



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

**LUAN PIER BENETTI**

**Análise histomorfométrica do processo de reparo ósseo de  
cavidades cirúrgicas recobertas por membrana biológica de  
origem bovina liofilizada em tíbia de ratos diabéticos e diabéticos  
controlados.**

**Araçatuba**

**2016**

**LUAN PIER BENETTI**

**Análise histomorfométrica do processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas recobertas por membrana biológica de origem bovina liofilizada em tíbia de ratos diabéticos e diabéticos controlados.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”–UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

**Orientadora:** Prof. Ass. Dra. Alessandra Marcondes Aranega.

**Araçatuba – SP**

**2016**

*Dedicatória*

À minha família que acreditou e seguiu junto a mim durante toda minha vida e minha formação como pessoa. Toda gratidão a eles.

Aos meus amigos de longa data que estão presentes em minha vida até hoje Camila Trivia, Renata Pedro, Bruna Guedes, José Rodrigo, Lucas Félix, Luan Oliveira e Felipe Augusto. Amigos verdadeiros!

Aos amigos da faculdade por toda a parceria e companheirismo em momentos de estudos distrações Ana Maria, Adriane Seolin, Michelle Kuhn, Jéssica de Andrade, Denis Cetrangolo, Tiago Amorim e Guilherme Ramires. Devo parte de minha formação profissional e pessoal a estes.

À Natália Menin, amiga e namorada, por todo o carinho e apoio, vivenciando comigo uma importante etapa da minha vida.

À professora Alessandra. Obrigado pelo ensinamento, competência, dedicação, puxões de orelha, respeito, por ter sido realmente PROFESSORA. Me sinto extremamente honrado e feliz em ter sido seu aluno orientado.

# *Agradecimientos*

# **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP e todo o seu corpo docente e funcionários, que contribuem significativamente para a nossa formação.

À minha orientadora Professora Dra. Ass. Alessandra Marcondes Aranega, que me iniciou e incentivou em 2 trabalhos científicos e no CIRPAC. Foi a pessoa fundamental para minha formação diferenciada em Odontologia com ênfase na cirurgia.

Também agradeço imensamente aos professores Francisley Ávila Sousa, Daniela Ponzoni, Ana Paula Bassi, Leonardo Faverani, Daniela Brandini, Letícia Helena Theodoro e Juliano Milanezi de Almeida, que participaram de todos os meus trabalhos de iniciação científica com toda cordialidade, contribuindo com seu conhecimento e mostrando-se sempre à disposição.

Aos alunos da pós-graduação pelo apoio e companheirismo em meus projetos de iniciação científica.

Aos técnicos de Laboratório de Cirurgia e Clínica Integrada Paulo e Marco e ao secretário do departamento Renato, agradeço por toda ajuda e dedicação.

“Faça o que você puder, onde você está e com o que você tem”

*Theodore Roosevelt*

*Resumo*

**BENETTI, L.P.: Análise histomorfométrica do processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas recobertas por membrana biológica de origem bovina liofilizada em tibia de ratos diabéticos e diabéticos controlados.** Trabalho de Conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

O objetivo deste trabalho foi analisar qualitativa e quantitativamente o comportamento das membranas de matriz óssea bovina liofilizada no processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas em tíbias de ratos diabéticos e diabéticos controlados. Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com aproximadamente 250 gramas, sendo divididos em 3 grupos. O grupo I (controle) recebeu inoculação endovenosa de tampão citrato a 0,01M, pH 4,5, o grupo II (diabético) recebeu estreptozotocina dissolvida no tampão citrato, em uma concentração de 35mg/Kg, e o grupo III (diabético controlado), além da estreptozotocina, recebeu 3 unidades de insulina diariamente para o controle da glicemia. Após controle glicêmico, os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, sendo que a cavidade da direita foi preenchida com coágulo e a da esquerda foi preenchida com coágulo e recoberta com a membrana bovina liofilizada. Os tempos de estudo foram de 10 e 30 dias pós-operatórios. Após análise histológica e histométrica observou-se que os grupos diabéticos apresentaram persistente infiltrado inflamatório, menor organização osteoblástica e muitos vasos sanguíneos nos períodos iniciais da reparação. A neoformação óssea foi mais tardia no grupo diabético não controlado aos 30 dias quando comparada aos demais grupos no mesmo período. Concluiu-se que a presença da membrana atrasou de forma discreta o processo de reparo, especialmente nos grupos diabéticos, embora não fossem encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A membrana cumpriu o seu papel dentro da regeneração óssea guiada em todos os grupos estudados, uma vez que houve um aumento no contorno da tibia.

**PALAVRAS-CHAVE:** Diabetes mellitus, regeneração óssea guiada, membrana biológica.

*Abstract*

**BENETTI, L.P.: Histomorphometric analysis of the bone healing process of surgical cavities coated with biological membrane of lyophilized bovine in the tibia of diabetic rats and controlled diabetics.** Trabalho de Conclusão de curso (Bachalorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

The objective of this study was to analyze qualitatively and quantitatively the behavior of lyophilized bovine bone matrix membranes on bone healing process of surgical cavities in the tibia of diabetic rats and controlled diabetics. 48 rats (*Rattus norvegicus Albinus*, Wistar rats), with approximately 250 grams were divided into 3 groups. Group I (control) received intravenous injection of 0.01M citrate buffer, pH 4.5, group II (diabetes) received streptozotocin dissolved in citrate buffer, at a concentration of 35mg / kg and group III (controlled diabetic ), as well as streptozotocin, received 3 units of insulin daily to control blood glucose. After glycemic control, the animals were submitted to surgical procedures, and the cavity was filled with the right and left clot was filled with blood clot and covered with lyophilized bovine membrane. Study times were 10 and 30 days postoperatively. After histologic and histometric observed that diabetics group had persistent inflammatory infiltration osteoblastic organization and many smaller blood vessels in the early repair periods. The bone formation was delayed in the diabetic group not controlled at 30 days compared to the other groups in the same period. It was concluded that the presence of the membrane delayed discretely the repair process, especially in diabetic groups, although not statistically significant differences between groups. The membrane has fulfilled its role within the guided bone regeneration in all groups, since there was an increase in the contour of the tibia.

**Key-Words:** Diabetes mellitus, guided bone regeneration, biological membrane.

# *Sumário*

## Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>Introdução e Justificativa .....</b>	<b>14</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>18</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>20</b>
Grupo Experimental .....	21
Procedimento Cirurgico.....	22
Eutanásia dos grupos e processamento das amostras coletadas .....	23
Forma de análise dos resultados.....	24
Análise Histológica.....	24
Análise Histométrica.....	25
Análise Estatística .....	25
<b>Resultados.....</b>	<b>26</b>
Resultados Histológicos .....	27
Resultados Histométricos .....	31
<b>Discussão .....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>37</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>39</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>39</b>

*Introdução e  
Justificativa*

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O comprometimento da estrutura, função e estética do arco dental pode ser decorrente de manifestações patológicas como cistos, neoplasias, procedimentos cirúrgicos e de deformação ou reabsorção do rebordo alveolar causados por traumas ou extrações dentais (SCHEPERS *et al.*, 1993). Diversas são as possibilidades relatadas na literatura para a reconstrução dos defeitos e deformidades ósseas dentro da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (ESTEVES *et al.*, 2008, MARIANO *et al.*, 2010,). Dentre elas citam-se os enxertos autógenos, alógenos, xenógenos e os implantes aloplásticos, sem ou com a utilização das membranas para obtenção da regeneração óssea guiada.

A terapia por meio da regeneração tecidual guiada para o restabelecimento de defeitos ósseos indica que a combinação de barreiras e dos materiais implantados resultam, predominantemente, em reparo ósseo. (SCULEAN *et al.*, 2008)

As membranas biológicas, podendo ser reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, devem ser biocompatíveis, impermeáveis às células, ter boa integração com os tecidos hospedeiros, ter facilidade de manipulação clínica e rigidez para que seja evitada a sua invaginação para o interior da ferida, mantendo espaço adequado para a regeneração abaixo dela (SCHENK *et al.* 1994).

Embora o melhor material documentado ainda seja o politetrafluoretileno expandido (e-PTEE) (DAHLIN, 1996), por ser inerte, ser artificialmente produzido, por não necessitar de animal ou área doadora, por não provocar intensa resposta inflamatória inicial, (LEKOVIC *et al.*, 1998), ainda é uma membrana não absorvível que necessita ser removida em um segundo momento cirúrgico. Dentre as membranas reabsorvíveis destacam-se as membranas ósseas bovinas de colágeno (TAKATA *et al.*, 2001, MOSES *et al.*, 2008) ou de cortical óssea desmineralizada (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Preparados ósseos de origem bovina e humana têm sido atualmente desmineralizados, conservados (FEIGHAN *et al.*, 1995) e comercializados em várias formas para a correção dos defeitos ósseos (ONO *et al.*, 1995, MARTINS *et al.*, 2007; SCULEAN *et al.*, 2008), mas ainda há dúvidas com relação ao emprego dos materiais implantados em organismos com a presença de alterações sistêmicas.

O Diabetes Mellitus é uma doença causada por um transtorno metabólico complexo e primário dos carboidratos, na qual há incapacidade de se oxidar a glicose, envolvendo, secundariamente, o metabolismo de lipídeos e proteínas (COTRAN *et al*, 2000).

Com a alteração do metabolismo das proteínas, há uma queda na produção do colágeno pelos fibroblastos, alterando a força estrutural e tensional dos ferimentos em cicatrização (FAHEY *et. al.*, 1991). A formação de novos capilares e a atividade bacteriana dos polimorfonucleares também são prejudicadas (CUTLER *et al.*, 1991; TERRANOVA, 1991, ESTEVES *et al*, 2008). O difícil controle da cicatrização das feridas cirúrgicas no estado diabético está diretamente relacionado à presença de microangiopatia, acidez, hiperglicemia e fagocitose ineficaz pelos macrófagos e aumento de atividade da colagenase.

O Diabetes mellitus produz acentuado atraso na reparação tecidual (DEVLIN *et al*, 1996, ESTEVES *et al*, 2008, RICIERY *et al.*, 2009), devido a uma deficiência na proliferação fibroblástica, osteoblástica e conseqüentes reflexos na produção de substância fundamental amorfa, fibras colágenas e matriz orgânica.

A deficiência insulínica pode restringir a atividade osteoblástica e osteoclástica da área em reparação, no entanto, a administração da insulina em organismo diabético, compensando os seus níveis glicêmicos, pode prevenir e reverter os efeitos na produção protéica, melhorando o metabolismo do tecido conjuntivo (UMPIERREZ *et al*, 1989)

Embora se conheça que o processo de reparo de uma ferida cirúrgica óssea ocorre, mesmo com atraso, no estado diabético (DEVLIN *et al*, 1996, ESTEVES *et al*, 2008, RICIERY *et al.*, 2009, RETZEPI *et al.*, 2010), grandes mudanças poderão acontecer nas fases de revascularização, incorporação, substituição e remodelação com relação às descritas por Anderson *et al.* (1964), alterando o contorno, densidade e estrutura óssea da área em processo de reparação, especialmente quando são utilizadas membranas com objetivo de regeneração óssea guiada (RETZEPI *et al.*, 2010).

Preparados ósseos de origem bovina e humana têm sido desmineralizados, conservados (FEIGHAN *et al.*, 1995; VAIL *et al.*, 1994) e comercializados em várias formas para a correção dos defeitos ósseos em cirurgia e traumatologia craniomaxilofacial (DUPOIRIEUX *et al.*, 1994, LYTLE, 1994), mas ainda são poucos os estudos experimentais empregando a membrana biológica de origem bovina liofilizada em ratos diabéticos para essa finalidade.

Diante disso, torna-se relevante avaliar, em nível de microscopia óptica, o comportamento da membrana biológica de origem bovina liofilizada em área óssea sob

processo de reparação de animais portadores da enfermidade sistêmica conhecida como Diabetes mellitus, sendo eles controlados ou não pela ação da insulina.

*Objetivo*

## **2. OBJETIVO**

A proposta deste estudo foi analisar qualitativa e quantitativamente o comportamento da membrana de matriz óssea bovina liofilizada no processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas em tibia de ratos controles e diabéticos controlados ou não pela ação da insulina.

# *Materiais e Métodos*

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. GRUPO EXPERIMENTAL

O projeto delineado foi aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba, conforme Protocolo 0004002/2009. (Figura 1 do anexo A)

Para o presente trabalho foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso aproximado de 250 gramas .

Os animais provenientes do Biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, foram transportados ao Biotério do departamento de cirurgia e foram tratados com ração sólida\* e água à vontade durante quase todo o experimento, exceto nos períodos de jejum. (Fig. 1-anexoB)

A permanência dos animais no biotério foi de, no mínimo, 5 dias antes da administração de estreptozotocina (STZ)<sup>†</sup> (Fig 2 – anexo B) e 14-16 horas antecedentes a esta administração todos os animais permaneceram em jejum, sendo mantidos apenas com água.

Os animais foram divididos em 6 grupos, cuja metodologia foi semelhante às preconizadas pelos trabalhos de ARANEGA, 1999 e 2001, ESTEVES *et al.*, 2008 e RICIERI *et al.*, 2009:

Grupo I: Controle: (C), com 8 animais, após jejum de 14-16 horas, o grupo recebeu injeção de tampão citrato a 0,01M<sup>‡</sup> pela via endovenosa, através da veia peniana, caracterizando o grupo controle.

Grupo II: Controle com Membrana (CM), com 8 animais, o qual recebeu a membrana no ato cirúrgico.

Grupo III: Diabético (D), com 8 animais e sob o mesmo jejum do grupo anterior, o grupo recebeu injeção de estreptozotocina. A estreptozotocina foi dissolvida em tampão citrato a 0,01M, ph 4,5, protegida da luz, em uma concentração de 35mg/Kg e injetada na veia peniana dos ratos.

Grupo IV: Diabético com Membrana (DM), com 8 animais.

---

\* Ração ativada Produtor - Anderson & Claiton S.A.

† Sigma-Aldrich

‡ Farmácia Aphoticário – Araçatuba-SP

Grupo V: Diabético Controlado (DC); com 8 animais, o grupo recebeu a insulina de longa duração por via subcutânea, sendo a dose aumentada gradativamente até 3 unidades diárias.

Grupo VI: Diabético Controlado com Membrana (DCM), com 8 animais.

Após cinco dias da indução do diabetes, foi realizado um controle glicêmico de todos os animais. Os do grupo III passaram a receber a insulina, devendo ser realizado um novo controle glicêmico após 10 dias da indução. Outros controles glicêmicos foram sendo realizados semanalmente até a véspera da eutanásia dos grupos, a fim de que fosse constatada a manutenção do estado glicêmico ou o controle do grupo controlado. O controle glicêmico foi instituído por meio da coleta de sangue da calda do animal, sendo os níveis de glicose obtidos por meio do sistema de monitorização automática de glicemia §. Foram considerados no grupo diabético da pesquisa os animais que tiverem glicemia superior a 350mg/dl.

### 3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

No 5º dia após esta administração, todos os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com injeção intramuscular de Xilazina\*\* e Cloridrato de quetamina††, (figura 3 do anexo B) na dosagem recomendada pelo fabricante para a realização dos procedimentos cirúrgicos descritos abaixo:

Inicialmente, foi realizada na região ântero-lateral das tíbias do membro posterior direito e esquerdo dos animais de cada grupo a tricotomia e a anti-sepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI), conforme figura 4 do anexo B.

A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma incisão linear de 15 mm de extensão, no sentido longitudinal de ambos membros posteriores. A incisão foi estendida até o periósteo, permitindo o afastamento dos tecidos em seu sentido látero-lateral (figuras 5 e 6 do anexo B).

Com trefina‡‡ acoplada em baixa-rotação e sob refrigeração com soro fisiológico foi preparada uma cavidade cirúrgica no membro posterior direito e outra no membro posterior esquerdo de aproximadamente 2mm de diâmetro por 2mm de profundidade, na face ântero-lateral. O canal medular foi ser exposto e ambas as cavidades foram preenchidas com coágulo sanguíneo (Figura 7 do anexo B), a esquerda recoberta com

---

§ Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostica Brasil Ltda)

\*\* Xilazina - Coopers. Ltda.

†† Cloridrato de quetamina Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.

