

Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho

“Análise da dinâmica do processo de reparo de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e vidro bioativo (Perioglass®) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico”.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do Grau de “Doutor em Odontologia” – Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto
Co-orientador: Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo

ARAÇATUBA – SP.
- 2009 -

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

C615a	Cláudio-Coutinho, Carolina Chiantelli Análise da dinâmica do processo de reparo de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e vidro bioativo (Perioglass®) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados : estudo histológico , histométrico e imunoistoquímico / Carolina Chiantelli Cláudio-Coutinho. – Araçatuba : [s.n.], 2009 202 f. : il. ; tab. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009 Orientadora: Roberta Okamoto Coorientador: Roelf Justino Cruz Rizzolo 1. Cicatrização de feridas 2. Diabetes mellitus experimental 3. Vidro 4. Materiais biocompatíveis Black D7 CDD 617.64
-------	---

Dados Curriculares

NASCIMENTO: 14.08.1979 – Araçatuba/SP.

FILIAÇÃO: Sadraque Cláudio
Maria Angela Chiantelli Cláudio

1997/2001: Curso de Graduação na Universidade Paulista
Campus de Araçatuba – UNIP.

1999/2001: Estagiária do Departamento de Cirurgia e
Clínica Integrada, Disciplina de Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP.

2003: Aluna Especial de Mestrado na Faculdade
de Odontologia de Araçatuba – UNESP;
Estagiária do Departamento de Cirurgia e
Clínica Integrada, disciplina de Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP.

2004/2005: Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial, nível de Mestrado, na
Faculdade de Odontologia de Araçatuba –
UNESP.

2006/2009: Curso de Pós-graduação em Odontologia,
Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial, nível Doutorado, na Faculdade
de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Dedicatória

Dedicatória

Ao meu marido Marcio pelo intenso e verdadeiro amor. Você é essencial em minha vida. Obrigado por todo incentivo e companheirismo durante esta jornada. Todo meu amor e agradecimento.

À minha filha Lívia que me proporcionou a maternidade. Agradeço a oportunidade de ter me tornado mãe e de compartilhar a vida com uma pessoa tão especial como você. Amor eterno.

Ao meu filho Marcelo, ainda em vida uterina, por trazer a minha vida a realização de uma família completa. Aguardo ansiosamente sua chegada. Amor eterno.

Aos meus pais Sadraque e Angela, pelos valores e ensinamentos ao longo da vida. Amo vocês.

À minha irmã Cristiane, pelo importante convívio no decorrer dos anos. Amo você.

Aos meus avós, sabendo que perto ou longe, vocês sempre estão junto de mim.

Agradecimentos Especiais

**À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa
do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro
que viabilizou a realização deste trabalho de
pesquisa.**

Processo 2006/04929-0.

Agradecimentos Especiais

À Minha Orientadora Prof. Dra. Roberta Okamoto, pela forma carinhosa que conduz os ensinamentos. Agradeço todo o empenho, liberdade de trabalho e confiança dedicados a mim durante esta jornada. Meu eterno agradecimento e admiração.

Ao grande mestre e amigo Prof. Dr. Tetuo Okamoto, responsável pelos meus primeiros passos na vida acadêmica e científica. Sempre será lembrado e agradecido.

Ao Prof. Dr. Roelf Justino Cruz Rizzolo por me proporcionar novas experiências acadêmicas e científicas. Meu agradecimento pelo tempo de convivência que gerou importantes resultados.

Aos Profs. Cláudio Aparecido Casatti e Edílson Ervolino que participaram desta caminhada científica e contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu Diretor Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé e de seu vice-diretor Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia, pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, na pessoa do coordenador do curso Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior, pelo alto nível científico oferecido a este programa.

Aos Professores Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior e Dr. Osvaldo Magro Filho pela amizade e oportunidade de aprendizado.

À Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega pela amizade e confiança. Sem o seu incentivo e orientação tudo seria mais difícil. Meu sincero agradecimento.

Aos professores Dr. Michel Saad Neto, Dra. Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah, Dra. Dóris Hissako Sumida e Dra. Alaíde Gonçalves pelos ensinamentos clínicos e científicos.

Aos meus colegas de Pós-graduação, cada qual com características e qualidades inconfundíveis, por tornarem os momentos muito mais agradáveis: Abrahão Cavalcante Carvalho, Albanir Gabriel Borrasca, Cassiano Pereira, Ellen Gaetti, Eloá Rodrigues Luvizuto, Fernando Guastaldi, Flávia Priscila Pereira,

Francisley Ávila Souza, Heloisa Fonseca Marão, Jéssica Lemos Gulinelli, Jonatas Caldeira Esteves, Leandro Carvalho Cardoso, Marcos Heidy Guskuma, Paulo Esteves Faria, Pedro Ivo, Rodolpho Valentini Neto, Thallita Pereira Queiroz, Thais da Silveira Rodrigues, Walter Betoni Júnior e Walter Gealh.

Aos antigos colegas do Curso de pós-graduação pela paciência e ensinamentos: André Dotto Sotovia, Cristiano Gaujac, Eduardo Faco, Fábio Yoshio Tanaka, Helen Ramon Éesper, Jordan Lima da Silva, Luis Francisco Coradazzi, Marcelo Kayatt Lacoscki, Natasha Magro Érnica, Paulo Almeida Júnior e Thaís Mara Manfrin.

A Paula Ervolino da Silva (Paulinha) e Thalyta Ribeiro Neves da Cruz (Thalytinha) pela colaboração durante toda esta jornada.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela constante torcida e carinhoso convívio: Bernadete Maria Nunes Kimura, Cleide Lemes da Silva, Gilmar Martins de Oliveira, Maria Dirce Colli Boatto e Paulo Roberto Gratão.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Básicas – UNESP, pela disposição e incentivo: André Luis de Matos Piedade, Hilda Teixeira e Sandra Blandy.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp, pela constante disposição.

Aos meus amigos pessoais por compreenderem minha ausência.

A todos os colegas que cursam qualquer tipo de pós-graduação
por contribuírem com a ciência.

" Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim ".

Chico Xavier

Resumo

CLÁUDIO-COUTINHO, CC. Análise da dinâmica do processo de reparo de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e vidro bioativo (Perioglass®) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico, [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2009.

Este trabalho teve como objetivo analisar a dinâmica da reparação de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e com vidro bioativo (Perioglass®) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados através de técnica histológica, histométrica e imunoistoquímica. Para tanto foram utilizados 90 ratos Wistar, machos, com peso entre 230-310g que foram divididos em 3 grupos: Grupo I (grupo controle), Grupo II (grupo diabético não controlado) e Grupo III (grupo diabético controlado); os animais dos Grupos II e III foram induzidos a diabetes através da administração de Streptozotocina (STZ) dissolvida em tampão citrato a 0,01M via veia peniana na concentração de 35mg/Kg de peso do animal enquanto os animais do grupo I receberam apenas a administração de tampão citrato a 0,01M. Os animais do Grupo III receberam diariamente a partir do 4º dia da indução do diabetes a administração de insulina NPH via subcutânea. No 12º após administração do diabetogênico ou tampão citrato os animais foram induzidos a anestesia geral e tiveram o incisivo superior direito extraídos. Metade dos animais de cada grupo tiveram o alvéolo preenchido com coágulo sanguíneo e a outra metade teve o alvéolo preenchido parcialmente com Perioglass®; todos os animais foram suturados com o fio de poliglactina 910. Os períodos experimentais foram aos

7, 14 e 28 dias pós-operatórios. Foram realizadas análise histológica qualitativa em lâminas coradas pela HE e análise histométrica em dois campos de tamanhos idênticos localizados na porção lingual do terço médio alveolar utilizando o Software Imagelab 2000 (Diracon 3) em lâminas coradas pelo Tricrômico de Masson; as médias percentuais de tecido ósseo neoformado foram submetidos ao teste estatístico de Análise de Variância e o pós teste de Holm Sidak para avaliar se houve diferenças entre os grupos experimentais avaliados ($p < 0,05$); para as comparações entre o processo de reparo alveolar observado na presença do coágulo sanguíneo ou vidro bioativo, foi utilizado o teste t de Student não pareado ($p < 0,05$). Reações imunoistoquímicas foram realizadas para evidênciação das proteínas OPG, RANK, RANKL, Osteocalcina e TRAP. Para estas reações foram realizadas análise qualitativa e semi quantitativa através da atribuição de scores para a intensidade da expressão das proteínas analisadas. A alteração sistêmica diabetes mellitus promove redução significativa na taxa de formação e maturação óssea; o vidro bioativo atrasa o processo de reparo alveolar e reduz as respostas sinalizadoras das células envolvidas no processo de reparo alveolar resultando numa menor imunomarcagem para as proteínas avaliadas neste projeto, exceto no grupo de diabéticos não controlados. A indução do diabetes leva a um aumento na imunomarcagem de proteínas conhecidas como novos membros do fator de necrose tumoral, entretanto, também causa uma redução na expressão de osteocalcina, conhecida como marcador da mineralização óssea.

Palavras-chave: cicatrização de feridas, diabetes mellitus experimental, vidro, materiais biocompatíveis.

Abstract

CLÁUDIO-COUTINHO, CC. Analysis of dynamics of alveolar healing process of dental sockets filled with blood clot and bioactive glass (Perioglass®) in non diabetics, controlled diabetics and non controlled diabetics rats. A histological, histometric and imunohistochemistry study, [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2009.

The present study has the aim to evaluate the dynamics of the bone repair in dental sockets filled with blood clot and with bioactive glass (Perioglass®) in non diabetics, controlled diabetics and non controlled diabetics rats through a histological, histometric and immunohistochemistry approach. To perform this study, 90 Wistar rats, male, weighing between 230-310g were divided in three groups: Group I (Control Group), Group II (Non controlled diabetic Group) and Group III (Controlled Diabetic Group); the animals of Groups II and III were induced to diabetes disease through the administration of Streptozotocin (STZ) dissolved in 0,01M citrate buffer in penis vein in concentration of 35mg/kg corporal weight while the animals of Group I received the administration of 0,01M citrate buffer. The animals of Group III received daily, since the 4th day after the diabetes induction, the administration of NPH insuline in a subcutaneous way. In the 12th day after the administration of STZ or citrate buffer, the animals were induced to general anesthesia and had the upper right incisor extracted. Half of the animals of each group had the dental socket filled with blood clot and the other animals had the dental socket partially filled with Perioglass®. All of the animals were sutured with 910 polyglactine

thread. The experimental periods were at 7, 14 and 28 post extraction days. It was performed a qualitative histological analysis in slices stained with HE and the histometric analysis in two sites with same size localized in the lingual portion of the middle third of the dental socket was performed using the Imagelab 2000 Software (Diracon 3) in slices stained with Masson's Tricomic; the percentual mean values of neoformed bone tissue were submitted to the statistical test of Variance Analysis and the post test of Holm Sidak to evaluate if there were differences between the experimental groups evaluated ($p < 0,05$); to the comparisons between the alveolar healing process observed in the presence of blood clot or bioactive glass, it was used the non paired Student's t test ($p < 0,05$). The immunohistochemistry reactions were performed in order to label the OPG, RANK, RANKL, Osteocalcin and TRAP proteins. The results obtained were evaluated through a qualitative analysis and through the scores attribution to the intensity of the expression of the proteins that were evaluated in this study. The systemic alteration induced by melittus diabetes promotes a significantly reduction in the formation and maturation of the bone; the bioactive glass delays the alveolar healing process and reduces the signalization responses to the cells involved in the alveolar healing process resulting in a reduction in the immunolabel of the proteins that were evaluated in this study, with exception of the non controlled diabetics groups. The induction of diabetes leads to an increase in the immunolabel of proteins that are called as new members of necrosis tumoral factor, otherwise, it also causes a reduction in the expression of osteocalcin, that is recognized as a bone mineralization marker.

Keywords: wound healing, diabetes mellitus experimental, glass, biocompatible materials.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

STZ	Streptozotocina
h	horas
°C	Graus Celsius
M	Molar
UI	Unidade Internacional
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
µm	micrometros
HE	Hematoxilina Eosina
%	Por cento ou porcentagem
mg	Miligrama
Kg	Quilograma
g	Grama
dl	Decilitro
X	Vezez
GI ou G1	Grupo I – controle
GII ou G2	Grupo II – diabético não controlado
GIII ou G3	Grupo III – diabético controlado
<	menor
RANK	Receptor Activator Nuclear Kappa-B
RANKL	Receptor Activator Nuclear Kappa-B Ligand
OTC	Osteocalcina
TRAP	Tartrate resistant acid phosphatase
OPG	Osteoprotegerina

Lista de Figuras

Figura 1	Corte histológico do alvéolo em reparação em sentido longitudinal. Coloração Tricrômico de Masson (aumento de 10X). Destaque para a região onde é realizada a análise histométrica.	39
Figura 2	Grupo I – coágulo terço médio – 7 dias HE 63X. Presença de formação óssea inicial e grande quantidade de células inflamatórias e fibroblastos predominando em grande parte do alvéolo.	44
Figura 3	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 7 dias HE 63X. Evidente presença de partículas de biovidro no interior do alvéolo. Discreto infiltrado inflamatório ao redor das partículas.	45
Figura 4	Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias HE 63X. Observam-se áreas de tecido ósseo neoformado.	46
Figura 5	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 14 dias HE 63X. Observam-se “pontes” de tecido ósseo neoformado ainda imaturo entre as partículas de biovidro.	47
Figura 6	Grupo I – coágulo terço médio – 28 dias HE 63X. Alvéolo apresenta tecido ósseo neoformado com maturidade em praticamente toda sua extensão.	48
Figura 7	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 28 dias HE 63X. Observa-se tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro (A).	49
Figura 8	Grupo II – coágulo terço médio – 7 dias HE 160X. Presença de infiltrado inflamatório intenso com desorganização celular.	50
Figura 9	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias HE 160X. Partículas de vidro bioativo no interior do alvéolo. Desorganização celular intensa (A) nos espaços entre as partículas do biomaterial.	51
Figura 10	Grupo II – coágulo terço médio – 14 dias HE 160X. Observa-se presença de trabéculas ósseas neoformadas imaturas e grandes lacunas com tecido conjuntivo (A).	52
Figura 11	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 14 dias HE 160X. Discretas áreas de “pontes” de tecido ósseo entre as partículas de biovidro.	53
Figura 12	Grupo II – coágulo terço médio – 28 dias HE 160X. Alvéolo apresenta tecido ósseo neoformado imaturo e algumas regiões com tecido conjuntivo (A).	54
Figura 13	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias HE 160X. Observa-se pequena quantidade de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro (A) e várias regiões com ausência da formação de tecido ósseo (B).	55

Figura 14	Grupo III – coágulo terço médio – 7 dias HE 160X. Nota-se presença de tecido conjuntivo junto aos remanescentes de coágulo sanguíneo.	56
Figura 15	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 7 dias HE 160X. Presença de partículas de biovidro no interior do alvéolo e intensa desorganização celular.	57
Figura 16	Grupo III – coágulo terço médio – 14 dias HE 160X. Observam-se áreas de tecido ósseo neoformado e grande quantidade de tecido conjuntivo.	58
Figura 17	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 14 dias HE 160X. Ausência de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro.	59
Figura 18	Grupo III – coágulo terço médio – 28 dias HE 160X. Alvéolo apresenta tecido ósseo neoformado com maturidade em praticamente toda sua extensão.	60
Figura 19	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 28 dias HE 160X. Observa-se tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro (A) e algumas regiões com tecido conjuntivo (B).	61
Figura 20	Grupo I – coágulo terço médio – 7 dias RANKL 63X. Marcações específicas para a proteína RANKL em osteoblastos e osteócitos.	71
Figura 21	Grupo I – coágulo terço médio – 7 dias Osteocalcina 63X. Discreta imunomarcação para Osteocalcina.	71
Figura 22	Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias RANKL 63X. Intensa marcação celular de RANKL em osteoblastos, fibroblastos e osteócitos.	73
Figura 23	Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias TRAP 63X. Intensa marcação em osteoclastos presentes junto as trabéculas ósseas neoformadas.	73
Figura 24	Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias RANK 63X. Marcações específicas para RANK em células semelhantes a osteoblastos.	74
Figura 25	Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias Osteocalcina 63X. Osteóide marcado positivamente para Osteocalcina.	74
Figura 26	Grupo I – coágulo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Imunomarcação moderada para Osteocalcina no trabeculado ósseo neoformado.	75
Figura 27	Grupo II – coágulo terço médio – 7 dias RANK 63X. Presença de tecido conjuntivo no interior do alvéolo. Discreta imunomarcação para RANK.	76
Figura 28	Grupo II – coágulo terço médio – 7 dias OPG 63X. Expressão com intensidade moderada a intensa para OPG.	77

Figura 29	Grupo II – coágulo terço médio – 14 dias OPG 63X. Células do tecido conjuntivo e osteoblastos marcados positivamente para OPG.	78
Figura 30	Grupo II – coágulo terço médio – 14 dias RANK 63X. Intensa marcação de RANK na periferia da matriz óssea neoformada.	78
Figura 31	Grupo II – coágulo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Trabéculas ósseas neoformadas com discreta marcação para Osteocalcina.	79
Figura 32	Grupo III – coágulo terço médio – 7 dias RANK 63x. Tecido conjuntivo e células com morfologia semelhante a osteoblastos marcados moderadamente para RANK.	80
Figura 33	Grupo III – coágulo terço médio – 14 dias Osteocalcina 63X. Marcações para Osteocalcina na matriz extracelular e trabéculas ósseas.	81
Figura 34	Grupo III – coágulo terço médio – 28 dias OPG 63X. Marcações específicas para OPG em osteócitos e osteoblastos ao redor do trabeculado ósseo.	82
Figura 35	Grupo III – coágulo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Trabéculas ósseas e matriz extracelular marcadas positivamente.	83
Figura 36	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 7 dias Osteocalcina 63X. Trabeculado ósseo em início de formação com discreta marcação para Osteocalcina.	85
Figura 37	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 7 dias RANKL 63X. Discreta marcação em osteócitos no osso pré-existente e tecido conjuntivo.	85
Figura 38	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 14 dias Osteocalcina 63X. Ausência de marcações específicas para Osteocalcina.	86
Figura 39	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 28 dias TRAP 63X. Marcação intensa de TRAP junto as partículas do biovidro e também nas trabéculas ósseas.	88
Figura 40	Grupo I – vidro bioativo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Algumas células (osteoblastos) marcadas positivamente para Osteocalcina.	88
Figura 41	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias OPG 63X. Osteoblastos e tecido conjuntivo com marcações positivas.	90
Figura 42	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias Osteocalcina 63x. Pouca formação de tecido ósseo. Discreta imunomarcação para Osteocalcina.	90
Figura 43	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias RANK 63X. Tecido conjuntivo (marcação moderada a intensa) e células semelhante a osteócitos e osteoblastos (marcação discreta a moderada) expressando RANK.	91

Figura 44	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 14 dias TRAP 63X. Osteoclastos marcados para TRAP.	92
Figura 45	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 14 dias OPG 63X. Tecido conjuntivo preenchendo grande parte do alvéolo dental. Intensa marcação de OPG.	93
Figura 46	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias RANK 63X. RANK se expressando com intensidade na periferia da matriz já sintetizada e em células semelhante a osteócitos.	94
Figura 47	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Partículas do biovidro no terço médio alveolar. Alguns pontos da matriz extracelular e osteoblastos com marcações específicas para Osteocalcina.	95
Figura 48	Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias OPG 63X. Tecido conjuntivo e osteoblastos marcados com intensidade.	95
Figura 49	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 7dias RANK 63X. Presença de tecido conjuntivo imaturo em praticamente toda extensão alveolar. Moderada expressão de RANK em osteoblastos.	97
Figura 50	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 7dias RANKL 63X. Células do tecido conjuntivo com discreta marcação para RANKL.	97
Figura 51	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 14dias TRAP 63X. Moderada expressão de TRAP.	98
Figura 52	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 14dias OPG 63X. Moderada a intensa expressão de OPG.	99
Figura 53	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 28dias Osteocalcina 63X. Intensa expressão de osteocalcina na matriz extracelular e moderada expressão nas trabéculas ósseas.	100
Figura 54	Grupo III – vidro bioativo terço médio – 28dias TRAP. Moderada-intensa expressão de TRAP.	100

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Gráfico em colunas representando a porcentagem média de osso neoformado no grupo I, comparando os subgrupos coágulo e vidro, em todos os períodos experimentais.	63
Gráfico 2	Gráfico em colunas representando a porcentagem média de osso neoformado no grupo II, comparando os subgrupos coágulo e vidro, em todos os períodos experimentais.	64
Gráfico 3	Gráfico em colunas representando a porcentagem média de osso neoformado no grupo III, comparando os subgrupos coágulo e vidro, em todos os períodos experimentais.	65
Gráfico 4	Porcentagem média de formação de tecido ósseo no terço médio do alvéolo dos grupos I, II e III e nos subgrupos coágulo e vidro aos 7 dias pós-operatórios.	66
Gráfico 5	Porcentagem média de formação de tecido ósseo no terço médio do alvéolo dos grupos I, II e III e nos subgrupos coágulo e vidro aos 14 dias pós-operatórios.	67
Gráfico 6	Porcentagem média de formação de tecido ósseo no terço médio do alvéolo dos grupos I, II e III e nos subgrupos coágulo e vidro aos 28 dias pós-operatórios.	67
Gráfico 7	Representação gráfica comparativa da expressão de Osteoprotegerina após análise semi quantitativa.	101
Gráfico 8	Representação gráfica comparativa da expressão de RANK após análise semi quantitativa.	101
Gráfico 9	Representação gráfica comparativa da expressão de RANKL após análise semi quantitativa.	102
Gráfico 10	Representação gráfica comparativa da expressão de Osteocalcina após análise semi quantitativa.	102
Gráfico 11	Representação gráfica comparativa da expressão de TRAP após análise semi quantitativa.	103

Sumário

1- Introdução.....	27
2- Proposição.....	30
3- Material e Método.....	32
4- Resultado.....	41
5- Discussão.....	104
6- Conclusão.....	119
Referências.....	122
Anexo.....	133

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A reparação óssea ocorre à partir de um balanço exercido entre diferentes linhagens celulares¹. A atividade metabólica destas células é mediada em função de eventos inflamatórios, controlados por inúmeros agentes moduladores (mediadores químicos, hormônios, proteínas, citocinas, fatores de crescimento entre outros), capazes de modificar elementos celulares e respostas teciduais².

