no significant differences were found between the groups regarding the alveolar dimensions ($p > 0.05$). Thus, these data indicate that HA accelerate the bone repair in human dental sockets.

Key words: Hyaluronic acid, dental socket, cone beam computed tomography, bone repair.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura do ácido hialurônico contendo repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glucorônico e de N-acetilglicosamina.....	12
Figura 2	Medida da espessura vestibulo-lingual (V-L) do processo alveolar nos três terços do alvéolo.....	25
Figura 3	Etapas para análise da porcentagem de osso neoformado. A – Recursos do programa KS300 usados para demarcações das imagens; B – Corte selecionado para análise; C – Delimitação da região de interesse; D – Área do alvéolo demarcada e isolada; E – Pixels de tons de cinza claro correspondentes às zonas de neoformação óssea; F – Todos pixels selecionados para cálculo da área total do alvéolo.....	26
Figura 4	Etapas para análise da dimensão fractal dos alvéolos dentais . A – Corte ortorrádial de uma tomografia computadorizada <i>cone beam</i> ; B – Região de interesse selecionada (alvéolo dental); C – Imagem borrada com filtro Gaussiano; D – Resultado da subtração da imagem; E – Adição de valor de cinza de 128; F – Imagem binária; G – Imagem erodizada; H – Imagem dilatada; I – Imagem esqueletonizada.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABO – Associação Brasileira de Odontologia

AH – Ácido hialurônico

BMP-2 – Proteína morfogenética do osso tipo 2

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DICOM – *Digital Imaging and Communications in Medicine*

GAG - Glicosaminoglicana

HY – Hialuronato de sódio

HYA – Hialuronana

LP – Ligamento periodontal

MEC – Matriz extracelular

NIC –Nível de inserção clínica

NIH – *National Institute of Health*

OPN – Osteopontina

PS – Profundidade de sondagem

RG – Recessão gengival

RHAMM - *receptor for HA-mediated mobility*

TCCB – Tomografia computadorizada *cone beam*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF – Fator crescimento de endotélio vascular

V-L – Vestíbulo-lingual

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	Efeito do ácido hialurônico no reparo ósseo	15
2.2	Aplicações clínicas do AH em Odontologia.....	16
2.3	Análise morfométrica da arquitetura óssea trabecular através da dimensão fractal.....	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivo geral.....	20
3.2	Objetivos específicos.....	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Ácido hialurônico.....	21
4.2	Desenho do estudo.....	21
4.3	Cálculo amostral.....	21
4.4	Participantes e critérios de elegibilidade	21
4.5	Aleatorização.....	22
4.6	Procedimentos cirúrgicos e aplicação do tratamento.....	23
4.7	Tomografias computadorizadas <i>cone beam</i> (TCCB).....	23
4.7.1	Alterações dimensionais do alvéolo.....	24
4.7.2	Avaliação morfométrica da porcentagem de osso neoformado e Análise fractal.....	25
4.8	Análise estatística.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO-Artigo submetido para publicação....	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
7	CONCLUSÃO	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9	ANEXOS.....	62
9.1	ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	62
9.2	ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	63
10	PRODUÇÃO INTELECTUAL DESENVOLVIDA DURANTE O CURSO..	67
10.1	Resumos publicado em Anais de congressos.....	67
10.2	Artigo publicado.....	67
10.3	Artigo submetido para publicação.....	67

INTRODUÇÃO

O ácido hialurônico (AH), também chamado de hialuronato de sódio (HY) ou hialuronana (HYA) (Aslan et al., 2006), é uma glicosaminoglicana (GAG) de alto peso molecular (104-107 Da) consistindo de repetidas unidades dissacarídicas não-sulfatadas de ácido D-glucorônico e N-acetilglicosamina (Moseley et al., 2002; Prince, 2004) (Figura 1). Ele é considerado uma biomolécula importante, uma vez que é um dos principais componentes da matriz extracelular (MEC) e por estar amplamente distribuído em tecidos, como pele (Juhlin, 1997), líquido sinovial, revestimentos dos tendões (Engström-Laurent, 1997; Fraser et al., 1997), olhos e na maioria dos líquidos corpóreos (Moseley et al., 2002; Prince, 2004).

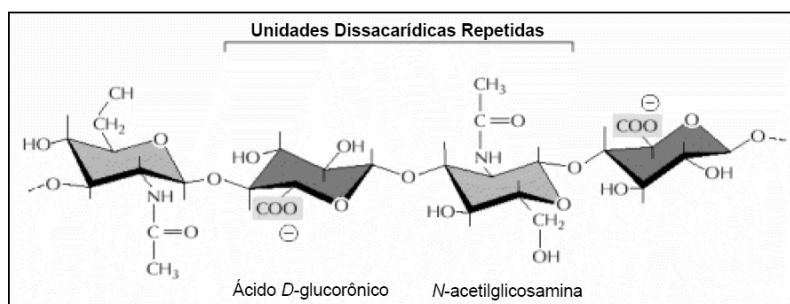


Figura 1: Estrutura do ácido hialurônico contendo repetidas unidades dissacarídicas de ácido D-glucorônico e de N-acetilglicosamina (Alberts et al., 2004).

Uma vez que é uma molécula biodegradável, biocompatível e que não desencadeia resposta imunogênica nos seres humanos, justamente por ser encontrada naturalmente nos tecidos, o AH tem se tornado um importante material para a criação de novos biomateriais para a engenharia de tecidos (Zhao et al., 2016). Ele participa de vários processos biológicos, dentre eles a mediação de sinalização celular, regulação da proliferação e adesão, assim como da diferenciação celular (Toole, 2004). Essas ações são mediadas principalmente por receptores como CD44 (glicoproteína de superfície) e RHAMM (*receptor for HA-mediated mobility*). A interação AH-CD44 está envolvida em múltiplas funções celulares como proliferação, diferenciação, inflamação e tumorigênese (Ponta et al., 2003; Cao et al., 2005). RHAMM é um regulador crítico da mobilidade celular e da resposta celular a fatores de crescimento (Entwistle ET al., 1996; Hall et al., 1994).

O AH apresenta propriedades biofísicas de alta viscosidade, elasticidade a carga negativa, além de mostrar características bacteriostáticas, fungistática, anti-inflamatórias, proangiogênicas e osteoindutiva (Carlson et al., 2004; Kang et al., 2011; Turley et al., 2002). Ele tem sido utilizado principalmente para a indução da formação óssea em modelos animais como defeitos críticos em calvárias ou tíbia de ratos e coelhos assim como para aplicações odontológicas após extração dentária em ratos e lesões periapicais em cães (Mendes et al., 2008; Raines et al., 2011; de Brito-Bezerra et al., 2012; Yeom et al., 2014; Kim et al., 2016). Estudos têm mostrado que o AH usado como veículo de fatores de crescimento, pode aumentar a formação de osso (Itoh et al., 2001; Arosarena & Collins, 2005). Além disso, o biomaterial tem sido associado a outros materiais de enxerto para melhorar sua propriedade mecânica para ser usado em áreas que recebem cargas. De uma forma geral, o AH apresenta dupla função. Por um lado, as propriedades físico-químicas (alta viscosidade, elasticidade e carga negativa) facilitam a sua aplicação em defeitos ósseos (Zhao et al., 2016).

A odontologia é uma área da saúde muito interessada no uso de biomateriais de enxerto e técnicas de engenharia tecidual. A reconstrução óssea é, muitas vezes, pré-requisito essencial à reabilitação funcional do sistema estomatognático, especialmente na correção de perdas traumáticas ou mudanças atróficas do processo alveolar da maxila ou mandíbula. A recuperação da estrutura óssea perdida pode demandar a realização de cirurgias de enxerto ósseo ou inserção de biomateriais. Vários materiais e técnicas que demandam um investimento relativamente alto têm sido propostos com o objetivo de otimizar o reparo alveolar e atenuar a perda óssea em altura e espessura que se seguem às extrações dentárias (Degidi et al., 2012; Loveless et al., 2015).

A cicatrização normal do osso/alvéolo, após injúrias, é caracterizada por ações integradas de diferentes células e pode ser dividida nas fases sequenciais de inflamação, migração, diferenciação e proliferação de células osteogênicas (Sasaki & Watanabe, 1995; Siqueira jr. & Dantas, 2000), síntese de 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 subsequentes 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 ligamento periodontal (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 no processo 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), importante passo 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 formando um tecido conjuntivo imaturo. Posteriormente, células mesenquimais oriundas do LP 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-radiculares remanescentes, presentes após a extração de dentes multiradiculares. Por fim, os eventos de cicatrização alveolar culminam no preenchimento do alvéolo com tecido ósseo trabecular (Devlin & Sloan, 2002).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Efeito do ácido hialurônico no reparo ósseo

O AH desempenha um papel crucial no reparo tecidual durante a cicatrização de feridas e em processos inflamatórios por estimular a migração, adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas, bem como por induzir sua diferenciação em células osteoblásticas (Grigolo et al., 2001; Lisignoli et al., 2002; Toole et al., 2002; Arosarena & Collins, 2005; Aslan et al., 2006; Dechert et al., 2006; David-Raoudi et al., 2008; Pasquinelli et al., 2008). Durante os processos de reparo ósseo, o AH, em virtude de suas propriedades físico-químicas, pode atuar na retenção de fatores de crescimento osteoindutores dentro do ambiente local (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* (Sasaki & Watanabe, 1995; Piloni & Bernard, 1998).

O AH tem sido usado como carreador de fatores de crescimento e de células mostrando bons resultados na osteogênese e também tem sido aplicado no reparo ósseo em combinação com outros materiais de enxerto (Patterson et al., 2010; Docherty-Skogh et al., 2010; Raines et al., 2011; de Brito-Bezerra et al., 2012; Martinez-Sanz et al., 2012; Yeom et al., 2014; Bae et al., 2014). Patterson e colaboradores (2010) observaram que um hidrogel à base de AH utilizado como carreador da proteína morfogenética do osso tipo 2 (BMP-2) promove formação óssea em modelo de defeito crítico em calvária de ratos. Resultado semelhante foi observado por Docherty-Skogh e colaboradores (2010), onde um gel à base de AH usado como veículo de BMP-2 induziu massiva formação óssea e cicatrização de defeitos cranianos em cobaias. Outro estudo observou que um hidrogel fotopolimerizável à base de AH, usado como carreador de fatores de diferenciação osteogênica como o GDF-5, é um bom biomaterial para otimizar a neo-formação óssea (Bae et al., 2014). Brito-Bezerra e colaboradores (2012) avaliaram o efeito do AH a 1% em combinação com uma esponja de colágeno na cicatrização de defeitos críticos de calvária de ratos. Foram comparados quatro grupos experimentais: Controle, AH 1%, Esponja de colágeno e Esponja de colágeno + AH 1%. Os melhores resultados foram obtidos quando o AH foi aplicado nos defeitos. A associação Esponja de colágeno + AH 1% mostrou um preenchimento do defeito

significativamente maior que os grupos controle e esponja de colágeno, porém sem diferenças em relação ao grupo AH 1%.

Em outro estudo realizado por Raines e colaboradores (2011) foi observado que o AH aumenta o número de vasos sanguíneos durante a cicatrização de defeitos ósseos em tíbias de ratos, confirmando que o biomaterial promove neovascularização. Mendes e colaboradores (2010), considerando a baixa estabilidade do AH em ambientes aquosos, avaliaram o efeito da funcionalização de nanotubos de carbono (NTC) com AH (NTC-AH) no reparo ósseo em alvéolos dentais de ratos. Foi observado que tanto o AH isolado quanto a associação NTC-AH induziram aumento na formação óssea e reduziram a quantidade de núcleos celulares nos alvéolos. Além disso, a expressão de colágeno tipo I também foi mais pronunciada na presença do AH. Os autores concluíram que os NTC representam um material viável para carrear o AH em defeitos ósseos, uma vez que a funcionalização preservou as propriedades biológicas benéficas do AH. A partir dos resultados desses estudos, concluímos que o AH pode ser usado em conjunto com outros materiais de enxerto para a cicatrização de defeitos ósseos (Zhao et al., 2016).

2.2 Aplicações clínicas do AH em Odontologia

Recentemente, a Odontologia tem dado mais atenção às características bioquímicas e biofísicas do AH, que já tem sido usado frequentemente em outras especialidades médicas como oftalmologia, dermatologia e ortopedia. A principal aplicação clínica do material tem sido observada no tratamento de doenças periodontais (Zhao et al., 2016). Eick e colaboradores (2013) realizaram um ensaio clínico randomizado para avaliar o efeito de um gel à base AH na cicatrização inicial após raspagem e alisamento radicular em pacientes com periodontite crônica. A aplicação do AH mostrou efeitos positivos sobre a redução da profundidade de sondagem (PS) e sobre a redução da recolonização por periodontopatógenos. Resultados semelhantes foram observados por outro ensaio clínico que utilizou gel de AH a 0,2% e observou efeito benéfico na terapia da gengivite induzida por placa. Eles mostraram que os parâmetros clínicos e inflamatórios foram melhores com a aplicação do gel, sendo os resultados atribuídos aos efeitos anti-inflamatórios do AH (Jentsch et al., 2003).