‡‡ Trefina de 2mm - Derig®

membrana biológica bovina<sup>§§</sup>, (Figura 8 do anexo B) ambas suturadas com fio de nylon 5.0<sup>\*\*\*</sup>, tomando-se o cuidado para incluir os planos musculares profundos (Figura 9 do anexo B).

Após o procedimento cirúrgico, cada animal recebeu, em dose única, 20.000 U.I. de penicilina G-benzatina<sup>†††</sup> por via intramuscular. (Figura 10 do anexo B).

### 3.3 EUTANÁSIA DOS GRUPOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS COLETADAS

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 10 e 30 dias pós-operatórios por dose excessiva de anestésico, conforme protocolo estabelecido pelo comitê de ética em experimentação animal.

Ambas tíbias de cada animal foram coletadas para obtenção da seguinte amostragem:

**Tabela 1 – Amostragem do grupo de 10 dias**

Código	Grupo	Tratamento	T. eutanásia	Amostras
IC 10	I: Controle	Controle/Coágulo	10 dias	8
ICMB 10	I: Controle	Controle/Membrana Bovina	10 dias	8
IID 10	II: Diabético	Diabético/Coágulo	10 dias	8
IIDMB 10	II: Diabético	Diabético/Membrana Bovina	10 dias	8
IIIDC10	III: DC	DC/Coágulo	10 dias	8
IIIDCMB	III: DC	DC/Membrana Bovina	10 dias	8

**Tabela 2 – Amostragem do grupo de 30 dias**

Código	Grupo	Tratamento	T. eutanásia	Amostras
IC 30	I: Controle	Controle/Coágulo	30 dias	8
ICMB 30	I: Controle	Controle/Membrana Bovina	30 dias	8
IID 30	II: Diabético	Diabético/Coágulo	30 dias	8
IIDMB 30	II: Diabético	Diabético/Membrana Bovina	30 dias	8
IIIDC30	III: DC	DC/Coágulo	30 dias	8

§§ Gen Derm, Baumer S.A.

\*\*\* nylon 5-0, Ethicon, São Paulo, SP, Brasil.

††† Benzetacil – Eurofarma Laboratórios Ltda

IIIDCMB	III: DC	DC/Membrana Bovina	30 dias	8
---------	---------	--------------------	---------	---

As tíbias obtidas dos ratos foram fixadas em formol neutro a 10% ou substituto orientado pela Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba, por, no mínimo, 24 horas. Em seguida, foram lavadas em água corrente por 24 horas e descalcificadas em solução de E.D.T.A a 18%. As peças foram desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes semi-seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrometros de espessura. Os cortes foram corados pelas técnicas da hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Masson para análise histológica e histométrica. A análise histológica foi realizada em microscópio óptico binocular. A análise histométrica foi executada com câmera acoplada ao computador e softwares para quantificação e análise estatística.

#### **4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

##### **4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Nos cortes histológicos corados com Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson, foi analisada, por microscopia óptica, a intensidade do processo inflamatório. Por se tratarem de cavidades realizadas em tíbias, pelo grande número de células inflamatórias ainda imaturas ou pouco específicas do canal medular, que comumente invadem a área reparada, foram observadas as áreas nas quais poderiam ocorrer presença das células clásticas, buscando identificá-las na área, especialmente próximas à membrana no subgrupo membrana. A qualidade do processo inflamatório próximo à membrana ou ao periósteo foi analisada na superfície da ferida. Nas áreas profundas, foram verificadas proliferações fibroblásticas e capilares, neoformação óssea na área da cavidade cirúrgica, disposição osteoblástica ao redor das trabéculas imaturas, organização do tecido de granulação, tendo em vista orientação das fibras colágenas e das pré-trabéculas formadas na região durante o processo de reparação tecidual.

##### **4.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA**

Para análise histométrica, foi selecionado um corte mais central de cada espécime e cada corte foi capturado com uma câmera digital (Axio Cam MRC 5, Zeiss)

conectada a um microscópio de luz (Zeiss) e salvo como uma imagem digitalizada no computador (Figura 11 do anexo B). As imagens foram utilizadas para a análise dos dados quantitativos nos períodos de 10 e 30 dias. Um examinador calibrado e cego ao estudo realizou a histometria da área total do defeito e da área de osso neoformado. Os dados foram obtidos em pixels e convertidos em porcentagem. Os seguintes critérios foram usados para padronizar a análise histométrica. A área total do defeito foi delineada, correspondendo ao espaço do defeito ósseo, considerado 100% da área analisada.

A área de osso neoformado dentro da área total foi calculada pelo delineamento de cada unidade óssea separadamente, fazendo-se a somatória dessas unidades.

As porcentagens foram calculadas (taxa de osso neoformado/área do defeito) e os dados obtidos foram submetidos à análise estatística.

### **4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para análise estatística, com os dados obtidos pela análise histométrica, inicialmente foi aplicado a cada grupo experimental o Teste de Aderência à Curva Normal, e em seguida, aplicado o teste de Mann-Whitney, submetidos pelo programa estatístico IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Os valores expressos em porcentagens da área óssea com relação à área do defeito foram usados para o cálculo das médias e dos desvios-padrão de cada grupo.

# *Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

#### 1-CAVIDADE PREENCHIDA APENAS POR COÁGULO – 10 DIAS

**IC10 (Grupo I com a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo e sem recobrimento por membrana aos 10 dias):** Na maioria dos espécimes, notam-se, superficialmente, cápsula fibrosa delgada, contendo fibras colágenas dispostas paralelamente ao longo eixo da tíbia, fibroblastos, alguns vasos sanguíneos e discreto número de células inflamatórias. Adjacentes e abaixo da cápsula, no interior da loja cirúrgica, observam-se trabéculas ósseas imaturas com amplos espaços intertrabeculares ocupados por tecido conjuntivo bem vascularizado, feixes de fibras colágenas ainda em organização, elevado número de fibroblastos ao lado de moderado número de células inflamatórias, sendo estas constituídas especialmente por linfócitos e macrófagos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado observam-se numerosos osteoblastos, na maioria dispostos paralelamente às suas margens (Figura 1 do anexo C).

**IID10 (Grupo II - Diabético com coágulo 10 dias):** Uma cápsula fibrosa delgada também recobre a tíbia com fibroblastos, vasos sanguíneos e células inflamatórias em número mais intenso. Adjacente e abaixo da cápsula, no interior da loja cirúrgica, observam-se muitas trabéculas ósseas imaturas com amplos espaços intertrabeculares, como no grupo controle. O tecido conjuntivo que rodeia essas trabéculas é bastante vascularizado, com menor quantidade de feixes de fibras colágenas e maior infiltrado inflamatório, constituído especialmente por linfócitos e macrófagos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado observam-se numerosos osteoblastos, na maioria dispostos de forma mais desorganizada que o grupo controle. (Figura 2 do anexo C)

**IIDC10 (Grupo III - Diabético Controlado com coágulo 10 dias):** O grupo diabético controlado representou o pior grupo aos 10 dias em qualidade da neoformação óssea, tanto ao serem analisadas as cavidades preenchidas apenas por coágulo como as recobertas pela membrana. Atraso na reabsorção da membrana, infiltrado inflamatório intenso no espaço intertrabecular, além das trabéculas neoformadas mais delgadas, foram alguns sinais desse atraso, comparando-os às observações feitas nos demais grupos (Figuras 3 e 4 do anexo C.)

## **B) CAVIDADE RECOBERTA POR MEMBRANA – 10 dias**

**ICMB10: (Grupo Controle com a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo e recoberta por membrana liofilizada aos 10 dias):** Superficialmente, nota-se cápsula fibrosa delgada, contendo fibras colágenas dispostas paralelamente ao longo eixo da tíbia, fibroblastos, alguns vasos sanguíneos, moderado número de células inflamatórias, localizado especialmente próximo aos remanescentes da membrana. Mesmo na ausência da membrana, percebe-se tecido conjuntivo rico em células alinhadas, entre o periósteo e o tecido neoformado. Apesar da membrana bovina estar praticamente reabsorvida, alguns de seus remanescentes podem ser observados, juntamente com a presença de alguns macrófagos. A presença da membrana proporcionou um aumento da espessura óssea da região, sendo observada aposição óssea externamente à cortical pré-existente nas bordas da ferida. Adjacente e abaixo da membrana, no interior da loja cirúrgica, as trabéculas ósseas ainda são imaturas como nos grupos anteriores, entremeadas por amplos espaços intertrabeculares, contendo tecido conjuntivo vascularizado, feixes de fibras colágenas em organização, elevado número de fibroblastos e moderado número de células inflamatórias, especialmente linfócitos e macrófagos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado, numerosos osteoblastos em disposição paralela às margens trabeculares podem ser observados (Figuras 5 e 6 do anexo C).

**IDMB10: (Grupo II, diabético, 10 dias: Cavidade preenchida com coágulo sanguíneo e recoberta com membrana bovina.):** Achados semelhantes ao grupo controle puderam ser vistos superficialmente na cavidade cirúrgica. Apesar da membrana bovina estar praticamente reabsorvida, alguns de seus remanescentes podem ser observados, proporcionando o mesmo aumento da espessura óssea da região, com aposição óssea externamente à cortical pré-existente nas bordas da ferida. Adjacente e abaixo da membrana, no interior da loja cirúrgica, as trabéculas ósseas parecem ser mais imaturas que no grupo controle, tendo em vista lacunas osteocíticas mais aumentadas no interior das trabéculas quando comparadas ao respectivo controle. Com relação aos espaços intertrabeculares, o tecido conjuntivo é mais vascularizado e os feixes de fibras colágenas ainda estão em organização. Há menor proliferação fibroblástica e fibras colágenas, além de persistente infiltrado inflamatório. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado, os osteoblastos se dispõem de forma mais desorganizada que o respectivo grupo controle junto às margens das trabéculas ósseas neoformadas (Figura 7 do anexo C).

### **IIDCMB10 (Grupo III, Diabético Controlado, com membrana bovina aos 10 dias):**

Da mesma forma que o respectivo grupo do diabético controlado aos 10 dias, onde as cavidades foram preenchidas apenas com coágulo, o grupo com o recobrimento pela membrana também apresentou um resultado menos satisfatório aos 10 dias quando comparado ao dos grupos controle e diabético sem controle no mesmo período estudado. Houve um atraso na reabsorção da membrana, um infiltrado inflamatório mais intenso nos espaços intertrabeculares, além das trabéculas neoformadas serem mais finas. A membrana também estava menos reabsorvida que os respectivos grupos controle e diabético onde a membrana também preenchia a cavidade cirúrgica (Figura 8 do anexo C).

### **C) CAVIDADE PREENCHIDA APENAS POR COÁGULO – 30 DIAS**

**IC30 (Grupo I, controle, com a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo e sem recobrimento por membrana aos 30 dias):** A loja cirúrgica, em todos os espécimes, encontra-se reparada em sua totalidade por tecido ósseo bem desenvolvido. Na maioria dos espécimes, o tecido ósseo neoformado é maior junto às bordas da loja cirúrgica, diminuindo à medida que se aproxima da sua área central. Nestes casos, o canal medular possui poucas trabéculas ósseas em seu interior, estando ainda em processo de remodelação. Na maioria dos espécimes, o tecido conjuntivo adjacente é comparável ao tecido presente no canal medular, ou seja, sem alterações. A área óssea neoformada diferencia-se do osso cortical primitivo e adjacente pela disposição ainda desorientada das lamelas ósseas e de seus osteócitos, uma vez que, exceto na área cirúrgica, as lamelas ósseas e seus osteócitos mostram-se mais paralelos ao longo eixo da tíbia (Figuras 9 e 10 do anexo C).

**IID30 (Grupo II, diabético, com a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo e sem recobrimento por membrana aos 30 dias):** Da mesma forma que o grupo anterior, a loja cirúrgica encontra-se reparada em sua totalidade por tecido ósseo mais delgado que o respectivo grupo controle sem membrana. O tecido ósseo neoformado é maior junto às bordas da loja cirúrgica, diminuindo à medida que se aproxima da sua área central. Ainda há algumas trabéculas finas abaixo da porção óssea estreita da superfície da cavidade. O canal medular ainda possui persistentes trabéculas ósseas em seu interior, estando em processo de remodelação. O tecido conjuntivo também é comparável ao tecido presente no canal medular. (Figuras 11 e 12 do anexo C).

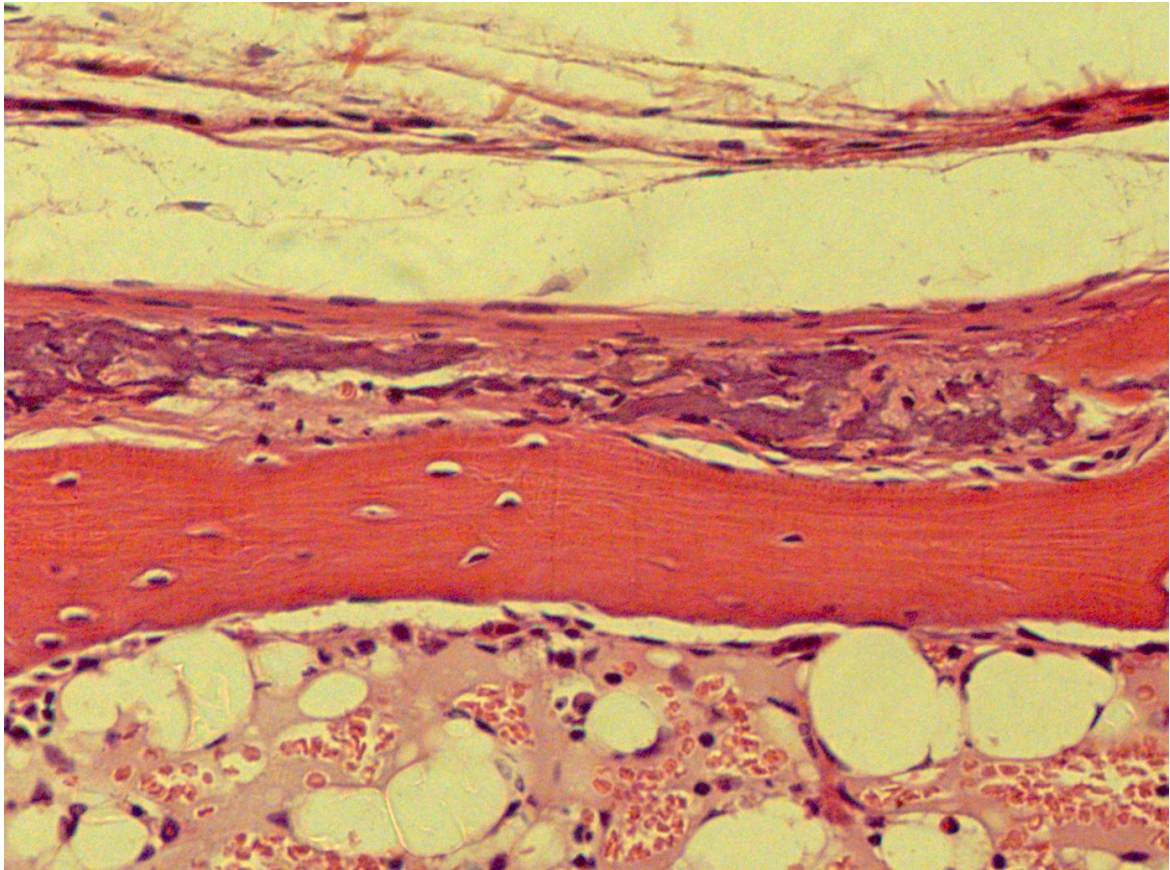
**IIDC30: (Grupo III, diabético controlado, com a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo e sem recobrimento por membrana aos 30 dias):** Aos 30 dias, esse grupo inverteu o resultado observado no grupo de 10 dias. Embora o grupo controle ainda tenha apresentado o melhor resultado, o diabético controlado apresentou melhor reparação se comparada com a do grupo diabético sem controle. Houve fechamento completo da cavidade da tibia, de forma bastante semelhante ao grupo controle aos 30 dias (Figuras 13 e 14 do anexo C).

#### **D- CAVIDADE RECOBERTA POR MEMBRANA – 30 dias**

**ICMB30: (Grupo Controle com a cavidade preenchida por coágulo sanguíneo e recoberta por membrana liofilizada aos 30 dias.):** A cavidade cirúrgica apresenta-se totalmente reparada por tecido ósseo bem desenvolvido e há ausência total da membrana liofilizada. Na porção central da loja óssea a espessura óssea ainda se encontra menor quando comparada à espessura das suas bordas na maioria dos espécimes, como ocorre com o grupo controle. Na grande maioria dos espécimes, o tecido conjuntivo adjacente é comparável ao tecido presente no canal medular, ou seja, sem alterações. O tecido ósseo neoformado diferencia-se do osso cortical primitivo e adjacente pela desorientada disposição das lamelas ósseas e de seus osteócitos. (Figuras 15 e 16 do Anexo C).