Pesquisadores apontam que fatores sistêmicos interferem diretamente nas respostas teciduais que promoverão a reparação óssea alveolar, sendo o diabetes uma patologia significativa para o processo alveolar³⁻⁹.

A cavidade bucal sofre transtornos frente à doença gerando sinais e sintomas que promoverão atraso na proliferação celular^{10,11} e no metabolismo do colágeno^{12,13}, interferindo assim na formação do tecido de granulação e na deposição óssea, retardando a reparação alveolar⁴⁻⁹.

Frente à necessidade de reverter ou minimizar processos que possam vir a interferir na reparação óssea, uma atenção particular tem sido dada ao estudo de biomateriais com atributos para a substituição óssea ou favorecimento da neoformação tecidual¹⁴.

O vidro bioativo é uma cerâmica sintética composta descrita por Hench¹⁵⁻¹⁷ na década de 70; é biocompatível¹⁸, atóxica¹⁹, reabsorvível²⁰, radiopaca²¹, com propriedades osteocondutora^{20,22,23}, hemostática^{23,24} e

antimicrobiana^{25,26} além se ter como sua principal característica a promoção de uma forte união química com o tecido ósseo^{24,27,28}.

Resultados clínicos obtidos com o seu emprego na forma de cones para aplicação intra-alveolar^{29,30} e, mais recentemente, em apresentação particulada³¹⁻³⁵ demonstraram ser positiva a sua participação no processo de reparo alveolar. Quando utilizado como implante intra-alveolar frente a alterações sistêmicas como a osteoporose³⁶ apresenta respostas bastante satisfatórias em relação à cronologia.

Visto que a cronologia do processo de reparo alveolar encontra-se comprometido frente a enfermidades sistêmicas como o diabetes, esse estudo busca avaliar se o uso do vidro bioativo (Perioglass®) em alvéolos de animais enfermos, diabéticos controlados e não controlados, após extração dental é capaz de reverter ou minimizar o comprometimento dos processos teciduais locais causados por alterações endócrinas que irão interferir na cronologia do reparo.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar através de técnica histológica, histométrica e imunoistoquímica a dinâmica da reparação de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e com vidro bioativo (Perioglass®) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados.

Material e Método

3 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Ética na Experimentação Animal e encontra-se aprovado sob protocolo nº 2008-003206.

Para o presente estudo foram utilizados 90 ratos (*Rattus norvegicus albinus*-Wistar), machos, com peso inicial variando entre 230-300 gramas. Os animais, provenientes do biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, foram transportados para o Biotério do Departamento de Ciências Básicas da mesma Faculdade, onde foram mantidos por 7 dias para adaptação em gaiolas à temperatura de 22°C e em ciclos claro-escuro (12/12h), recebendo ração sólida e água à vontade. Prévia a indução do diabetes, os animais foram mantidos em jejum por 14-16 horas recebendo apenas água.

3.1 - Indução do diabetes - administração de STZ.

Decorridos 7 (sete) dias e após jejum, os animais foram induzidos à anestesia geral pela infiltração via intramuscular de Coopazine (Xilazina – Coopers Brasil Ltda) e Vetaset (Cloridrato de quetamina injetável - Fort Dodge Saúde Animal Ltda) na dosagem indicada conforme fabricante. Foram induzidos ao diabetes através da administração de Streptozotocina (STZ-Sigma) dissolvida em tampão citrato a 0,01M pH 4,5 (Farmácia Aphoticário – Araçatuba – SP), abrigada da luz e administrada no animal via veia peniana na concentração de 35mg/Kg de peso do animal.

Os animais foram divididos em três grupos:

- **GRUPO I:** grupo controle, onde o animal recebeu a administração apenas de tampão citrato 0,01 M;
- **GRUPO II:** grupo diabético não controlado, onde o animal recebeu a administração de STZ dissolvido em tampão citrato 0,01M e ;
- **GRUPO III:** grupo diabético controlado, onde o animal recebeu o mesmo tratamento do grupo II e a administração de insulina diariamente via subcutânea.

3.2- Determinação das taxas glicêmicas, peso e administração de insulina.

As taxas glicêmicas dos animais foram monitoradas do 4º ao 40º dia após a administração de STZ e tampão citrato.

Nos animais dos grupos I e II o monitoramento glicêmico foi realizado em três períodos do experimento sendo a primeira glicemia realizada 4 (quatro) dias após a administração de STZ ou tampão citrato; a segunda glicemia foi realizada 1(um) dia antes da extração dental e a terceira glicemia feita antes do sacrifício do animal. Já nos animais do Grupo III os testes glicêmicos foram realizados em dias alternados até o final do experimento à partir do 4º dia após a indução do diabetes. Foram desprezados os animais do grupo I que apresentaram glicemia superior a 180 e os animais do grupo II e III que apresentaram glicemia inferior a 350; o score de descarte foi considerado logo

na primeira determinação de taxa glicêmica e mantido até o final do experimento.

O peso corporal dos animais dos grupos I, II e III foi monitorado 3 (três) vezes durante todo o experimento, não sendo considerado o peso inicial; a pesagem dos animais foi realizada em balança digital (Balança eletrônica de bancada modelo 9094 3/6Kg – Toledo do Brasil) nos mesmos dias em que foram realizados os testes glicêmicos dos animais dos grupos I e II.

A administração de insulina no grupo diabético controlado foi realizada diariamente a partir do 4º dia da indução do diabetes. A insulina utilizada foi a NPH – (Novolin N® - Novo Nordisk) administrada via subcutânea. As unidades de insulina foram administradas conforme necessidade individual dos animais a partir dos resultados glicêmicos.

3.3- Procedimento cirúrgico.

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em jejum por 14 horas. No 12º dia após administração de STZ e tampão citrato os animais foram induzidos à anestesia geral pela infiltração via intramuscular de Coopazine (Xilazina – Coopers Brasil Ltda) e Vetaset (Cloridrato de quetamina injetável - Fort Dodge Saúde Animal Ltda) na dosagem indicada conforme fabricante. Foi realizada antissepsia do campo operatório com PVP-I (polivinilpirrolidona iodada) e a extração do incisivo superior direito através de técnica previamente descrita³⁷.

No dia da extração dental, os animais do Grupo III (diabético controlado) não receberam injeção de insulina pelo fato de estarem em jejum e do stress

gerado pelo procedimento causar hipoglicemia.

Após a extração dental, 5 animais de cada grupo e período tiveram o alvéolo preenchido por coágulo sanguíneo e receberam sutura. Outros 5 animais tiveram o alvéolo parcialmente preenchido com vidro bioativo Perioglass® e também receberam sutura. O fio utilizado para sutura foi o Vicryl® 4-0.

Para a adaptação do vidro bioativo Perioglass® no terço médio do alvéolo utilizou-se um calcador metálico, onde através de compressão adaptou-se o biomaterial que preencheu parcialmente o alvéolo.

A disposição dos grupos e subgrupos pode ser melhor compreendida com a utilização da tabela abaixo:

	HISTOLÓGICO						IMUNOISTOQUÍMICA					
	7 dias		14 dias		28 dias		7 dias		14 dias		28 dias	
	c	v	c	v	c	v	c	v	c	v	c	v
GI	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GII	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
GIH	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Tabela 1: Disposição de grupos e subgrupos com o respectivo número de animais analisados por período onde:

c: alvéolo preenchido com coágulo sanguíneo.

v: alvéolo preenchido com vidro bioativo (Perioglass®).

Todos os animais receberam após extração dental a administração de 20.000UI de benzilpenicilina via intramuscular.

Os períodos experimentais foram aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios.

3.4- Sacrifício dos animais, obtenção das peças e processamento laboratorial.

Todos os animais foram sacrificados por injeção excessiva de anestésico (Pentobarbital sódico 100mg/Kg de peso) via intraperitoneal. Independente do tipo de tramitação laboratorial as maxilas contendo os alvéolos em reparação foram removidas através de um corte tangenciando a sutura intermaxilar realizado com lâmina de bisturi e outro corte junto à face distal do último molar realizada com tesoura. A peça foi recortada removendo-se os excessos de tecido mole.

Para a análise histológica e imunoistoquímica as peças foram fixadas em formalina 10% por 24 horas e descalcificadas em EDTA (Merck) 5% por 42 dias. Foram incluídas em parafina e submetidas à microtomia para a obtenção de cortes longitudinais com 6µm de espessura.

3.5- Análise dos resultados.

Os cortes utilizados para análise histológica foram corados pela HE e analisados qualitativa e quantitativamente em microscópio de luz, onde foi levado em consideração o infiltrado inflamatório e a organização do tecido durante o processo de reparação, assim como os tipos celulares envolvidos.

Para os cortes corados por Tricrômico de Masson foi realizada uma análise quantitativa do tecido ósseo neoformado no alvéolo com o auxílio do Software Imagelab 2000 (Diracom 3). A quantificação foi realizada em dois 2

campos de tamanhos idênticos capturados na porção lingual do terço médio alveolar. Por meio de uma objetiva de aumento de 10/0,25 Axiolab (Carl Zeiss, Alemanha) as imagens foram capturadas (.tif) e transferidas para o software Imagelab 2000. O tecido ósseo presente no campo foi delimitado manualmente e foi realizado o “Cálculo de regiões”. Após a realização da histometria, os valores obtidos foram armazenados em uma planilha de cálculos, e descritas em gráficos para comparação de valores.

Para esta análise foram adotados 3 critérios: 1-) análise de apenas um corte histológico de cada animal; 2-) delimitação de dois campos de tamanhos equivalentes na porção lingual do terço médio e 3-) padronização no tamanho e posição dos campos.

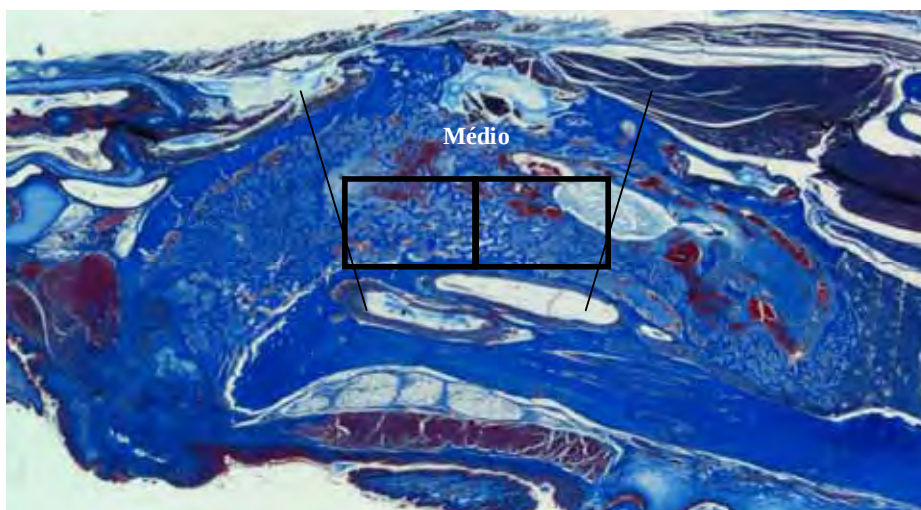


Figura 1- Corte histológico do alvéolo em reparação em sentido longitudinal. Coloração Tricrômico de Masson (aumento de 10X). Destaque para a região onde é realizada a análise histométrica.

A partir dos valores obtidos na análise histométrica foi realizada análise estatística através do Programa Sigma Stat 3.1 (Systat Software, Califórnia, USA), utilizando-se os testes paramétricos de Análise de Variância e o pós

teste de Holm Sidak para avaliação de possíveis diferenças estatísticas em nível de 5% ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais avaliados. Para as comparações entre os subgrupos foi aplicado o teste t de Student não pareado adotando-se também nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Para análise imunoistoquímica foram realizadas reações para a evidenciação das proteínas Osteoprotegerina-OPG (SC21038 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), RANK (SC7626 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), RANKL (SC7627 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), Osteocalcina (SC18319 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) e TRAP (SC 30832 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) utilizando como método de detecção a imunoperoxidase; a streptavidina (Dako, Carpinteria, USA) foi utilizada como amplificador do sinal de marcação e a Diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA) como cromógeno. Ao término da reação, os cortes receberam contra coloração por Hematoxilina de Harris.

Nas lâminas onde foram realizadas as reações imunoistoquímicas foram realizadas análises qualitativa e semi quantitativa em microscópio de luz. Para a análise qualitativa foram levados em consideração os tipos celulares marcados positivamente pelas proteínas analisadas; a análise semi quantitativa foi realizada atribuindo scores (0,1,2 e 3) para mensurar o nível de intensidade da expressão das proteínas (marcação ausente, discreta, moderada e intensa) onde foram considerados:

Intensidade da marcação	Score
Ausente	0
Discreta	1
Moderada	2
Intensa	3

Resultado

4 RESULTADO

4.1 - Análise clínica dos animais.

Os animais foram separados por grupos (GI, GII e GIII) e subgrupos (coágulo e vidro bioativo) e mantidos em número de 4 por gaiola, todos nas mesmas condições de temperatura, luz, alimentação e higiene; tiveram o peso e as taxas glicêmicas monitorados durante todo o experimento.

Ao analisarmos os animais do grupo I, notamos que após a administração de tampão citrato, sem exceção, todos apresentaram aumento progressivo do peso corporal, além de não apresentaram clinicamente sinal de polifagia, poliúria ou polidipsia.

Nos animais dos grupos II e III, 4 dias após a administração de STZ, os sinais clínicos de poliúria, polifagia e polidipsia eram bastante evidentes. No entanto, nos animais do grupo II a perda de peso foi mais acentuada quando comparado ao grupo III que recebeu doses diárias de insulina; ainda com relação ao peso corporal, os animais do grupo III se comportaram com semelhança ao grupo controle após o início da insulino-terapia.

Durante todo o experimento não houve alterações relevantes nas taxas glicêmicas dos animais do grupo I e II, onde a média glicêmica do grupo I foi de 103,8 mg/dl e a do grupo II de 468,8mg/dl. Já nos animais do grupo III, as taxas glicêmicas tiveram discretas variações, sendo estas estabilizadas por doses individualizadas de insulina. A média glicêmica dos animais do grupo III foi de 169,5 mg/dl. Observou-se ainda discreta agressividade e intolerância nos animais do grupo III.

4.2- Análise histológica.

A análise histológica foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico, onde foram considerados qualitativamente o infiltrado inflamatório e a quantidade e qualidade do tecido ósseo neoformado no terço médio do alvéolo. Nos grupos em que o alvéolo foi parcialmente preenchido com o vidro bioativo Perioglass® observou-se também o comportamento biológico do biomaterial utilizado.

Os resultados serão apresentados em função dos grupos experimentais.

Grupo I

No grupo I, aos 7 dias, coágulo, foi observada a presença do coágulo sanguíneo ao longo de todo o alvéolo. Notou-se a presença de uma proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais e macrófagos) provenientes dos remanescentes do ligamento periodontal (Figura 2). Nos terços médio e apical, em algumas áreas, foi possível observar a presença de um tecido em organização com algumas trabéculas ósseas imaturas.

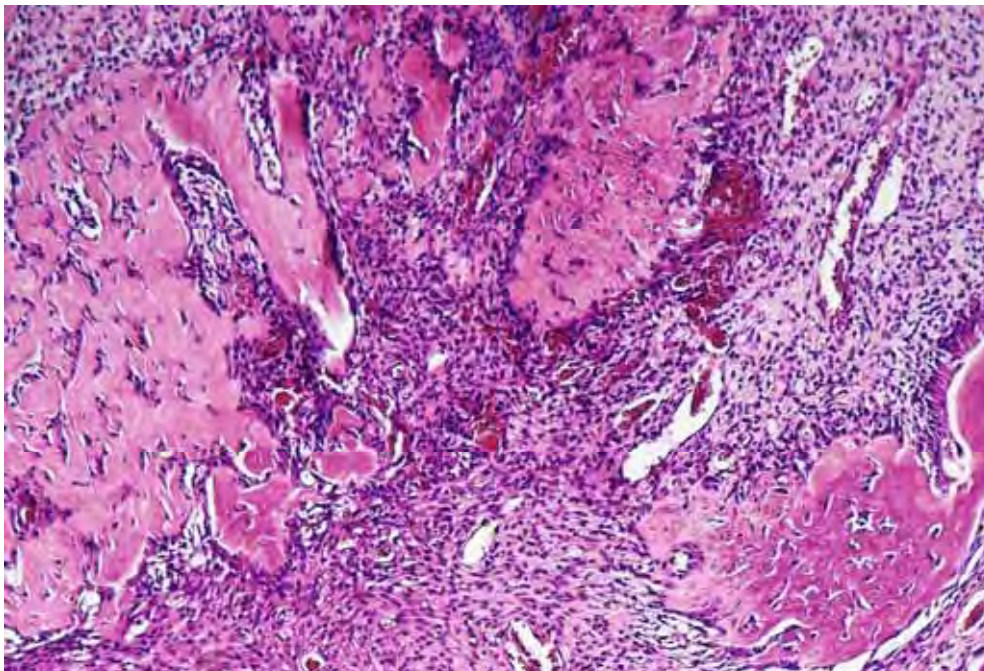


Figura 2 – Grupo I – coágulo terço médio – 7 dias HE 63X. Presença de formação óssea inicial e grande quantidade de células inflamatórias e fibroblastos predominando em grande parte do alvéolo.

No grupo I, aos 7 dias, vidro bioativo, foi observada a presença de coágulo sanguíneo e de vidro bioativo nos terços médio e cervical do alvéolo dental. Vale destacar que o vidro bioativo foi implantado junto ao terço médio dos alvéolos dentais, no entanto, durante a evolução do processo de reparo alveolar, houve uma migração do biomaterial fazendo com que ele permanecesse, na maioria dos espécimes junto ao terço médio, mas em alguns espécimes, junto ao terço cervical. Foi observado infiltrado inflamatório ao redor das partículas do biomaterial (Figura 3). Destaca-se também a presença de proliferação celular discreta a partir dos remanescentes do ligamento periodontal.

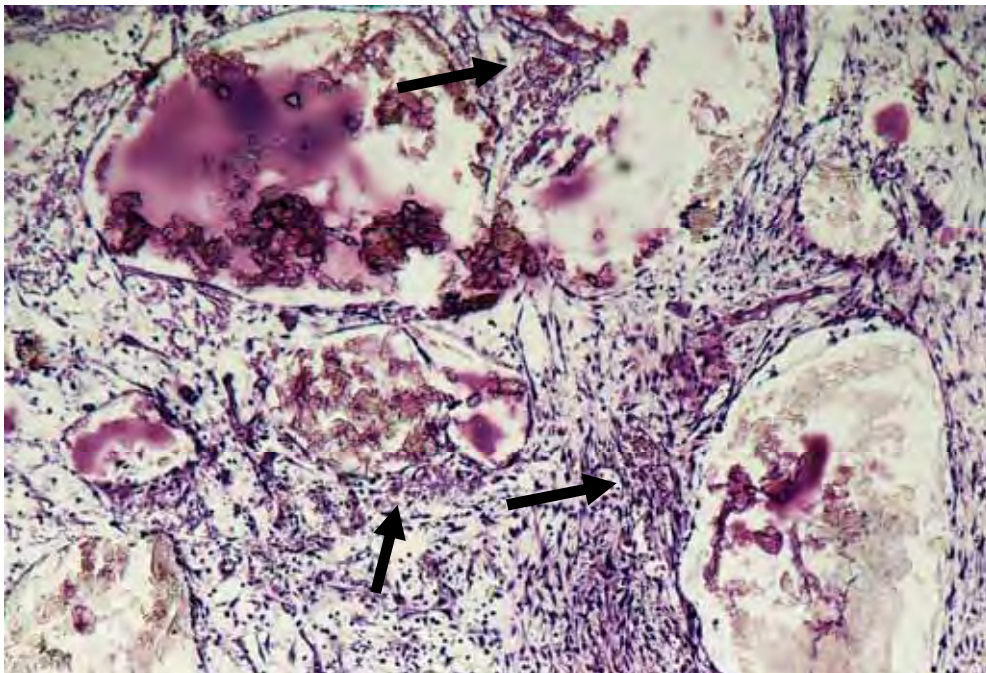


Figura 3- Grupo I – vidro bioativo terço médio – 7 dias HE 63X. Evidente presença de partículas de biovidro no interior do alvéolo. Discreto infiltrado inflamatório ao redor das partículas.

No grupo I, aos 14 dias, coágulo, foi observado trabeculado ósseo em maturação, preenchendo grande parte do alvéolo dental (figura 4). A formação óssea observada foi encontrada principalmente junto aos terços médio e cervical. Raras regiões com coágulo sanguíneo foram observadas neste período.

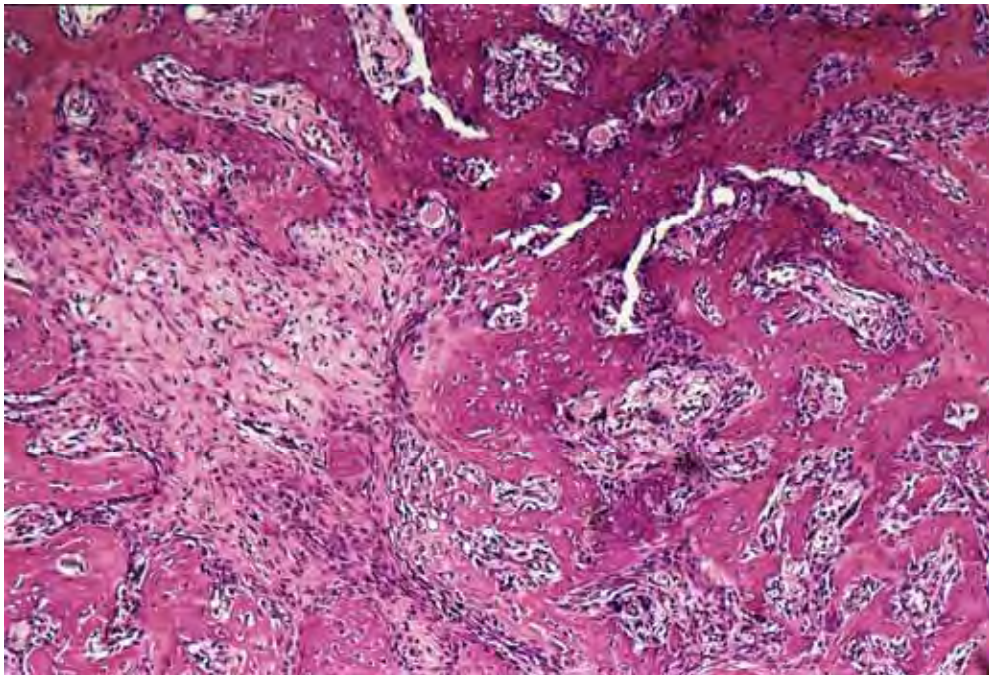


Figura 4- Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias HE 63X. Observam-se áreas de tecido ósseo neoformado.