Ainda nesse contexto, a aplicação de um gel adjunto à cirurgia periodontal mostrou uma significativa melhora dos níveis de inserção clínica (NIC) e da redução da recessão gengival (RG) (Fawzy El-Sayed et al., 2012). Briguglio e colaboradores (2013) avaliaram o efeito do AH em defeitos ósseos periodontais comparado à raspagem de campo aberto e observaram que o uso do biomaterial oferece efeito benéfico adicional em termos de ganho de NIC (>2 mm) e redução de PS (>2 mm). Kim e colaboradores (2016) realizaram um estudo para avaliar o efeito do AH em alvéolos dentais infectados de cães da raça beagle e observaram que as propriedades bacteriostática, osteoindutiva e anti-inflamatória do AH podem melhorar a formação óssea e acelerar a cicatrização de alvéolos infectados.

Existem na literatura diversos estudos que relatam a aplicação de produtos à base de HA na terapia periodontal. Bertl e colaboradores (2015) realizaram uma revisão da literatura para avaliar o efeito da aplicação do AH como terapia única ou como adjunto à terapia periodontal cirúrgica e não-cirúrgica. Foi concluído que a aplicação do material como adjunto ao tratamento periodontal tem efeito benéfico e geralmente moderado sobre os parâmetros periodontais (NIC e PS). Entretanto existe grande heterogeneidade nos estudos, com diferentes concentrações e modos de aplicação. Tais divergências fazem com que o material ainda não tenha recomendação como coadjuvante ao tratamento periodontal cirúrgico e não-cirúrgico.

Outras aplicações clínicas para o AH têm sido estudadas em Odontologia. Em cicatrização de feridas, o uso de um gel à base de AH e aminoácidos mostrou maior rapidez de cicatrização por segunda intenção em feridas cirúrgicas produzidas por laser (Romeo et al., 2014). Em cirurgias de terceiro molar, um ensaio clínico randomizado comparou a aplicação de dois *sprays*, um à base de AH e outro de um anti-inflamatório não esteroide no controle do edema, trismo e dor pós-operatória. Foi observado que grupo tratado com AH apresentou um efeito melhor no controle pós-operatório imediato do edema e do trismo após a exodontia de terceiros molares impactados (Koray et al., 2014). Neste sentido, outro estudo que aplicou o material em alvéolos após cirurgias de terceiros molares observou redução do infiltrado inflamatório e aumento da angiogênese em relação aos alvéolos controles, mostrando um efeito anti-inflamatório do AH (Gocmen et al., 2015).

Os efeitos do AH no reparo ósseo da região maxillofacial ainda são pouco investigados. Durante o estudo em ratos (Mendes et al., 2008), foi observado que o

AH acelera a cicatrização de alvéolos dentais após exodontia de primeiros molares superiores. Análises histológicas e morfométricas demonstraram um aumento significativo na formação de trabéculas ósseas após 7 e 21 dias de cicatrização, um menor número de núcleos celulares e um aumento no número de vasos sanguíneos nos alvéolos tratados. Além disso, a expressão de BMP-2 e OPN, moléculas usualmente referidas como indicadoras do processo inicial de reparo ósseo, foi mais precoce e pronunciada nos alvéolos tratados em relação aos controles (Mendes et al., 2008). Após ter sido observado sucesso na pesquisa em alvéolos dentais de ratos, o uso em humanos com o objetivo de otimizar a cicatrização alveolar torna-se uma etapa de fundamental importância uma vez que o sucesso do tratamento de alvéolos humanos com AH poderá reduzir o tempo de cicatrização após procedimentos cirúrgicos.

2.3 Análise morfométrica da arquitetura óssea trabecular através da dimensão fractal

O osso trabecular, embora tenha formas complexas, apresenta um padrão de ramificação que exhibe propriedades fractais tais como a auto-semelhança estatística e falta de escala bem definida. A auto-semelhança é a simetria através das escalas, bem representativa nos fractais naturais e se refere à manutenção da estrutura mesmo alterando a escala de observação. O objeto apresenta invariância na sua forma à medida que a escala é modificada, mantendo-se a sua estrutura idêntica à original (Sindeaux et al. 2014). Por causa desse fenômeno, a aplicação da geometria e análise fractal podem ser utilizadas para determinar a complexidade trabecular da estrutura óssea (Sanchez-Molina et al., 2013).

Em 1999, White e Rodolph, a fim de avaliar as alterações do padrão do osso trabecular de pacientes com osteoporose em radiografias periapicais, deram início a um método de análise da morfologia óssea trabecular em imagens radiográficas. Utilizando um software de imagens de domínio público do *National Institute of Health* (NIH), eles desenvolveram um método para medir as características morfológicas da arquitetura trabecular óssea. Após selecionar uma região de interesse em uma radiografia digitalizada, a imagem foi sendo manipulada (aplicação de filtros, alteração de brilho e quantidade de pixels) para que obtivesse uma imagem binária que representasse áreas de osso trabecular e osso medular. Por fim a imagem

sofria um processo de “esqueletonização” que sobreposta à imagem original correspondia ao trabeculado ósseo da mesma (White e Rudolph, 1999).

A dimensão fractal (DF), expressão numérica da análise fractal, é um método de análise relativamente novo na Odontologia. Ela pode ser calculada de diversas formas, mas o método mais comum em radiografias e tomografias dentais em razão de sua facilidade de execução e também de acesso é o método *box counting* (Leite et al., 2015). Os estudos de forma geral utilizam o programa ImageJ, que é um programa de domínio público do NIH que pode ser adquirido no site <http://rbs.info.nih.gov/ij/>. A DF de um processo mede a sua complexidade, extensão espacial, ou capacidade de preenchimento espacial e está relacionada à forma e dimensionalidade deste processo (Leite et al., 2015). Na análise fractal, um algoritmo de contagem de caixa é usado principalmente para quantificar o padrão trabecular pela contagem do osso trabecular e interface de medula óssea. O método também avalia a fronteira do osso trabecular e na medula óssea, e um maior valor da contagem de caixas indica uma estrutura mais complexa (Caligiuri et al, 1994).

Em odontologia, a DF representa uma excelente ferramenta para estudar o padrão ósseo trabecular. Doenças caracterizadas por alterações ósseas metabólicas que interferem na densidade óssea, como a osteoporose tem sido muito estudadas em radiografias dentais e panorâmicas (Koh et al., 2012; Sindeaux et al. 2014). De forma geral, tem sido observado que a DF tem correlação com a massa óssea (Bollen et al., 2001). Ela também tem servido como instrumento para detectar mudanças iniciais no padrão ósseo trabecular periapical após o tratamento endodôntico (Chen et al., 2005). Em tomografias computadorizadas *cone beam* (TCCB) a DF já foi usada para verificar alterações ósseas em pacientes com osteonecrose associada a uso de bisfosfonatos (Torres, 2011) e tem sido frequentemente empregada para avaliar a formação óssea em estudos com implantes dentários.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do AH no reparo ósseo de alvéolos dentais humanos após exodontia de pré-molares inferiores com indicação ortodôntica.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a neoformação óssea nos alvéolos dentais através de um *software* de morfometria digital (KS300).
- Avaliar, através de imagens de tomografias computadorizadas do tipo *cone beam*, as alterações dimensionais dos alvéolos dentais.
- Avaliar o padrão estrutural do trabeculado ósseo alveolar através da mensuração da dimensão fractal.

4 METODOLOGIA

4.1 Ácido hialurônico

Comercialmente, o AH apresenta-se em sua fórmula solúvel como gel (C₁₄H₂₀NNaO₁₁)_n.Na. A análise do produto AH a 1% (fabricante BIO PRODUCTS), fornecido pelo distribuidor BS Pharma descreve-o como um líquido límpido e viscoso, incolor, pH 5,99, densidade 1 kg/m³ e viscosidade 8400 Pa.s.

4.2 Desenho do estudo

O presente estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com o parecer de nº: 656/2011 (Anexo 1). O mesmo está registrado na plataforma clinicaltrials.gov com o número de registro: NCT02709525 e foi desenvolvido de acordo com o *Consolidated Standards of Reporting Trials statement* - CONSORT (Schulz et al., 2010). Trata-se de um estudo unicêntrico, prospectivo, randomizado, controlado (boca dividida) e triplo-cego. Todos os pacientes receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2) concordando em participar do estudo.

4.3 Cálculo amostral

Para o cálculo amostral foi empregado a fórmula de medidas repetidas (Jekel et al. 2001). O cálculo foi realizado considerando um nível de significância de 95%, variância de 207,327 (obtido do estudo piloto) e uma diferença de, pelo menos, 5 pontos para ser detectado entre os grupos controle e tratado. Empregando esta fórmula, o tamanho amostral mínimo necessário foi estimado em 16 pacientes.

4.4 Participantes e critérios de elegibilidade

Os sujeitos da pesquisa foram cuidadosamente selecionados a partir do curso de especialização em Ortodontia da Associação Brasileira de Odontologia (ABO) – Seção Minas Gerais e da Faculdade de Odontologia da UFMG, no período de agosto de 2012 a fevereiro de 2015. Todos os pacientes responderam a um

questionário de saúde e foram avaliados clinicamente. Os mesmos deveriam ter os seguintes critérios de elegibilidade.

Critérios de inclusão:

- Pacientes de ambos os gêneros com idade entre 14 a 40 anos;
- Necessidade ortodôntica de exodontia bilateral de primeiros pré-molares inferiores;
- Boa saúde geral (física e mental) no período da seleção.

Critérios de exclusão:

- Uso de álcool, tabaco, drogas ou abuso de medicamentos (julgado pelo investigador), que pudessem influenciar o acompanhamento em longo prazo;
- Pacientes com doenças sistêmicas como, diabetes não controlada, discrasias sanguíneas, insuficiência renal ou cardíaca e osteoporose;
- Gravidez;
- Sinais clínicos ou radiográficos de processos patológicos no osso mandibular;
- Pacientes cujos pré-molares inferiores apresentassem cárie, trauma, fratura, doença periodontal e/ou tratamento endodôntico;
- Fratura radicular ou perda óssea em algum dos processos alveolares;
- Alvéolos tratados em que a cicatrização não estivesse compatível com a normalidade durante o acompanhamento da pesquisa.

4.5 Aleatorização

Cada paciente foi submetido a exodontias bilaterais dos primeiros pré-molares inferiores e os alvéolos foram aleatoriamente divididos em: preenchido com AH a 1% (Grupo A) e coágulo - controle (Grupo B). A randomização foi realizada da seguinte forma: dois envelopes opacos, identificados (1 e 2) e selados foram preparados. O envelope 1 continha 16 cartões com a identificação “lado direito” e “lado esquerdo”. O envelope 2 continha 16 cartões referentes aos grupos de estudo (Grupos A e B). Foi realizado um sorteio de um cartão em cada envelope e criada uma lista numerada sequencialmente (1 a 16 – número de pacientes) com as combinações obtidas. Após determinado qual lado receberia o tratamento com AH 1%, automaticamente o contralateral foi designado como controle. A lista ficou sob os cuidados de um investigador responsável por realizar a randomização e alocação do lado do tratamento e de informar ao auxiliar do cirurgião qual o lado de cada paciente foi escolhido para receber o tratamento.

4.6 Procedimentos cirúrgicos e aplicação do tratamento

Previamente às exodontias, todos os pacientes selecionados receberam instruções de higiene bucal e procedimentos básicos de controle de placa (raspagem supra-gengival, polimento coronário e aplicação de flúor). Um único operador realizou os procedimentos de exodontia e a aplicação do tratamento foi feita pelo auxiliar. As exodontias de ambos os pré-molares inferiores foram realizadas sob anestesia local (cloridrato de lidocaína 2% com epinefrina 1:100.000) e com a utilização de fórceps para pré-molares inferiores (nº 151), seguindo técnica clássica.

Foi realizada sutura em “X” com fio de seda 5.0. Imediatamente após as suturas, o AH 1% foi injetado nos alvéolos selecionados utilizando uma seringa e agulha descartável e estéril até o seu completo preenchimento (~ 1 mL), enquanto que os alvéolos contralaterais foram naturalmente preenchidos apenas com coágulo (controle). Para que o paciente não tivesse conhecimento de qual alvéolo tinha recebido o tratamento, em ambos os alvéolos a seringa foi levada em posição por 30 segundos, mas apenas no selecionado para receber o tratamento o gel foi aplicado.

Todos os pacientes receberam a mesma medicação pós-cirúrgica (Paracetamol 750 mg – 6/6 horas em caso de dor) e recomendações pós-operatórias por escrito. Nenhum paciente foi informado sobre qual o lado recebeu a aplicação do tratamento com AH 1%. Ao final do experimento, o paciente foi instruído a manter uma gaze estéril entre as arcadas durante 30 minutos.