**IIDMB30 – (Diabético com membrana 30 dias):** Na área superficial, observa-se a presença de fragmentos de membrana óssea disposta paralelamente ao longo eixo da tibia e recobrindo o defeito ósseo criado, semelhante ao grupo controle. A membrana está menos reabsorvida no grupo diabético que no controle, podendo ser identificados fragmentos aos 30 dias. Abaixo da membrana, em alguns espécimes, algumas células semelhantes aos condrócitos aparecem com maior frequência no grupo diabético, sendo observadas em pequenas áreas também do grupo controle. No interior da loja, observam-se, nesse grupo diabético, trabéculas ósseas em quantidade e espessura semelhante ao respectivo grupo controle, apesar destas terem suas fibras colágenas mais espaçadas uma das outras. O espaço intertrabecular é amplo, com tecido conjuntivo bastante vascularizado, poucos feixes de fibras colágenas em organização, muitos fibroblastos e moderado número de células inflamatórias, sendo estas constituídas especialmente por macrófagos e linfócitos. Junto às bordas das trabéculas ósseas neoformadas observam-se alguns osteoblastos com disposição irregular. Observa-se, no grupo diabético, discreto atraso na qualidade da reparação, uma vez que os espaços intertrabeculares possuem maior infiltrado inflamatório e vasos neoformados, além de menor quantidade de fibras colágenas e de fibroblastos. (Figuras 17 e 18 do anexo C).

**IIDCMB 30 dias:** A presença da membrana, apesar do discreto atraso, não interferiu no processo de reparação tecidual, sendo a membrana quase toda reabsorvida aos 30 dias. Apesar de pouco reabsorvida aos 10 dias, aos 30 dias a sua presença é identificada pela presença de pequenos fragmentos. Há um aumento da espessura óssea com o uso da membrana nas tíbias, tanto nos animais controle como nos diabéticos, mas os espaços intertrabeculares abaixo dela são mais espaçados, deixando a tíbia mais “porosa” (Figuras 19, 20 e 21 do anexo



C).

**Figura representativa** – IIDMB30 –Fragmentos da membrana presentes e em processo de reabsorção na superfície da cavidade óssea, especialmente do grupo diabético. Neoformação óssea abaixo e próxima a eles e ausência de células multinucleadas do tipo osteoclásticas.

## 5.1. RESULTADOS HISTOMÉTRICOS

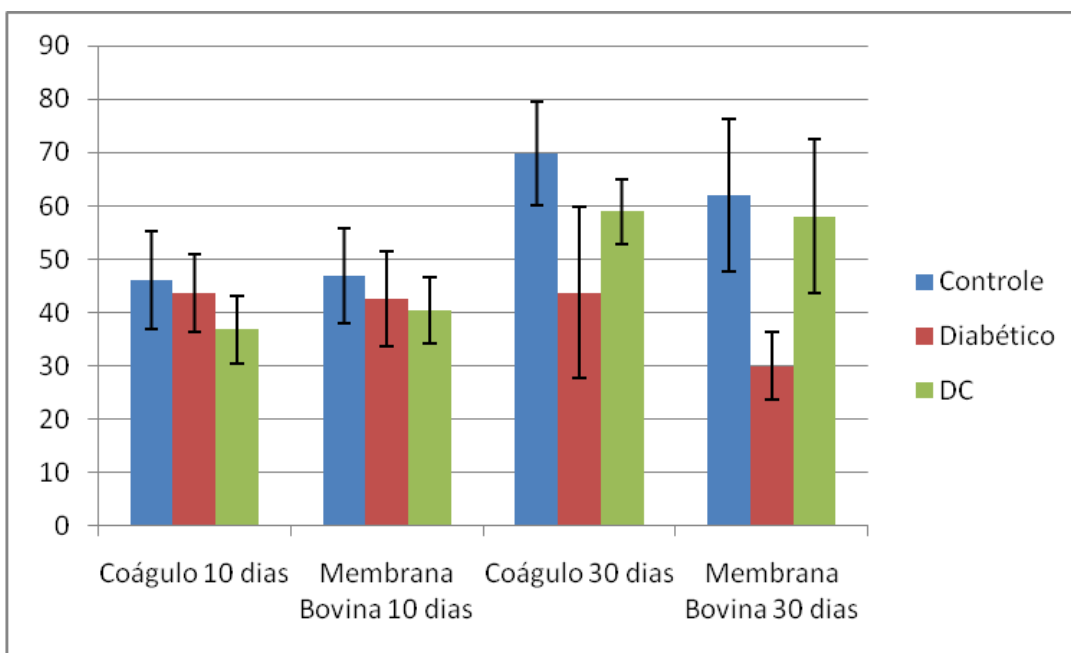
Para a histometria, os dados foram analisados usando o programa estatístico IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA). O valor de P para a comparação entre os grupos foi calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, ao nível de significância igual a

0,05, sendo os dados expressos pela média e desvio padrão da porcentagem da área óssea quantificada.

Ao serem comparadas as áreas ósseas das cavidades preenchidas com o coágulo e as recobertas por Membrana Bovina aos 10 dias, expressou-se comparação entre os grupos Controle, Diabético e Diabético Controlado, resultando na negativa da hipótese nula, ou seja, não apresentando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados (Figura 1 do anexo D).

Teste similar ocorreu para a comparação das áreas ósseas das cavidades preenchidas com o coágulo e as recobertas por Membrana Bovina aos 30 dias, estabelecendo a comparação entre os grupos Controle, Diabético e Diabético Controlado. Da mesma forma, o teste não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos estudados, conforme figura 2 do anexo D.

Tento em vista a proposição do projeto, procedeu-se a organização dos dados quantificados na forma de gráfico, expressando a média da porcentagem da área óssea dos grupos, com os seus respectivos desvios padrões.



**Figura XXX** – Médias e desvios padrões das áreas ósseas das cavidades apenas preenchidas com coágulo e as recobertas pela membrana dos grupos controle, diabético e diabético controlado.

Verificou-se que, aos 10 dias, as áreas ósseas das cavidades preenchidas apenas por coágulo ( $37\% \pm 6,298$ ) e das recobertas por membrana ( $40\% \pm 6,193$ ) do grupo

diabético controlado foram menores do que as do grupo controle (46% +/- 9,143 e 47% +/- 8,89) e as do grupo diabético não controlado (44% +/- 7,35 e 43% +/- 8,99), respectivamente, demonstrando um possível atraso na neoformação óssea do grupo diabético controlado com relação aos demais grupos estudados. Com relação à membrana, essa pareceu não interferir na neoformação óssea com relação ao período de 10 dias se forem comparadas as áreas ósseas do período de 10 dias, utilizando ou não a membrana bovina.

Aos 30 dias, com relação ao grupo diabético controlado, o resultado foi invertido, uma vez que a área óssea das cavidades com coágulo dos animais controles (70% +/- 9,75) foi maior do que das cavidades com coágulo dos grupos diabético (44% +/- 16) e diabético controlado (59% +/- 6), sendo que o diabético controlado foi maior que o grupo diabético não controlado. O mesmo resultado invertido, porém esperado, com relação ao grupo da membrana, ocorreu no período de 30 dias, uma vez que o grupo controle possuiu uma área óssea de 62% +/- 14,36, o grupo diabético de 30% +/- 6,47 e o grupo diabético controlado 58% +/- 14,41. Observou-se também, no período de 30 dias, que as áreas ósseas das cavidades que receberam a membrana foram discretamente menores com relação as áreas das cavidades preenchidas apenas com coágulo, o que demonstra um pequeno atraso da reparação óssea quando há a utilização da membrana bovina.

# *Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

O tecido ósseo possui alta capacidade de reparação e regeneração podendo restaurar sua estrutura e funções originais completamente (FREIRE, 2010). Contudo, os defeitos ósseos podem não ser devidamente reparados com tecido ósseo, sendo constantemente utilizados no interior dos defeitos materiais de enxerto ósseo e outros substitutos (LINDHE *et al.*, 1999, GOMES *et al.*, 2007, ESTEVES *et al.*, 2008), a fim de facilitar e/ou promover a reparação.

Utilizando-se do princípio da osteopromoção, o uso das membranas previne a migração e a proliferação de tecidos menos especializados para a região do defeito ósseo, possibilitando a ocorrência da neoformação óssea sem interferências frequentemente proporcionadas por estes (DAHLIN, 1994).

Com relação às membranas reabsorvíveis, estas devem ser reabsorvidas em tempo hábil para que as células ósseas migrem para o interior da ferida previamente às células menos especializadas e o processo de reabsorção das membranas deve produzir resposta inflamatória mínima a fim de que não haja interferência no processo de regeneração óssea (GOTTLOW, 1993).

Com o presente trabalho, pôde verificar que a membrana bovina não invaginou para o interior da ferida cirúrgica, contribuindo para a neoformação óssea abaixo dela e sobre a cortical óssea da tíbia, adjacente à borda da cavidade cirúrgica, proporcionando um sobrecontorno da tíbia no local onde a membrana esteve presente.

Observou-se, em outros trabalhos, que a membrana de osso cortical bovino desmineralizado, quando implantada em tecido subcutâneo de rato, foi bem tolerada pelos tecidos adjacentes. Os autores também observaram que esse tipo de membrana foi completamente reabsorvida após 30-60 dias após sua implantação por células mononucleadas ou por células gigantes tipo corpo estranho (OLIVEIRA *et al.*, 2004). No presente trabalho, fragmentos da membrana ainda estiveram presentes aos 30 dias, especialmente no grupo diabético. Com resposta inflamatória considerada mínima, a membrana foi sendo gradativamente reabsorvida, se comparados ambos os períodos, 10 e 30 dias, não sendo identificadas células gigantes tipo corpo estranho próximas à membrana, sugerindo que seu processo de reabsorção não é dependente da presença dos fagócitos, especialmente dos multinucleados.

Diante observações realizadas por esse trabalho, conforme metodologia preconizada, o uso da membrana em organismo diabético proporcionou resultados satisfatórios uma vez que cumpriu o seu papel na regeneração óssea guiada mesmo sob a condição sistêmica presente. Por outro lado, deve-se ressaltar que, tais membranas, para serem bem empregadas, deverão obedecer aos critérios mínimos de utilização, devendo respeitar o controle asséptico e serem adequadamente isoladas do meio externo a fim de que não haja exposições e riscos de infecção das feridas onde são utilizadas.

Observou-se que o tecido mesenquimal formado no interior do defeito ósseo em processo de reparação inicial foi mais imaturo no estado diabético, especialmente nos períodos iniciais da reparação. Conforme a literatura, essas observações poderiam ser explicadas por falha na expressão genética que regula a diferenciação osteoblástica, conduzindo a uma baixa formação óssea, identificadas por LU *et al.*, 2003. Além do atraso na neoformação óssea, o estado diabético altera a mineralização, a reabsorção e o remodelamento ósseo (SHYNG *et al.*, 2001).

Os resultados contraditórios encontrados no grupo diabético controlado por esse trabalho fizeram com que houvesse a seguinte reflexão: embora o organismo diabético controlado possua a tendência de se assemelhar ao organismo com a ausência da enfermidade sistêmica, especialmente nos períodos iniciais da reparação, o organismo diabético, mesmo controlado, possui um grande potencial de descontrole, sendo o ato cirúrgico um fator predisponente para esse desequilíbrio hormonal existente. Diante disso, o organismo controlado deverá ter, especialmente nos períodos iniciais da reparação, a mesma atenção que um organismo não controlado no que diz respeito às complicações das feridas cirúrgicas e à dificuldade de reparação do estado diabético.

*Conclusão*

## 7. CONCLUSÃO

Conforme proposta e metodologia do projeto, concluiu-se que:

1) A presença da membrana atrasou de forma discreta o processo de reparo, especialmente nos grupos diabéticos, embora não fossem encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, nos seus respectivos períodos de estudo.

2) A membrana se comportou de forma favorável para a regeneração óssea guiada em todos os grupos estudados, uma vez que houve o fechamento ósseo da ferida com o aumento do contorno ósseo da tíbia.

# *Bibliografia*

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, K. J. *et al.* End point results of processed heterogenous, autogenous and homogenous bone transplants in the human: a histologic study, clinical orthopedics. Philadelphia: *J. B. Lippincott*, 1964.
2. ARANEGA, A. *Microbiological analisys of dry sockets in uncontrolled diabetics rats.* Araçatuba, 1999. 168 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - UNESP.
3. ARANEGA, A. *Histomorphometric analysis of dental socket repair after tooth extraction in controlled and uncontrolled diabetics rats.* Araçatuba 2001. 226 p. Tese ( Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
4. COTRAN; R. S., COLLINS, T.; KUMAR, V. Robbins patologia estrutural e funcional, 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 817-829, 2000.
5. CUTLER, C. W., EKE, P., ARNOLD, R. R., VAN DYKE, T. E. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient: a case report. *J. periodontal.* v. 62, n. 6, p. 394-401, 1991.
6. DAHLIN C. Scientific background of guided bone regeneration. In: Buser, D. Guided bone regeneration – In: Implant Dentistry. Chicago, Quintessence Publishing Co, Inc, p 31-48, 1994.
7. DAHLIN, C. A origem científica da regeneração óssea guiada. In: BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. Regeneração óssea guiada em implantodontia. São Paulo: Quintessence Editora Ltda. Cap.III, p.31-48, 1996.DEVLIN, H., GARLAND, H., SLOAN, P. Healing of Tooth Extraction Sockets in Experimental Diabetes Mellitus. *J. Oral Maxillofac Surg.*, v. 54, p. 1087-91, 1996.
8. DUPOIRIEUX L., COSTES V., JAMMET P., SOUYRIS F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg.* v. 23, n. 6 Pt 2, p. 395-8, 1994.
9. ESTEVES JC, ARANEGA AM, BORRASCA AG, FATTAH CM, GARCIA-JÚNIOR IR. Repair process of surgical defects filled with autogenous bone grafts in tibiae of diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* v. 16, n. 5, p. 316-20, 2008.