No grupo I, aos 14 dias, vidro bioativo, foi observada pequena quantidade de trabeculado ósseo imaturo e tecido conjuntivo preenchendo o alvéolo dental. Junto ao trabeculado ósseo e tecido conjuntivo, foram observadas as partículas de vidro bioativo em processo de incorporação pelo tecido ósseo formado, como ilustrado na Figura 5.

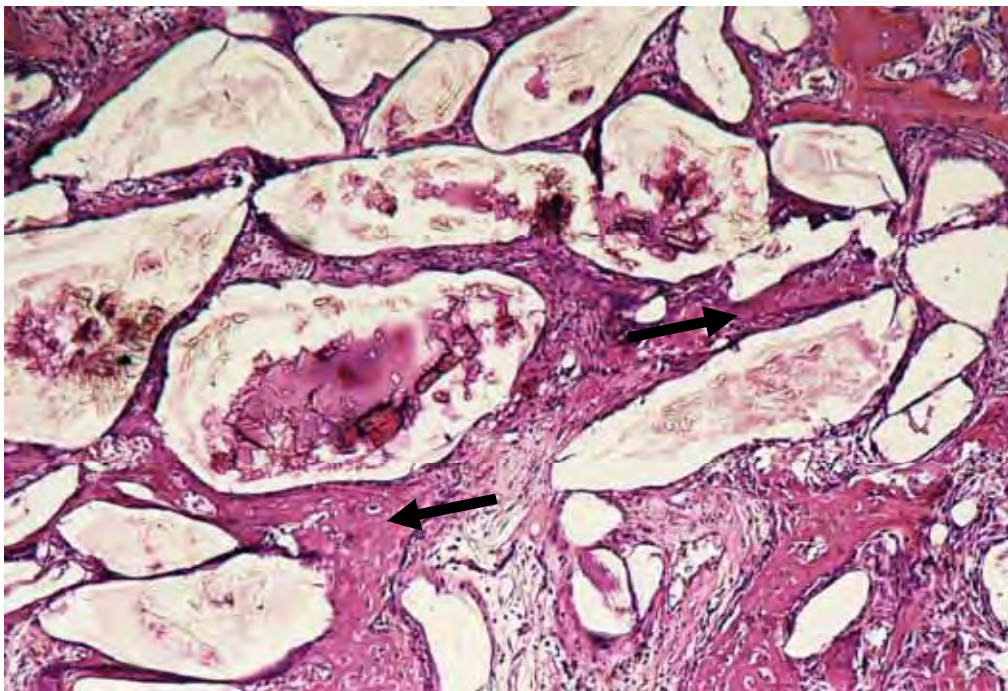


Figura 5- Grupo I – vidro bioativo terço médio – 14 dias HE 63X. Observam-se “pontes” de tecido ósseo neoformado ainda imaturo entre as partículas de biovidro.

No grupo I, aos 28 dias, coágulo, foi observado trabeculado ósseo maduro preenchendo grande parte do alvéolo. Nota-se a presença de osteócitos no interior das trabéculas ósseas, que se encontravam bastante espessas e com a morfologia bem definida. Pequenas ilhas de tecido conjuntivo foram observadas entre as trabéculas ósseas neoformadas (figura 6).

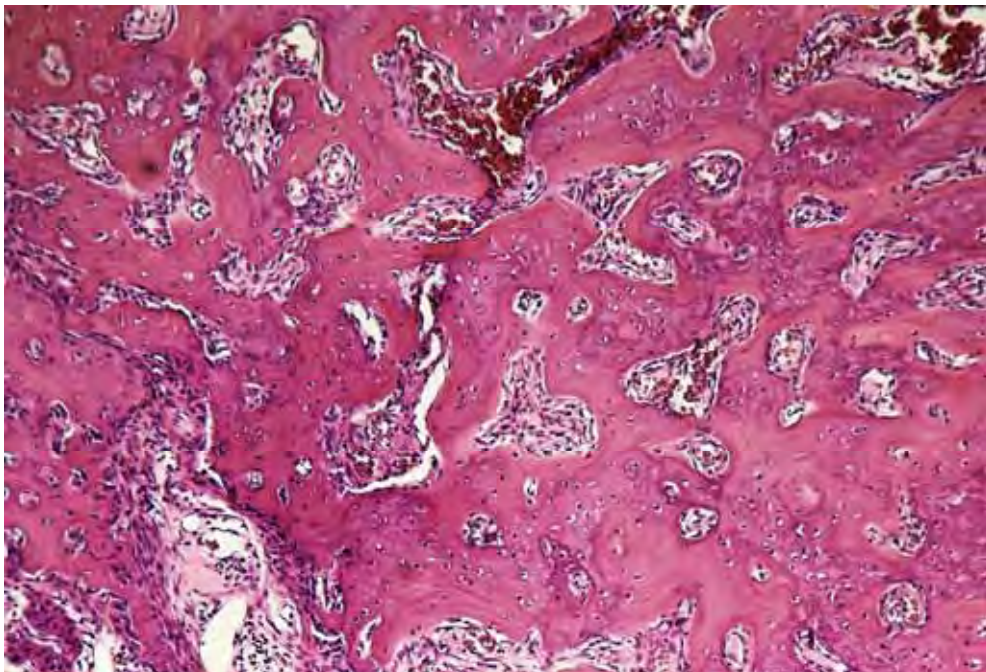


Figura 6- Grupo I – coágulo terço médio – 28 dias HE 63X. Alvéolo apresenta tecido ósseo neoformado com maturidade em praticamente toda sua extensão.

No grupo I, aos 28 dias, vidro bioativo, foi observado o biomaterial envolvido pelo tecido conjuntivo e em algumas áreas, por tecido ósseo neoformado (figura 7), sendo que este apresentava-se em maior proporção do que no grupo de 14 dias, vidro. As partículas do biomaterial encontravam-se bem incorporadas ao tecido neoformado e não havia sinais de reabsorção do material mostrando a sua biocompatibilidade

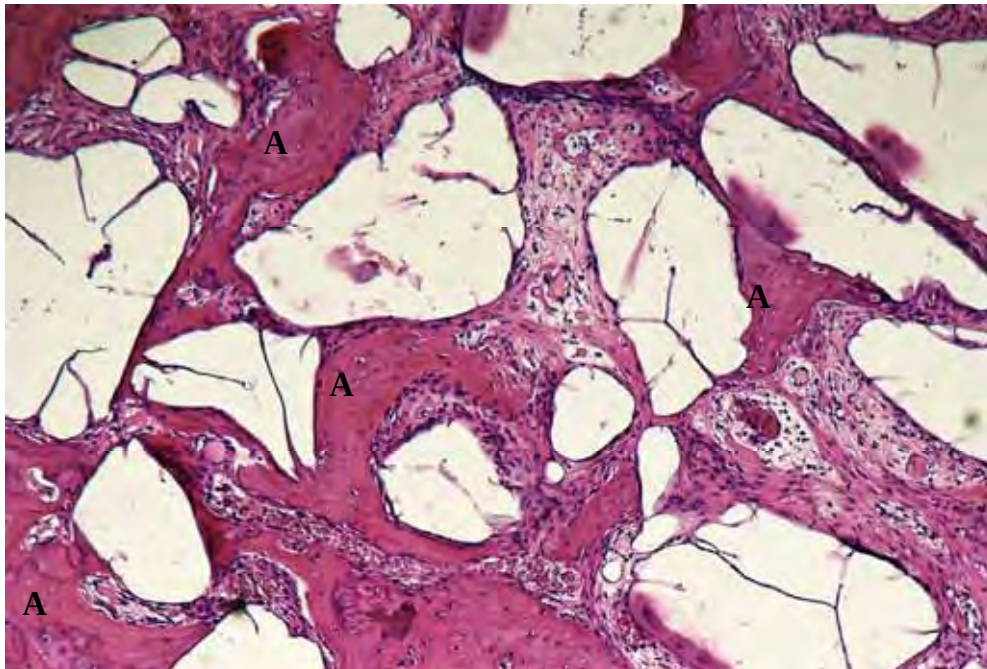


Figura 7- Grupo I – vidro bioativo terço médio – 28 dias HE 63X. Observa-se tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro (A).

Grupo II

No grupo II, aos 7 dias, coágulo, foi observado intenso infiltrado inflamatório, presença de coágulo sanguíneo, discreta proliferação fibroblástica e de células endoteliais a partir dos remanescentes do ligamento periodontal. No terço médio do alvéolo, foi possível observar o início de formação de tecido ósseo, ainda bastante incipiente e envolto por grande quantidade de coágulo sanguíneo (figura 8).

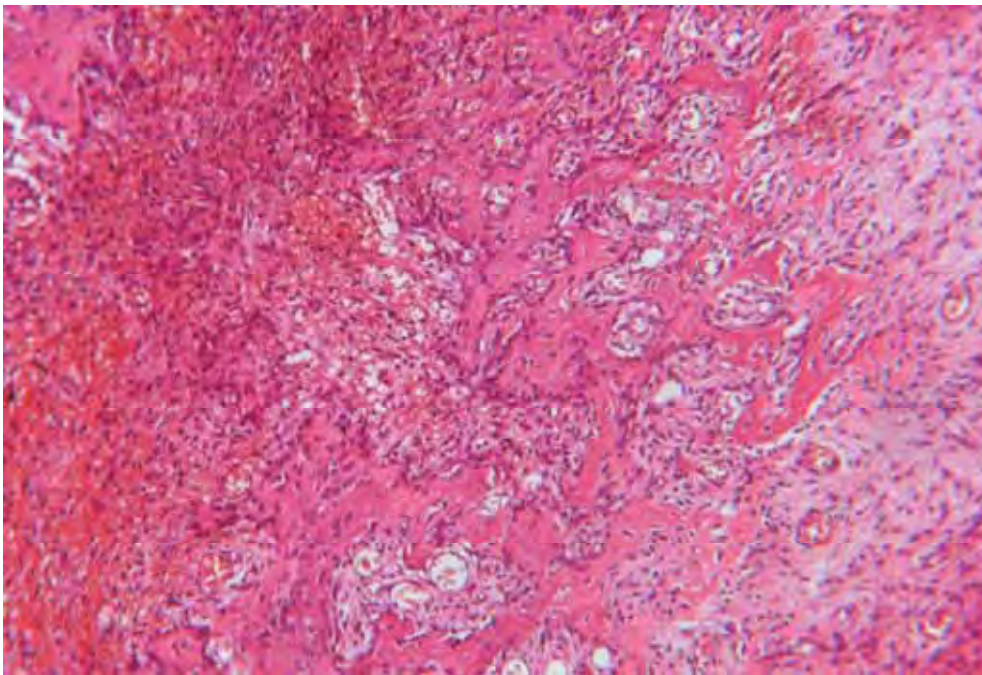


Figura 8- Grupo II – coágulo terço médio – 7 dias HE 160X. Presença de infiltrado inflamatório intenso com desorganização celular.

No grupo II, aos 7 dias, vidro bioativo, foi observado tecido conjuntivo imaturo envolvendo as partículas do biomaterial. Junto a este tecido conjuntivo imaturo, foi possível observar ainda a presença de um infiltrado inflamatório intenso. A Figura 9 representa o alvéolo em reparação aos 7 dias de um espécime do grupo II, vidro bioativo, mostrando as partículas do vidro bioativo envolvidas pelo tecido conjuntivo junto com remanescentes do coágulo sanguíneo.

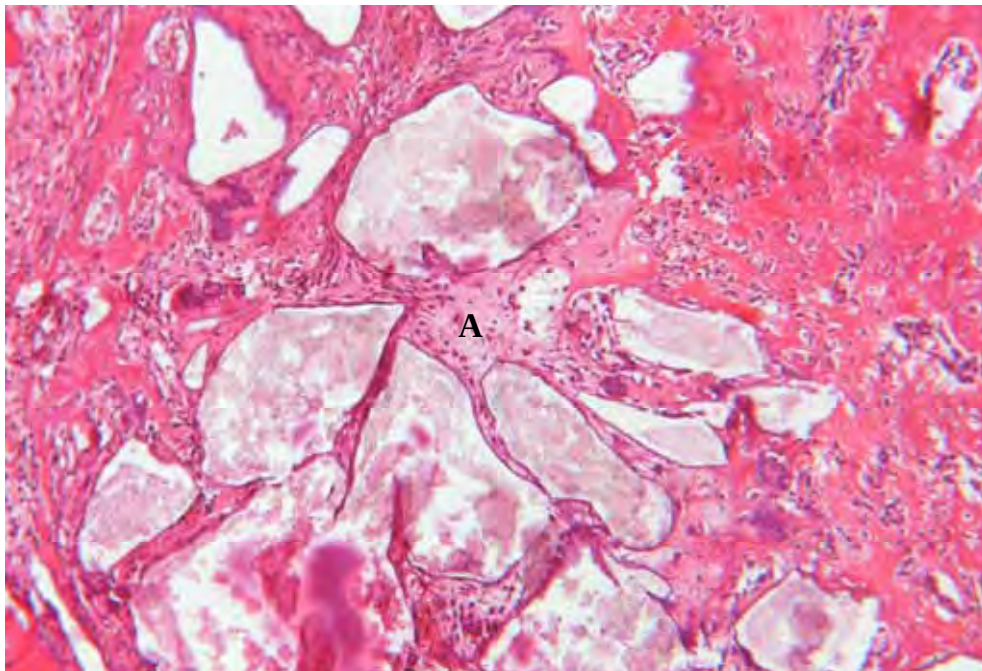


Figura 9- Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias HE 160X. Partículas de vidro bioativo no interior do alvéolo. Desorganização celular intensa (A) nos espaços entre as partículas do biomaterial.

No grupo II, aos 14 dias, coágulo, foi observado tecido conjuntivo imaturo e trabéculas ósseas delgadas e imaturas presentes nos terços médio e apical do alvéolo dental. Foi possível visualizar uma menor quantidade de trabeculado ósseo quando comparado ao grupo I coágulo 14 dias, mostrando um atraso na cronologia do processo de reparo alveolar neste grupo experimental. Nota-se a presença das trabéculas delgadas e imaturas e grande parte de tecido conjuntivo envolvendo este trabeculado ósseo em formação (figura 10).

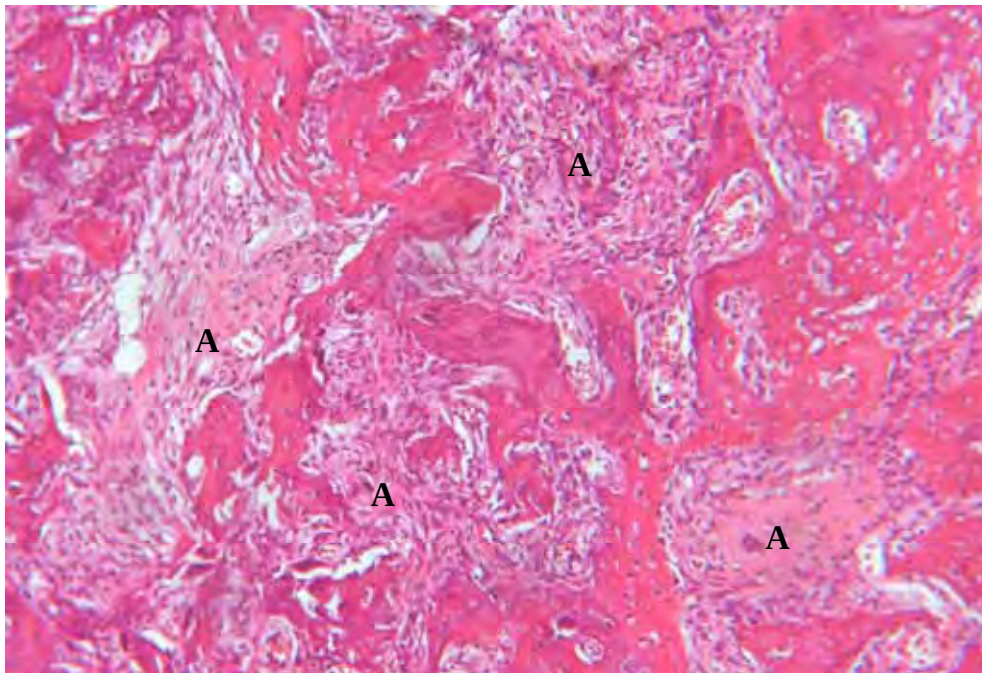


Figura 10- Grupo II – coágulo terço médio – 14 dias HE 160X. Observa-se presença de trabéculas ósseas neoformadas imaturas e grandes lacunas com tecido conjuntivo (A).

No grupo II, aos 14 dias, vidro bioativo, foi observado um tecido conjuntivo imaturo junto às partículas de vidro bioativo. Algumas áreas de mineralização do tecido conjuntivo (bastante discretas) foram observadas próximas às partículas do biomaterial (figura 11).

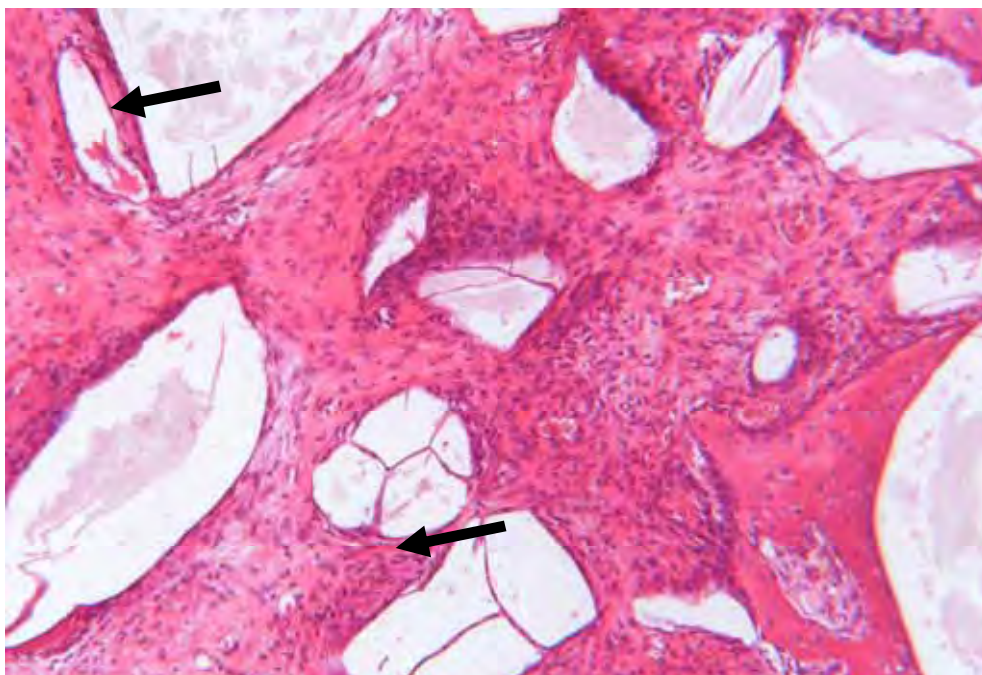


Figura 11- Grupo II – vidro bioativo terço médio – 14 dias HE 160X. Discretas áreas de “pontes” de tecido ósseo entre as partículas de biovidro.

No grupo II, 28 dias, coágulo, foram observadas trabéculas ósseas imaturas preenchendo uma maior proporção do alvéolo quando em comparação ao período anterior neste mesmo grupo. Vale destacar que estas trabéculas imaturas apresentavam-se bastante delgadas, e em muitas regiões do alvéolo dental ainda era possível observar tecido conjuntivo imaturo (figura 12).

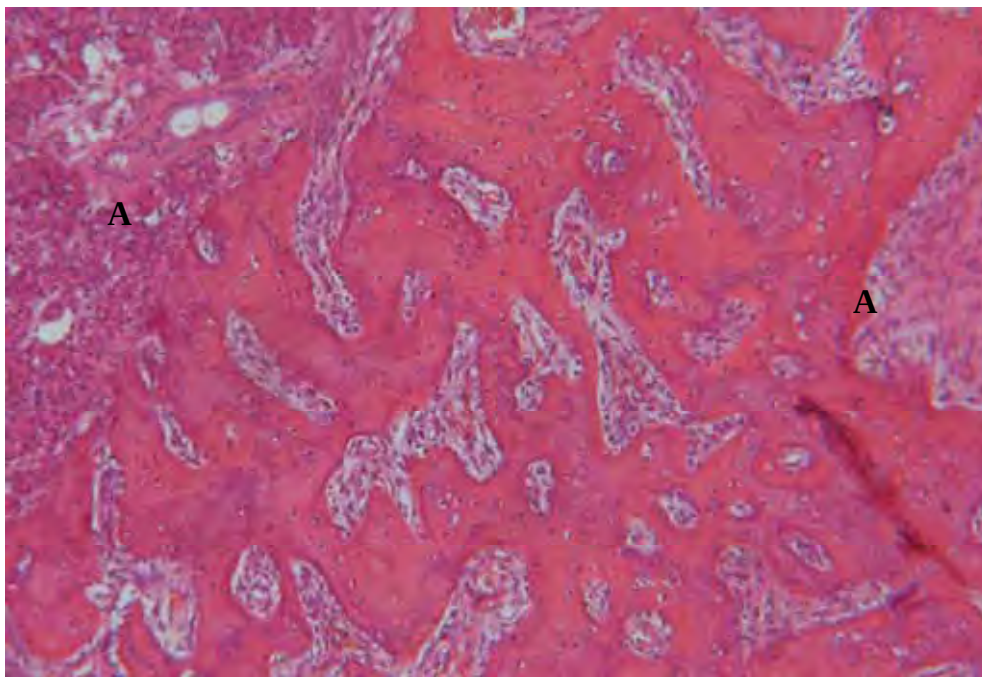


Figura 12- Grupo II – coágulo terço médio – 28 dias HE 160X. Alvéolo apresenta tecido ósseo neoformado imaturo e algumas regiões com tecido conjuntivo (A).