4.7 Tomografias computadorizadas *cone beam* (TCCB)

Cada paciente realizou tomografias computadorizadas tipo *cone beam* em dois períodos pós-operatórios: 30 dias e 90 dias após os procedimentos cirúrgicos. As tomografias foram realizadas no aparelho I-CAT® (Modelo Next Generation – Imaging Sciences International – Hatfield, PA, EUA). Os exames foram realizados com voxel a 0,25 mm, com campo de visão de 7x16 cm e tempo de exposição de 26,9 segundos. As reconstruções das tomografias foram feitas por um único examinador e as imagens obtidas foram usadas para analisar as alterações dimensionais do alvéolo, avaliação morfométrica da porcentagem de osso neoformado e dimensão fractal. Esses parâmetros foram analisados por um único

examinador que era desconhecedor de qual alvéolo (esquerdo ou direito) tinha recebido o tratamento. Esse examinador passou por um exercício de treinamento e calibração previamente ao estudo principal. Foram selecionadas 10 imagens de alvéolos dos pacientes, de forma aleatória, nas quais o examinador realizou as medidas em dois momentos distintos com intervalo de 15 dias. O coeficiente de correlação intra-classes variou entre 0,87 e 0,94, mostrando que o examinador estava calibrado para realizar as análises.

4.7.1 Alterações dimensionais do alvéolo

As imagens foram avaliadas da seguinte forma: 1º passo – o longo eixo do alvéolo foi alinhado verticalmente nos planos coronal e sagital (na reconstrução multiplanar); 2º - após a reconstrução panorâmica foram determinados cortes ortorradiais (1mm de espessura e 1mm de espaçamento) perpendiculares às margens do processo alveolar na região correspondente ao dente extraído; 3º - no corte ortorradial mais central do alvéolo na tomografia de 30 dias foi feita a medida do ápice do alvéolo até o limite externo da basilar (padronização para avaliação da próxima tomografia de 90 dias). Posteriormente, o alvéolo foi medido (ápice até cervical) para que fosse dividido em três terços (cervical, médio e apical).

Para avaliar possíveis alterações dimensionais do alvéolo foi mensurada a espessura vestibulo-lingual (V-L) do processo alveolar. As medidas V-L foram feitas no centro de cada terço do alvéolo: cervical, médio e apical. Por exemplo: se o alvéolo apresentou 13,6 mm, cada terço possuía aproximadamente 4,5 mm. No centro de cada terço (2,2 mm) foi realizada a medida. A primeira a 2,2 mm do ápice, a segunda a 6,8 mm (4,5 mm + 2,2 mm) e a terceira a 11,2 mm (9 mm + 2,2 mm). As medidas foram realizadas no corte ortorradial mais central de cada alvéolo (Figura 2).

Para avaliar a evolução nas alterações dimensionais entre um e três meses, foram comparadas as medidas de espessura entre 30 e 90 dias pós operatório.

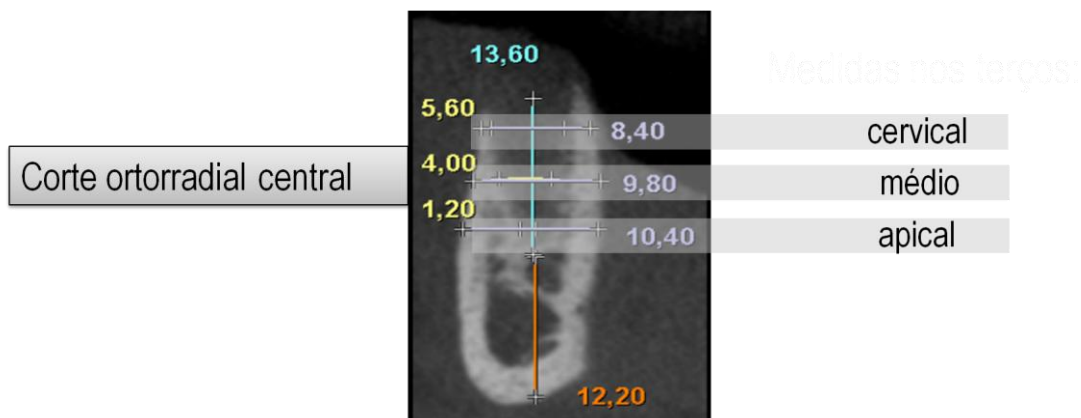


Figura 2: Medida da espessura vestibulo-lingual (V-L) do processo alveolar nos três terços do alvéolo.

4.7.2 Avaliação morfométrica da porcentagem de osso neoformado e análise fractal

Para medir a formação óssea dentro do alvéolo foi utilizada a metodologia adaptada de Miranda e colaboradores (2012). Cinco cortes ortorradiais de cada lado (experimental e controle) foram capturados, totalizando 80 imagens por grupo. Em cada imagem, o examinador demarcava com recursos do programa KS300 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) a área do alvéolo (região de interesse). As áreas mais claras correspondiam ao tecido ósseo mais maduro, enquanto as áreas mais escuras correspondiam a matriz de fibrina, processo inflamatório e coágulo sanguíneo. Na área demarcada foram selecionados todos os pixels de tons de cinza claros correspondentes às zonas de neoformação óssea e criada uma imagem binária para o cálculo da área em mm^2 . Em seguida, todos os pixels da área demarcada foram selecionados para o cálculo da área total do alvéolo pelo mesmo programa (Figura 3). Os resultados foram expressos pela porcentagem média de osso formado obtida através da fórmula:

$$\text{Área de forte intensidade} / \text{área total do alvéolo} \times 100$$

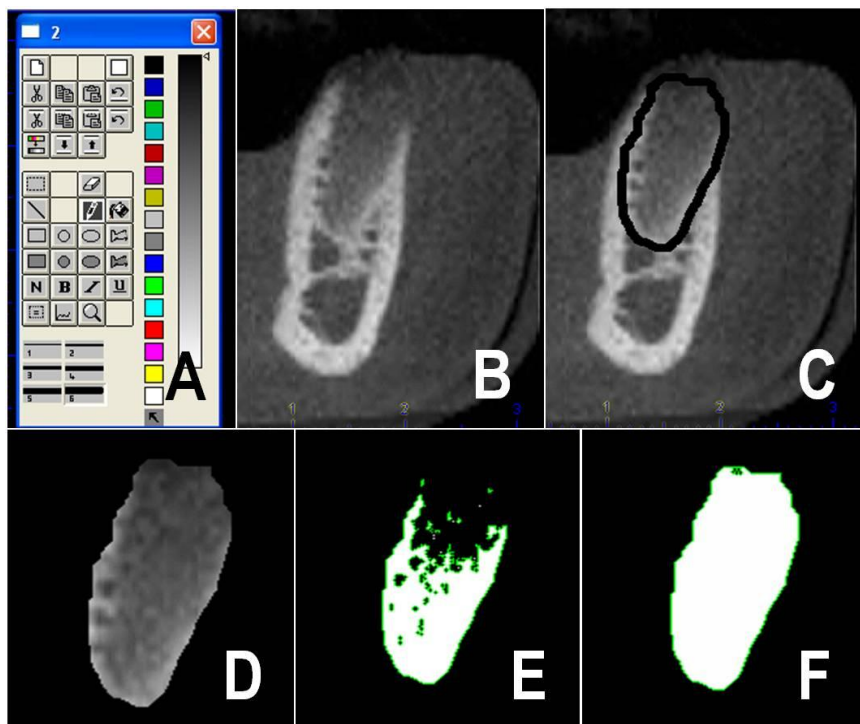


Figura 3: Etapas para análise da porcentagem de osso neoformado. A – Recursos do programa KS300 usados para demarcações das imagens; B – Corte selecionado para análise; C – Delimitação da região de interesse; D – Área do alvéolo demarcada e isolada; E – Pixels de tons de cinza claro correspondentes às zonas de neoformação óssea; F – Todos pixels selecionados para cálculo da área total do alvéolo.

Em relação à análise fractal, foram também usadas 5 imagens do lado tratado e 5 do lado controle, processadas de acordo com o método proposto por White & Rudolph (1999). Elas foram salvas em 8-bit de profundidade de aquisição em escala de cinza e 600 dpi de resolução espacial. A região de interesse para análise foi delimitada englobando toda extensão do alvéolo de cada imagem, excluindo a lâmina dura alveolar. Para o cálculo da dimensão fractal foi utilizado o programa ImageJ, que é de domínio público e pode ser acessado no site <http://rbs.info.nih.gov/ij/>. O cálculo da dimensão fractal foi realizado pelo método proposto por White & Rudolph (1999) através da técnica algorítmica de contagem de células (*box counting*). A área de interesse foi selecionada e posteriormente duplicada. Esta dupla imagem recebeu um filtro Gaussiano (sigma-35) e subtraída da imagem original. Em seguida, foi somado valor de cinza de 128 e a imagem transformada em binária, fazendo com que as regiões que representassem osso passassem a ficar da cor preta e os

espaços passassem a ficar com a cor branca. A imagem foi erodizada, dilatada e, finalmente, esqueletonizada para aplicação final da análise fractal (Figura 2).

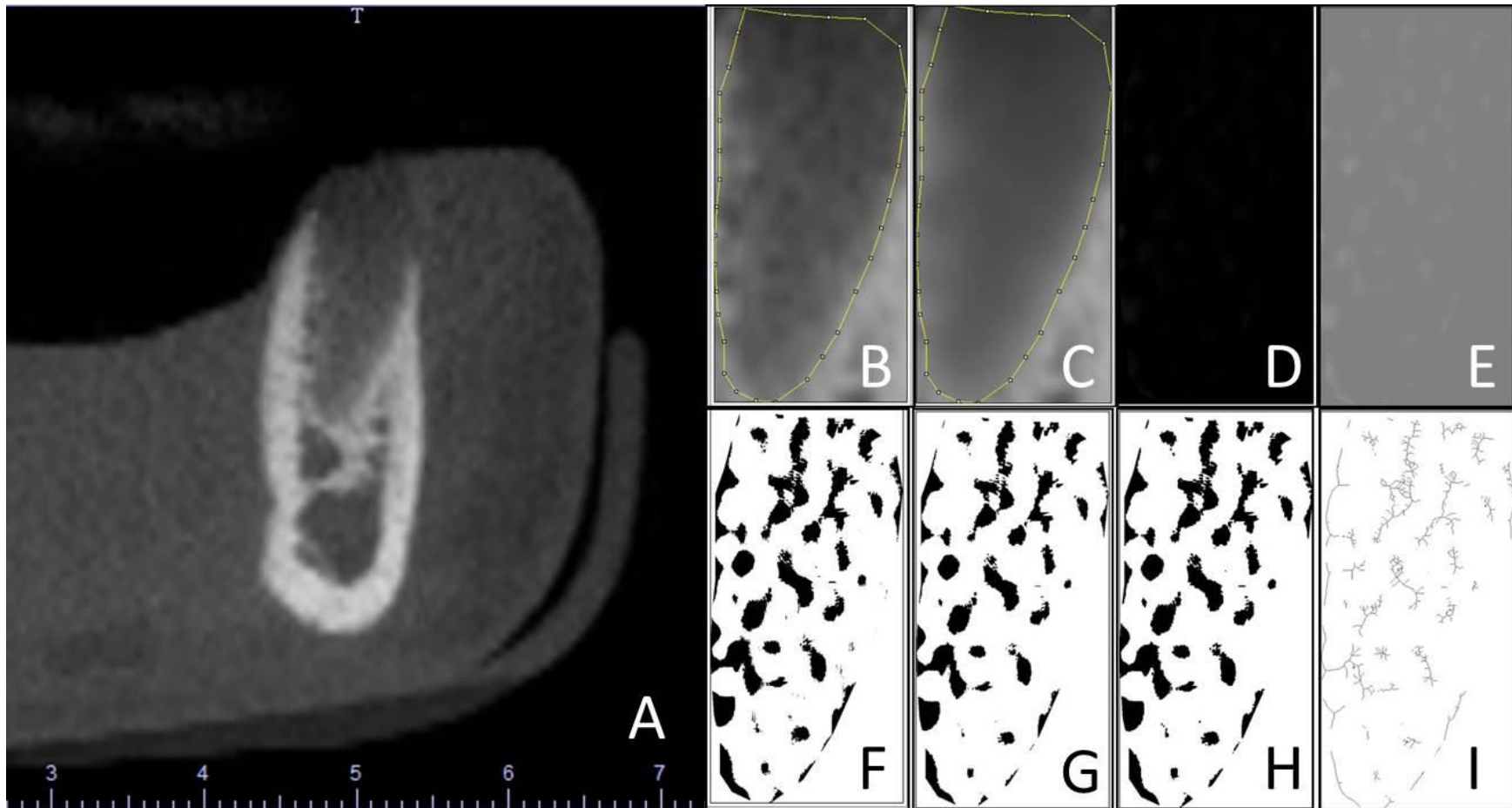


Figura 4: Etapas para análise da dimensão fractal dos alvéolos dentais . A – Corte ortorrádial de uma tomografia computadorizada *cone beam*; B – Região de interesse selecionada (alvéolo dental); C – Imagem borrada com filtro Gaussian; D – Resultado da subtração da imagem; E – Adição de valor de cinza de 128; F – Imagem binária; G – Imagem erodizada; H – Imagem dilatada; I – Imagem eskeletonizada.