10. FAHEY, T. J. SADATY, A., JONES, W. G., BARBER, A., SMOLLER, B., SHIRES, G. T. Diabetes impairs the late inflammatory response to wound healing. *J. Surg. Res.*, v. 50, n. 4, p. 308-13, 1991.
11. FEIGHAN J.E., DAVY D., PREWETT A.B., STEVENSON S. Induction of bone by a demineralized bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model. *J Orthop Res.* v. 13, n.6, p.881-91, 1995.
12. FREIRE AR, QUEIROZ TP, OKAMOTO R. Utilização de biomateriais poliméricos associados a implantes dentários: revisão de literatura. *Int J Dent.* v. 9, n.2, p. 93-95, 2010.
13. GOMES, M.F., BANZI, E.C., DESTRO, M.F. LAVINICKI, V., GOULART, M.G. Homogenous demineralized dentin matrix for application in cranioplasty of rabbits with alloxan-induced diabetes: histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* v. 22, n.6, P.939-47, 2007.
14. GOTTLOW J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol.* v. 64, n. 11 Suppl, p.1157-65. Review, 1993.
15. LEKOVIC, V.; KLOKKEVOLD, P.R.; BARRIE KENNEY, E.; DIMITRIJELIC, B.; NEDIC, M.; WEINLANDER, M. Histologic evaluation of guided tissue regeneration using 4 barrier membranes: a comparative furcation study in dogs. *J. Periodontol.* V.69, n.1, p. 54-61, 1998.
16. LINDHE, J. *Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral.* 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 668-9.
17. LU H, KRAUT D, GERSTENFELD LC, GRAVES DT. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology.* v.144;p.346-52, 2003.
18. LYTLE J.L. Freeze-dried demineralized bone in dental implant reconstruction. *J Calif Dent Assoc.* v. 22, n.5, p.47-51. Review, 1994.
19. MARIANO R, MESSORA M, DE MORAIS A, NAGATA M, FURLANETO F, AVELINO C, PAULA F, FERREIRA S, PINHEIRO M, DE SENE JP. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 109, n. 1, p.72-8, 2010.
20. MARTINS, A.C.O.; CESTARI, T.M.; CEOLIN, D.S.; RODRIGUES, P.A.L.; TAGA, R. Influence of GenDerm<sup>®</sup> thickness in MMP-2 and MMP-9 expression during its

- resorption in rat subcutaneous tissue. *J. Appl. Oral Sci. 20<sup>th</sup> Academic Conference Of Bauru School Of Dentistry.* v.15, n.4, July/Aug, 2007.
21. MOSES, O. VITRIAL. D., ABOODI, G.; SCULEAN, A. TAL, H. ; KOZLOVSKY, A.; ARTZI, Z.; WEINREB, M.; NEMCOVSKY, C. E. Biodegradation of three different collagen membranes in the rat calvarium: a comparative study. *J Periodontol*, v. 79, n. 5, p.905-911, 2008.
  22. OLIVEIRA, R.C., MENEZES, R., CESTARI, T.M., TAGA, E.M., TAGA, R., BUZALAF, M.A.R., GRANJEIRO, J.M. Tissue response to a membrane of demineralized bovine cortical bone implanted in the subcutaneous tissue of rats. *Braz Dent J.* v.15, n.1, p. 3-8, 2004.
  23. ONO, I.; GUNJI, H.; KANEKO, F.; SAITO, T.; KUBOKI, Y. Efficacy of hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg.* May. v.6, n.3, p.238-44, 1995.
  24. RETZEPI M, LEWIS MP, DONOS N. Effect of diabetes and metabolic control on de novo bone formation following guided bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* v. 21, n. 1, p. 71-9, 2010.
  25. RICIERI CB, SONODA CK, ARANEGA AM, PANZARINI SR, POI WR, SUNDEFELD ML, OKAMOTO T. Healing process of incisor teeth of diabetic rats replanted after storage in milk. *Dent Traumatol.* 2009 Jun;25(3):284-9.
  26. SCHEPERS, E. J., DUCHEYNE, P., BARBIER, L., SCHEPERS, S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implants. Dent.* v. 2, n.3, p.151-6, 1993.
  27. SCHENK R.K., BUSER D., HARDWICK W.R., DAHLIN C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* v.9, n.1, p. 13-29, 1994.
  28. SCULEAN, A.; NIKOLIDAKIS, D.; SCHWARZ, F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol.* v. 35(8 Suppl): 106-16, 2008.
  29. SHYNG YC, DEVLIN H, SLOAN P. The effect of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus on calvarial defect healing and bone turnover in the rat. *Int J Oral Maxillofac Surg.* v.30;p.70-4:2001.

30. TAKATA, T.; WANG, H-L., MIYAUCHI, M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J. Periodont Res.* v. 36, p. 322-7, 2001.
31. TEERRANOVA, A. The effects of diabetes mellitus on wound healing. *Plastic Surgical nursing*, v.11, n. 1, 1991.
32. UMPIERREZ, G. E., ZLATEV, T., SPANHEIMER, R. G. Correction of altered collagen metabolism in diabetic animals with insulin therapy. *Matrix.*, v. 9, p. 336-42, 1989.
33. VAIL T.B., TROTTER G.W., POWERS B.E. Equine demineralized bone matrix: relationship between particle size and osteoinduction. *Vet Surg.* v.23, n.5, p.386-95, 1994.

*Anexos*

# ANEXO A

## Certificado CEEA

# Anexo A –

## ANEXO A - Certificado CEEA:F



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DE REPARO ÓSSEO DE CAVIDADES CIRÚRGICAS RECOBERTAS POR MEMBRANA BIOLÓGICA DE ORIGEM BOVINA LIOFILIZADA EM TÍBIA DE RATOS DIABÉTICOS”** sob responsabilidade do **Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega** e colaboração de **Juliana Zorzi Coléte** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 004002-2009.

Araçatuba, 14 de Julho de 2009

A handwritten signature in blue ink that reads "Tereza Cristina Cardoso da Silva".

**Prof.<sup>a</sup> Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva**  
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

# ANEXO B

## Metodologia

# Anexo B -

## ANEXO B: Ilustrações da metodologia



Fig. 1 - Ratos machos com peso corporal aproximado de 250 gramas.



Fig. 2 - Estreptozotocina.



Fig. 3 - Cloridrato de Xilazina e cloridrato de Cetamina.



Fig. 4 - Membro posterior tricotomizado e antissepsia realizada.



Fig. 5 - Incisão.



Fig. 6 - Afastamento tecidos e exposição da tíbia.



Fig. 7 - Cavidade na tíbia esquerda preparada e preenchida com coágulo.



Fig. 8 - Membrana acomodada e devidamente estabilizada.



Fig. 9 - Sutura finalizada.



Fig. 10 - Penicilina G benzatina (20.000 U.I.).

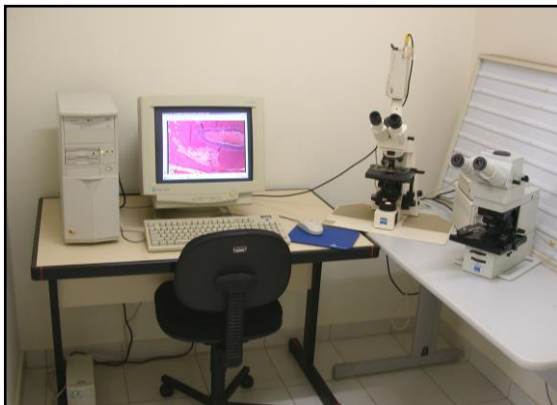


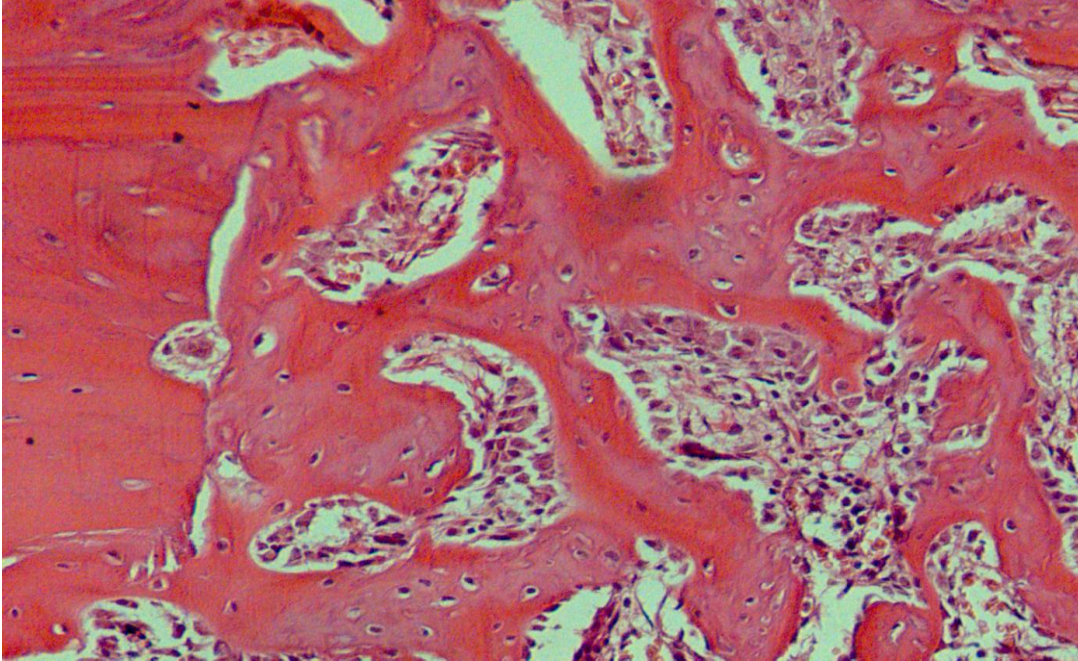
Fig. 11 - Equipamento utilizado na captação das imagens histológicas. Câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio Carl Zeiss (Axiolab) e conectada ao computador.

# ANEXO C

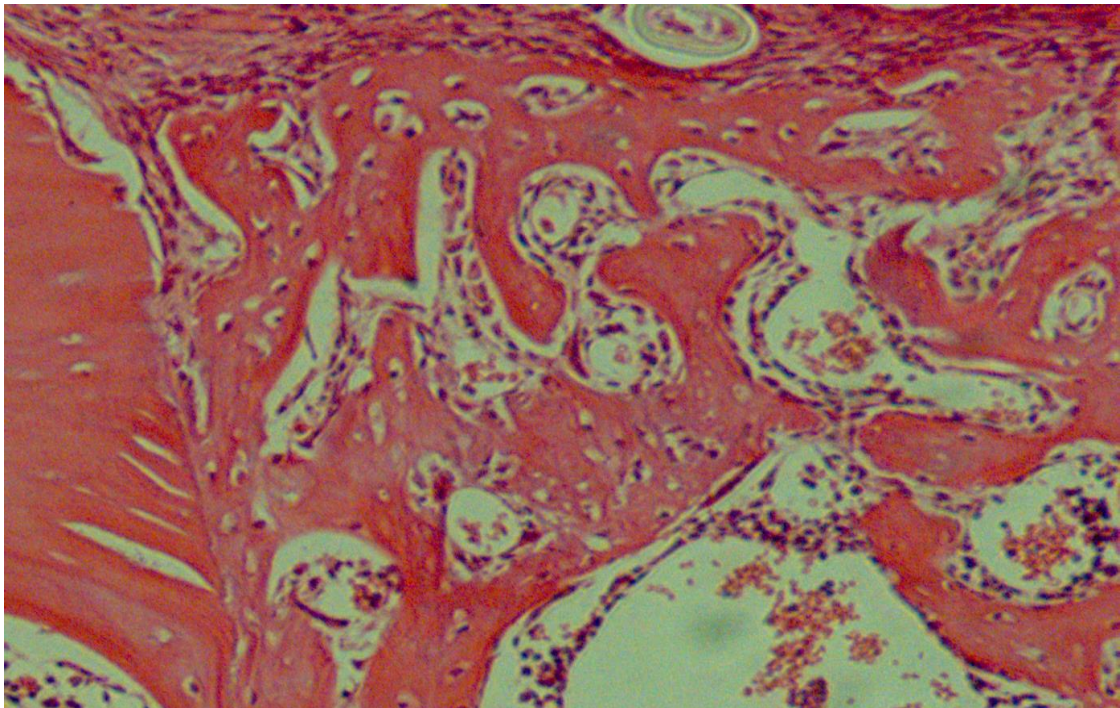
## Figuras Histológicas

# Anexo-C

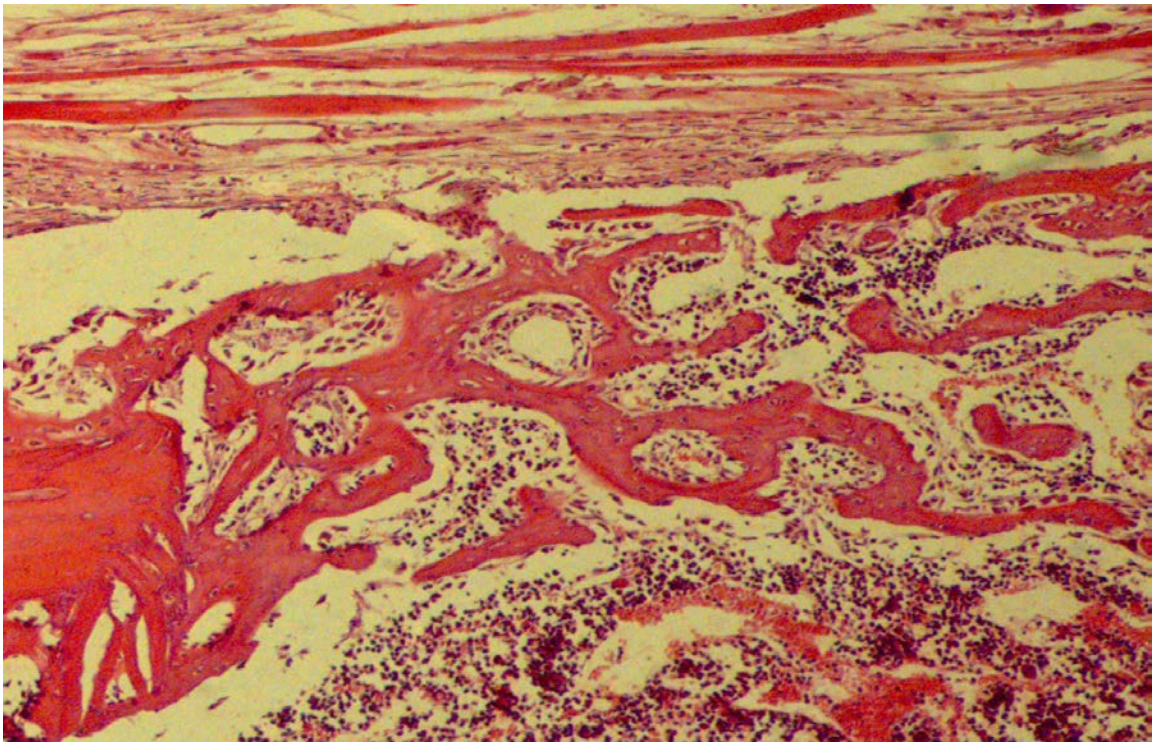
## ANEXO C - Resultados histológicos: Grupos 10 dias



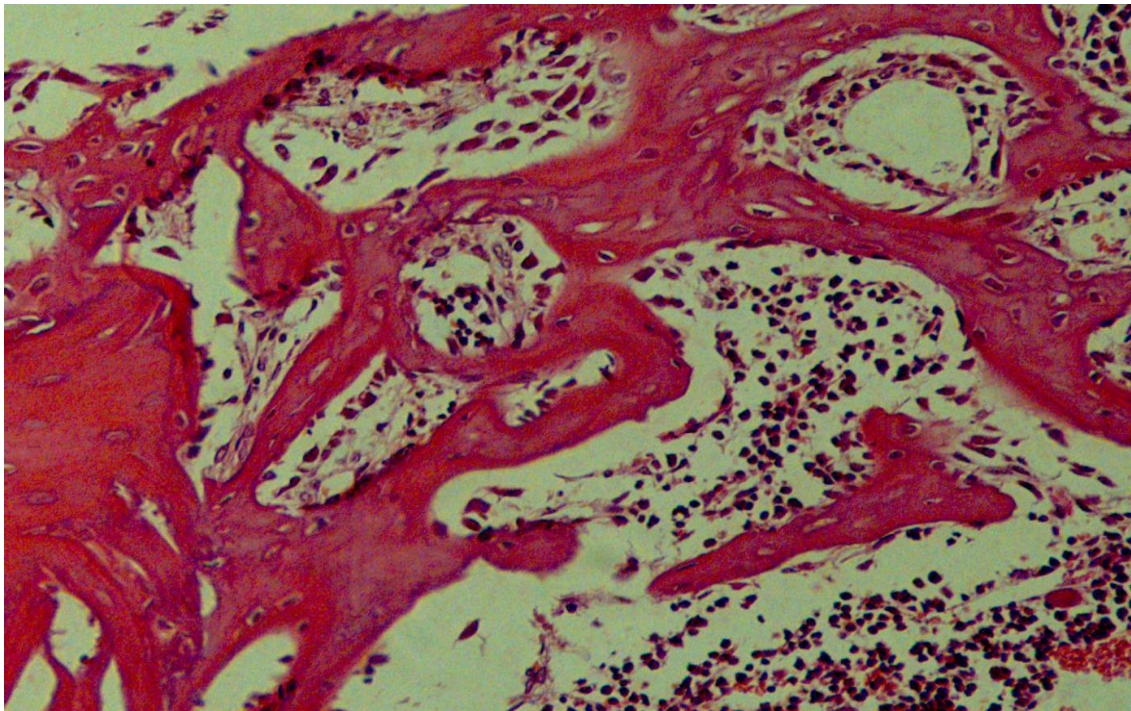
**Figura 1** – IC10 – .Trabéculas ósseas imaturas contendo muitos osteoblastos ao seu redor. Há amplos espaços intertrabeculares ocupados por tecido conjuntivo contendo feixes de fibras colágenas, elevado número de fibroblastos ao lado de moderado número de células inflamatórias. H.E. Original objetiva 25X..