No grupo II, 28 dias, vidro bioativo, foi observado tecido conjuntivo envolvendo as partículas do biomaterial. Como no período anterior, neste mesmo grupo, apenas discretas áreas de mineralização óssea foram observadas junto a algumas partículas do biovidro (figura 13).

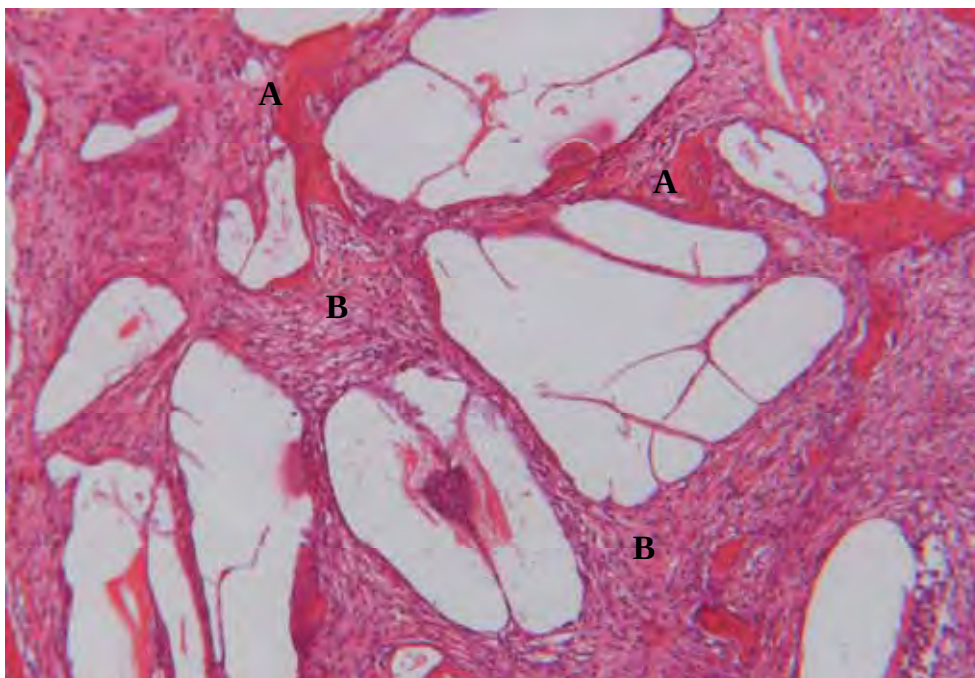


Figura 13- Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias HE 160X. Observa-se pequena quantidade de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro (A) e várias regiões com ausência da formação de tecido ósseo (B).

Grupo III

No grupo III, 7 dias, coágulo, foi observado o coágulo sanguíneo preenchendo grande parte do alvéolo dental. Foi observada também a presença de proliferação fibroblástica e de células endoteliais a partir dos remanescentes do ligamento periodontal, em direção ao alvéolo dental. Vale destacar a presença de um tecido conjuntivo junto com remanescentes do coágulo sanguíneo (figura 14).

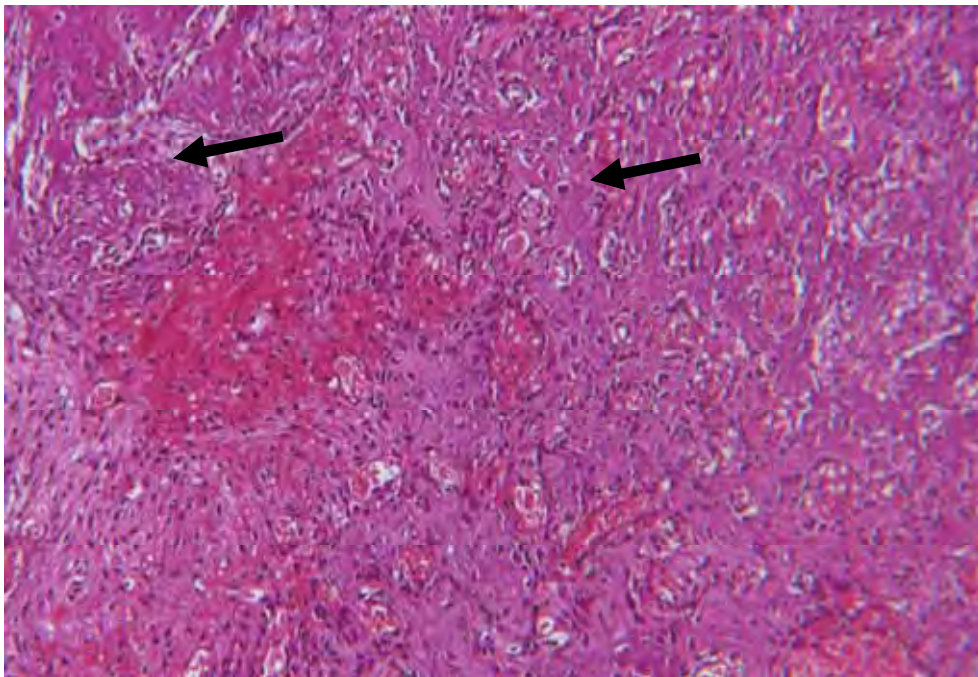


Figura 14- Grupo III – coágulo terço médio – 7 dias HE 160X. Nota-se presença de tecido conjuntivo junto aos remanescentes de coágulo sanguíneo.

No grupo III, 7 dias, vidro bioativo, foi observado um infiltrado inflamatório envolvendo todas as partículas do biomaterial. Nas regiões do terço apical e médio, onde não foram observadas as partículas do biomaterial, foi observada a presença de um tecido conjuntivo imaturo e uma discreta proliferação de fibroblastos e células endoteliais a partir dos remanescentes do ligamento periodontal. Nota-se a presença de grande quantidade de infiltrado inflamatório envolvendo as partículas do biomaterial (figura 15).

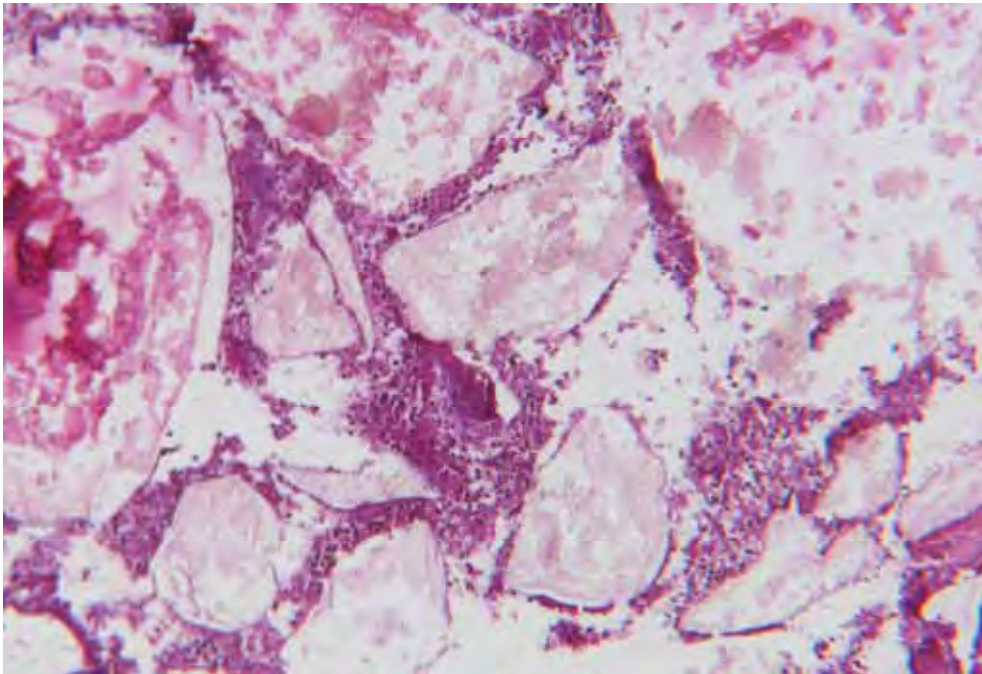


Figura 15- Grupo III – vidro bioativo terço médio – 7 dias HE 160X. Presença de partículas de biovidro no interior do alvéolo e intensa desorganização celular.

No grupo III, 14 dias, coágulo, foram observadas discretas trabéculas ósseas imaturas, delgadas, preenchendo pequena parte do alvéolo dental. Nota-se a presença das trabéculas ósseas delgadas e imaturas ainda envoltas por grande quantidade de tecido conjuntivo (figura 16).

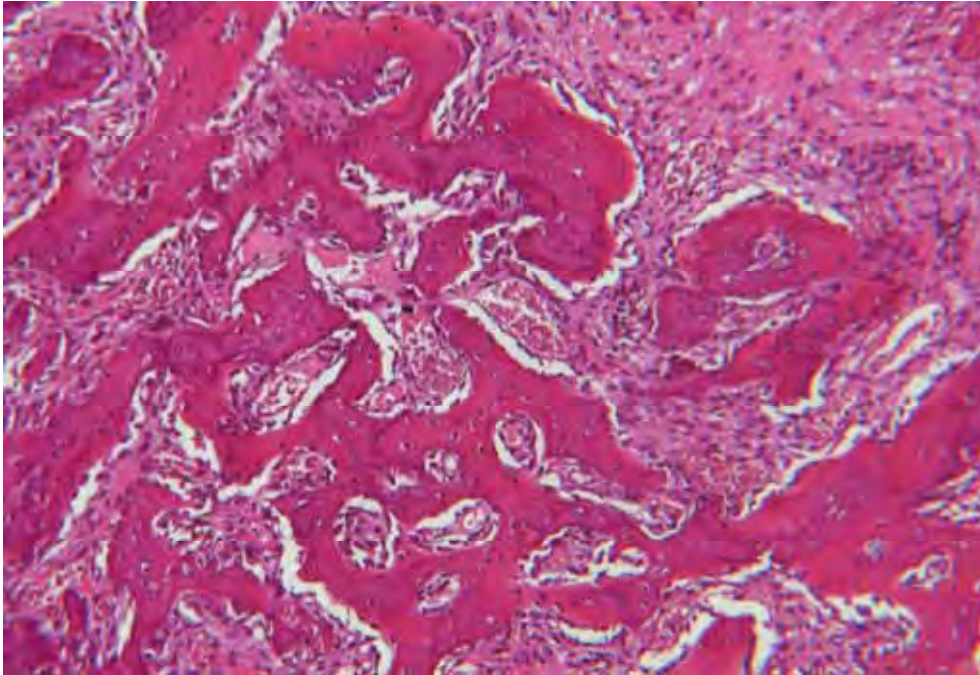


Figura 16- Grupo III – coágulo terço médio – 14 dias HE 160X. Observam-se áreas de tecido ósseo neoformado e grande quantidade de tecido conjuntivo.

No grupo III, 14 dias, vidro bioativo, foram observadas partículas de vidro bioativo envolvidas por tecido conjuntivo imaturo. Não foram observadas áreas de mineralização junto às partículas do biomaterial na maioria dos espécimes avaliados, como pode ser observado na Figura 17, que representa o terço médio do alvéolo em reparação de um dos espécimes deste grupo e período experimental.

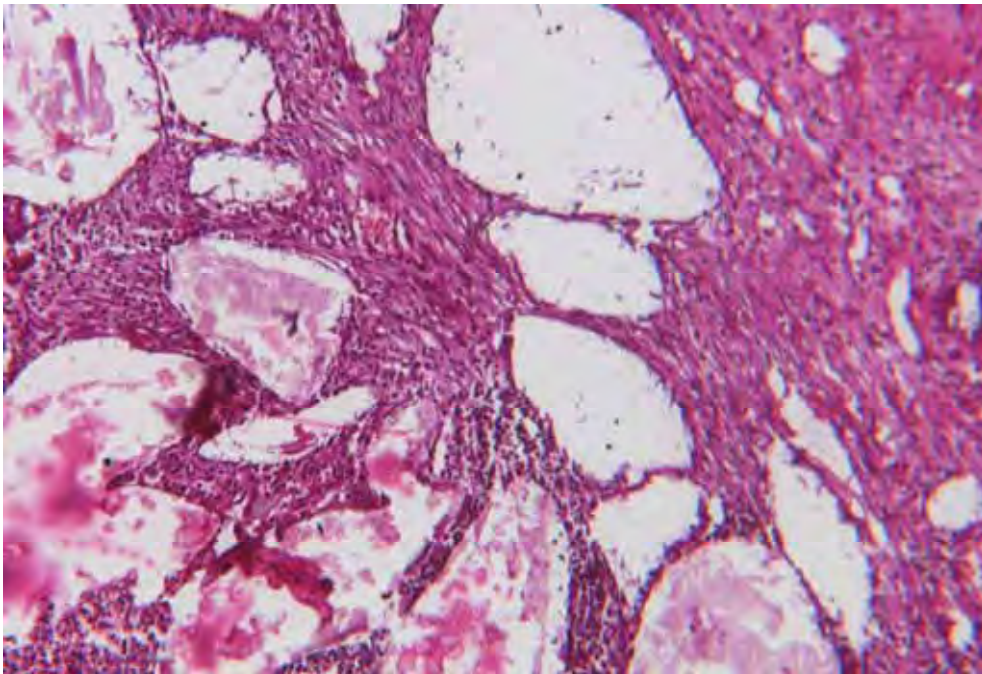


Figura 17- Grupo III – vidro bioativo terço médio – 14 dias HE 160X. Ausência de tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro.

No grupo III, 28 dias, coágulo, foram observadas trabéculas ósseas mais maduras do que no período anterior. No entanto, as trabéculas ainda se apresentavam delgadas e com morfologia irregular, apesar de serem observadas preenchendo uma maior quantidade do alvéolo dental quando comparado ao período anterior, neste mesmo grupo experimental (figura 18).

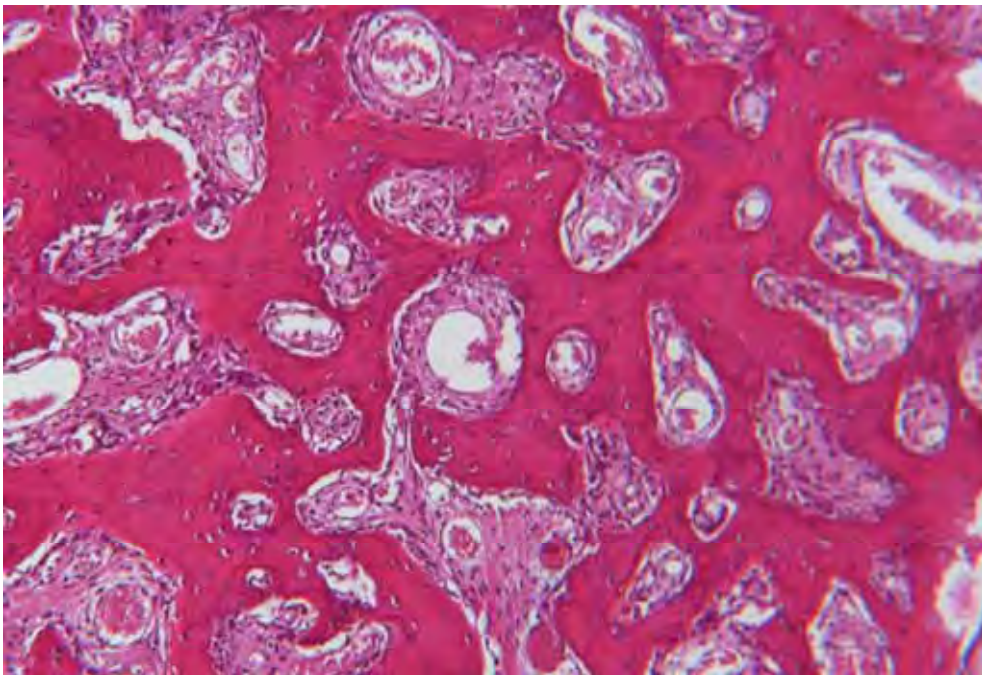


Figura 18- Grupo III – coágulo terço médio – 28 dias HE 160X. Alvéolo apresenta tecido ósseo neoformado com maturidade em praticamente toda sua extensão.

No grupo III, 28 dias, vidro bioativo, foram observadas partículas de vidro bioativo envolvidas por tecido conjuntivo e próximo ao biomaterial foi possível observar áreas de mineralização óssea. Entretanto, na maioria dos espécimes, apesar da mineralização junto às partículas do biomaterial, foi observado um predomínio de tecido conjuntivo junto a toda a extensão do alvéolo dental (figura 19).

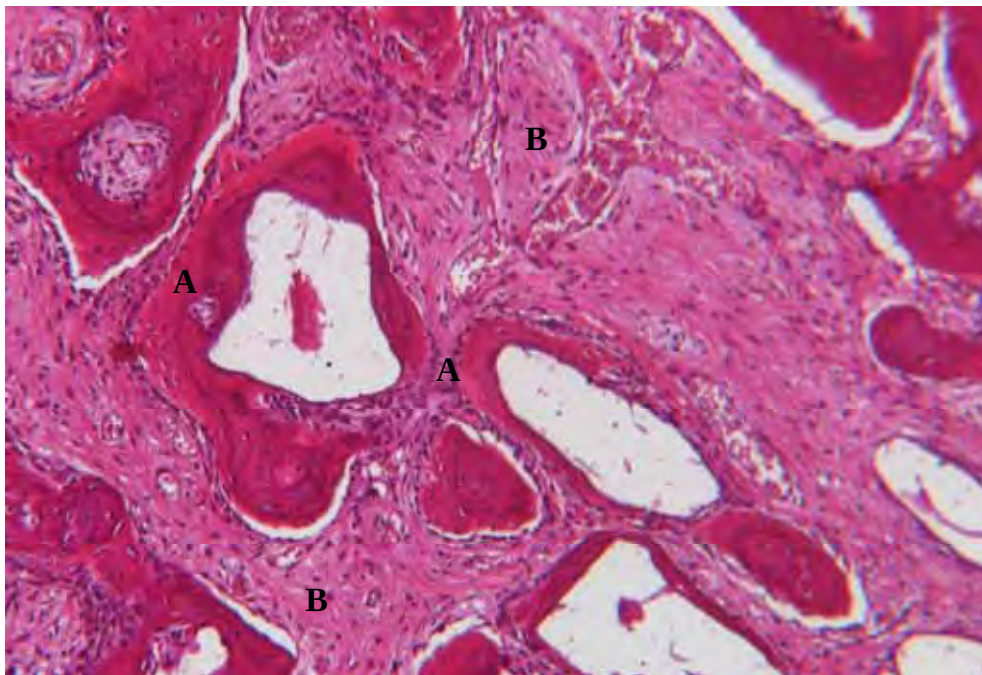


Figura 19- Grupo III – vidro bioativo terço médio – 28 dias HE 160X. Observa-se tecido ósseo neoformado ao redor das partículas de biovidro (A) e algumas regiões com tecido conjuntivo (B).

4.3 – Análise histométrica.

Para os cortes corados por Tricrômico de Masson foi realizada uma análise quantitativa do tecido ósseo neoformado no terço médio lingual do alvéolo. As imagens referentes aos dois campos de tamanhos idênticos localizados na porção lingual do terço médio do alvéolo foram capturadas e então transferidas para o Software Imagelab2000 (Diracom 3) onde o tecido ósseo neoformado no campo foi delimitado manualmente realizando-se o “Cálculo de regiões”. Os valores obtidos de cada área analisada foram armazenados em uma planilha de cálculos, e descritas em gráficos para comparação de valores.

Cada grupo experimental (GI, GII e GIII) foi demonstrado separadamente pelos gráficos 1, 2 e 3 respectivamente, a fim de se estabelecer comparações visíveis entre os subgrupos. As porcentagens representadas nos gráficos representam valores percentuais médios da área ocupada por tecido ósseo.

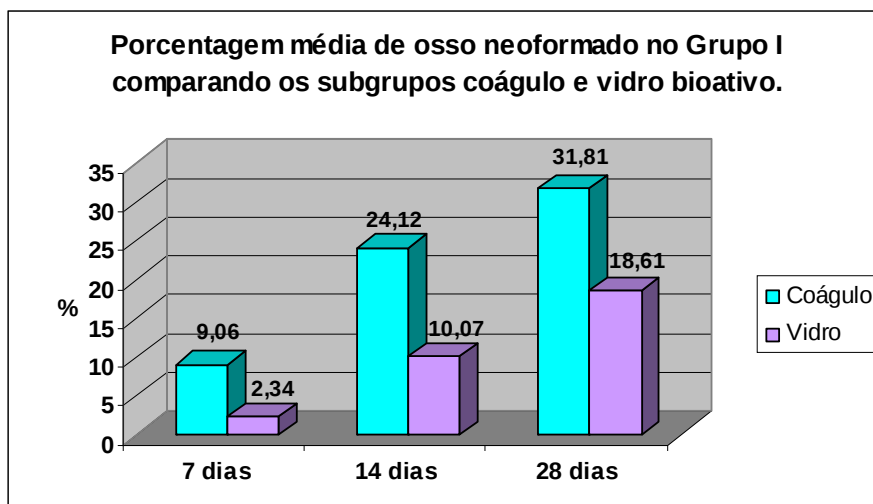


Gráfico 1- Gráfico em colunas representando a porcentagem média de osso neoformado no grupo I, comparando os subgrupos coágulo e vidro, em todos os períodos experimentais.