4.8 Análise estatística

Os dados foram digitalizados e organizados no *Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Statistics* versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Para análise estatística dos resultados, foi realizada análise descritiva e teste de normalidade Shapiro-Wilk para determinar se os dados apresentavam distribuição normal. Foram utilizados testes não paramétrico (Wilcoxon) ou paramétrico (teste t de Student pareado) para comparação entre os grupos (AH e coágulo). O nível de significância considerado para todos os dados analisados foi de $p < 0,05$. O investigador responsável pelas análises estatísticas também não tinha conhecimento de qual alvéolo recebeu o tratamento, que foi revelado apenas após aquisição e análise de todos os dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO – submetido para publicação na revista Journal of Dental Research

Title: Use of hyaluronic acid as a therapeutic strategy for bone repair in human dental sockets: a split-mouth randomized triple-blind clinical trial

Keywords: Hyaluronic acid, dental socket, cone beam computed tomography, bone repair.

ABSTRACT

Hyaluronic Acid (HA), in the last decades, has become widely studied as a powerful biomaterial for tissue engineering, since its biocompatibility, biodegradability, and participation in several biological processes related to morphogenesis and tissue healing. The aim of this study was to evaluate the effects HA on bone repair in human dental sockets. Thirty-two premolars were extracted from 16 patients with a mean age of 18.67 (SD = 7.95) years old with indication of bilateral extraction of lower first premolars. Immediately after the extractions, one socket was randomly filled with 1% HA gel, while the other side was naturally filled with blood clot. During the postoperative intervals of 30 and 90 days, the patients underwent cone beam computed tomography (CBCT). Five central orthoradial slices were captured from each socket. The gray intensity was measured in each image and the results were expressed as mean percentage of bone formation. The buccolingual alveolar ridge width was also measured and dimensional changes were compared between the postoperative intervals. The pattern of the alveolar trabecular bone was evaluated through the fractal dimension. Statistical analyses included descriptive analysis and Wilcoxon and paired-t tests ($p < 0.05$). The treated sockets showed a higher percentage of bone formation and fractal dimension values (58.17% and 1.098, respectively) compared with controls (48.97% and 1.074, respectively) in the 30-day postoperative period ($p < 0.05$). After 90 days, there were no significant differences between the groups. Additionally, no significant differences were found between the groups regarding the alveolar dimensions ($p > 0.05$). Thus, these data indicate that HA accelerate the bone repair in human dental sockets.

INTRODUCTION

Hyaluronic acid (HA), also known as sodium hyaluronate (HY) or hyaluronan (HYA), is a high molecular weight glycosaminoglycan (GAG) composed of repeating disaccharide non-sulfated units of D-glucuronic acid and N-acetylglucosamine (Aslan et al., 2006). HA is a biomolecule of considerable importance since it is one of the major component of the extracellular matrix in addition to be widely distributed in several tissues, like skin, synovial fluid, cartilage, tendons, eyes and in most body fluids (Prince, 2004; Falcone et al., 2006).

Due to its participation in several biological processes related to morphogenesis and tissue healing along with its biocompatibility, biodegradability, and nonimmunogenicity, HA, in the last decades, has become widely studied as a powerful biomaterial for tissue engineering (Zhao et al., 2016). It plays a key role during bone repair by stimulating cell migration, adhesion and proliferation of undifferentiated mesenchymal cells inducing their differentiation into osteoblastic cells (Dechert et al., 2006; Kim et al., 2007; Pasquinelli et al., 2008). Because of its physicochemical properties, it can retain osteoinductive growth factors into the local environment, as well as mediate the adhesion of osteoclasts to the bone surface, and accelerate revascularization and bone formation *in vitro* (Sasaki & Watanabe, 1995; Prince, 2004; Giavaresi et al., 2005; David-Raoudi et al., 2008).

More recently, HA-based materials have been applied into bone defects in animal models experiments alone, associated to scaffolds or as a delivery carrier of growth factors, promoting and/or enhancing bone formation (Mendes et al., 2008; Tanaka et al., 2011; Brito Bezerra et al., 2012; Bhakta et al., 2013; Suzuki et al., 2014).

Despite the fact that HA is widely used in many medical fields, such as dermatology as dermal filler (Hemshkhar et al., 2016), ophthalmology (Fakhari and Berkland, 2014; Kretz et al., 2014) and orthopedic as an anti-inflammatory agent in various inflammatory conditions, clinical applications of HA in dentistry is still little known. Recent investigations found that HA appears to offer a beneficial effect on the management of swelling and trismus (Koray et al., 2014) and on the inflammatory reaction following third molar surgery (Gocmen et al., 2015). Also, along with guided tissue regeneration, a HA-based matrix induced a significant added benefit in terms

of cClinical Attachment Level gain, reduction of radiographic defect depth and probing pocket depth (Sehdev et al., 2016). Regarding the wound healing, it was observed that the use of a gel containing amino acids and sodium hyaluronate promotes faster healing via secondary intention in laser-induced wounds (Romeo et al., 2014). Thus, the effects of HA on human bone repair in maxillofacial regions remains under investigated, mainly in terms of bone repair. In this context, the aim of the present study was to evaluate the effects of HA on bone repair in human dental sockets.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This study was approved by the National Research Ethics Committee (CONEP) (protocol #656/2011), registered in the clinicaltrials.gov platform (#NCT02709525) and conducted in accordance with the Consolidated Standards of Reporting Trials statement (Schulz et al., 2010). It is a single-center, prospective, randomized, controlled (split-mouth) and triple-blind clinical trial. Each patient signed a statement of informed consent prior participation in the study.

Sample size calculation and pilot study

The sample size was calculated based on the outcome measure percentage of bone formation and the estimate for the comparison of repeated quantitative measurements was used for calculation (Jeckel et al., 2001). It was considered a 95% confidence level, a standard deviation of 207,327 and the difference between groups of at least 5 points (parameters obtained from a pilot study involving 5 patients) to calculate the sample size. A minimum of 16 patients was determined.

Sample selection and eligibility criteria

The subjects were carefully selected from the orthodontic clinics of the Brazilian Dental Association (ABO-MG), as well as of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) from August 2012 to July 2015. All patients responded to a health questionnaire and assessed clinically. The inclusion criteria were healthy volunteers aged 14 to 40 years with an orthodontic indication for bilateral extraction of

mandibular first premolars. The following were the exclusion criteria: alcoholism; smoking; drug use and abuse of drugs; pregnancy or lactation; systemic diseases (uncontrolled diabetes, blood dyscrasias, kidney or heart failure and osteoporosis); clinical or radiographic signs of pathological processes in the bone, premolars with caries, periodontal disease, endodontic treatment or root fracture and hypersensitivity to the drugs or other substances employed in the study.

Randomization

Each patient underwent bilateral extraction of the lower first premolars and the sockets were randomly divided into: i) sockets filled with 1% HA (Group A) and ii) sockets filled with clot - control (Group B). Randomization was performed by a researcher not directly involved in the evaluation of the outcomes and surgeries, using two opaque, labeled, sealed envelopes. The envelope #1 contained 16 cards labeled right or left and the envelope #2 contained 16 cards labeled with the groups (group A or group B). A numbered sequentially list (1 to 16 - the number of patients) with a combination obtained by means of a draw of the group and side of the surgery was created. After determination of the side that should be filled with HA, automatically the contralateral side was designated as control. For each patient enrolled, the researcher responsible for randomization informed the surgeon assistant which side was allocated to receive HA.

Surgical procedures and dental sockets treatment

Prior to tooth extractions, all selected patients received instructions for oral hygiene and basic procedures to plaque control (supra-gingival scaling, coronary polishing and fluoride application). A single operator performed the extraction procedures and the application of the HA was made by the surgeon assistant. The extraction of both lower premolars was performed under local anesthesia (2% lidocaine with 1:100,000 epinephrine) and the forceps for premolars (#151) was used following classical technique. The sockets were sutured with interrupted "X" stitches using silk thread 5.0. Immediately after the sutures, the selected socket was filled with 1% HA (approximately 1 mL) using a sterile disposable syringe and needle, while the contralateral socket was filled only with natural clot. The syringe was taken into the position for 30 seconds in both sockets, but only in the socket selected for

the treatment the HA gel was applied. This manouver aimed keeping the patient unaware of which socket received the treatment.

All patients received the same post-surgical medication (paracetamol/acetaminophen 750 mg - every six hours, as needed, for the control of pain for a maximum of three days) and post-operative written recommendations. Patients were not informed about which side was applied with HA. At the end of the procedure, patients were instructed to maintain an sterile gauze between the arches for approximately 30 minutes.

Cone beam computed tomography (CBCT)

Each patient underwent CBCT scans at two post-operative periods: 30 days and 90 days after surgery. The scans were performed in the I-CAT® device (Model Next Generation - Imaging Sciences International - Hatfield, PA, USA). The examinations were performed with voxel= 0.25 mm, 7x16 cm field of view and time of 26.9 seconds of exposure. The images obtained were used to analyze the alveolar dimensional changes, morphometric evaluation of the percentage of newly formed bone and mean fractal dimension (FD). These parameters were analyzed by a single trained, calibrated examiner who was blinded to which sockets received the HA. This examiner went through a training exercise and calibration prior to the main study. Calibration was performed using 10 images randomly, in which the examiner performed the measurements in two separate occasions with a 15-day interval. The intra-class correlation coefficient ranged from 0.87 to 0.94, showing that the examiner was calibrated to perform analyzes.

Alveolar dimensional changes

The images were evaluated as follows: 1) the long axis of the socket was aligned vertically in the coronal and sagittal planes (during multiplane reconstruction); 2) after the panoramic reconstruction, orthoradial slices (1mm thick and 1mm spacing) perpendicular to surfaces of buccolingual plates of the alveolar ridge on axial view were determined in the region corresponding to the tooth extracted; 3) in the 30-day period, it was measured the distance from the apex to the outer limit of the basilar in the most central slice (standardization for evaluation of the 90-day tomography); 4) subsequently, the socket was measured (apex to cervical) divided

into three thirds (cervical, middle and apical). The buccolingual alveolar ridge width was measured and compared with the postoperative data to evaluate possible alveolar dimensional changes. The measurements were made at the center of each third portion of the socket: cervical, middle and apical.

Morphometric evaluation and fractal dimension analysis

To measure bone formation inside the tooth sockets, the methodology was adapted from Miranda et al. (2012). Five representative images of each socket were captured, totaling 80 images per group. In each image, the examiner delimited the area of dental socket (region of interest – ROI). The gray intensity was measured for each image with the use of the KS300 software coupled to a Carl Zeiss image analyzer (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The high intensity areas (HIA) corresponded to the more mature bone tissue, while the weak intensity areas (WIA) corresponded to fibrin matrix, inflammatory process and blood clot. Thus, at the delimited dental socket area (ROI), pixels of light gray tones corresponding to areas of bone formation were selected and then created a binary image to calculate the area in mm². Then, all pixels of the ROI were selected for the calculation of the socket total area (STA). The percentage of formed bone was obtained through the following formula: Mean socket filling = $[HIA (mm^2)/STA(mm^2)] \times 100$.

Regarding the fractal dimension (FD) analysis, five digital images of each side, processed in accordance to White & Rudolph (1999), were used. Data were analyzed with the ImageJ software (Image J, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The ROI analysis was defined as encompassing all socket extension of each image, excluding the alveolar lamina dura. The calculation of the FD was conducted by the box-counting method. The ROI was selected, cropped and subsequently duplicated. This double image was blurred with a Gaussian filter (sigma-35) and subtracted from the original image. Then, a gray value of 128 was added to each pixel location and the resultant image was converted into a binary image, making regions that represent bones black in color and marrow spaces white in color. The image was eroded and dilated to reduce the noise and finally skeletonized for FD analysis (Figure 1).

Statistical analysis

Data were organized in the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 20.0 Statistics (IBM Corp., Armonk, NY, USA). For statistical analysis, descriptive statistics were performed, as well as the Shapiro-Wilk normality test to evaluate the distribution of the data. Non-parametric (Wilcoxon) or parametric (paired Student's t test) tests were used to compare the groups. The level of significance for all the analyzed data was $p < 0.05$. The statistician was also unaware of which socket received the treatment, that was only revealed after the acquisition and analysis of all data.

RESULTS

Thirty-two lower premolars were extracted from 16 patients with a mean age of 18.67 (SD = 7.95) years old with orthodontic indication of bilateral extraction. Patients participated of all stages of the trial and there was no segment loss. The sockets filled with 1% HA presented a higher percentage of newly formed bone than the sockets that were filled only with natural clot in the postoperative period of 30 days ($p = 0.004$) (Figures 2 and 3). However, no significant differences were observed in the 90-day period ($p = 0.216$) (Figure 2).

In terms of buccolingual alveolar ridge width at the three thirds of the sockets, no significant differences were viewed between the groups ($p > 0.05$) (Table). Also, when comparing the evolution of bone loss between the first and third postoperative month, no statistically significant differences between the groups were found (Figure 4). Regarding the analysis of the FD, it was observed a significant increase in the HA-treated group at 30 days (1.098 ± 0.042 vs. 1.074 ± 0.045 in the control group, $p = 0.003$), but not at 90 days after the surgery, when compared with the untreated group (Figure 5).

DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate if sockets filled with hyaluronic acid gel present any improvement on bone formation regarding the time and alveolar

dimensions preservation. To the best of our knowledge, this is the first study to assess the effect of HA on bone formation in human dental sockets. In tooth sockets of rats, it was observed that HA accelerates the healing process after extraction of first molars (Mendes et al 2008). Histological and morphometric analyses showed a significant increase in the amount of bone trabeculae at 7 and 21 days after tooth extraction and in the vessels counting at 7 days. Furthermore, expression of BMP-2 and osteopontin was enhanced in HA-treated sockets (Mendes et al 2008).

The experimental model adopted (split-mouth) enables each patient acts as his/her own control, minimizing individual factors that might interfere in the results of the work. The use of fresh sockets of mandibular first premolars with orthodontic extraction indication was practical, since these teeth were uniradicular teeth free of inflammation and with a reasonable demand for orthodontic treatment. On the other hand, this model presented as a limitation the impossibility of performing histological analysis or long term evaluation. Although the use of HA as adjunctive strategy for orthodontic treatment was not the main objective of this study, the orthodontist was asked to assess during the course of the treatment if there was any negative interference or change after application of force between the two sides of the arch. It was reported that no significant changes in the course of the treatment or in the outcome of the orthodontic treatment were observed due to the presence of the material.

Several graft materials used alone or associated (autograft, allograft and alloplastic) have shown good results in bone therapy. Many strategies adopted immediately after extraction have proven to maintain bone dimensions (Degidi et al., 2012; Loveless et al., 2015). The process of resorption and bone remodeling is more intense in the first three months after extraction and to control this process is a challenge for dentistry. The bone formation in this study was evaluated by CBCT 30 and 90 days after the beginning of the healing process. At 30 days, it was observed that bone formation was more advanced in sockets filled with HA, whereas at 90 days treated and control sockets had similar bone density pattern, showing that the biomaterial had a positive influence in the beginning of the alveolar healing process.

The evaluation of bone formation using CBCT is done through various methods without a defined standardization, making it difficult to compare different

studies. The use of Hounsfield units (HU) is a controversial subject in the literature since the consistency and accuracy of the values remain elusive (Loveless et al., 2015). On the other hand, the morphometric analysis using the software KS300 was carried out in a recent study by Miranda et al. (2012) who applied the gray intensity to compare bone formation in images captured by CBCT.

Because trabecular bone structure is quite complex, numerically quantification of bone formation is also complex. Trabecular bone has a branching pattern that displays fractal properties, such as statistical self-similarity and lack of well-defined scale. Thus, due to these phenomena, the application of fractal geometry and analysis can be used to determine the complexity and trabecular bone structure (Sanchez-Molina et al., 2013). FD, a numerical expression of the fractal analysis, is a method of analysis relatively new in dentistry. It can be calculated by different ways, but the most common method in dental x-rays and CT scans is the box counting due to easy implementation and access (Leite et al., 2015). In general, FD has good correlation with bone mass (Bollen et al., 2001) and it has been used as a tool to detect early changes in periapical trabecular bone pattern after endodontic treatment (Chen et al., 2005; Yu et al., 2009). In addition, FD associated with CBCT has been utilized to evaluate bone alterations in patients with osteonecrosis linked to bisphosphonates (Torres et al., 2011), as well as bone formation in studies of dental implants (Gonzalez-Martin et al. 2012; Veltri et al, 2011). In our study, it was possible to evaluate the bone structural complexity and to observe that the sockets receiving HA had a higher bone formation. Unfortunately, due to methodological differences among the studies, these results can not be compared with others works.

Atrophic changes in the alveolar process caused by biologic events occurring during the healing after tooth extraction are a problem for aesthetic and functional rehabilitation (Jambhekar et al., 2015). For these reasons various strategies that involve alveolar ridge preservation and/or replacement of the bone structure have been proposed. Here, no significant differences in relation to dimensional changes of the alveolar process were observed. A similar result was found in a previous study comparing the dimensional changes between sockets filled with an osteoinductive allograft or with blood clot (Brownfield and Weltman, 2012).

Although in the last few years, the anti-inflammatory, osteoinductive, bacteriostatic and other beneficial effects of HA have emerged for possible therapies in dentistry, its full effectiveness to become indeed indicated as a biomaterial for clinical application still requires further investigations. The results of this study are promising from the viewpoint of bone formation. It is noteworthy that it was not possible to perform histological analysis, as the methodology did not allow bone biopsy. Thus, future clinical studies in human involving both radiographic diagnosis of bone formation and histological evaluation can bring a new perspective to accelerate alveolar bone formation. Furthermore, the use of HA in association with other materials can result in an excellent strategy in oral regenerative medicine.

FINANTIAL SUPPORT

Authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil) for the financial support.

REFERENCES

1. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl.* 2006;20(3):209-220.
2. Bhakta G, Lim ZX, Rai B, Lin T, Hui JH, Prestwich GD, van Wijnen AJ, Nurcombe V, Cool SM. The influence of collagen and hyaluronan matrices on the delivery and bioactivity of bone morphogenetic protein-2 and ectopic bone formation. *Acta Biomater.* 2013;9:9098–9106.
3. Bollen AM, Taguchi A, Hujuel PP, Hollender LG. Fractal dimension on dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol.* 2001;30(5):270–275.
4. Brownfield LA, Weltman RL. Ridge preservation with or without an osteoinductive allograft: a clinical, radiographic, micro-computed tomography,

and histologic study evaluating dimensional changes and new bone formation of the alveolar ridge. *J Periodontol.* 2012;83(5):581-589.

5. Chen SK, Oviir T, Lin CH, Leu LJ, Cho BH, Hollender L. Digital imaging analysis with mathematical morphology and fractal dimension for evaluation of periapical lesions following endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(4):467–472.
6. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K, Pujol JP. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: Relation to wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16:274–287.
7. de Brito Bezerra B, Mendes Brazao MA, de Campos ML, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23:938–942.
8. Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen.* 2006;14(3):252-258.
9. Degidi M, Nardi D, Daprile G, Piattelli A. Buccal bone plate in the immediately placed and restored maxillary single implant: a 7-year retrospective study using computed tomography. *Implant Dent.* 2012;21(1):62-66.
10. Falcone SJ, Palmeri DM, Berg RA. Rheological and cohesive properties of hyaluronic acid. *J Biomed Mater Res A.* 2006;76:721–728.
11. Fakhari A, Berkland C. Applications and emerging trends of hyaluronic acid in tissue engineering, as a dermal filler and in osteoarthritis treatment. *Acta Biomater.* 2013;9:7081–7092.
12. Giavaresi G, Torricelli P, Fornasari PM, Giardino R, Barbucci R, Leone G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials.* 2005;26(16):3001-3008.

13. Gocmen G, Gonul O, Oktay NS, Yarat A, Goker K. The antioxidant and anti-inflammatory efficiency of hyaluronic acid after third molar extraction. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(7):1033-1037.
14. González-Martín O, Lee EA, Veltri M. CBCT fractal dimension changes at the apex of immediate implants placed using undersized drilling. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(8):954-957.
15. Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, Sherman LS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol.* 2016;86:917-928.
16. Jambhekar S, Kernén F, Bidra AS. Clinical and histologic outcomes of socket grafting after flapless tooth extraction: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *J Prosthet Dent.* 2015;113:371-382.
17. Jekel JF, Katz DL, Elmore JG. *Epidemiology, biostatistics, and preventive medicine.* (2nd ed.). Elsevier: Atlanta, USA, 2001.
18. Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G, Noh I, Lee SH, Park Y, Sun K. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2007;28:1830–1837.
19. Koray M, Ofluoglu D, Onal EA, Ozgul M, Ersev H, Yaltirik M, Tanyeri H. Efficacy of hyaluronic acid spray on swelling, pain, and trismus after surgical extraction of impacted mandibular third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(11):1399-1403.
20. Kretz FT, Limberger IJ, Auffarth GU. Corneal endothelial cell coating during phacoemulsification using a new dispersive hyaluronic acid ophthalmic viscosurgical device. *J Cataract Refract Surg.* 2014;40(11):1879-1884.
21. Leite AF, Figueiredo PT, Caracas H, Sindeaux R, Guimarães AT, Lazarte L, Paula AP, Melo NS. Systematic review with hierarchical clustering analysis for the fractal dimension in assessment of skeletal bone mineral density using dental radiographs. *Oral Radiol.* 2015;31(1):1-13.

22. Loveless TP, Kilinc Y, Altay MA, Flores-Hidalgo A, Baur DA, Quereshy FA. Hounsfield unit comparison of grafted versus non-grafted extraction sockets. *J Oral Sci.* 2015;57(3):195-200.
23. Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.* 2008;53(12):1155-1162.
24. Miranda SC, Silva GA, Mendes RM, Abreu FA, Caliari MV, Alves JB, Goes AM. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: a potential strategy for alveolar bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(10):2775-2786.
25. Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, et al. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *J Anat.* 2008;213(5):520-530.
26. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet Disord.* 2004;5:12.
27. Romeo U, Libotte F, Palaia G, Galanakis A, Gaimari G, Tenore G, Del Vecchio A, Polimeni A. Oral soft tissue wound healing after laser surgery with or without a pool of amino acids and sodium hyaluronate: a randomized clinical study. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(1):10-6
28. Sanchez-Molina D, Velazquez-Ameijide J, Quintana V, Arregui-Dalmases C, Crandall JR, Subit D, Kerrigan JR. Fractal dimension and mechanical properties of human cortical bone. *Med Eng Phys.* 2013;35(5):576-582.
29. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone.* 1995;16(1):9-15.
30. Schulz KF, Altman DG, Moher D; CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med* 2010;8:18.
31. Sehdev B, Bhongade ML, Ganji KK. Evaluation of effectiveness of hyaluronic acid in combination with bioresorbable membrane (poly lactic acid-poly

- glycolic acid) for the treatment of infrabony defects in humans: A clinical and radiographic study. *J Indian Soc Periodontol.* 2016;20(1):50-56.
32. Suzuki K, Anada T, Suzuki O. Effect of addition of hyaluronic acids on the osteoconductivity and biodegradability of synthetic octacalcium phosphate. *Acta Biomater.* 2014;10:531–543.
33. Tanaka K, Goto T, Miyazaki T, Morita Y, Kobayashi S, Takahashi T. Apatite-coated hyaluronan for bone regeneration. *J Dent Res.* 2011;90(7):906-911.
34. Torres SR, Chen CS, Leroux BG, Lee PP, Hollender LG, Schubert MM. Fractal dimension evaluation of cone beam computed tomography in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2011;40(8):501-505.
35. White SC, Rudolph DJ. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(5):628-635.
36. Yu YY, Chen H, Lin CH, Chen CM, Oviir T, Chen SK, et al. Fractal dimension analysis of periapical reactive bone in response to root canal treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(2):283–288.
37. Veltri M, Ferrari M, Balleri P. Correlation of radiographic fractal analysis with implant insertion torque in a rabbit trabecular bone model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(1):108-114.
38. Zhao N, Wang X, Qin L, Zhai M, Yuan J, Chen J, Li D. Effect of hyaluronic acid in bone formation and its applications in dentistry. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(6):1560-1569.

TABLE

Table: Buccolingual alveolar ridge width at the three thirds of the sockets (cervical, medium and apical).

Postoperative Interval	Third of socket	Experimental group – mean (SD)		p value
		Control	HA	
30 days	Cervical	7.90 (1.34)	8.29 (1.43)	>0.05
	Medium	8.87 (1.72)	8.83 (1.71)	
	Apical	9.31 (1.75)	9.23 (1.88)	
90 days	Cervical	7.14 (1.26)	7.73 (1.40)	>0.05
	Medium	8.33 (1.68)	8.57 (1.89)	
	Apical	9.09 (1.68)	9.04 (2.06)	

No significant differences between the groups were found. Paired T-test or Wilcoxon Test.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Steps for fractal dimension analysis of dental socket. A – orthoradial slice of cone beam computed tomography; B - selected region of interest (socket); C - blurred image with Gaussian filter; D - image subtraction result; E - added gray value of 128; F - binary image; G - eroded image; H - dilated image; I - skeletonized image.

Figure 2: Representative slices of cone beam computed tomography of control and 1% hyaluronic acid (HA)-treated sockets at 30 days after tooth extraction. Top panel - socket treated with HA; bottom panel - control socket. 1 - delimitation of the region of interest (dental socket); 2 - total area of the socket; 3 - overlapped area of intra-alveolar newly formed bone; 4 - demarcation of high intensity areas.

Figure 3: Percentage of newly formed bone in tooth sockets of hyaluronic acid (HA) and control groups at 30 and 90 days after surgery. * $p < 0.05$ (Paired t test).

Figure 4: Dimensional changes in cortical thickness of tooth sockets treated or not with hyaluronic acid (HA) between 30 and 90 days after surgery in cervical, medium and apical thirds of the sockets. No significant changes between the groups were observed (paired T test).

Figure 5: Representative (1) selected original image, (2) skeletonized image and (3) overlapped images of (A) control socket and (B) hyaluronic acid (HA)-treated socket after 30 days of healing process.