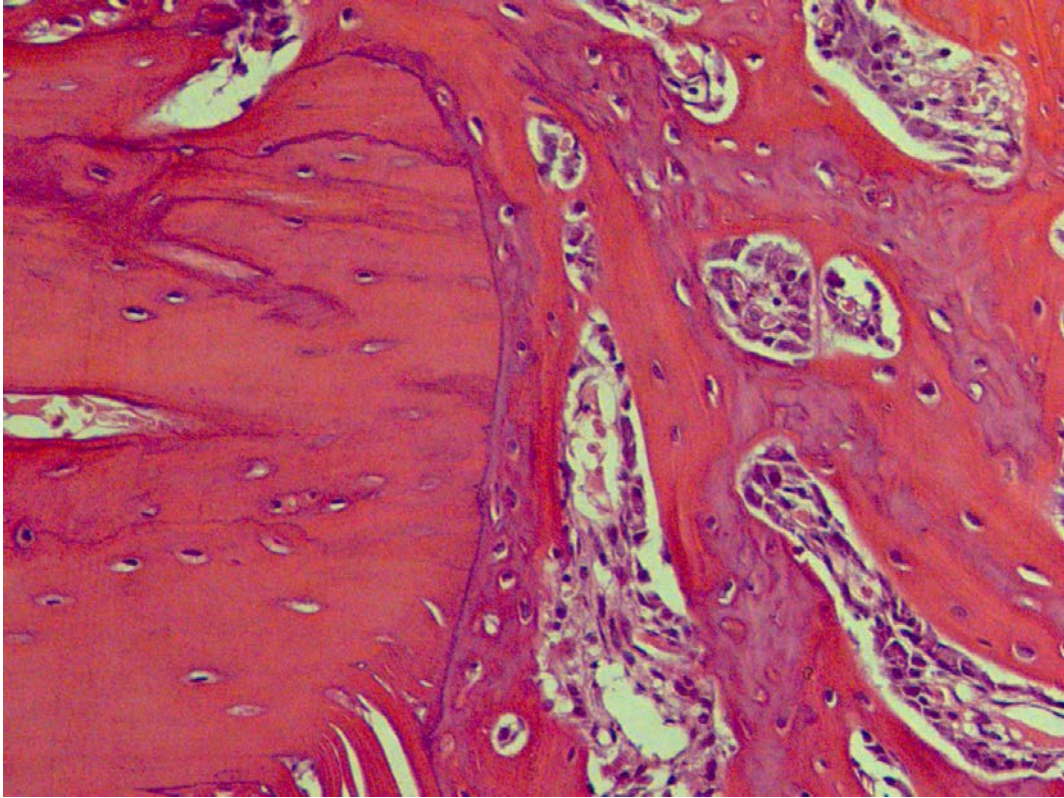
**Figura 2** – IID10 –. H.E. Original objetiva 25X..



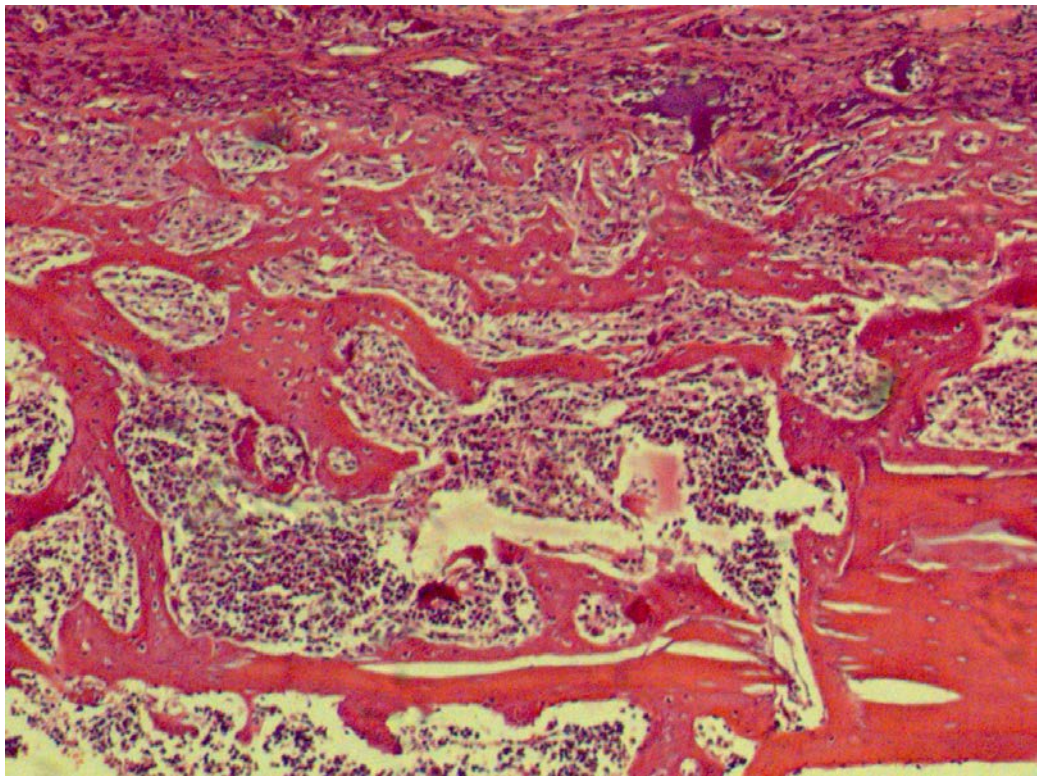
**Figura 3** – IIIDC10 –próximos à borda desta. H.E. Original objetiva 12,5X..



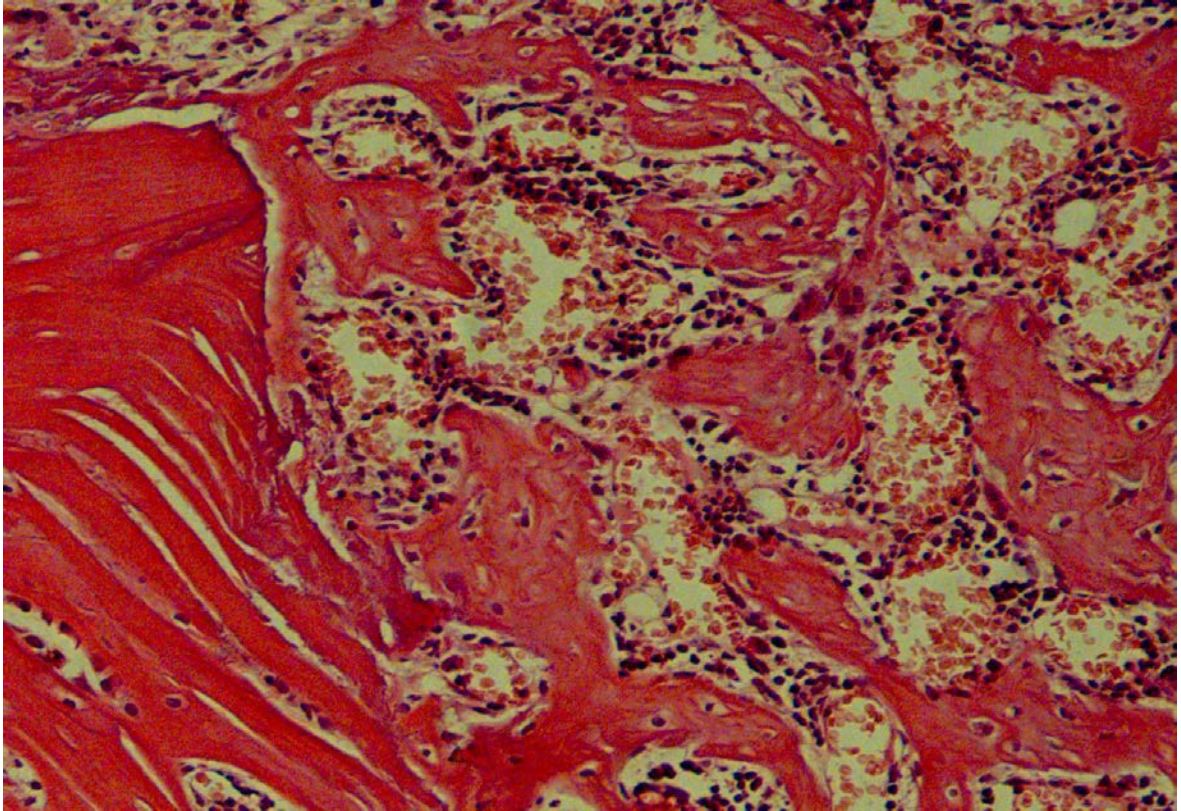
**Figura 4** – IIIDC10 – Infiltrado inflamatório crônico e proliferação fibroblástica. H.E. Original objetiva 25X..



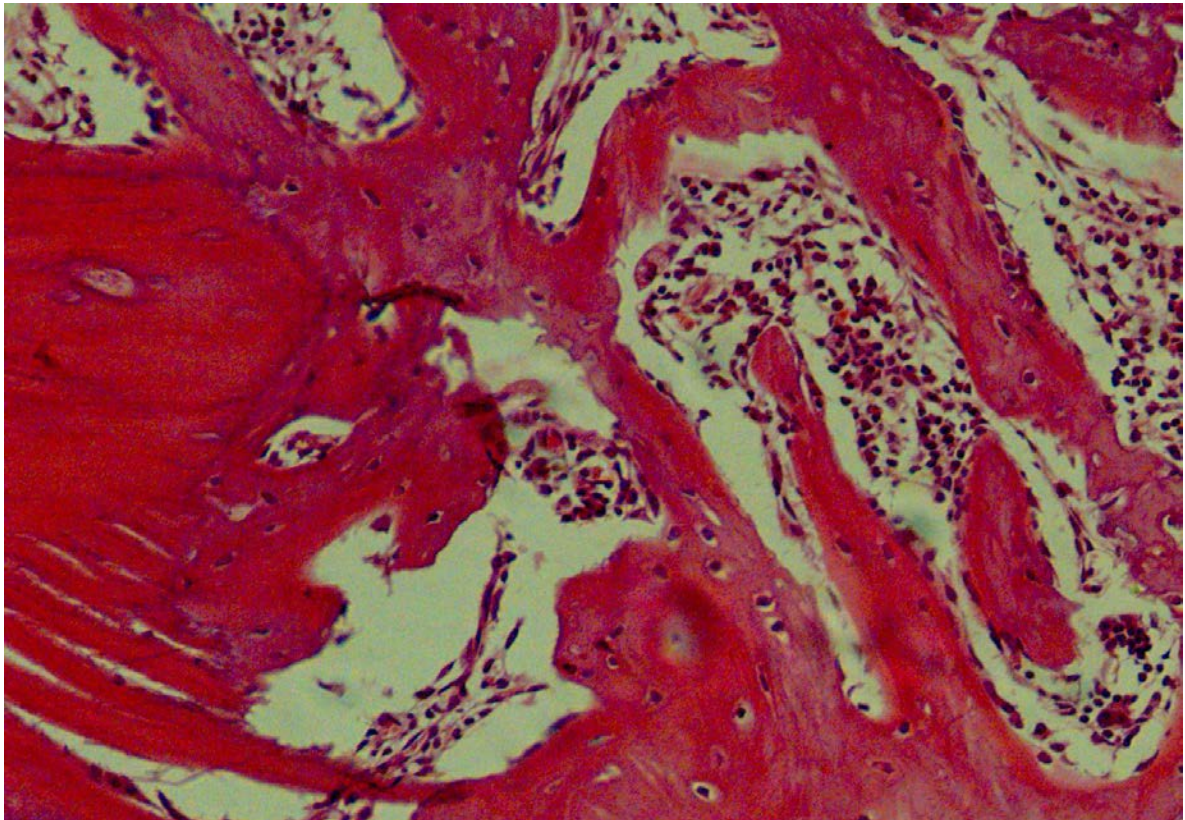
**Figura 5** – ICMB10 – Espécime com grande atividade na formação de trabéculas ósseas. Presença de fibroblastos, fibras colágenas, vasos sanguíneos e osteoblastos podem ser identificados. H.E. Original objetiva 25X..



**Figura 6** – ICMB10 – Trabéculas ósseas neoformadas dispendo-se paralelamente nas proximidades da membrana bovina em reabsorção. H.E. Original objetiva 12,5X..



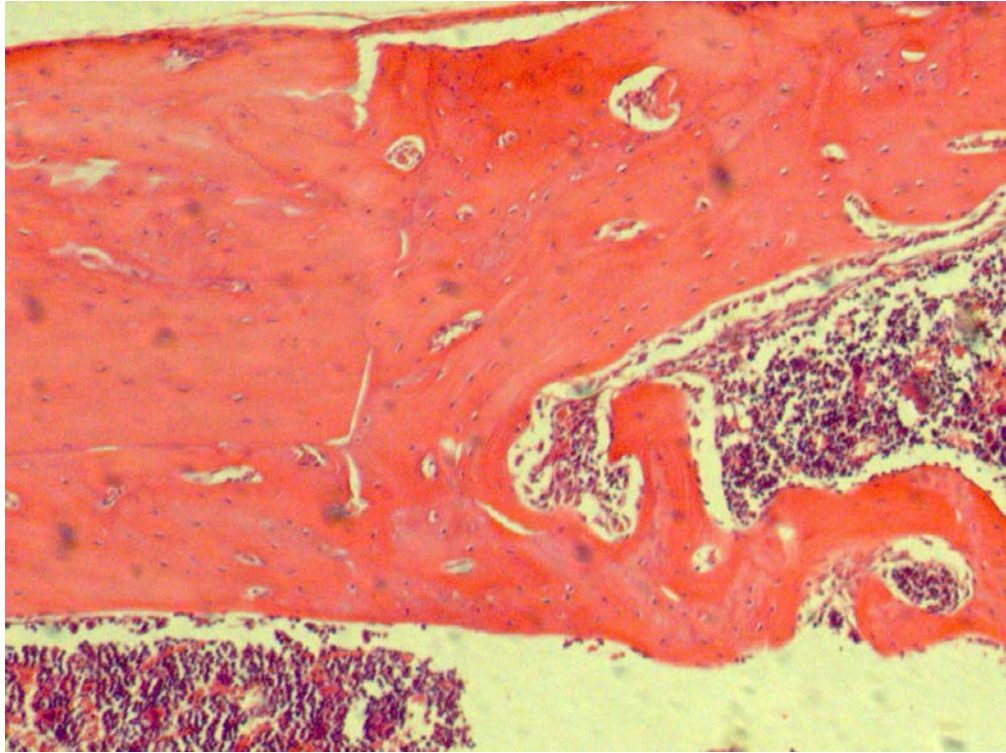
**Figura 7** – IIDMB10 – HE. Original objetiva 25X.



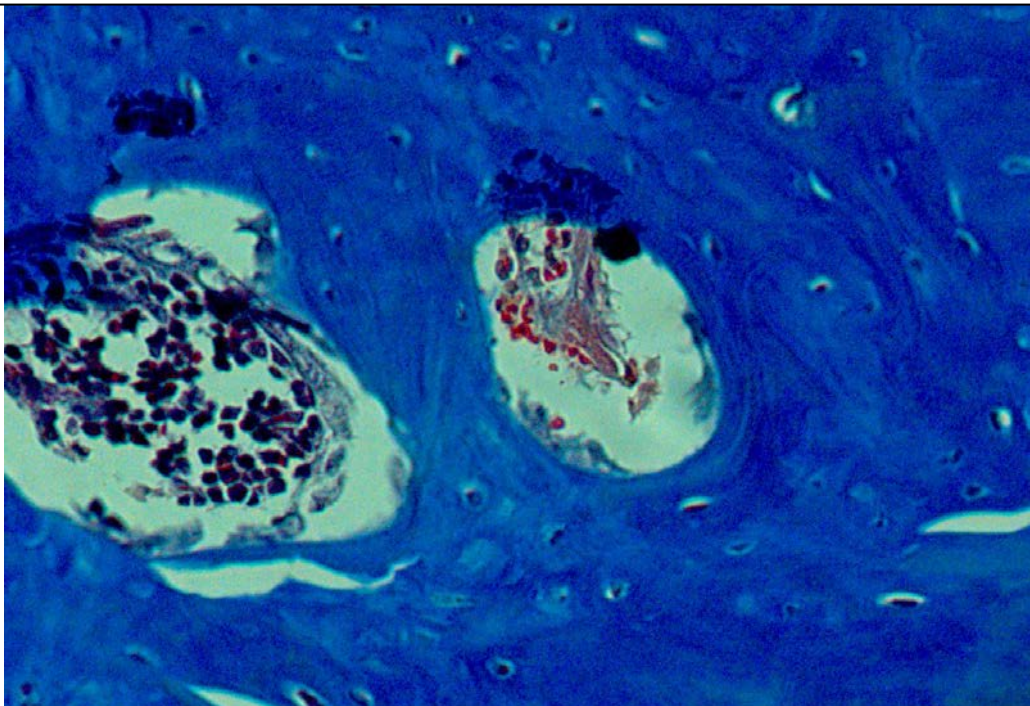
**Figura 8** – IIIDCMB10 –delgada. H.E. Original objetiva 25X.