GRUPO CONTROLE COÁGULO – G1C

Período	%	Desvio	Erro
7 dias	9.06	6.0831	2.4826
14 dias	24.12	7.3835	2.6024
28 dias	31.81	11.2755	3.5656

GRUPO CONTROLE VIDRO – G1V

Período	%	Desvio	Erro
7 dias	2.34	2.6521	0.9845
14 dias	10.07	3.0825	1.0864
28 dias	18.61	5.6968	2.0079

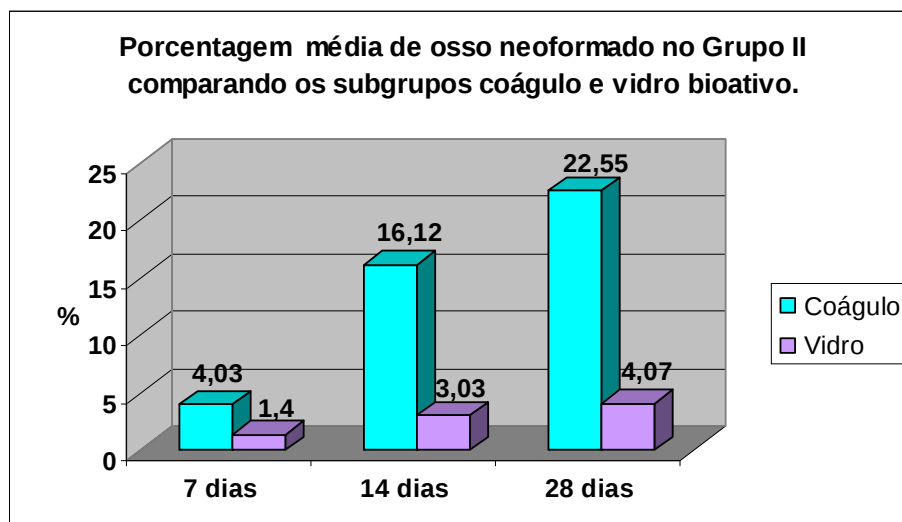


Gráfico 2- Gráfico em colunas representando a porcentagem média de osso neoformado no grupo II, comparando os subgrupos coágulo e vidro, em todos os períodos experimentais.

GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO COÁGULO – G2C

Período	%	Desvio	Erro
7 dias	4.03	1.2336	0.4347
14 dias	16.12	4.9345	1.7392
28 dias	22.55	6.9028	2.4329

GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO VIDRO – G2V

Período	%	Desvio	Erro
7 dias	1.40	0.4285	0.1510
14 dias	3.03	0.9275	0.3269
28 dias	4.07	1.2458	0.4390

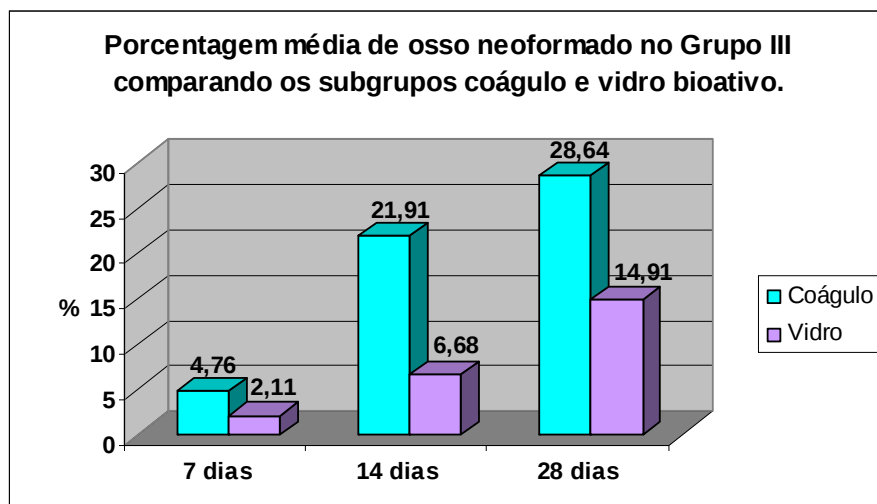


Gráfico 3- Gráfico em colunas representando a porcentagem média de osso neoformado no grupo III, comparando os subgrupos coágulo e vidro, em todos os períodos experimentais.

GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO COÁGULO – G3C

Período	%	Desvio	Erro
7 dias	4.76	1.4571	0.5135
14 dias	21.91	6.7069	2.3639
28 dias	28.64	8.7671	3.0900

GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO VIDRO – G3V

Período	%	Desvio	Erro
7 dias	2.11	0.6459	0.227
14 dias	6.68	2.0448	0.1064
28 dias	14.91	4.5641	1.6086

4.4- Análise Estatística.

A análise estatística foi realizada através da comparação entre a taxa de formação óssea observada, na presença do coágulo sanguíneo ou vidro bioativo, nos três diferentes grupos experimentais.

Após a aplicação do teste de normalidade, foi utilizado o teste paramétrico de Análise de Variância e o pós teste de Holm Sidak para avaliar se houve diferenças entre os grupos experimentais avaliados ($p < 0,05$). Para as comparações entre o processo de reparo alveolar observado na presença do coágulo sanguíneo ou vidro bioativo, foi utilizado o teste t de Student não pareado. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$).

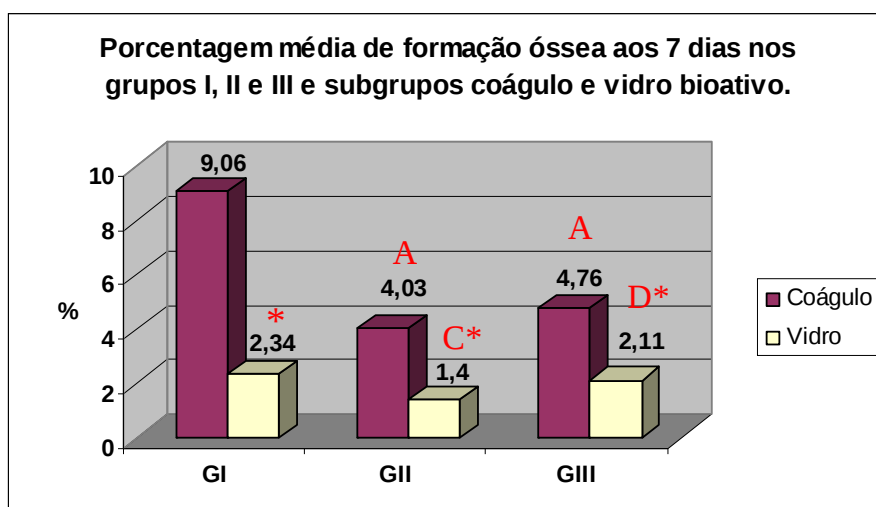


Gráfico 4- Porcentagem média de formação de tecido ósseo no terço médio do alvéolo dos grupos I, II e III e nos subgrupos coágulo e vidro aos 7 dias pós-operatórios.

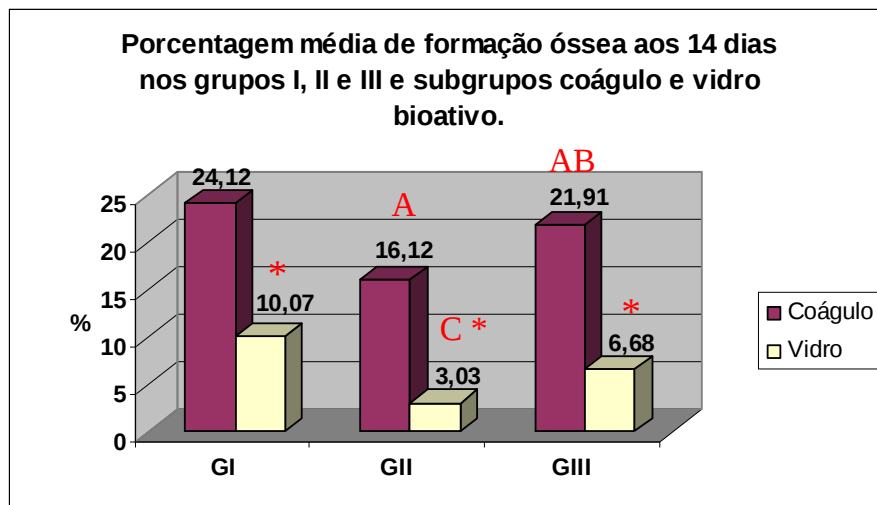


Gráfico 5- Porcentagem média de formação de tecido ósseo no terço médio do alvéolo dos grupos I, II e III e nos subgrupos coágulo e vidro aos 14 dias pós-operatórios.

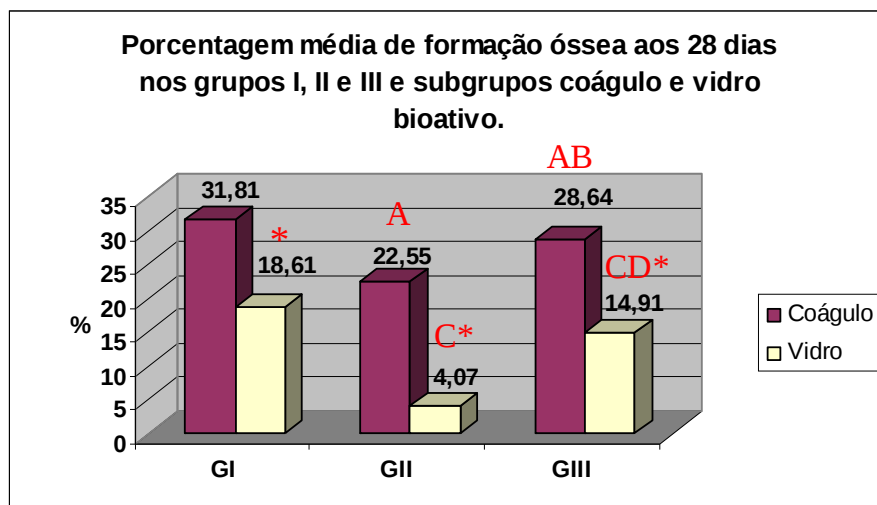


Gráfico 6- Porcentagem média de formação de tecido ósseo no terço médio do alvéolo dos grupos I, II e III e nos subgrupos coágulo e vidro aos 28 dias pós-operatórios.

Onde:

A:- há diferença estatisticamente significativa em nível de 5 % ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo I subgrupo coágulo.

B:- há diferença estatisticamente significativa em nível de 5 % ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo II subgrupo coágulo.

C:- há diferença estatisticamente significativa em nível de 5 % ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo I subgrupo vidro.

D:- há diferença estatisticamente significativa em nível de 5 % ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo II subgrupo vidro.

*:- há diferença estatisticamente significativa em nível de 5 % ($p < 0,05$) quando se compara os subgrupos coágulo e vidro bioativo.

4.5- Análise Imunoistoquímica.

As análises das reações imunoistoquímicas foram qualitativa e semi quantitativa em microscópio de luz. Na análise qualitativa foram consideradas a ausência e presença de marcações positivas para as proteínas estudadas e a expressão das mesmas em diferentes tipos celulares. A avaliação semi quantitativa foi realizada a partir da atribuição de escores para as lâminas de cada espécime dos diferentes grupos e períodos experimentais.

Foram avaliadas as imunomarcações para as proteínas OPG, RANK, RANKL, Osteocalcina e TRAP.

A imunomarcação para a proteína RANK foi visualizada em células do tecido conjuntivo, bem como em células semelhantes a osteoblastos dispostas ao redor das trabéculas ósseas em formação.

As marcações positivas para RANKL foram visualizadas em células do tecido conjuntivo, osteoblastos ao redor do trabeculado ósseo neoformado e também em osteócitos aprisionados no tecido ósseo formado durante o processo de reparo alveolar.

A Osteoprotegerina (OPG) foi visualizada em células do tecido conjuntivo, osteoblastos e osteócitos presentes ao redor e no interior do trabeculado ósseo neoformado.

A expressão da Osteocalcina foi observada em osteoblastos e também na matriz extracelular, ou seja, no tecido conjuntivo antes que o processo de mineralização tenha ocorrido. Vale destacar que a osteocalcina é uma proteína da matriz óssea não colagenosa que também apresenta imunomarcação no próprio tecido ósseo ao se mineralizar e portanto sendo também considerada uma marcação positiva para esta proteína.

A proteína TRAP foi visualizada em osteoclastos presentes ao redor do alvéolo e também junto às trabéculas ósseas neoformadas.

Os resultados qualitativos serão apresentados descritivamente em função dos grupos experimentais. A análise semi quantitativa será apresentada em função dos escores atribuídos após a avaliação de cada espécime analisado; estes resultados estão descritos em função de cada proteína analisada e estão sumariados numa Tabela que vem na sequência da descrição dos campos histológicos.

GRUPO I

Coágulo

7 dias

É observada discreta imunomarcção para RANK em células semelhantes a osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas em fase inicial de formação, visualizadas na porção apical e próxima à parede lingual do alvéolo. Junto as paredes alveolares as marcações são moderadas para esta proteína.

A RANKL apresenta-se expressa moderadamente em osteoblastos presentes ao redor de trabéculas ósseas nos terços médio e apical. Alguns osteócitos também são observados com marcação discreta para RANKL.

Fibroblastos do tecido conjuntivo apresentam marcação discreta para OPG; a Osteocalcina apresenta marcação discreta em trabéculas ósseas em formação. Nas bordas do alvéolo nota-se moderada expressão de TRAP.

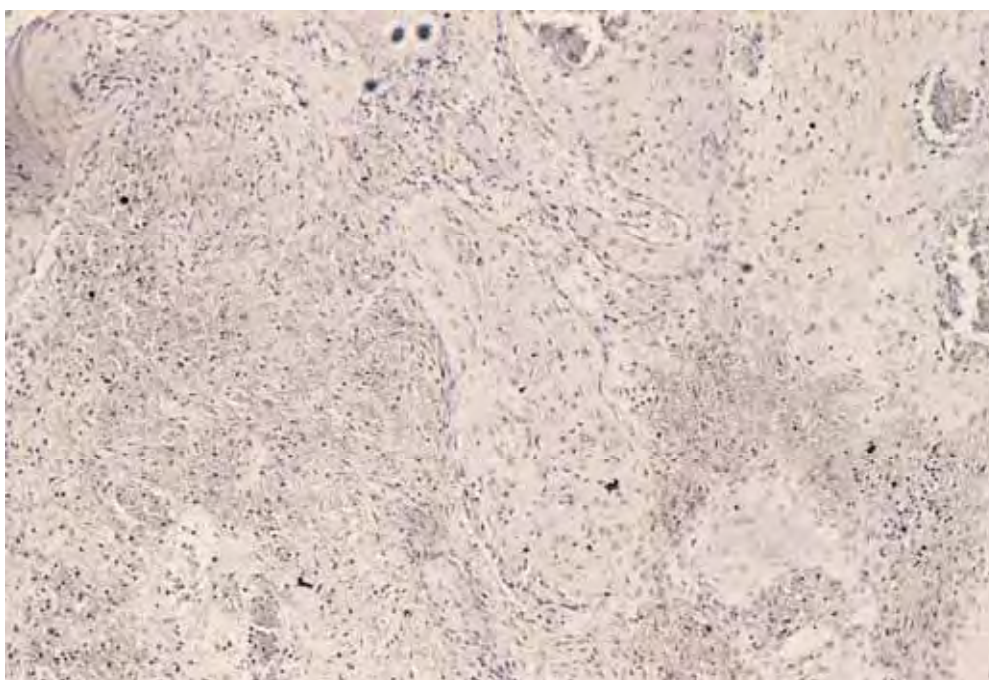


Figura 20 – Grupo I – coágulo terzo médio – 7 dias RANKL 63X. Marcações específicas para a proteína RANKL em osteoblastos e osteócitos.

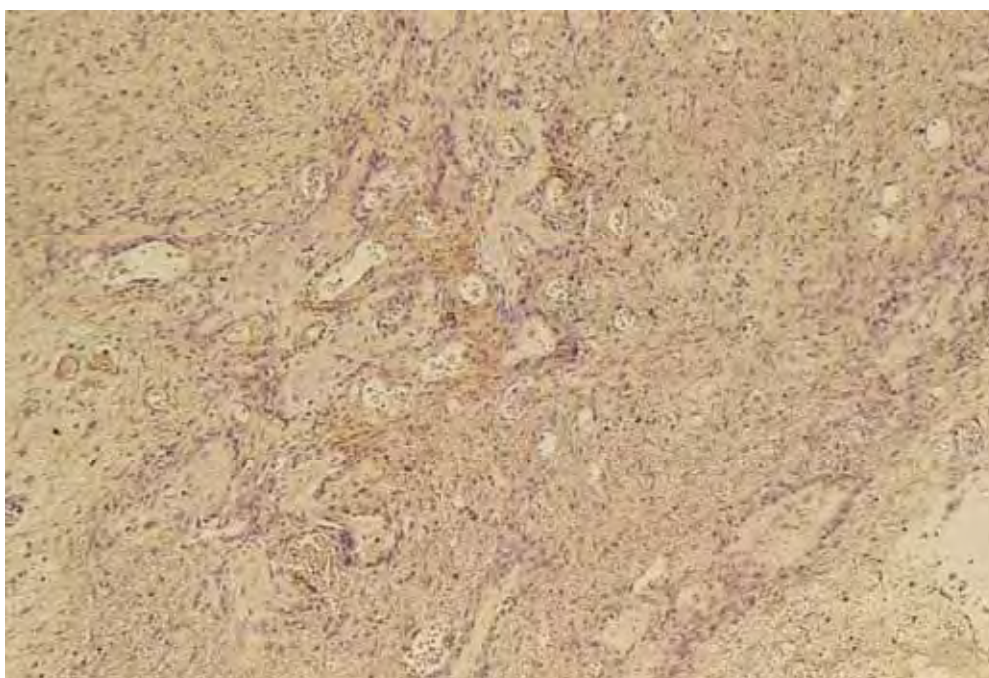


Figura 21- Grupo I – coágulo terzo médio – 7 dias Osteocalcina 63X. Discreta imunomarcacão para Osteocalcina.

14 dias

Ao redor das trabéculas ósseas, localizadas nos terços médio e apical do alvéolo, observamos marcações de moderada a intensa para RANK em células com morfologia semelhante a osteoblastos.

Nos três terços alveolares, evidenciamos marcações positivas intensas para RANKL em células como osteoblastos, fibroblastos e osteócitos localizados ao redor do trabeculado ósseo.

A OPG apresenta discreta marcação em fibroblastos e osteoblastos localizados na periferia da matriz sintetizada.

No osteóide encontramos marcações com intensidade de moderada a intensa para Osteocalcina e marcações bastante discretas nas trabéculas neoformadas.

Foi observada intensa marcação positiva para TRAP em células osteoclásticas presentes junto às trabéculas neoformadas e na parede do alvéolo (borda).

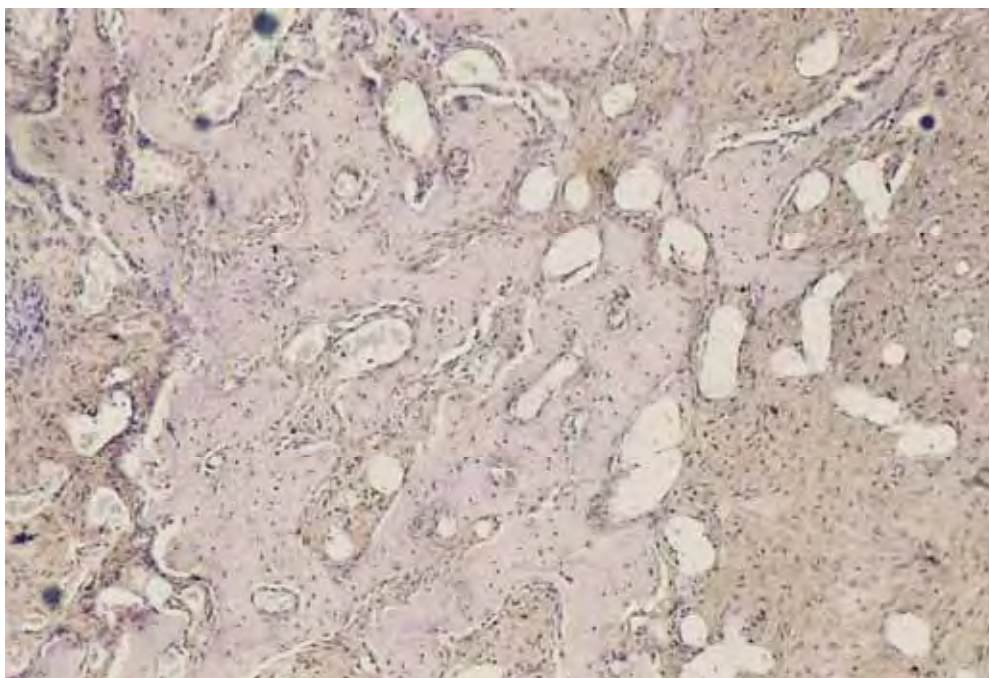


Figura 22 – Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias RANKL 63X. Intensa marcação celular de RANKL em osteoblastos, fibroblastos e osteócitos.

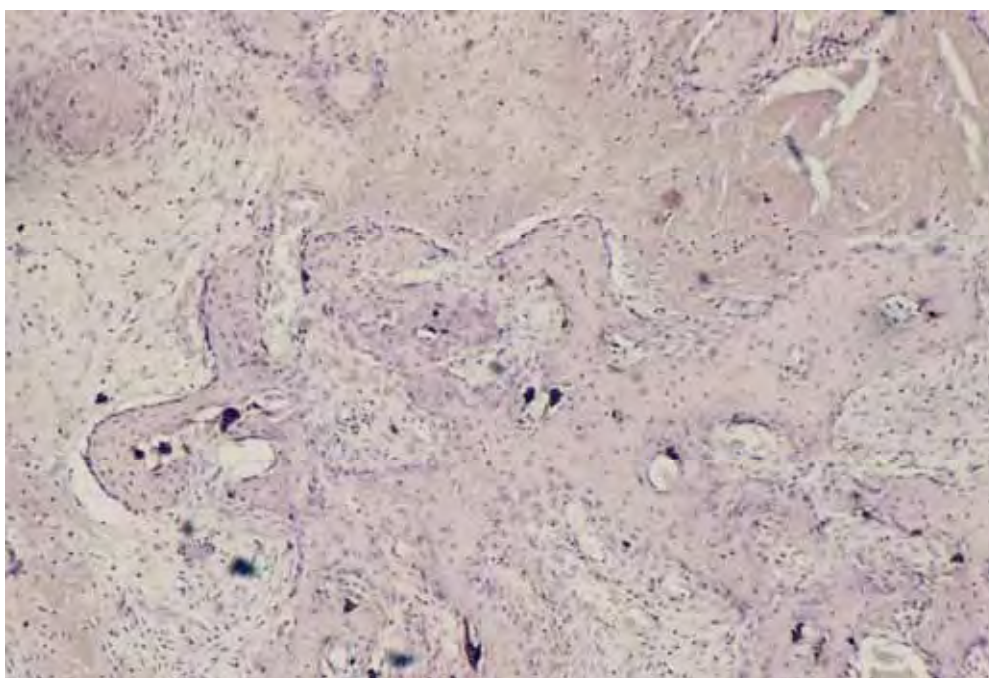


Figura 23 – Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias TRAP 63X. Intensa marcação em osteoclastos presentes junto as trabéculas ósseas neoformadas.