Figure 1:

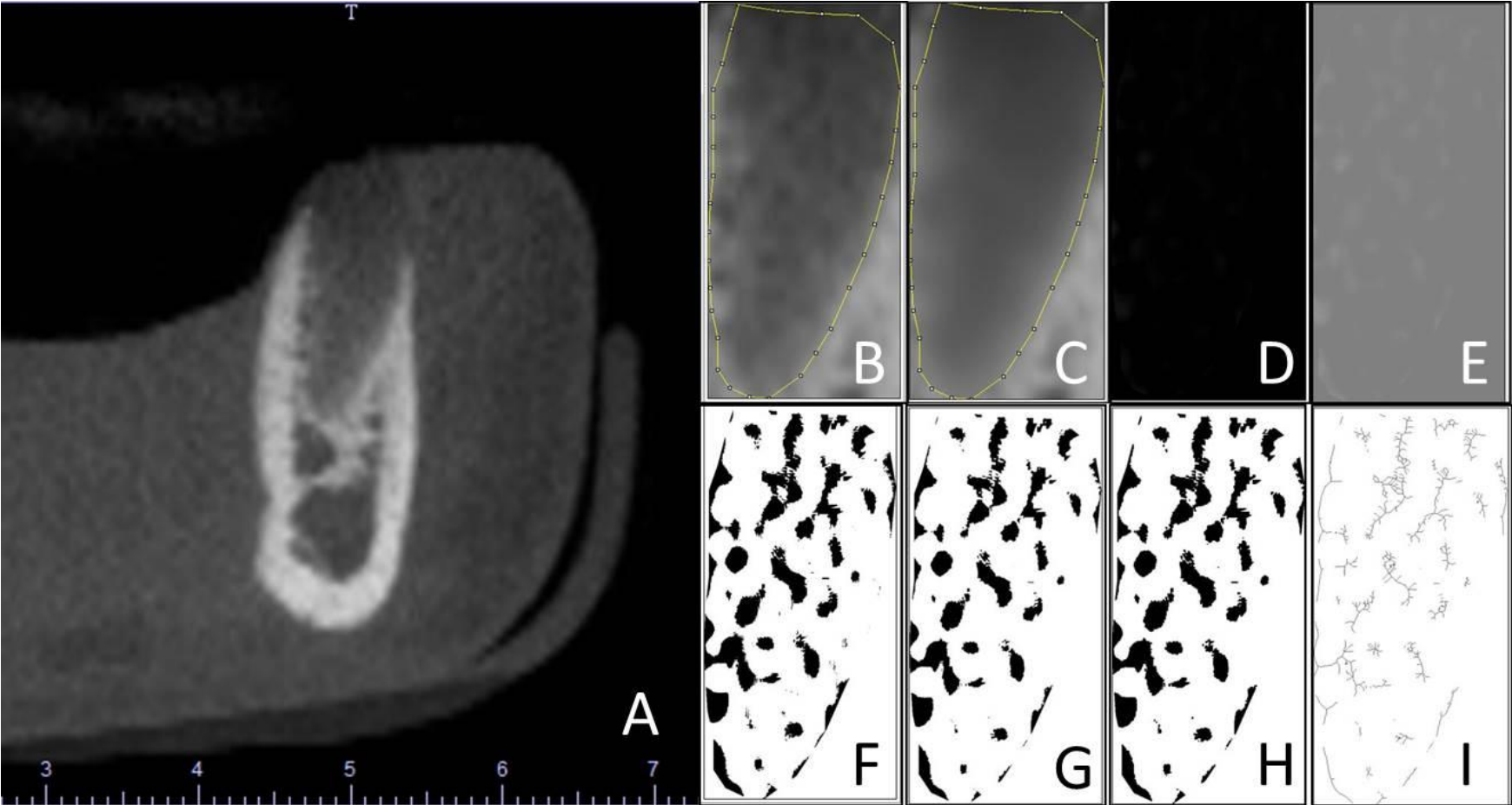


Figure 2:

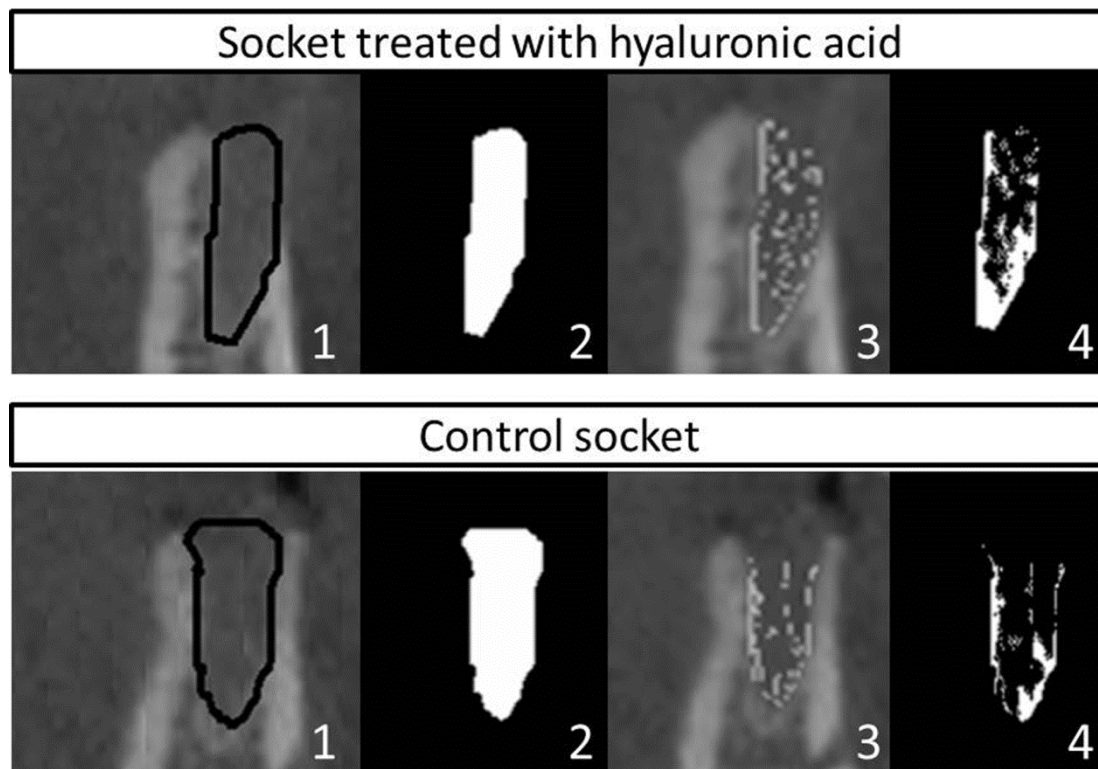


Figure 3:

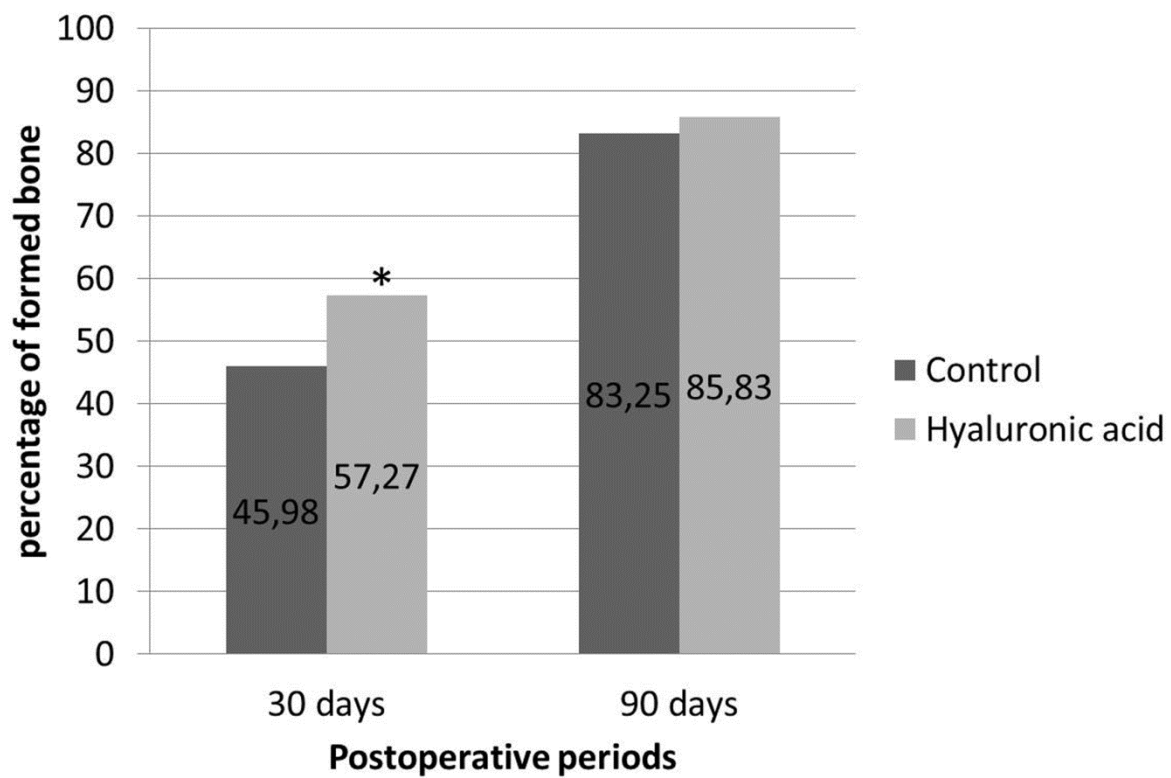


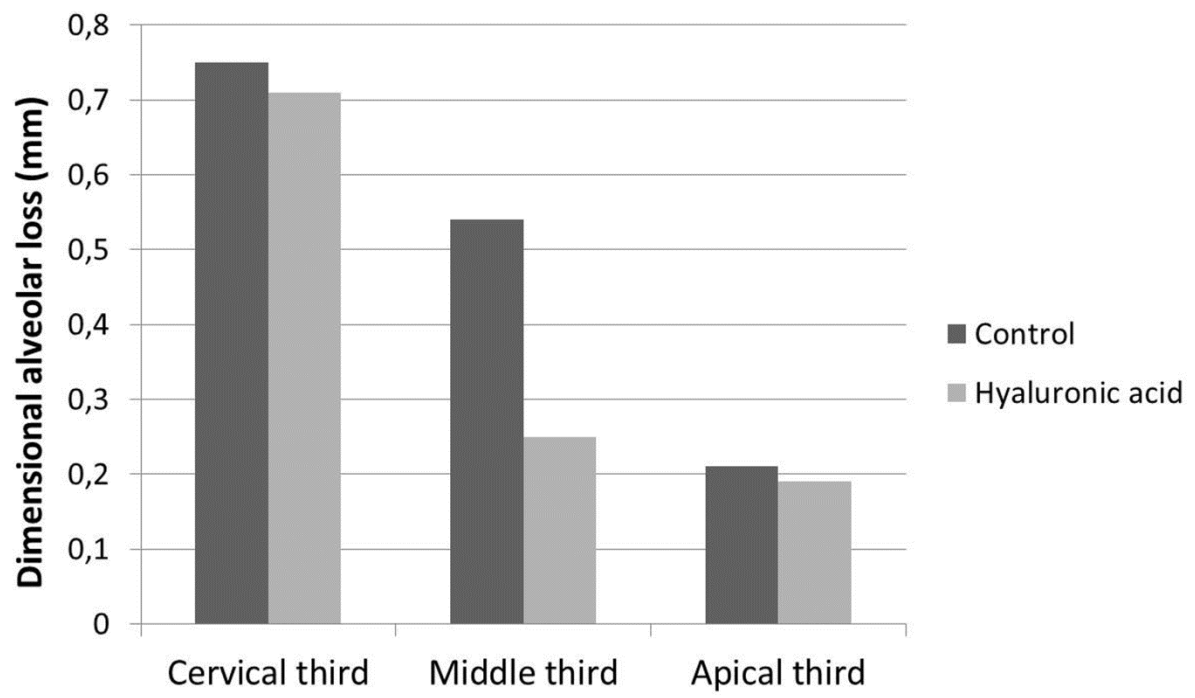
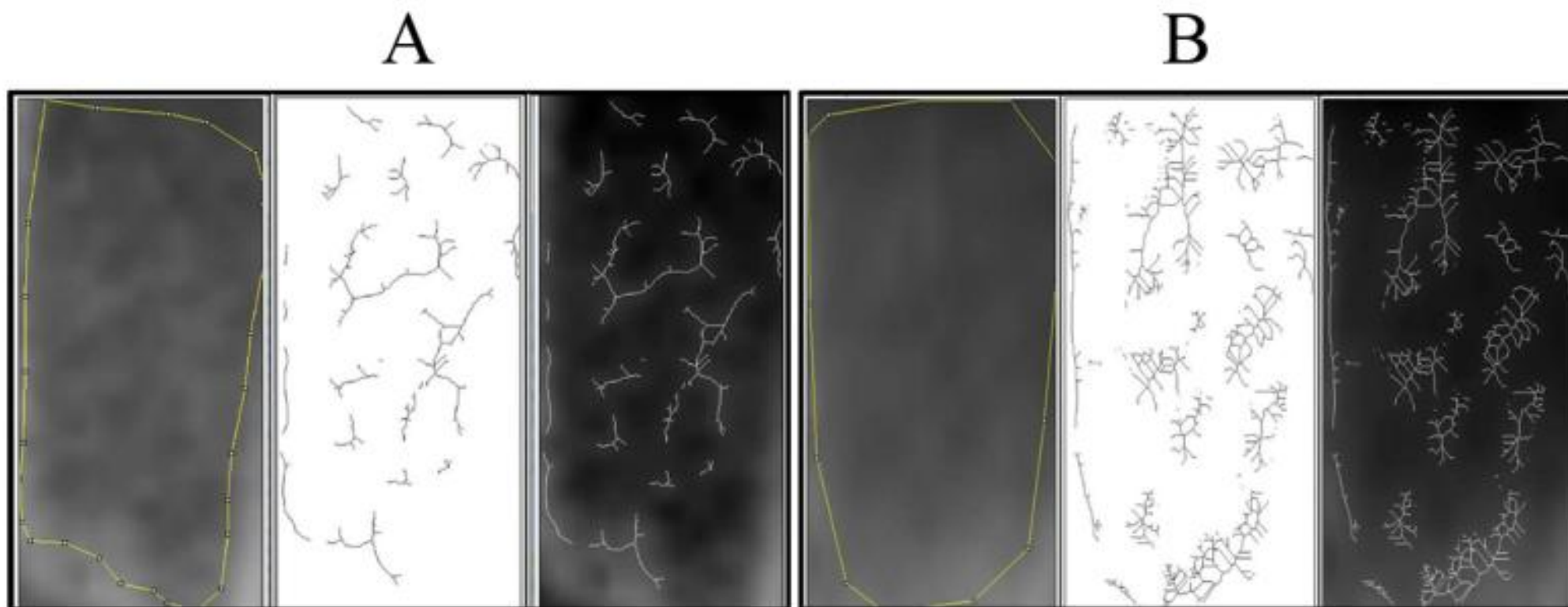
Figure 4:

Figure 5:



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O AH apresenta uma variedade de aplicações clínicas na atualidade. Estudos laboratoriais *in vitro* e experimentos com animais demonstraram que ele apresenta capacidade de induzir a neoformação óssea. Entretanto, até o momento, sua aplicabilidade clínica em Odontologia é pouco explorada. O presente estudo é o primeiro a avaliar a eficácia do AH, em relação ao reparo ósseo, em alvéolos dentais em humanos.

Existem diversos materiais e estratégias de enxertos usados atualmente na Odontologia, entretanto um biomaterial ideal ainda não existe. O AH apresenta propriedades osteoindutoras e biocompatibilidade, uma vez que o mesmo está presente naturalmente nos tecidos do corpo. Sendo assim, ele pode ser potencialmente útil para o reparo de defeitos teciduais ósseos, acelerando a formação e deposição de matriz óssea.

O nosso estudo indica que o AH pode representar um potencial biomaterial para o reparo ósseo em humanos. Foi observada uma maior formação óssea nos alvéolos tratados com AH imediatamente após a exodontia. Áreas da Odontologia como a Implantodontia, Cirurgia e Periodontia que utilizam de estratégias como regeneração óssea guiada, enxertos ósseos e biomateriais podem se beneficiar do uso do AH.

Futuros estudos clínicos em humanos que envolvam tanto o diagnóstico radiográfico da neoformação óssea quanto avaliação histológica podem trazer mais informações acerca da capacidade osteoindutora desse material. Além disso, a utilização do AH associado a outros materiais que auxiliem na preservação alveolar pode se tornar uma excelente estratégia não só para a preservação óssea alveolar, mas também como material de enxerto.

7 CONCLUSÃO

Houve uma maior porcentagem de neoformação óssea nos alvéolos tratados com AH e esses alvéolos apresentaram valores de dimensão fractal maiores um mês após a exodontia. Em relação às alterações dimensionais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os alvéolos tratados e os controles. Esses achados indicam que o AH representa um potencial biomaterial para o reparo ósseo de alvéolos dentais humanos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberts B et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 1463p.
2. Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;132(4):592-597.
3. Aslan M, Simsek G, Dayi E. The effect of hyaluronic acid-supplemented bone graft in bone healing: experimental study in rabbits. *J Biomater Appl*. 2006;20(3):209-220.
4. Bae MS, Ohe JY, Lee JB, Heo DN, Byun W, Bae H, Kwon YD, Kwon IK. Photo-cured hyaluronic acid-based hydrogels containing growth and differentiation factor 5 (GDF-5) for bone tissue regeneration. *Bone*. 2014;59:189–198.
5. Bertl K, Bruckmann C, Isberg PE, Klinge B, Gottfredsen K, Stavropoulos A. Hyaluronan in non-surgical and surgical periodontal therapy: A systematic review. *J Clin Periodontol*. 2015;42:236–246.
6. Bollen AM, Taguchi A, Hujoel PP, Hollender LG. Fractal dimension on dental radiographs. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001;30(5):270–275.
7. Briguglio F, Briguglio E, Briguglio R, Cafiero C, Isola G. Treatment of infrabony periodontal defects using a resorbable biopolymer of hyaluronic acid: a randomized clinical trial. *Quintessence Int*. 2013;44(3):231-240.
8. de Brito Bezerra B, Mendes Brazao MA, de Campos ML, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW. Association of hyaluronic acid with a collagen scaffold may improve bone healing in critical-size bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2012;23:938–942.

9. Caligiuri P, Giger ML, Favus M. Multifractal radiographic analysis of osteoporosis. *Med Phys*. 1994;21:503–8
10. Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, Boudignon B, Burghardt A, Kurimoto P, Wronski TJ, Bourguignon LY, Halloran BP. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res*. 2005;20:30–40.
11. Carlson GA, Dragoo JL, Samimi B, Bruckner DA, Bernard GW, Hedrick M, Benhaim P. Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;321:472–478.
12. Chen SK, Oviir T, Lin CH, Leu LJ, Cho BH, Hollender L. Digital imaging analysis with mathematical morphology and fractal dimension for evaluation of periapical lesions following endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(4):467–472.
13. David-Raoudi M, Tranchepain F, Deschrevel B, Vincent JC, Bogdanowicz P, Boumediene K, et al. Differential effects of hyaluronan and its fragments on fibroblasts: relation to wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(2):274-287.
14. Dechert TA, Ducale AE, Ward SI, Yager DR. Hyaluronan in human acute and chronic dermal wounds. *Wound Repair Regen*. 2006;14(3):252-258.
15. Degidi M, Nardi D, Daprile G, Piattelli A. Buccal bone plate in the immediately placed and restored maxillary single implant: a 7-year retrospective study using computed tomography. *Implant Dent*. 2012;21(1):62-66.
16. Devlin H, Sloan P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31(6):641-645.
17. Docherty-Skoggh AC, Bergman K, Waern MJ, Ekman S, Hultenby K, Ossipov D, Hilborn J, Bowden T, Engstrand T. Bone morphogenetic protein-2 delivered

by hyaluronan-based hydrogel induces massive bone formation and healing of cranial defects in minipigs. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125:1383–1392.

18. Eick S, Renatus A, Heinicke M, Pfister W, Stratul SI, Jentsch H. Hyaluronic Acid as an adjunct after scaling and root planing: a prospective randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2013;84(7):941-9.
19. Engström-laurent A. Hyaluronan in joint disease. *J Intern Med*. 1997;242(1):57-60.
20. Entwistle J, Hall CL, Turley EA. HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem*. 1996;61:569–577.
21. Fawzy El-Sayed KM, Dahaba MA, Aboul-Ela S, Darhous MS. Local application of hyaluronan gel in conjunction with periodontal surgery: a randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1229-1236.
22. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242(1):27-33.
23. Giavaresi G, Torricelli P, Fornasari PM, Giardino R, Barbucci R, Leone G. Blood vessel formation after soft-tissue implantation of hyaluronan-based hydrogel supplemented with copper ions. *Biomaterials*. 2005;26(16):3001-3008.
24. Gocmen G, Gonul O, Oktay NS, Yarat A, Goker K. The antioxidant and anti-inflammatory efficiency of hyaluronic acid after third molar extraction. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015;43(7):1033-1037.
25. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*. 2001;22(17):2417-24.

26. Hall CL, Wang C, Lange LA, Turley EA. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol.* 1994;126:575–588.
27. Itoh S, Matubara M, Kawauchi T, Nakamura H, Yukitake S, Ichinose S, et al. Enhancement of bone ingrowth in a titanium fiber mesh implant by rhBMP-2 and hyaluronic acid. *J Mater Sci Mater Med.* 2001;12(7):575-581.
28. Jekel JF, Katz DL, Elmore JG. *Epidemiology, biostatistics, and preventive medicine.* (2nd ed.). Elsevier: Atlanta, USA, 2001.
29. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Gocke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol.* 2003;30:159–164.
30. Kang JH, Kim YY, Chang JY, Kho HS. Influences of hyaluronic acid on the anticandidal activities of lysozyme and the peroxidase system. *Oral Dis.* 2011;17:577–583.
31. Kim JJ, Song HY, Ben Amara H, Kyung-Rim K, Koo KT. Hyaluronic Acid Improves Bone Formation in Extraction Sockets With Chronic Pathology: A Pilot Study in Dogs. *J Periodontol.* 2016 Mar 18:1-13. [Epub ahead of print]
32. Koh KJ, Park HN, Kim KA. Prediction of age-related osteoporosis using fractal analysis on panoramic radiographs. *Imaging Sci Dent.* 2012;42(4):231-235.
33. Koray M, Ofluoglu D, Onal EA, Ozgul M, Ersev H, Yaltirik M, Tanyeri H. Efficacy of hyaluronic acid spray on swelling, pain, and trismus after surgical extraction of impacted mandibular third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014;43(11):1399-1403.
34. Juhlin L. Hyaluronan in skin. *J Intern Med.* 1997;242(1):61-66.

35. Lalani Z, Wong M, Brey EM, Mikos AG, Duke PJ, Miller MJ. Spatial and temporal localization of FGF-2 and VEGF in healing tooth extraction sockets in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(10):1500-1508.
36. Lekic P, Rubbino I, Krasnoshtein F, Cheifetz S, Mcculloch CAG, Tenenbaum H. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. *Anat Rec.* 1997;247:329-340.
37. Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, Nicoli AN, 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.* 2002;23(4):1043-1051.
38. Loveless TP, Kilinc Y, Altay MA, Flores-Hidalgo A, Baur DA, Quereshy FA. Hounsfield unit comparison of grafted versus non-grafted extraction sockets. *J Oral Sci.* 2015;57(3):195-200.
39. Martinez-Sanz E, Varghese OP, Kisiel M, Engstrand T, Reich KM, Bohner M, Jonsson KB, Kohler T, Muller R, Ossipov DA, Hilborn J. Minimally invasive mandibular bone augmentation using injectable hydrogels. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6(Suppl 3):s15–s23.
40. Mendes RM, Silva GA, Lima MF, Calliari MV, Almeida AP, Alves JB, et al. Sodium hyaluronate accelerates the healing process in tooth sockets of rats. *Arch Oral Biol.* 2008;53(12):1155-1162.
41. Mendes RM, Silva GA, Caliari MV, Silva EE, Ladeira LO, Ferreira AJ. Effects of single wall carbon nanotubes and its functionalization with sodium hyaluronate on bone repair. *Life Sci.* 2010;87:215–222.
42. Miranda SC, Silva GA, Mendes RM, Abreu FA, Caliari MV, Alves JB, Goes AM. Mesenchymal stem cells associated with porous chitosan-gelatin scaffold: a potential strategy for alveolar bone regeneration. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100(10):2775-2786.

43. Moseley R, Leaver M, Walker M, Waddington RJ, Parsons D, Chen WY, et al. Comparison of the antioxidant properties of HYAFF-11p75, AQUACEL and hyaluronan towards reactive oxygen species in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(10):2255-2264.
44. Pasquinelli G, Orrico C, Foroni L, Bonafè F, Carboni M, Guarnieri C, et al. Mesenchymal stem cell interaction with a non-woven hyaluronan-based scaffold suitable for tissue repair. *J Anat*. 2008;213(5):520-30.
45. Patterson J, Siew R, Herring SW, Lin AS, Guldberg R, Stayton PS. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*. 2010;31:6772–6781.
46. Pilloni A, Bernard GW. The effect of hyaluronan on mouse intramembranous osteogenesis in vitro. *Cell Tissue Res*. 1998;294(2):323-333.
47. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:33–45.
48. Prince CW. Roles of hyaluronan in bone resorption. *BMC Musculoskelet Disord*. 2004;5:12.
49. Raines AL, Sunwoo M, Gertzman AA, Thacker K, Guldberg RE, Schwartz Z, Boyan BD. Hyaluronic acid stimulates neovascularization during the regeneration of bone marrow after ablation. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96:575–583.
50. Rasubala L, Yoshikawa H, Islam AAS, Nagata K, Lijima T, Ohishi A. Comparison of the healing process in plated and non-plated fractures of the mandible in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2004;42(4):315-322.
51. Romeo U, Libotte F, Palaia G, Galanakis A, Gaimari G, Tenore G, Del Vecchio A, Polimeni A. Oral soft tissue wound healing after laser surgery with or

without a pool of amino acids and sodium hyaluronate: a randomized clinical study. *Photomed Laser Surg.* 2014;32(1):10-16.