# Anexo-C

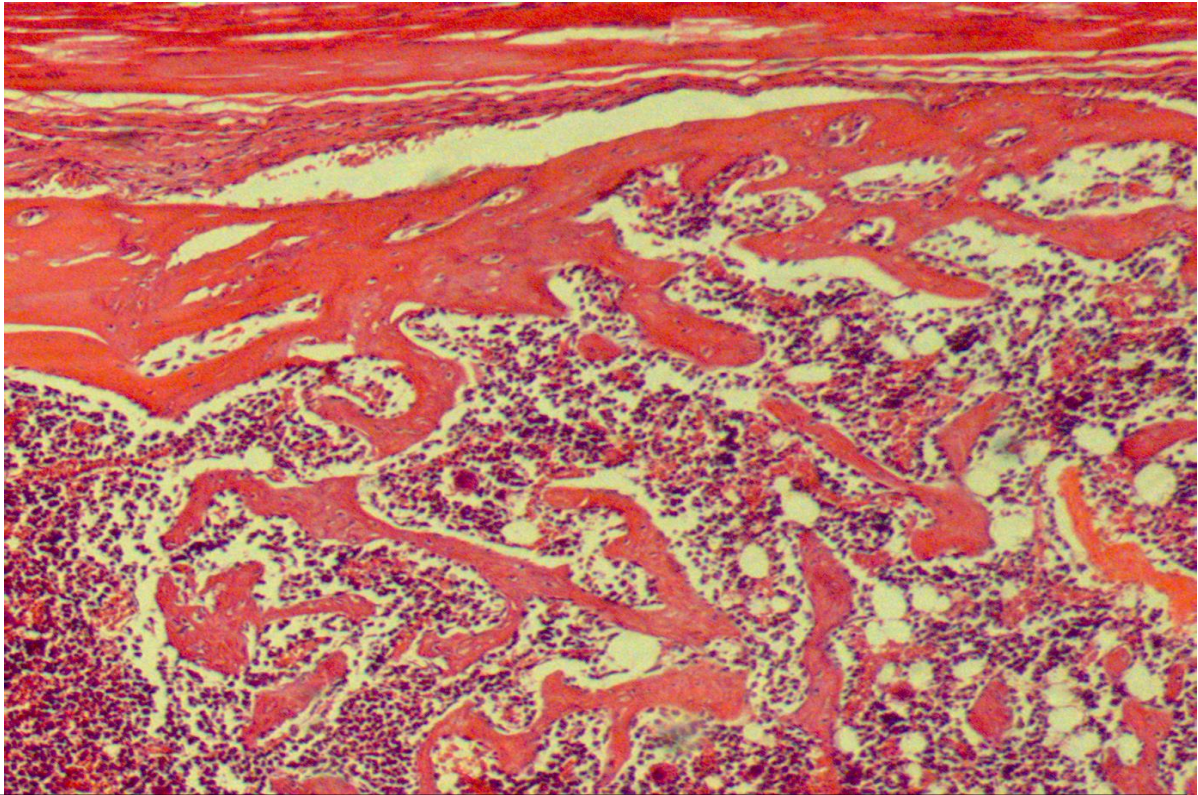
## ANEXO C - Resultados histológicos: Grupos 30 dias



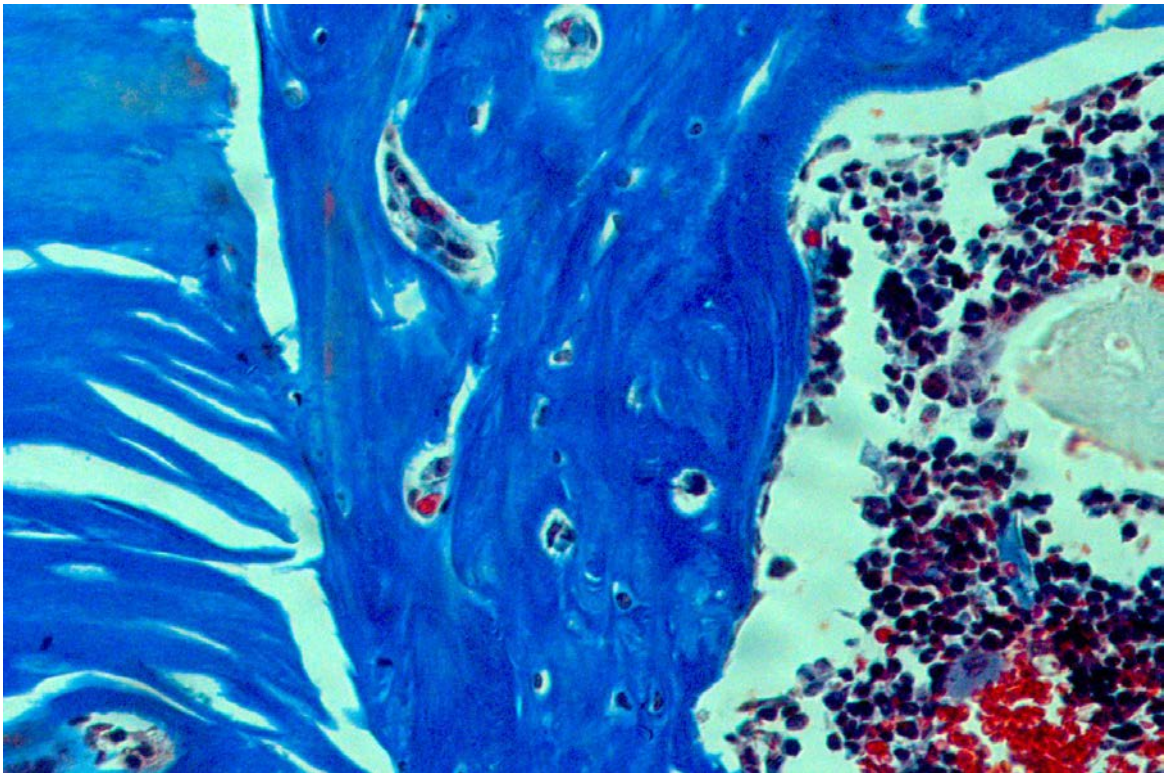
**Figura 9** – IC30 – Fechamento da cavidade com tecido ósseo bem desenvolvido. H.E. Original objetiva 12,5X.



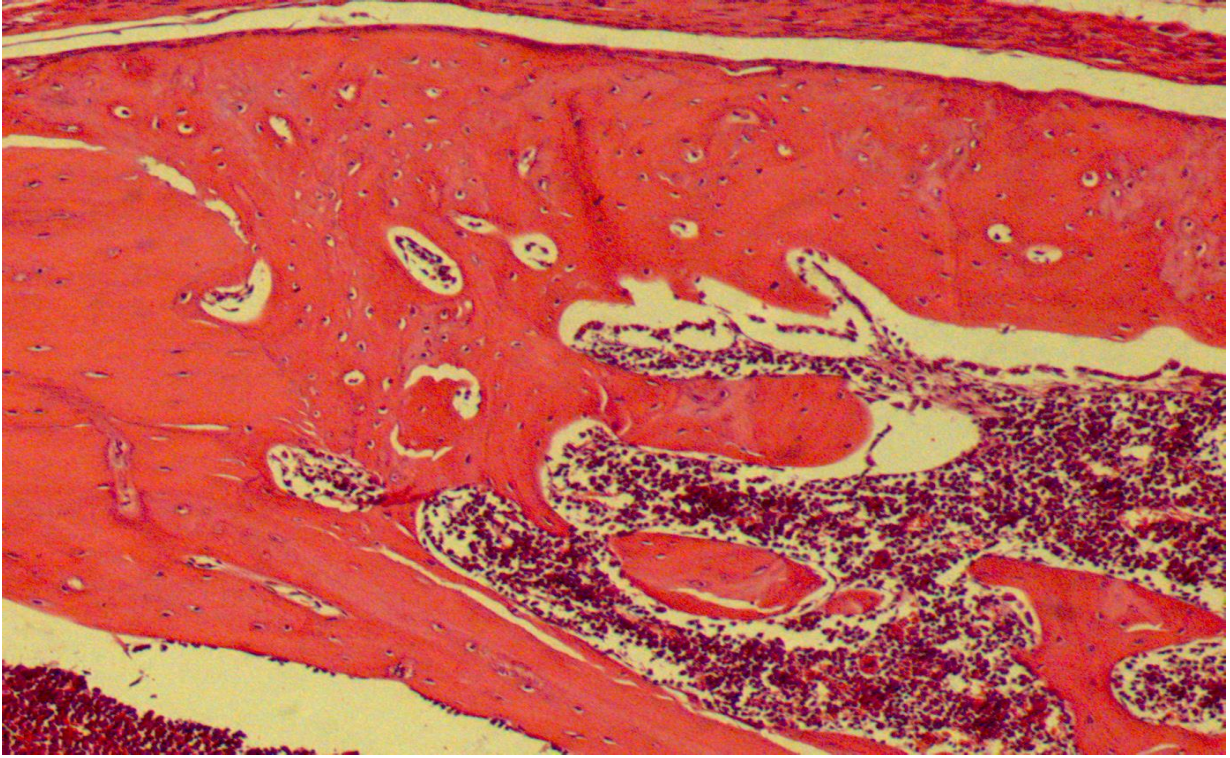
**Figura 10** – IC30 – Trabeculado ósseo bem desenvolvido. Tricrômico de Masson. Original objetiva 40X.



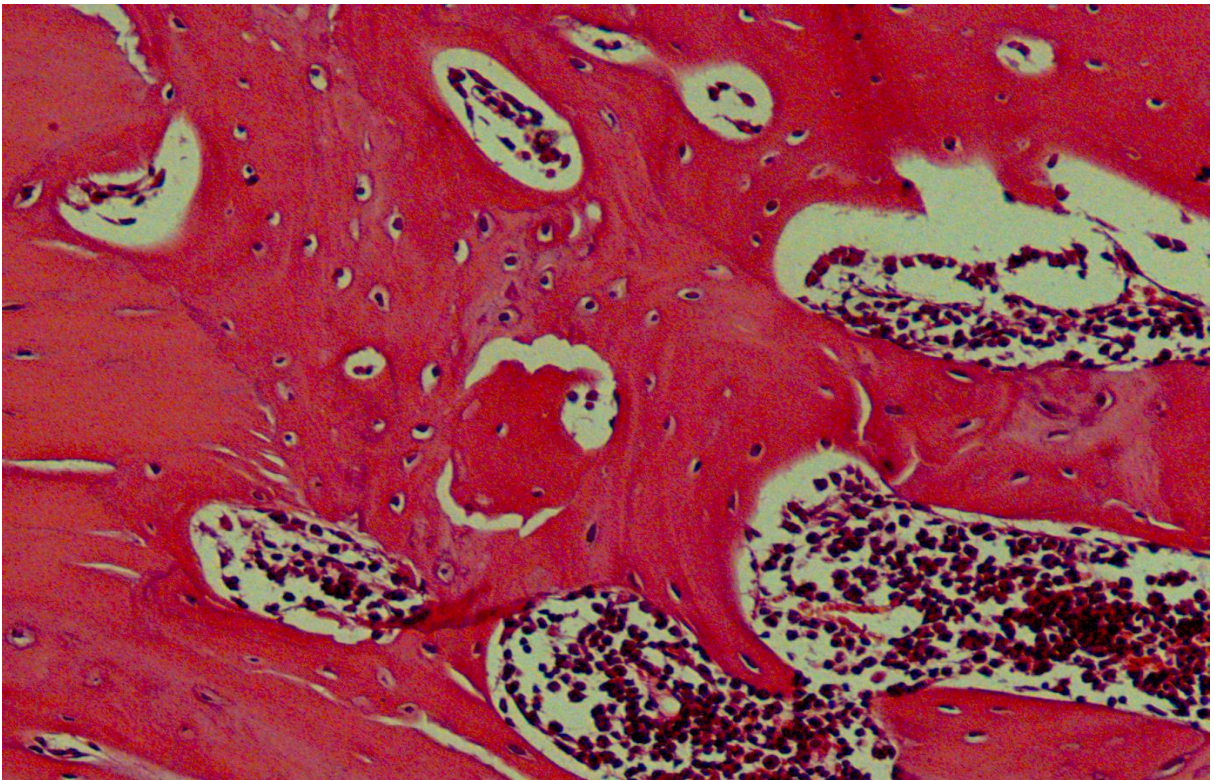
**Figura 11** – IID30 – Fechamento da cavidade com tecido ósseo pouco desenvolvido. Presença de grande quantidade de trabéculas no canal medular. H.E. Original objetiva 12,5X.



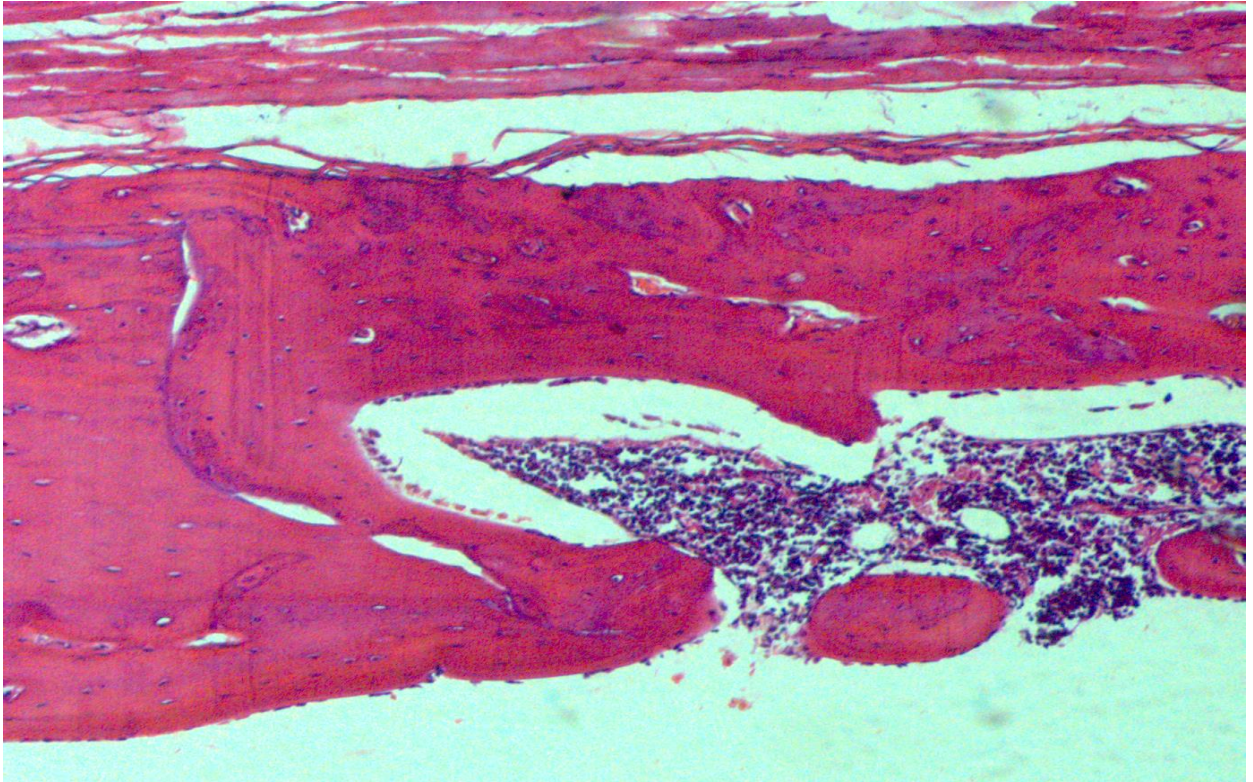
**Figura 12** – IID30 – Trabeculado ósseo mais desenvolvido próximo à borda da cavidade. Tricrômico de Masson. Original objetiva 40X.