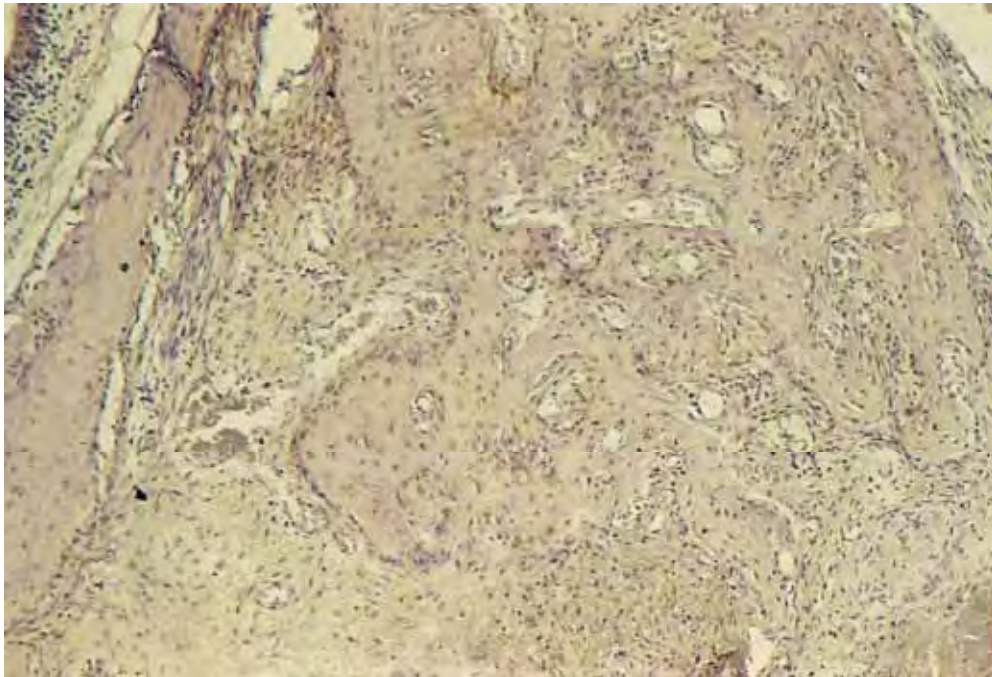


Figura 24 – Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias RANK 63X. Marcações específicas para RANK em células semelhantes a osteoblastos.

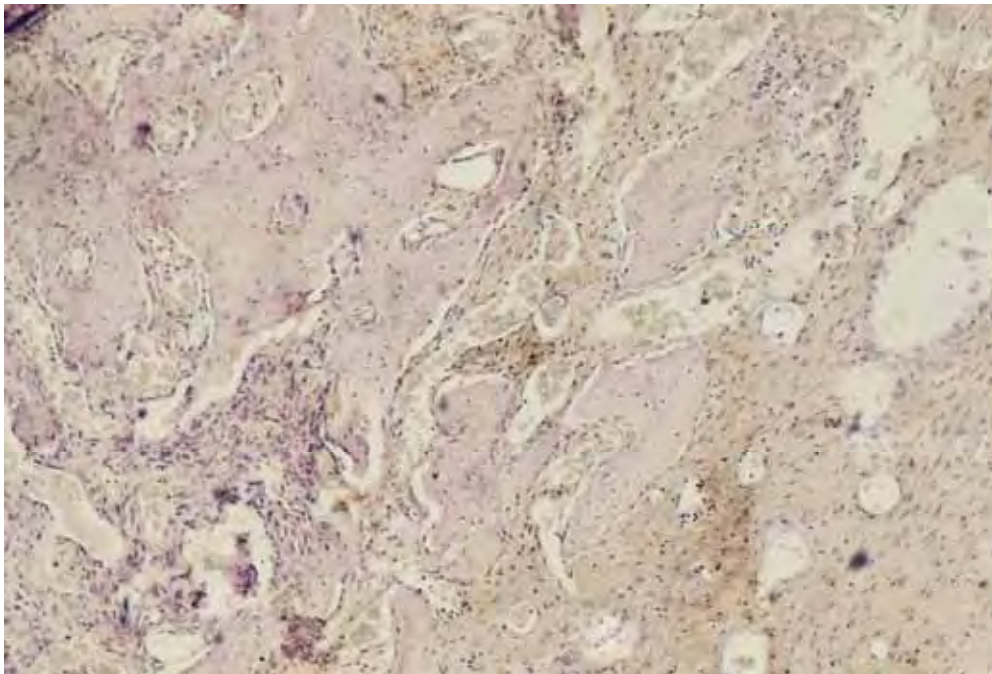


Figura 25 – Grupo I – coágulo terço médio – 14 dias Osteocalcina 63X. Osteóide marcado positivamente para Osteocalcina.

28 dias

Ao redor das trabéculas ósseas neoformadas e em osteócitos a RANK apresenta discreta expressividade.

A RANKL apresenta marcações de moderada a intensa em células do tipo osteócitos localizados nas trabéculas neoformadas. Já para as proteínas OPG e RANK as marcações são discretas.

No trabeculado ósseo neoformado podemos notar ainda moderada imunomarcação para Osteocalcina. Ao longo de toda a extensão alveolar notamos imunomarcação moderada para TRAP.

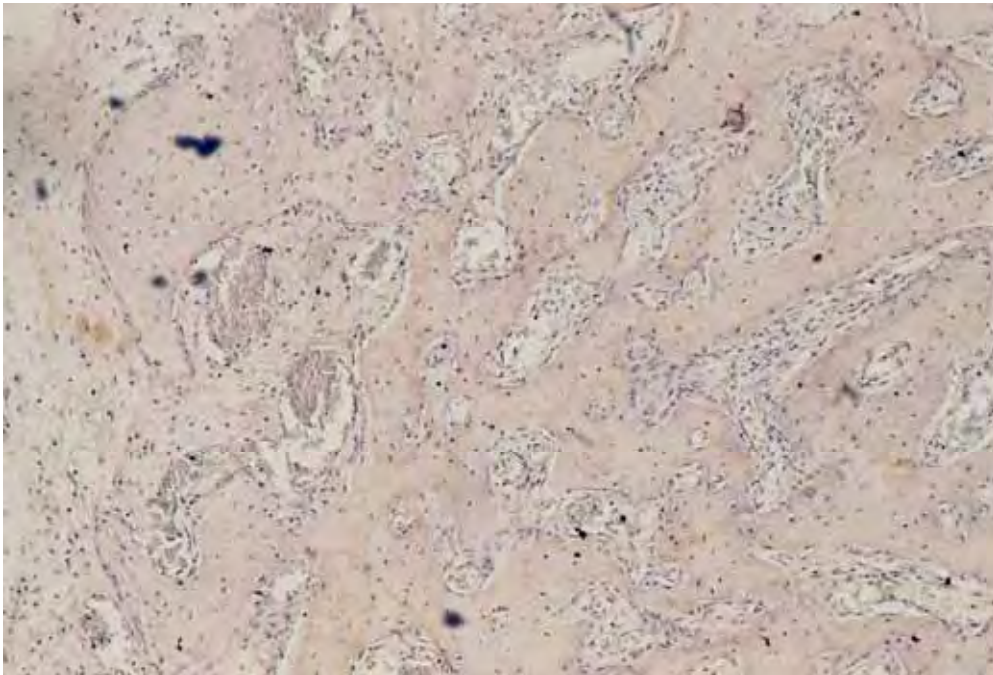


Figura 26 – Grupo I – coágulo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Imunomarcação moderada para Osteocalcina no trabeculado ósseo neoformado.

GRUPO II

Coágulo

7 dias

Ao compararmos este grupo com o grupo I coágulo no mesmo período notamos uma diminuição na quantidade do trabeculado ósseo neoformado. Há a presença de tecido conjuntivo intercalando-se com remanescentes de coágulo sanguíneo preenchendo todo o alvéolo. Nota-se a presença de algumas trabéculas ósseas em início de formação.

Ocorre discreta imunomarcagem para RANK. A RANKL apresenta discreta expressão em células do tecido conjuntivo; a expressão para OPG é de moderada a intensa. As marcações para Osteocalcina e TRAP também são de intensidade discreta.

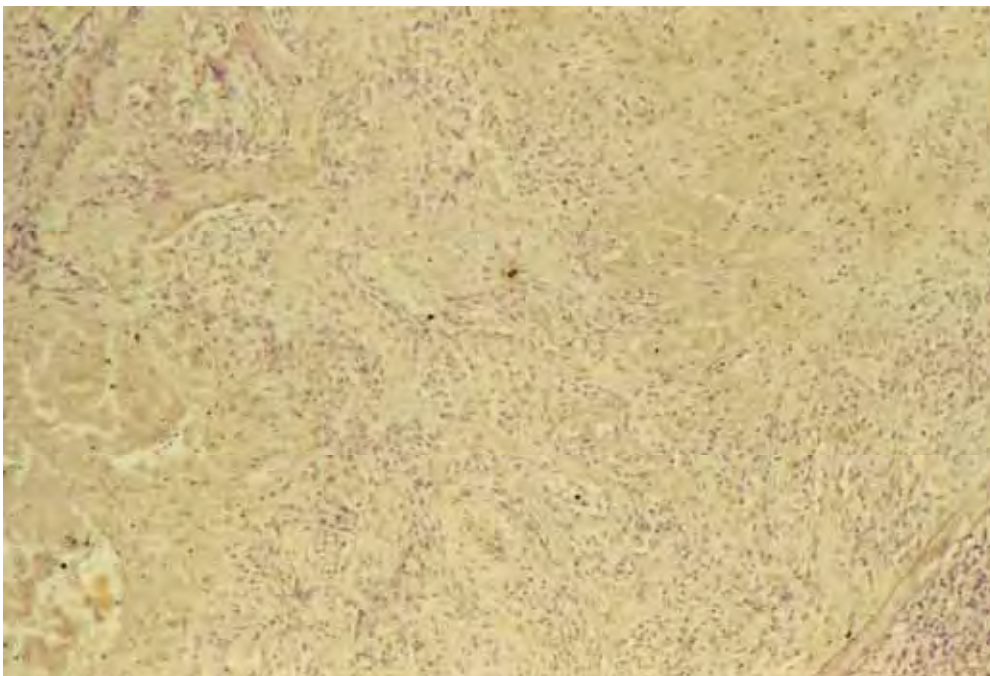


Figura 27 – Grupo II – coágulo terço médio – 7 dias RANK 63X. Presença de tecido conjuntivo no interior do alvéolo. Discreta imunomarcagem para RANK.

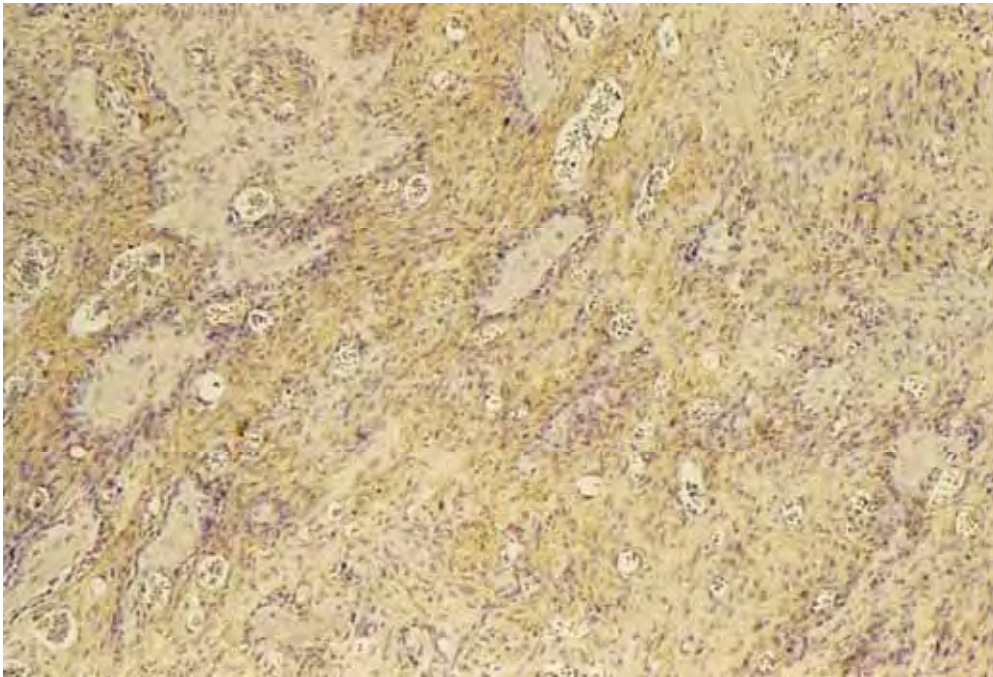


Figura 28 – Grupo II – coágulo terço médio – 7 dias OPG 63X. Expressão com intensidade moderada a intensa para OPG.

14 dias

As células com morfologia semelhante a osteoblastos, localizadas na periferia da matriz óssea neoformada, apresentam intensa marcação positiva para RANK. As mesmas células são marcadas moderadamente para RANKL, que se expressa principalmente nas células do tecido conjuntivo; alguns osteócitos também são marcados por essa proteína.

A OPG apresenta de discreta a moderada imunomarcação em células do tecido conjuntivo e em osteoblastos.

Em alguns locais onde ainda se observa tecido conjuntivo notamos discreta imunomarcação para Osteocalcina. Nas trabéculas ósseas

neoformadas ainda não ocorrem marcações para esta proteína. São discretas as marcações em osteoclastos para TRAP.

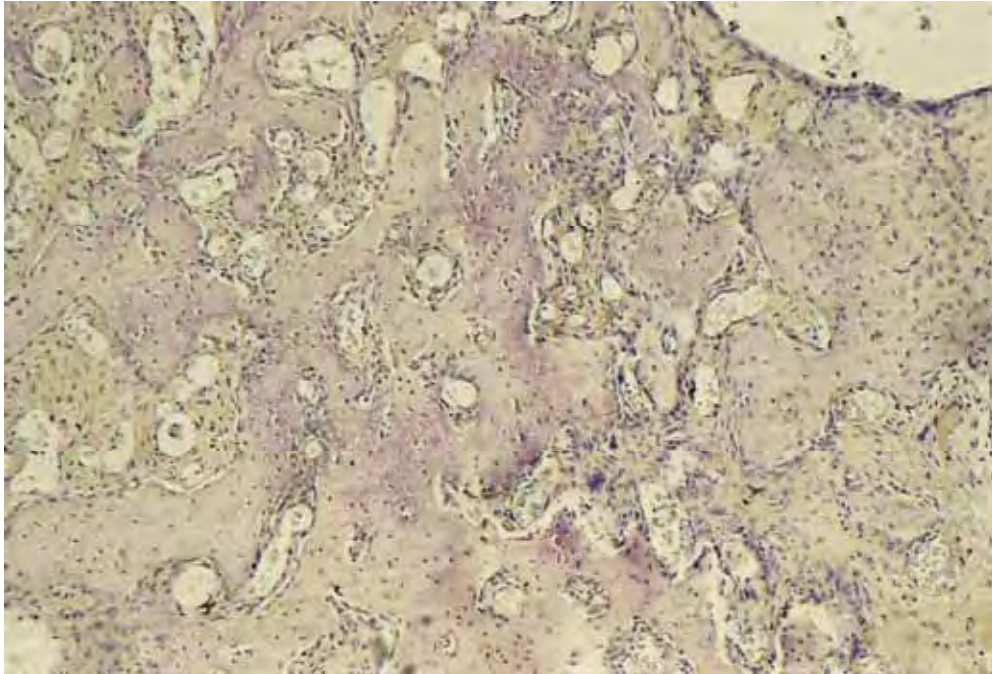


Figura 29 – Grupo II – coágulo terço médio – 14 dias OPG 63X. Células do tecido conjuntivo e osteoblastos marcados positivamente para OPG.

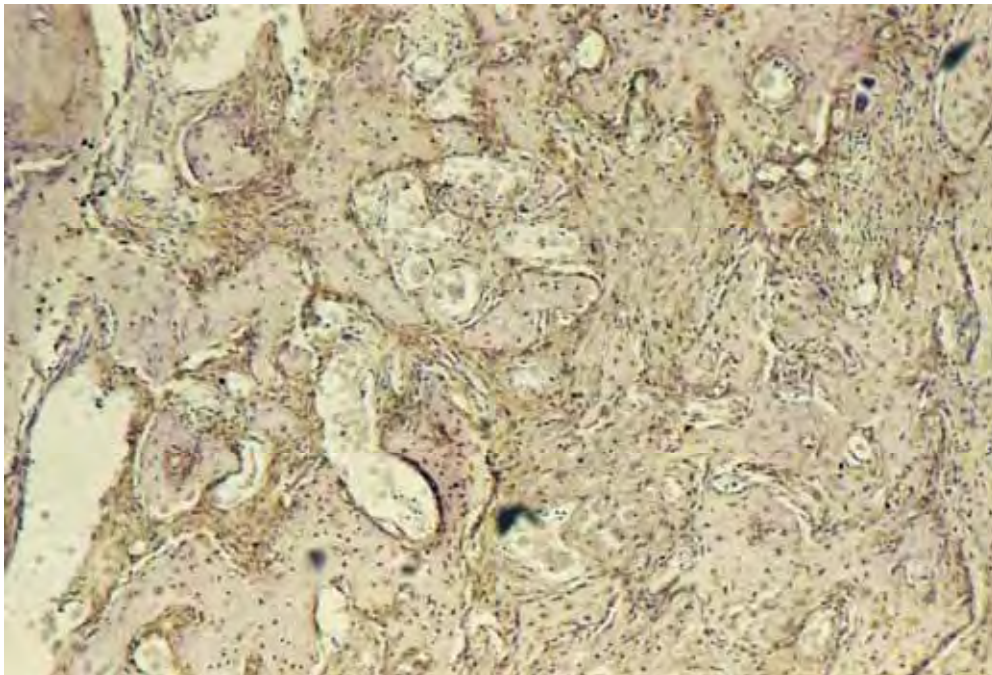


Figura 30 – Grupo II – coágulo terço médio – 14 dias RANK 63X. Intensa marcação de RANK na periferia da matriz óssea neoformada.

28 dias

Ocorre intensa imunomarcção para RANK em células semelhantes a osteoblastos ao redor do trabeculado ósseo e também em osteócitos; também ocorre imunomarcção intensa para RANKL nos mesmos locais de RANK e em células do tecido conjuntivo presente.

A OPG apresenta moderada expressão em osteoblastos localizados ao redor das trabéculas ósseas e também em osteócitos. As trabéculas ósseas formadas apresentam discretas marcações para Osteocalcina.

Com intensidade discreta as células do tipo osteoclastos são marcadas positivamente para TRAP.

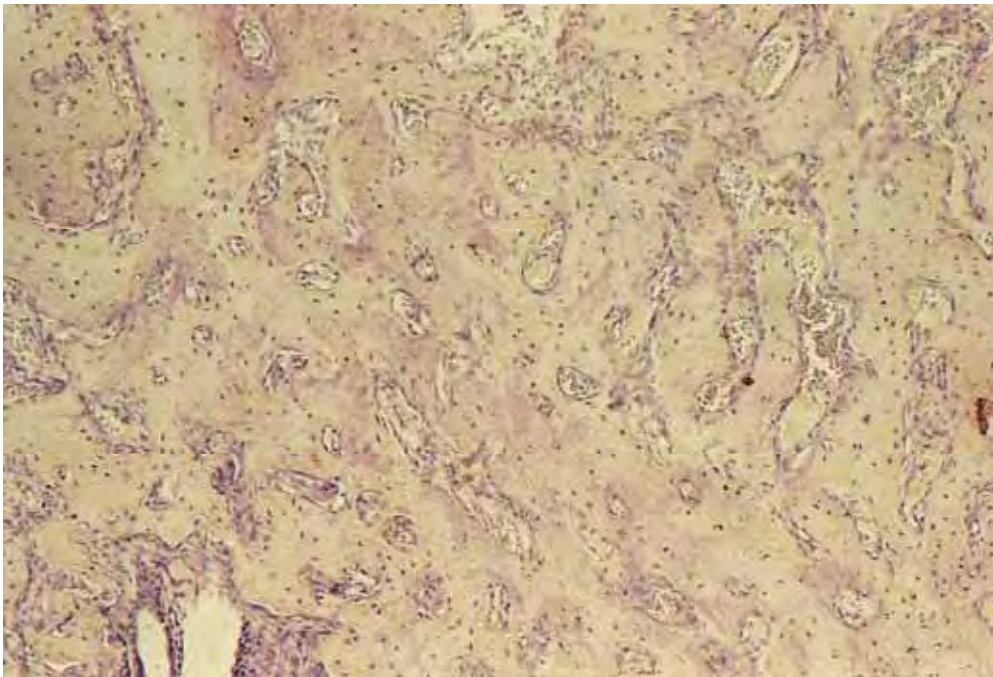


Figura 31 – Grupo II – coágulo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Trabéculas ósseas neoformadas com discreta marcação para Osteocalcina.

GRUPO III

Coágulo

7 dias

O tecido conjuntivo está presente em grande parte do alvéolo e apresenta moderada marcação para RANK, que também se expressa na mesma intensidade em células semelhantes a osteoblastos localizados na periferia da matriz. Ocorre intensa imunomarcação para as proteínas RANKL e OPG em osteoblastos e células do tecido conjuntivo.

A TRAP e a Osteocalcina apresentam discreta expressividade neste período.