52. Sanchez-Molina D, Velazquez-Ameijide J, Quintana V, Arregui-Dalmases C, Crandall JR, Subit D, Kerrigan JR. Fractal dimension and mechanical properties of human cortical bone. *Med Eng Phys.* 2013;35(5):576-582.

53. Schulz KF, Altman DG, Moher D; CONSORT Group. CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC Med.* 2010;8:18.

54. Sasaki T, Watanabe C. Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone.* 1995;16(1):9-15.

55. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, Delisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36770-36778.

56. Shyng YC, Devlin H, Riccardi D, Sloan P. Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Arch Oral Biol.* 1999;44(9):751-7.

57. Siqueira Jr JF, Dantas CJS. *Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação.* Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 238p.

58. Sindeaux R, Figueiredo PT, de Melo NS, Guimarães AT, Lazarte L, Pereira FB, de Paula AP, Leite AF. Fractal dimension and mandibular cortical width in normal and osteoporotic men and women. *Maturitas.* 2014;77(2):142-148.

59. Teófilo JM, Brentegani LG, Carvalho TL. A histometric study in rats of the effect of the calcium antagonist amlodipine on bone healing after tooth extraction. *Arch Oral Biol.* 2001;46(4):375-379.

60. Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease - minireview. *J Biol Chem.* 2002;277(7):4593-4596.
61. Toole BP. Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:528–539.
62. Torres SR, Chen CS, Leroux BG, Lee PP, Hollender LG, Schubert MM. Fractal dimension evaluation of cone beam computed tomography in patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2011;40(8):501-505.
63. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LY. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem.* 2002;277:4589–4592.
64. White SC, Rudolph DJ. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88(5):628-635.
65. Yeom J, Hwang BW, Yang DJ, Shin H-I, Hahn SK. Effect of osteoconductive hyaluronate hydrogels on calvarial bone regeneration. *Biomater Res.* 2014;18:1–6.
66. Yugoshi LI, Sala MA, Brentegani LG, Lamano Carvalho TL. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. *Braz Dent J.* 2002;13(2):92-96.
67. Zhao N, Wang X, Qin L, Zhai M, Yuan J, Chen J, Li D. Effect of hyaluronic acid in bone formation and its applications in dentistry. *J Biomed Mater Res A.* 2016;104(6):1560-1569.

9 ANEXOS

9.1 – ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0328.0.203.000-10

Interessado(a): Prof. Anderson José Ferreira
Departamento de Morfologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP analisou e aprovou, no dia 24 de setembro de 2012, o atendimento às recomendações da CONEP do projeto de pesquisa intitulado "**Uso do Hialuronato de Sódio como uma estratégia terapêutica para reparos ósseos em humanos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

9.2 ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Identificação do Projeto de Pesquisa
Título do Projeto: Uso do Hialuronato de Sódio como uma Estratégia Terapêutica para Reparos Ósseos em Humanos
Área do Conhecimento: Odontologia
Curso: Odontologia
Patrocinador da pesquisa: CNPq
Instituição onde será realizada: Universidade Federal de Minas Gerais
Nome dos pesquisadores: Anderson José Ferreira, Renato de Melo Mendes e Carlos Eduardo Pinto de Alcântara

Eu, Carlos Eduardo Pinto de Alcântara, responsável pelo projeto de pesquisa acima identificado juntamente com o Prof. Anderson José Ferreira e o Dr. Renato de Melo Mendes, convido você para participar deste projeto. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos realizando:

Eu, _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar ou que meu filho(a) participe como voluntário(a) do projeto de pesquisa acima identificado. Discuti com o pesquisador responsável sobre a minha decisão em participar e estou ciente que:

1. Justificativa da pesquisa:

Pesquisas realizadas na área médica mostram que um produto, chamado de hialuronato de sódio, quando aplicado sobre feridas acelera a sua cicatrização. A injeção de um gel de hialuronato de sódio, realizada por ortopedistas, também ajuda a melhorar problemas de articulação. Em pesquisas que fizemos com animais de laboratório, vimos que o gel de hialuronato de sódio acelera a cicatrização do osso após a extração dos dentes. Mas, apesar do gel já ser usado em outras especialidades da Medicina, nenhuma pesquisa foi feita em Odontologia colocando o gel na cavidade que fica após a extração dos dentes.

2. Objetivo da pesquisa:

Uma vez que o gel ainda não foi testado em Odontologia, o objetivo desta pesquisa é avaliar os efeitos do gel de hialuronato de sódio depois de colocado na cavidade produzida após a extração dos dentes. Para realizar esta pesquisa, precisamos de pessoas que tenham boa saúde geral e dos dentes e que precisam extrair dois dentes pré-molares. Você ou seu filho(a) foi selecionado(a) porque o seu ortodontista, após o planejamento do seu tratamento, concluiu que a melhor opção para o seu tratamento de aparelho fixo é através da extração de dentes pré-molares. Portanto, serão extraídos apenas os dentes que o ortodontista indicou.

O ideal é que toda pesquisa seja realizada com voluntários com mais de 18 anos. Seu filho, apesar de ser menor de idade, está sendo convidado a participar desta pesquisa porque precisamos de pacientes que necessitam extrair dois pré-molares, sem cáries ou problemas de gengiva, sendo um de cada lado da boca. Normalmente, pacientes que precisam extrair estes dois dentes são pacientes de ortodontia e menores de idade.

3. Procedimentos a serem realizados:

Numa primeira consulta farei uma limpeza e polimento dos dentes para remoção de cálculo dentário, bem como serão ensinadas formas de higienização. Numa segunda consulta, vou extrair os pré-molares que o ortodontista pediu para retirar. Em seguida, vou colocar um gel de hialuronato de sódio em uma das cavidades. Não vou lhe informar, no dia da cirurgia, em qual cavidade vou colocar o gel, pois os voluntários não podem saber qual lado foi tratado, para que a pesquisa tenha valor. Depois, eu vou remover os pontos sete dias após as extrações. No final da pesquisa, eu vou lhe informar todos os resultados: se o lado tratado foi melhor ou pior que o outro. Para ver se houve diferença na cicatrização entre a cavidade tratada e a não tratada serão realizadas tomografias, radiografias e fotos apenas da região dos dentes extraídos com 30 e 90 dias após a cirurgia.

4. Benefícios esperados com a pesquisa:

Sempre que extrai um dente, forma osso na cavidade. Esperamos que o gel acelere a formação de osso. Caso melhore a cicatrização, podemos usar o gel em Odontologia em todos os pacientes que precisam extrair dentes. Diminuir o tempo de cicatrização pode acelerar o tratamento de ortodontia e até mesmo para a colocação de implantes dentários. De toda forma, a tomografia vai mostrar se melhorou ou não a formação de osso.

5. Desconfortos esperados:

Toda extração causa um desconforto após a cirurgia. A colocação de um gel na cavidade não aumenta ou diminui esse desconforto. De toda forma, eu vou lhe receitar um analgésico (remédio contra dor), chamado de Paracetamol, para que seja tomado por 2 dias. Caso tenha qualquer dor ou dúvida após as extrações deve me comunicar imediatamente para que eu avalie e indique mais analgésico ou outro medicamento. Meu telefone de contato é (33) 91329696 e o telefone do Dr. Renato de Melo Mendes é (31) 3223-3035.

6. Possíveis riscos:

Vamos colocar o gel em uma das cavidades e esperamos que ele acelere a cicatrização. Entretanto, pode ser que por algum motivo o gel não modifique em nada a cicatrização ou até mesmo dificulte a cicatrização. Lembro que outras especialidades médicas usam o produto e já fizemos vários testes após a extração de dentes com animais de laboratório. Mesmo assim, caso tenha qualquer problema de cicatrização ou de saúde, a pesquisa será interrompida imediatamente.

Uma desvantagem das radiografias periapicais digitais e das tomografias computadorizadas é a utilização de radiação X. A principal característica deste tipo de radiação é que ela é ionizante, ou seja, tem a capacidade de arrancar elétrons dos átomos por onde passa. Isto pode ter um efeito negativo sobre as células, sobretudo pela capacidade de causar mutações genéticas, visível principalmente naquelas que se multiplicam rapidamente. Embora o risco de se desenvolverem anomalias seja muito baixo, será de extrema importância que as exposições à radiação ionizante sejam controladas de forma adequada, seguindo as normas de proteção radiológica. Além disso, no nosso protocolo você realizará os exames apenas 1 e 3 meses após os procedimentos cirúrgicos, o que diminui sensivelmente os riscos inerentes à exposição à

radiação pelos exames radiográficos e tomográficos.

A pesquisa será suspensa imediatamente caso percebamos que tenha algum risco à sua saúde, mesmo que este risco não tenha sido previsto anteriormente.

7. Despesas:

A sua participação é isenta de despesas. As extrações, analgésicos, tomografias, radiografias, fotos e quaisquer medicamentos ou tratamentos médicos que precisar realizar, por problema causado pelas extrações ou por ter colocado o gel, serão pagos por mim, Dr. Renato de Melo Mendes.

8. Divulgação dos resultados:

Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas ao participar da pesquisa você, desde já, concorda que os resultados sejam divulgados em publicações científicas. Nenhuma informação sobre seus dados pessoais será divulgada em hipótese alguma. Você receberá, por escrito, ao final dos testes, todos os resultados da pesquisa, antes que qualquer dado seja publicado.

9. Desistência durante a pesquisa:

Durante toda a pesquisa, a qualquer hora, você tem o direito de pedir qualquer esclarecimento, em função de qualquer dúvida que tenha. Pode inclusive desistir no momento que quiser sem causar nenhum prejuízo à sua saúde ou bem estar físico. Você pode cancelar este consentimento que está assinando sem a necessidade de me dar qualquer explicação. Mesmo que desista de participar da pesquisa, você não terá que arcar com nenhum custo e continuará a ter direito de fazer os tratamentos médicos e aos remédios, se tiver tido algum problema causado pela pesquisa.

10. Assistência em caso de danos:

Caso você venha a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento, desde que seja exclusivamente resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, você tem direito à indenização. Assim, assumo toda a responsabilidade de lhe dar assistência integral caso tenha alguma complicação ou dano decorrentes da pesquisa.

11. Contatos em caso de dúvidas:

Você poderá consultar os pesquisadores responsáveis e o COEP/UFMG (Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG), sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo. Os telefones de contato dos pesquisadores são os seguintes: (33) 91329696 (Dr. Carlos Eduardo Pinto de Alcântara), (31) 3409-2811 (Dr. Anderson José Ferreira) e (31) 3223-3035 (Dr. Renato de Melo Mendes). O endereço do COEP é Unidade Administrativa II, 2º andar, sl 2005, Campus Pampulha – Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte MG CEP 31.270-901 Tel (31) 3409-4592.

Você, abaixo assinado, declara que obteve todas as informações necessárias e esclarecimentos quanto às dúvidas que por você foram apresentadas e, por estar de acordo, assina o presente documento em duas vias de igual teor (conteúdo) e forma, ficando uma em minha posse e outra em sua. Todas as folhas do Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) deverão ser rubricadas pelo participante da pesquisa e pelo pesquisador acrescido de suas assinaturas na última página do referido Termo.

Belo Horizonte, _____ de _____ de _____.

2. Identificação do Sujeito da Pesquisa	
Nome:	
Data de Nascimento:	Nacionalidade:
Estado Civil:	Profissão:
CPF/MF:	RG:
Endereço:	
Telefone:	E-mail:

Pesquisador Responsável pelo Projeto

Sujeito da pesquisa e/ou responsável

Pesquisador Responsável pelo Projeto

Testemunhas:

Nome:
RG:
CPF/MF:
Telefone:

Nome:
RG:
CPF/MF:
Telefone:

10 PRODUÇÃO INTELECTUAL DESENVOLVIDA DURANTE O CURSO

10.1 Resumos publicados em anais de congresso

10.1.1 NORONHA, MS; ALCÂNTARA, CE; MESQUITA, RA. Reação de corpo estranho a material de preenchimento labial à base de ácido hialurônico: relato de caso. In: XXI JORNADA MINEIRA DE ESTOMATOLOGIA, 2014, Belo Horizonte. Anais da XXI JORNADA MINEIRA DE ESTOMATOLOGIA, 2014.

10.1.2 ALCÂNTARA, CE; MENDES, RM; MARTINS-JUNIOR, PA; SA, MA; CALIARI, MV; PRETTI, H; MESQUITA, RA; FERREIRA AJ. Uso do ácido hialurônico no reparo ósseo de alvéolos dentais humanos: um ensaio clínico randomizado, triplo-cego, boca dividida. Anais da 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Odontologia, 2014, 2014. v. 28. p. 301.

10.2 Artigo publicado

MARTINS-JÚNIOR PA, ALCÂNTARA CE, RESENDE RR, FERREIRA AJ. Carbon nanotubes: directions and perspectives in oral regenerative medicine. J Dent Res. 2013 Jul;92(7):575-83.

10.3 Artigo submetido para publicação

Granulomatous reaction to hyaluronic acid filler material in oral and perioral region: a case report and review of literature. Journal of Cosmetic Dermatology