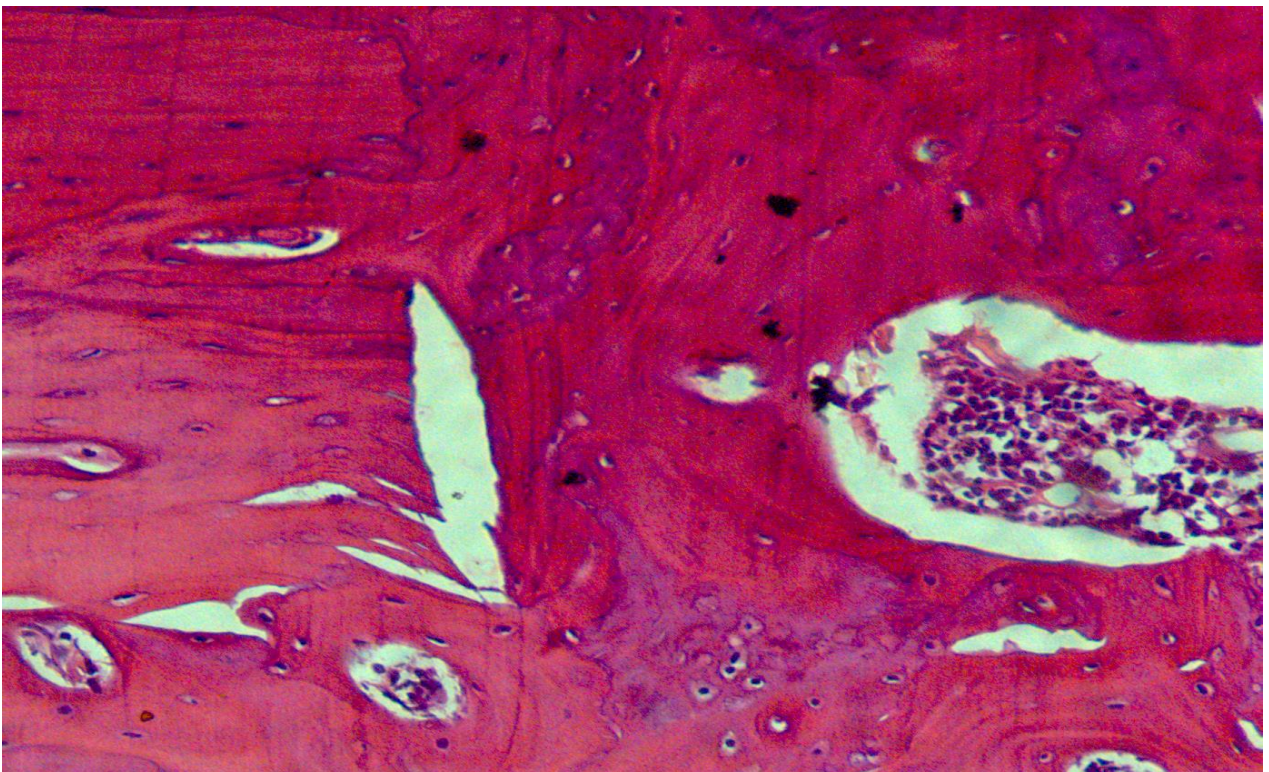
**Figura 13** – IIIDC30 – Trabeculado ósseo bem desenvolvido, especialmente próximo às bordas da cavidade. Algumas trabéculas no interior do espaço medular em processo de remodelação HE. Original objetiva 12,5X.



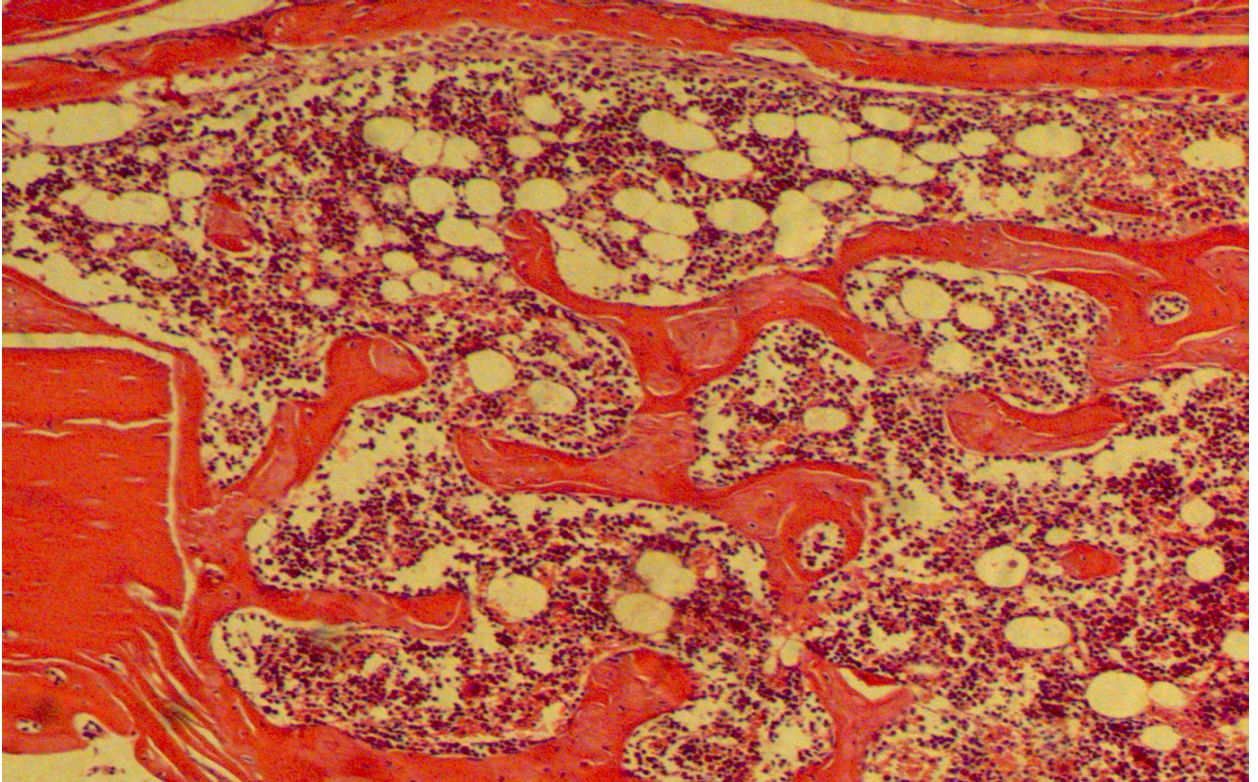
**Figura 14** – IIIDC30 – Trabelculado ainda em processo de desenvolvimento, com espaços intertrabeculares contendo tecido semelhante ao do canal medular. H.E. Original objetiva 25X



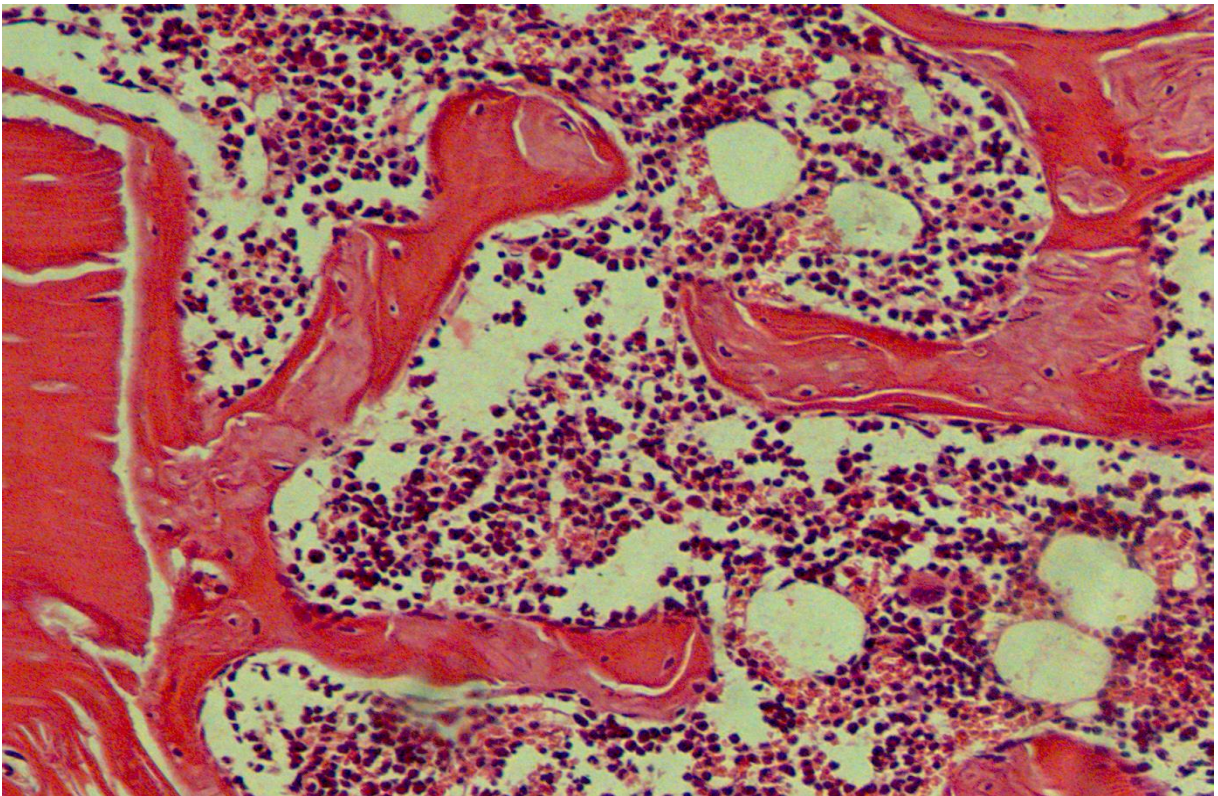
**Figura 15** – ICMB30 – Trabeculado ósseo bem desenvolvido, especialmente próximo às bordas da cavidade. Algumas trabéculas no interior do espaço medular em processo de remodelação HE. Original objetiva 12,5X..



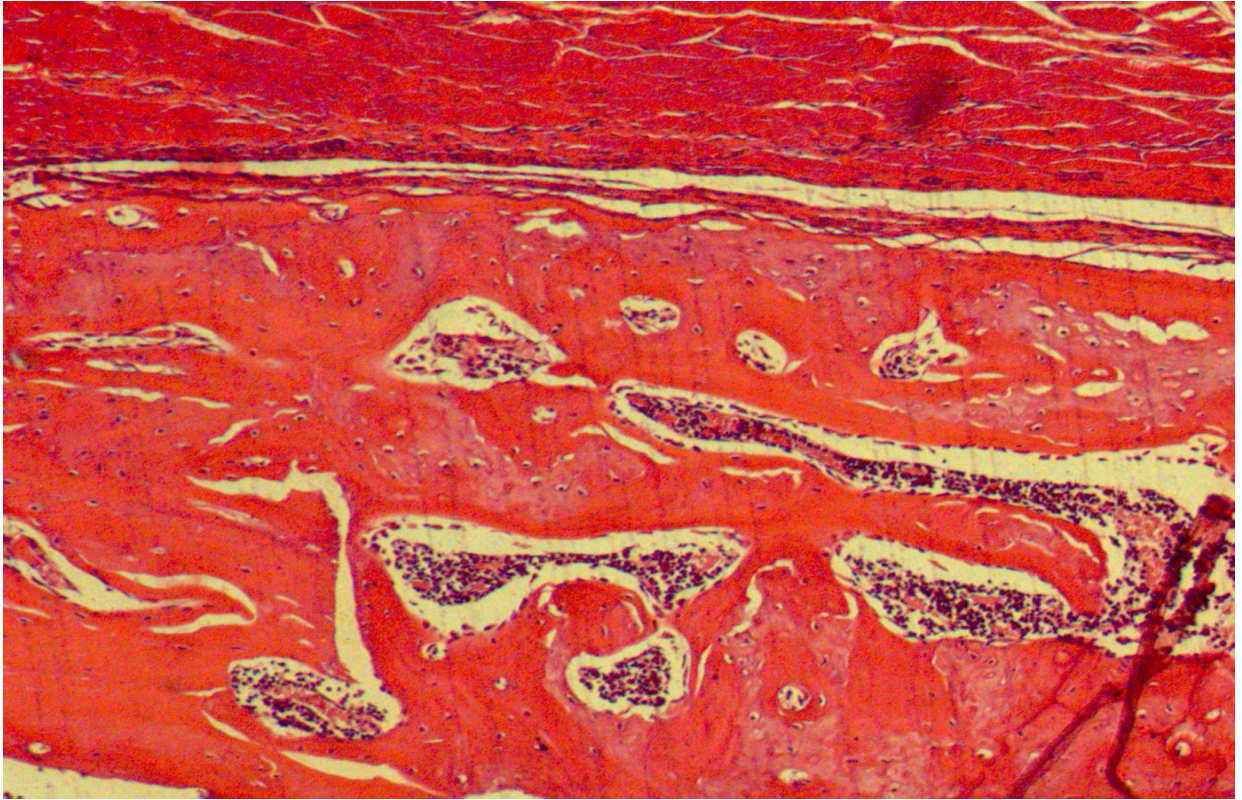
**Figura 16** – ICMB30 –Trabeculado bem desenvolvido, com aprisionamento recente de osteoblastos e disposição ainda irregular das lamelas, se comparado à borda. H.E. Original 25X.



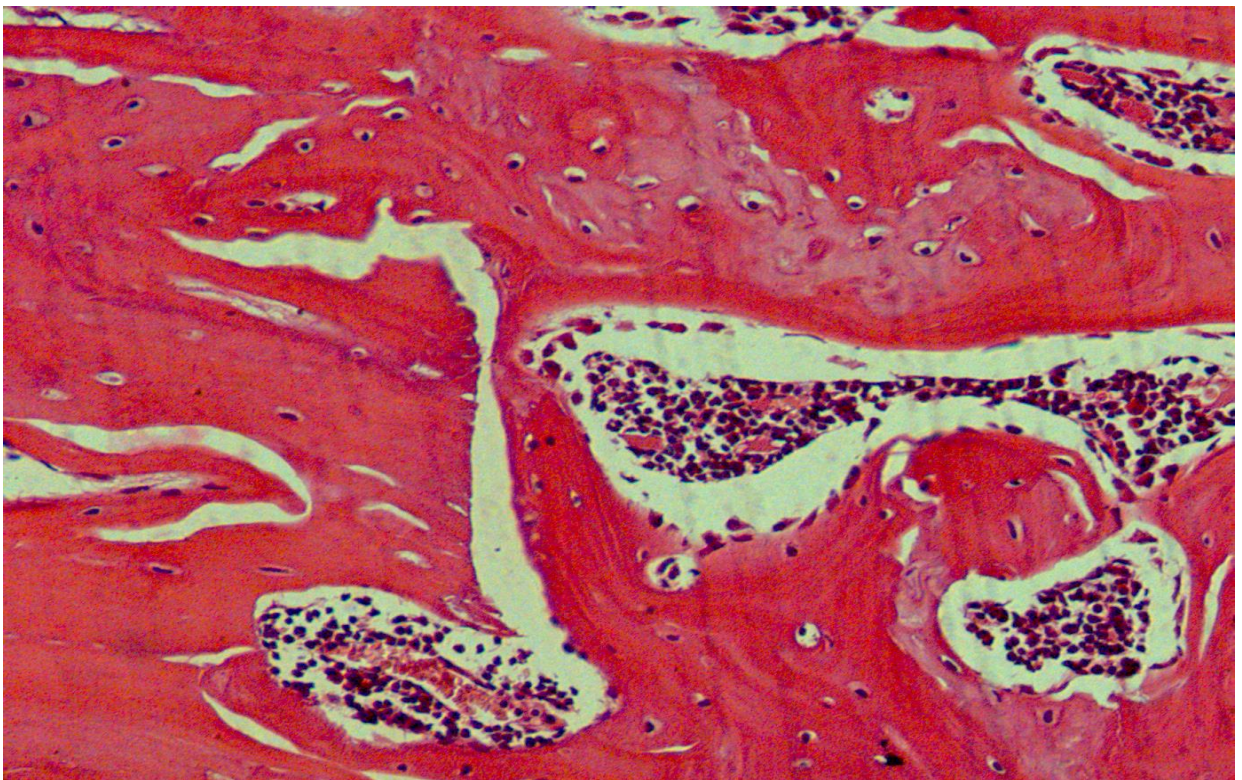
**Figura 17** – IIDMB30 – Fechamento da cavidade com tecido ósseo mais desenvolvido, porém delgado. Presença de grande quantidade de trabéculas ainda em processo de remodelação no interior da cavidade óssea. H.E. Original objetiva 12,5X.