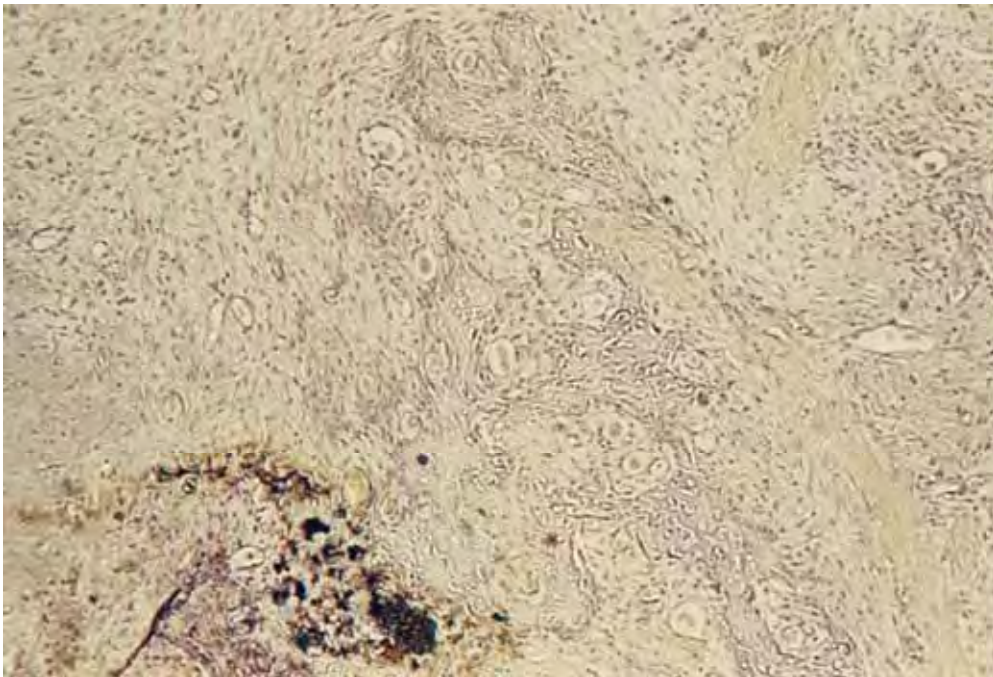


Figura 32 – Grupo III – coágulo terço médio – 7 dias RANK 63x. Tecido conjuntivo e células com morfologia semelhante a osteoblastos marcados moderadamente para RANK.

14 dias

Ocorrem marcações intensas de RANKL e OPG em osteoblastos localizados ao redor das trabéculas ósseas e também em osteócitos. As marcações positivas para Osteocalcina variam de moderada a intensa em trabéculas ósseas e matriz extracelular. Não ocorrem marcações para RANK neste grupo e período.

A TRAP apresenta imunomarcacão moderada.

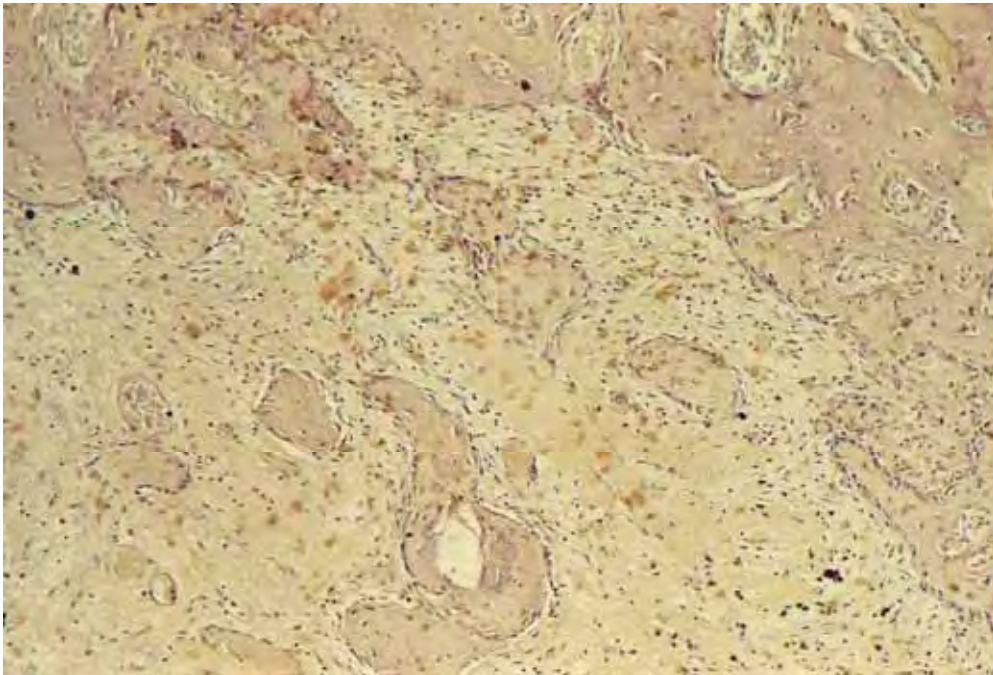


Figura 33 – Grupo III – coágulo terço médio – 14 dias Osteocalcina 63X. Marcações para Osteocalcina na matriz extracelular e trabéculas ósseas.

28 dias

Observa-se a presença de apenas algumas células semelhantes a osteoblastos presentes ao redor das trabéculas ósseas. A imunomarcação para RANK varia de ausente a discreta nestas células.

Os osteócitos são marcados moderadamente para RANKL. Já a OPG apresenta intensa imunomarcação em osteócitos e nos osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas neoformadas.

A Osteocalcina apresenta imunomarcações com moderação na matriz extracelular e trabéculas ósseas. Observamos moderada expressão de TRAP.

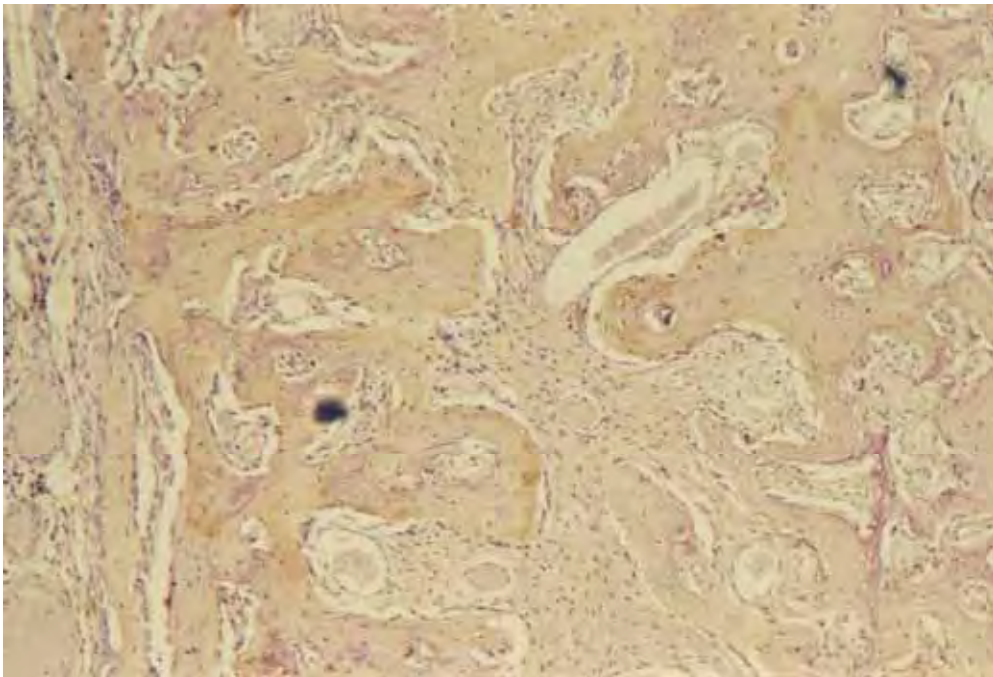


Figura 34 – Grupo III – coágulo terço médio – 28 dias OPG 63X. Marcações específicas para OPG em osteócitos e osteoblastos ao redor do trabeculado ósseo.

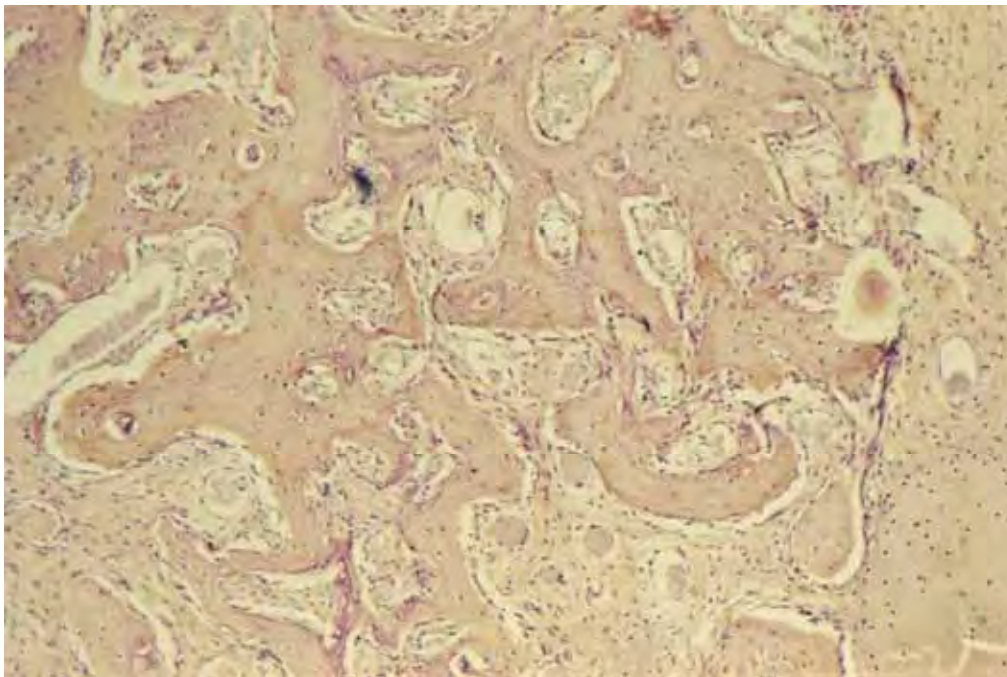


Figura 35 – Grupo III – coágulo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X.
Trabéculas ósseas e matriz extracelular marcadas positivamente.

GRUPO I

Vidro Bioativo

7 dias

Nota-se a presença de grande quantidade de células inflamatórias localizadas ao redor do vidro bioativo. Em alguns espécimes, foi observado o vidro bioativo localizado no terço apical e em outros espécimes, o vidro bioativo estava localizado no terço médio. Neste período não foram observadas trabéculas ósseas neoformadas e a imunomarcacão positiva para RANK foi observada de discreta a moderada no tecido conjuntivo. Em alguns pontos foi observado o início de organizacão do trabeculado ósseo preenchendo o alvéolo dental.

A RANKL apresenta-se expressa com discricão em osteócitos, no osso pré-existente e no tecido conjuntivo. Ocorre discreta imunomarcacão para OPG em células do tecido conjuntivo.

Observamos imunomarcacão discreta no trabeculado ósseo em início de formacão para Osteocalcina. A mesma intensidade de marcaçoes ocorre para TRAP.

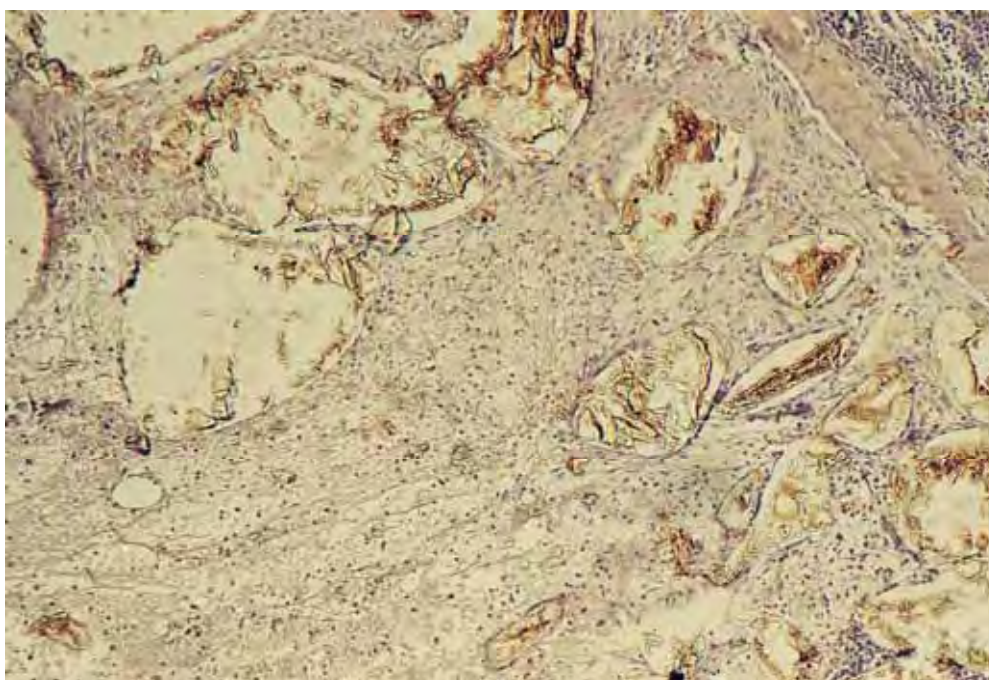


Figura 36 – Grupo I – vidro bioativo terço médio – 7 dias Osteocalcina 63X. Trabeculado ósseo em início de formação com discreta marcação para Osteocalcina.

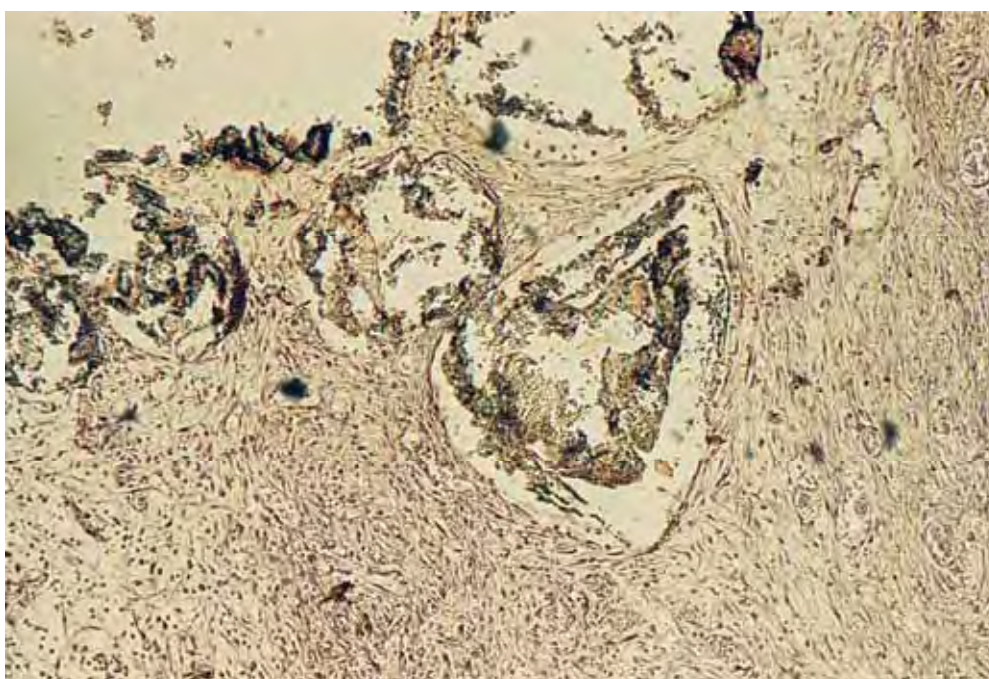


Figura 37 – Grupo I – vidro bioativo terço médio – 7 dias RANKL 63X. Discreta marcação em osteócitos no osso pré-existente e tecido conjuntivo.

14 dias

Ocorre imunomarcacão moderada para RANK nas células do tecido conjuntivo preenchendo grande parte do alvéolo dental. As marcações para RANKL também são de intensidade moderada, no entanto, ocorrem em osteoblastos localizados ao redor das trabéculas ósseas neoformadas e também nos osteócitos; há a presença de imunomarcacão positiva também no tecido conjuntivo.

Nas lâminas analisadas para este grupo, subgrupo e período não há evidenciación da expressão de OPG e Osteocalcina. A TRAP apresenta imunomarcacão discreta.

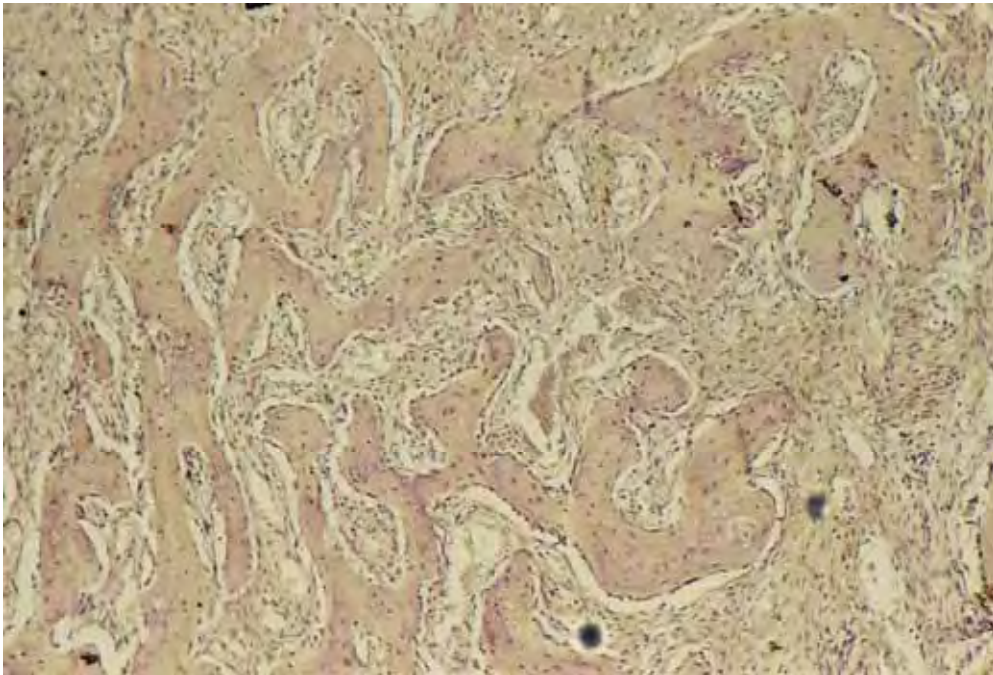


Figura 38 – Grupo I – vidro bioativo terço médio – 14 dias Osteocalcina 63X. Ausência de marcações específicas para Osteocalcina.

28 dias

Osteócitos são marcados positivamente com intensidade moderada para RANK.

Ocorre imunomarcacão variando de moderada a intensa para RANKL em osteócitos e em osteoblastos localizados na periferia da matriz óssea. Há imunomarcacão positiva para RANKL também em tecido conjuntivo.

A ausência da expressão de OPG ainda ocorre como aos 14 dias. Alguns osteoblastos estão marcados positivamente para Osteocalcina. No entanto, não há marcação positiva em trabéculas ósseas neoformadas.

A TRAP apresenta imunomarcacão intensa junto ao biomaterial e também nas trabéculas ósseas neoformadas.

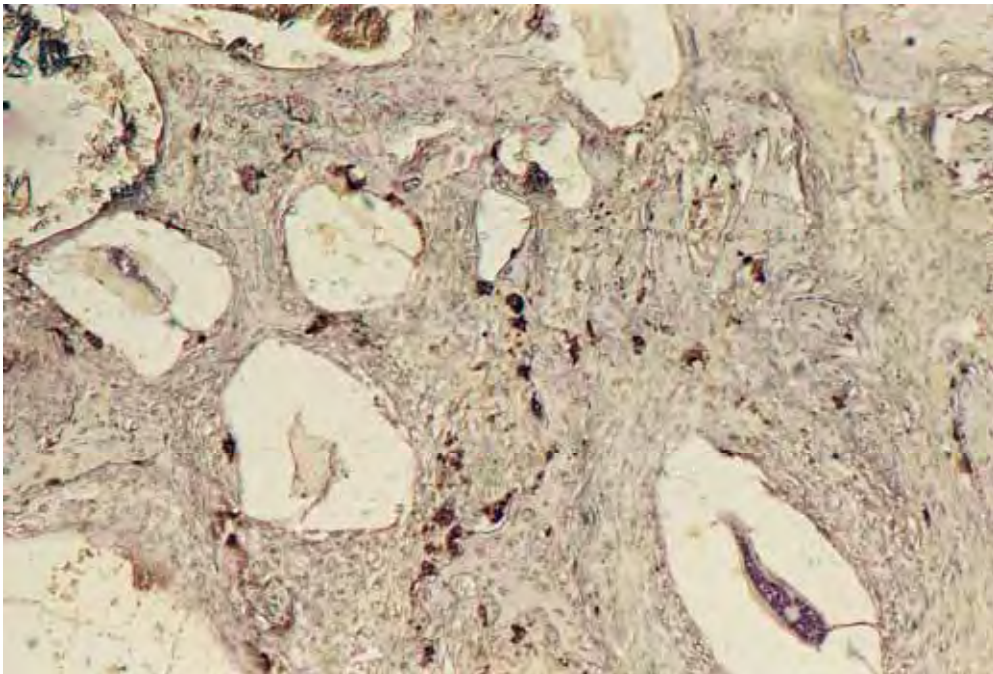


Figura 39 – Grupo I – vidro bioativo terço médio – 28 dias TRAP 63X. Marcação intensa de TRAP junto as partículas do biovidro e também nas trabéculas ósseas.

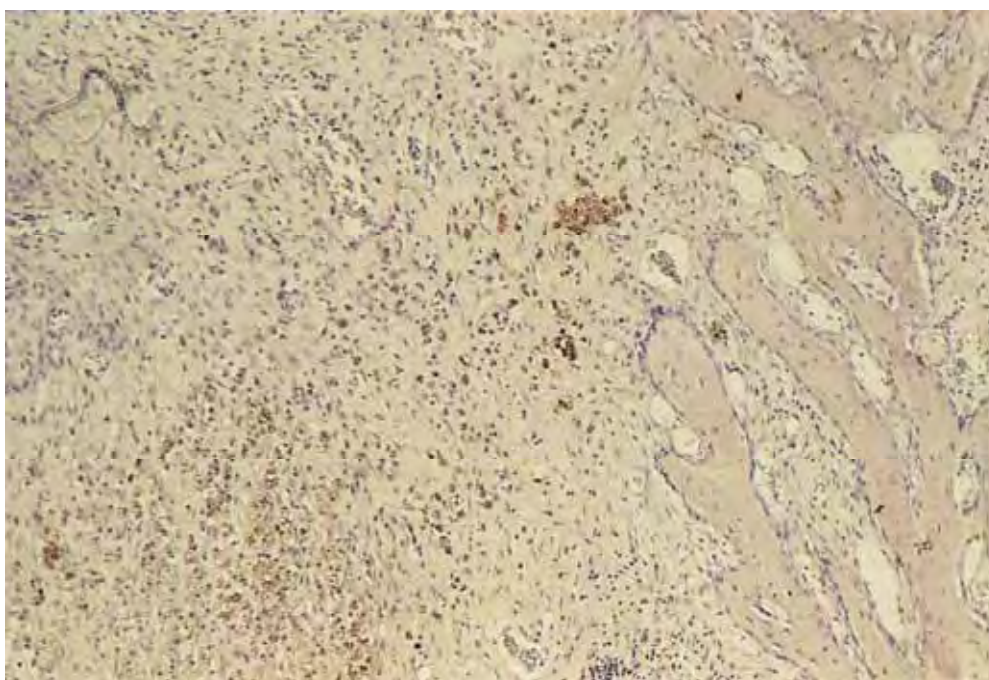


Figura 40 – Grupo I – vidro bioativo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Algumas células (osteoblastos) marcadas positivamente para Osteocalcina.