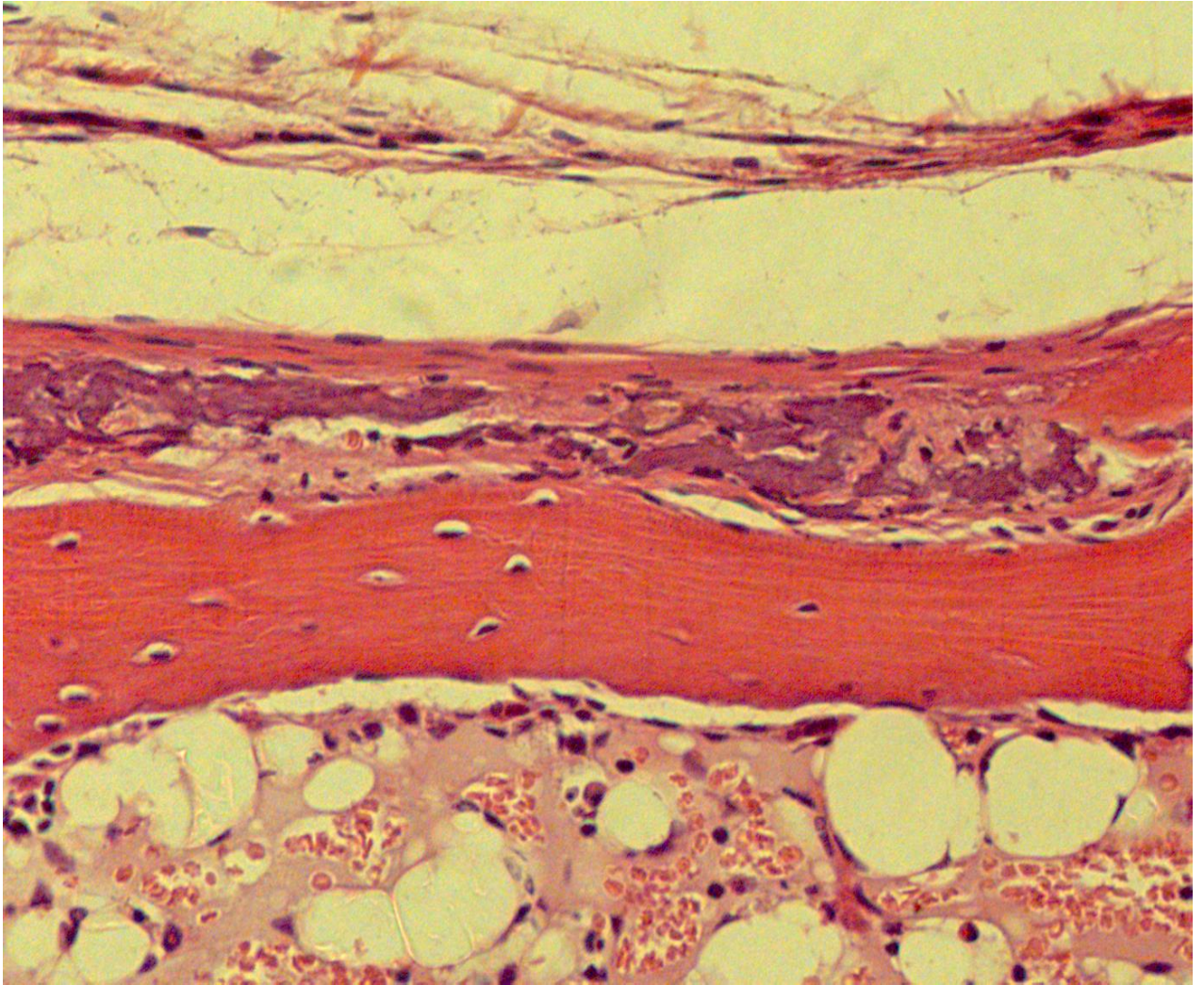
**Figura18** – IIDMB30 – Trabéculado ósseo delgado no interior da cavidade óssea. Espaços intertrabeculares amplos com poucos fibroblastos, grande quantidade de infiltrado inflamatório crônico e vasos sanguíneos. H.E. Original 400X.



**Figura 19**– IIDCMB30 – Fechamento da cavidade com trabeculado ósseo bem desenvolvido e espesso. Ainda há espaços intertrabeculares amplos no interior da cavidade. HE. Original objetiva 12,5X..



**Figura 20** – IIDCMB30 – Trabeculado ósseo bem desenvolvido, com osteoblastos dispostos paralelamente ao redor de suas trabéculas, espaços intertrabeculares amplos no interior da cavidade com infiltrado inflamatório crônico e vasos sanguíneos e. HE. Original objetiva 12,5X.



**Figura 21** – IIDMB30 –Fragmentos da membrana presentes e em processo de reabsorção na superfície da cavidade óssea, especialmente do grupo diabético. Neoformação óssea abaixo e próxima a eles e ausência de células multinucleadas ou osteoclásticas.

# ANEXO D

## Estadística

# Anexo-D

## ANEXO D - Estatística

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Controle is the same across categories of Grupos.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,756 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Diabético is the same across categories of Grupos.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,863 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Diabético_Controlado is the same across categories of Grupos.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,310 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

<sup>1</sup>Exact significance is displayed for this test.

**Figura 1:** Comparação entre as áreas ósseas das cavidades preenchidas apenas com o coágulo e as recobertas por Membrana Bovina aos 10 dias.

**Hypothesis Test Summary**

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Controle is the same across categories of Grupos.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,201 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Diabético is the same across categories of Grupos.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,065 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Diabético_Controlado is the same across categories of Grupos.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,847 <sup>1</sup>	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

<sup>1</sup>Exact significance is displayed for this test.

**Figura 2:** Comparação entre as áreas ósseas das cavidades preenchidas apenas com o coágulo e as recobertas por Membrana Bovina aos 30 dias.

# ANEXO E


# RELATÓRIO FINANCEIRO

# Anexo-E

## ANEXO E - Figuras das RMS's Departamentais para Relatório Financeiro.

03 JUL 2012 16:40 004:55 2/2

UNESP ARACATUBA - S. ADMINISTRACAO 2/4

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - "JULIO DE MESQUITA FILHO"**  
 CAMPUS DE ARACATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
**Requisição de Material**

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA**

Convênio/Projeto PROEX  
 PROPE- Programa RENOVE

Aplicação/  
 Justificativa: *(Cirurgia)*



Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Aranega

**2012-0617 - 03**  
 03/07/2012  
 Página: 1 / 3

**03 - MAT.MEDICO-ODONT, LABOR E VETERIN (Lab)**

ITEM	QTD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR TOTAL ESTIMADO R\$
001	2	caixa	03.069.021	3271862	Lamina em vidro para microscopia, silanizada, 26 x 76mm, borda fosca, caixa com 10 unidades	109,60
002	10	Caixa	03.070.006	2477890 (R)	Laminula de vidro p/ histologia, 24x50 c/100 Corning, Perfecda, Inlab, easypath	38,00

REQUISITANTE		DIRETOR	
<b>Emitente</b>	03/07/2012	<b>Responsável</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora
			Autorizo: ____/____/20____ Prof. Dra Ana Maria Pires Soubhia Diretora
Cleide L.S. Toquedo - Assessor Adm		Alessandra Marcondes Aranega - Coordenador	
<b>Total</b>		<b>R\$ 147,60</b>	



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS DE ARARAQUÁ - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Requisição de Material

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Convênio: Projeto PROEX

PROPE - Programa RENOVE

Aplicação/  
Justificativa:

(Cirurgia)

05 - MAT.MEDICO-ODONT, LABOR E VETERIN (MO)

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Aranega

2012-06-17 - 05

03/07/2012

Página: 3 / 3

ITEM	QTDD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	2	caixa	05 . 101 . 012	1655272 (R)	Tira de teste para glicemia, caixa com 50 tiras, para uso no monitor Accu Check Performa, Marca: Roche	130,00

03 Jul 2012 16:40 00457 2/2

UNESP - ARARAQUÁ - S.C.M.V.INDICADORES F04

REQUISITANTE		Total
<b>Emitente</b>	03/07/2012	<b>R\$ 130,00</b>
<b>Responsável</b>	Alessandra Marcondes Aranega - Coordenador	
<b>DIRETOR</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora	
Autorizo: _____ / ____ / 20	Profª. Dra. Ana Maria Pires Sobhia Diretora	

Cleide L.S. Toquetto - Assessor Adm.

Alessandra Marcondes Aranega - Coordenador

Autorizo: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / 20

Profª. Dra. Ana Maria Pires Sobhia  
Diretora

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
CAMPUS DE ARACATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Requisição de Material

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Araneaga

CÓPIA

Programa Renove

(Carimbo)

2012-0577 - 03

26/06/2012

Página: 1 / 6

03 - MAT.MEDICO-ODONT, LABOR E VETERIN (Lab)

ITEM	QTDD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	4	peça	03.267.002	NT	(C) Caixa para lâminas, capacidade 100 lâminas c/ feiche metálico (OK)	95,20
002	2	Caixa	03.069.003	1794450 (R)	Lâmina de vidro p/microscopia/histologia, 26x76, c/ 50, lapidada, extremidade fosca Marcas: INLAB, GLASSTÉCNICA, MMG, DIFCO, BIOGLASS 521, Precision ou Easyath	4,00
003	1	Peça	03.209.003	NT	(C) Navalha de aço, histológica, para micrótomo, com 16 cm de comprimento, marca Leica (OK)	967,00

29 Jun 20:20:12 08:39 004055 2/2

UNESP - ARACATUBA - S. COMUNICACOES FQA

REQUISITANTE		DIRETOR	
<b>Emittente</b>	26/06/2012	<b>Responsável</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora
 Cleide S. Tequeleto - Assessor Adm.		 Alessandra Marcondes Araneaga - Coordenador	Autorizo: ___/___/20___ Profa. Dra Ana Maria Pires Soubhia Diretora
<b>Total</b>		<b>R\$ 1.066,20</b>	



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
CAMPUS DE ARACATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Requisição de Material

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Aranega

**CÓPIA**

Programa Renove

2012-0577 - 04

Aplicação/  
Justificativa:

26/06/2012  
Página: 2 /6

04 - MEDICAMENTOS E INSUMOS FARMACEUTICOS

ITEM	QTDD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	6	Frasco	04.101.001	(R)	Halotano ou Iatohalo com 250 ml (OK)	991,86
002	5	frasco	04.113.004	(R)	Xilazina 200mg/10 ml, Solução injetável Dopaser, Anasedan ou Coopazine (OK)	37,40

UNESP ARACATUBA - S.COMUNICACOES FEA  
29 Jun 20:2 08:39 004056 2/2

<b>REQUISITANTE</b>		<b>DIRETOR</b>	
<b>Emissante</b>	26/06/2012	<b>Responsável</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora
 Cleide L. Stroque - Assessor Adm.		 Alessandra Marcondes Aranega - Coordenador	
		<b>Autorizo:</b> ____/____/20	Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia Diretora
<b>Total</b>		<b>R\$ 1.029,26</b>	

## DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Araneira

Programa Renove

2012-0577 - 05

Aplicação/

26/06/2012

Justificativa:

Página: 3 /6

## 05 - MAT.MEDICO-ODONT, LABOR E VETERIN (MO)

ITEM	QTDD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	10	unidade	05.447.001	NT	(c) Barreira biológica natural osteoprotetora de cortical óssea bovina, 30mm x 30mm Marca: Genderm / Baumer Cód. 980.S	1.100,00
002	8	Caixa	05.046.018	NT	(c) Fio de nylon 5-0 com 24 envelopes (OK)	123,76
003	100	Par	05.181.010	NT	(c) Luva cirurgica, descartável, esterilizada, nº 7,0 Mucambo, Lenigruber, Madellex, Descarpack	78,00
004	2	caixa	05.180.023	(R)	Seringa descartável para insulina - 1 ml, c/ agulha com 100 (OK)	31,00
005	1	caixa	05.101.012	(R)	Tira de teste para glicemia, caixa com 50 tiras, para uso no monitor Accu Check Performa. Marca: Roche	67,00

2012-08:39 004057 2/2

UNESP ARACATUBA - S.C.MUNICIPALIDADES FPA

<b>REQUISITANTE</b>		<b>DIRETOR</b>	
<b>Emissor</b>	26/06/2012	<b>Responsável</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora
			Autorizo: ____ / ____ / 20 ____
Cleide L. S. Toqueiro - Assessor Adm		Alessandra Marcondes Araneira - Coordenador	Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia Diretora
<b>Total</b>		<b>R\$ 1.399,76</b>	

CÓPIA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
CAMPUS DE ARACATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Requisição de Material



DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Araneja

Programa Renove

2012-0577 - 07

26/06/2012

Página: 4 / 6

Aplicação/  
Justificativa:

07 - SUPRIMENTOS DE INFORMATICA

ITEM	QTDD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	1	peça	07.020.016	2420465	Cartucho de tonner para impressora HP LaserJET P3005n	230,00
002	1	peça	07.020.147	3362221 (R)	Toner para impressora HP, Ref.: CE255A, Cód 55A - preto, rendimento 6.000 páginas, ORIGINAL	265,32

Total R\$ 495,32

REQUISITANTE

Emitente

26/06/2012

Responsável

Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora

DIRETOR

Cleide L.S. Toqueijo - Assessor Adm.

Alessandra Marcondes Araneja - Coordenador

Autorizo: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ /20 \_\_\_\_

Profª. Dra. Ana Maria Pires Soubhia  
Diretora



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA JUNIOR"  
 CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
 Requisição de Material

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Araneaga

**CÓPIA**

Programa Renove  
 Aplicação/  
 Justificativa:



2012-0577 - 08  
 26/06/2012  
 Página: 5 /6

**08 - MAT.MEDICO-ODONT, LABOR E VETERIN (Sub)**

ITEM	QTDD.	UNID.	Cód.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	3	frasco	08.038.004	NT	(c) EDTA - titríplex III com 1kg, marca Merck - cod. 1084181000 (OK)	1.531,20
002	2	frasco	08.079.002	NT	(c) Estreptozotocina anomeros mistos com 1g. código S0130, SIGMA (OK)	2.108,00
003	3	pacote	08.023.005	NT	(c) Parafina histologica 56 a 58° Marca: Merck (OK)	1.513,20

29 Jun 2012 09:40:00 004069 2/2

UNESP ARAÇATUBA - S. DOMINGOS PRA

REQUISITANTE		DIRETOR	
<b>Emitente</b>	26/06/2012	<b>Responsável</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora
 Cleide L.S. Toquetão - Assessor Adm.		 Alessandra Marcondes Araneaga - Coordenador	Autorizo: ____ / ____ /20 ____ Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia Diretora
<b>Total</b>		<b>R\$ 5.152,40</b>	



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA HO"  
CAMPUS DE ARACATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Requisição de Material



DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E CLÍNICA INTEGRADA

Conta: RP - PROEX - Alessandra Marcondes Araneza

Aplicação/  
Justificativa:  
Programa Renove

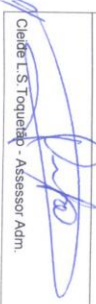

2012-0577 - 11

26/06/2012

Página: 6 /6

11 - OUTROS MATERIAIS DE CONSUMO

ITEM	QTDD.	UNID.	Cod.Material	BEC	DESCRIÇÃO DO MATERIAL	VR.TOTAL ESTIMADO R\$
001	1	Peça	11.046.001	NT	(C) Toner para maquina copiadora Ricoh FT 3213 e FT 3713	108,00

<b>REQUISITANTE</b>		<b>DIRETOR</b>	
Total		R\$ 108,00	
<b>Emitente</b>	26/06/2012	<b>Responsável</b>	Disponibilidade orçamentária a ser confirmada com a assinatura da Diretora
 Cleide T. S. Toqueleto - Assessor Adm.	 Alessandra Marcondes Araneza - Coordenador	Autorizo: ____ / ____ /20 ____  Profª Dra. Ana Maria Pires Soubhia Diretora	