GRUPO II

Vidro bioativo

7 dias

A RANK apresenta imunomarcacão de discreta a moderada em células semelhantes a osteócitos presentes no tecido ósseo em formação, bem como em células semelhantes a osteoblastos localizadas ao redor das trabéculas ósseas neoformadas. Células do tecido conjuntivo também apresentam imunomarcacão positiva para esta proteína variando de moderada a intensa.

Ocorre intensa imunomarcacão de RANKL em células do tecido conjuntivo, que preenche grande parte do alvéolo. Observa-se moderada imunomarcacão para OPG em osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas neoformadas e também nas células do tecido conjuntivo. Há poucas trabéculas ósseas neoformadas e estas apresentam discreta imunomarcacão para Osteocalcina.

No terço apical nota-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado em relação aos outros dois terços alveolares. Ocorre um predomínio de marcações no terço apical para TRAP com discreta intensidade.

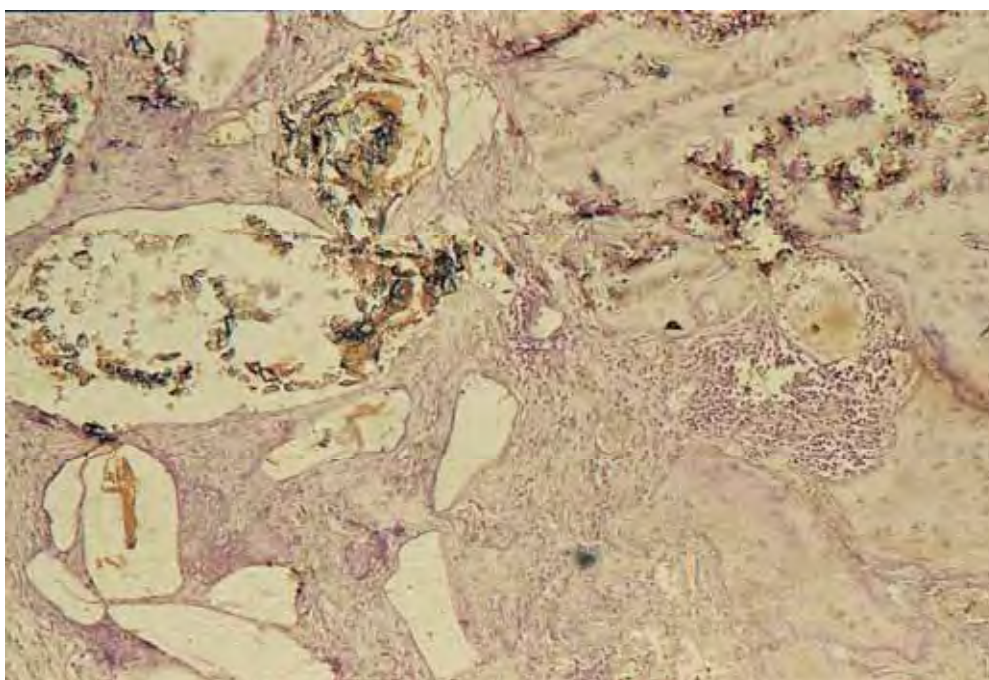


Figura 41 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias OPG 63X. Osteoblastos e tecido conjuntivo com marcações positivas.

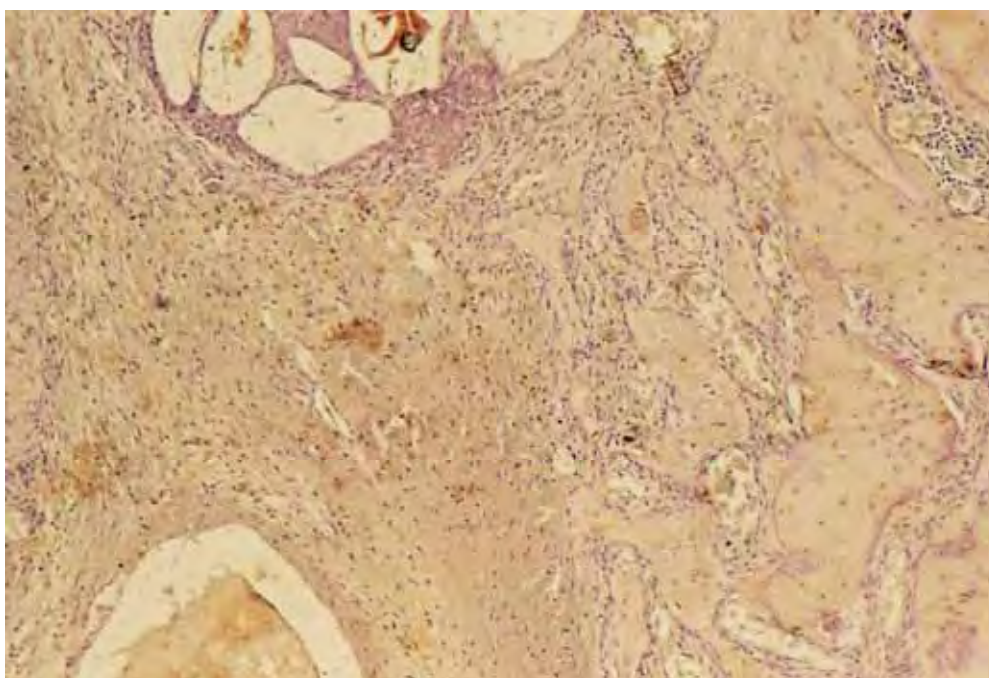


Figura 42 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias Osteocalcina 63x. Pouca formação de tecido ósseo. Discreta imunomarcacão para Osteocalcina.

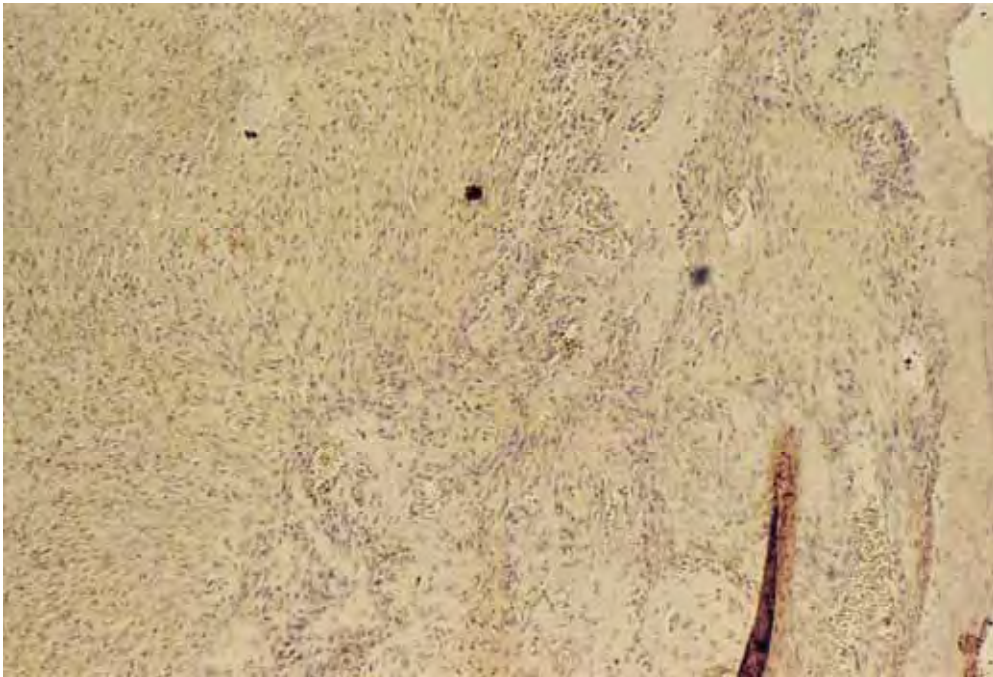


Figura 43 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 7 dias RANK 63X. Tecido conjuntivo (marcação moderada a intensa) e células semelhante a osteócitos e osteoblastos (marcação discreta a moderada) expressando RANK.

14 dias

Poucas trabéculas ósseas são observadas próximas às partículas do biomaterial. No entanto, a RANK apresenta imunomarcação positiva de moderada a intensa nas células do tecido conjuntivo bem como em células semelhantes a osteoblastos.

Ocorre intensa marcação para RANKL em osteoblastos e também em osteócitos. A OPG também apresenta intensa marcação em osteoblastos localizados ao redor das trabéculas ósseas, bem como nas células do tecido conjuntivo que preenche a maior parte do alvéolo dental.

Na matriz extracelular nota-se imunomarcação moderada para Osteocalcina; as trabéculas ósseas não apresentam imunomarcação positiva.

A TRAP apresenta imunomarcção moderada em osteoclastos.

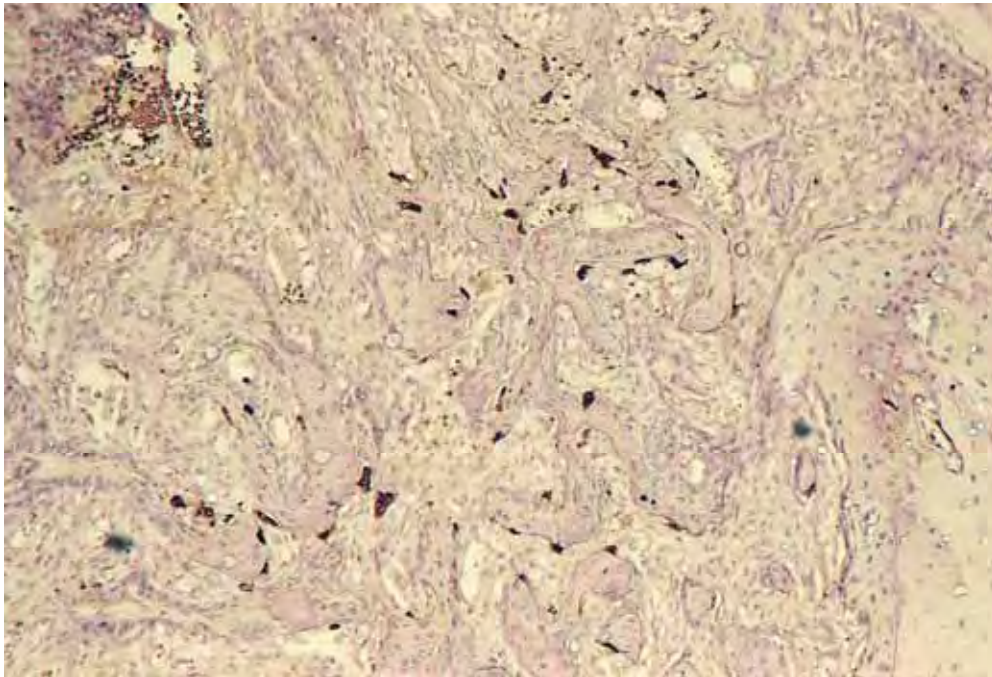


Figura 44 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 14 dias TRAP 63X. Osteoclastos marcados para TRAP.

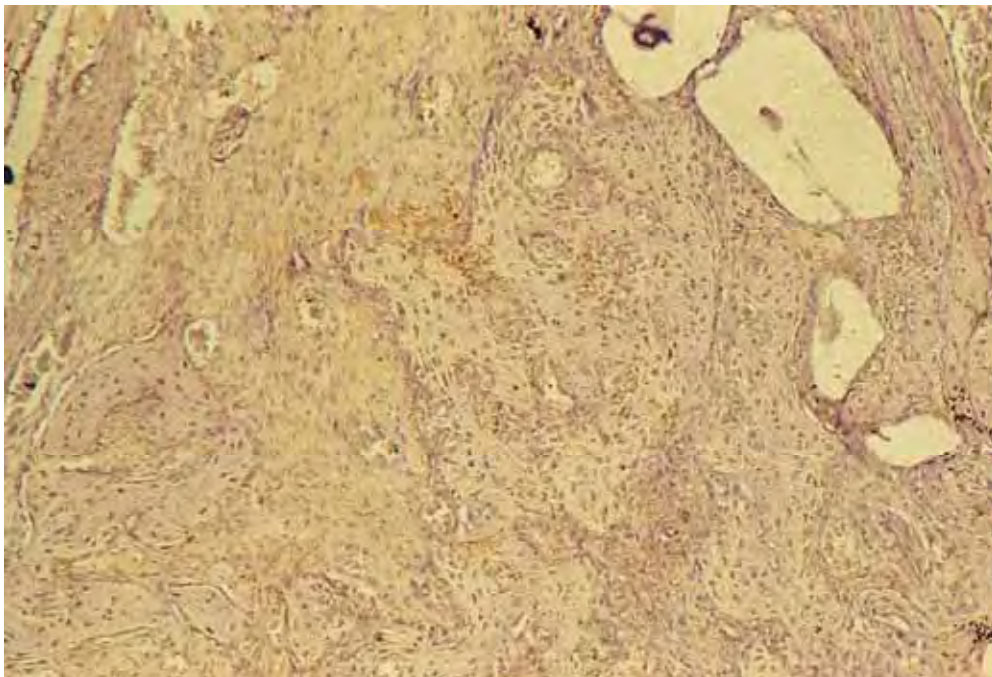


Figura 45 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 14 dias OPG 63X. Tecido conjuntivo preenchendo grande parte do alvéolo dental. Intensa marcação de OPG.

28 dias

Osteoblastos localizados na periferia da matriz sintetizada e osteócitos apresentam intensa imunomarcacão para RANK.

Ocorre intensa imunomarcacão nos osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas e também nas células do tecido conjuntivo para RANKL e OPG.

Alguns pontos da matriz extracelular apresentam discreta imunomarcacão para Osteocalcina, que se expressa com intensidade moderada em osteoblastos ao redor das trabéculas neoformadas. Não há marcação nas trabéculas ósseas.

A TRAP apresenta moderada imunomarcacão positiva no terço médio alveolar. Menor imunomarcacão para esta proteína pode ser observada no terço apical do alvéolo.

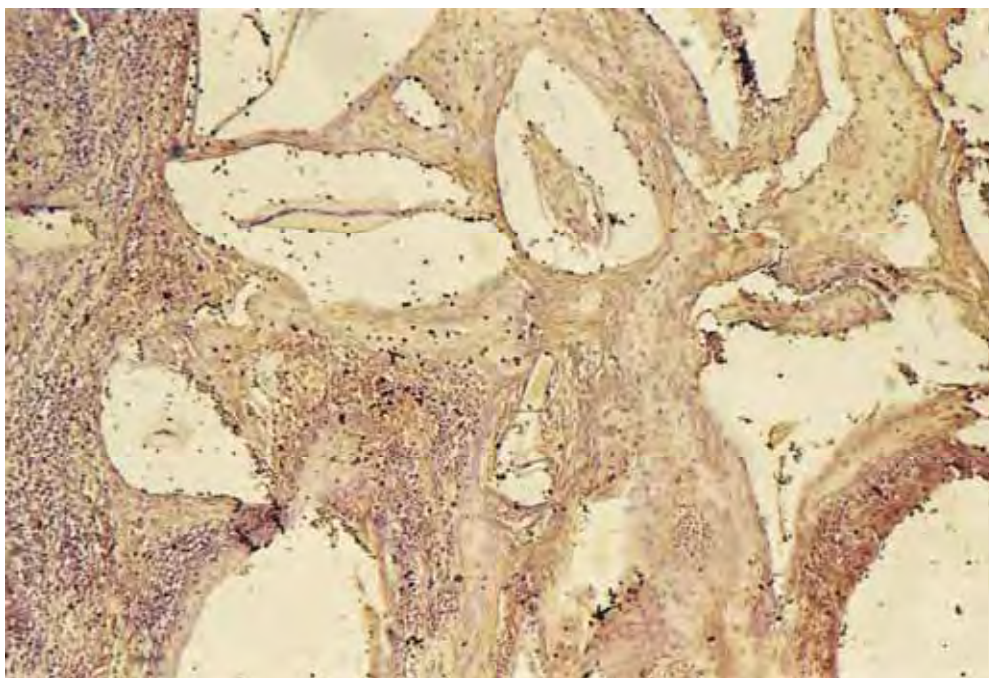


Figura 46 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias RANK 63X. RANK se expressando com intensidade na periferia da matriz já sintetizada e em células semelhante a osteócitos.

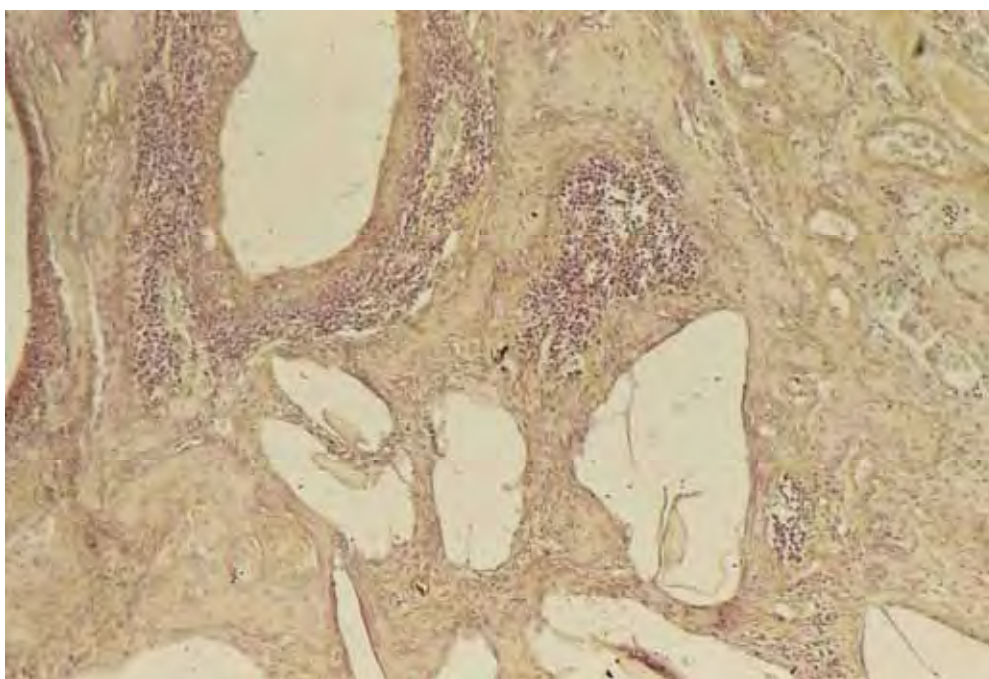


Figura 47 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias Osteocalcina 63X. Partícula do biovidro no terço médio alveolar. Alguns pontos da matriz extracelular e osteoblastos com marcações específicas para Osteocalcina.

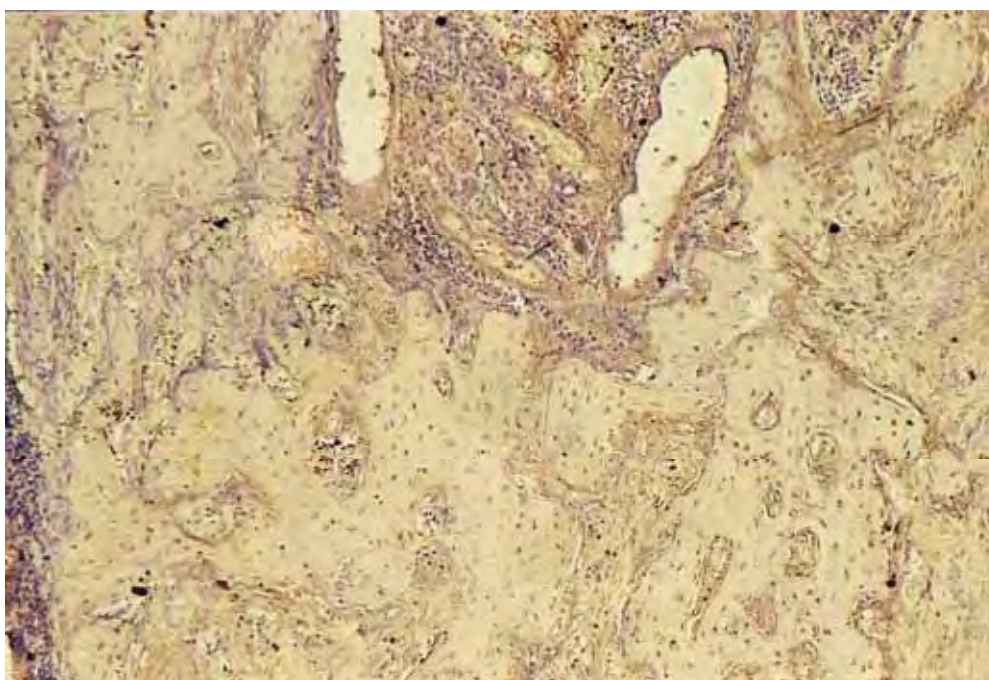


Figura 48 – Grupo II – vidro bioativo terço médio – 28 dias OPG 63X. Tecido conjuntivo e osteoblastos marcados com intensidade.

GRUPO III

Vidro bioativo

7 dias

Neste período não foram observadas partículas do biomaterial no terço médio e apical; há a presença de tecido conjuntivo imaturo em praticamente toda a extensão alveolar. A expressividade de RANK é moderada em células semelhantes a osteoblastos.

A RANKL apresenta discreta imunomarcacão nas células do tecido conjuntivo. O mesmo ocorre para a proteína Osteoprotegerina. Alguns osteócitos são marcados positivamente para OPG e também alguns osteoblastos localizados ao redor das trabéculas ósseas.

O trabeculado ósseo neoformado apresenta discreta marcação para Osteocalcina . A TRAP expressa-se com moderação.

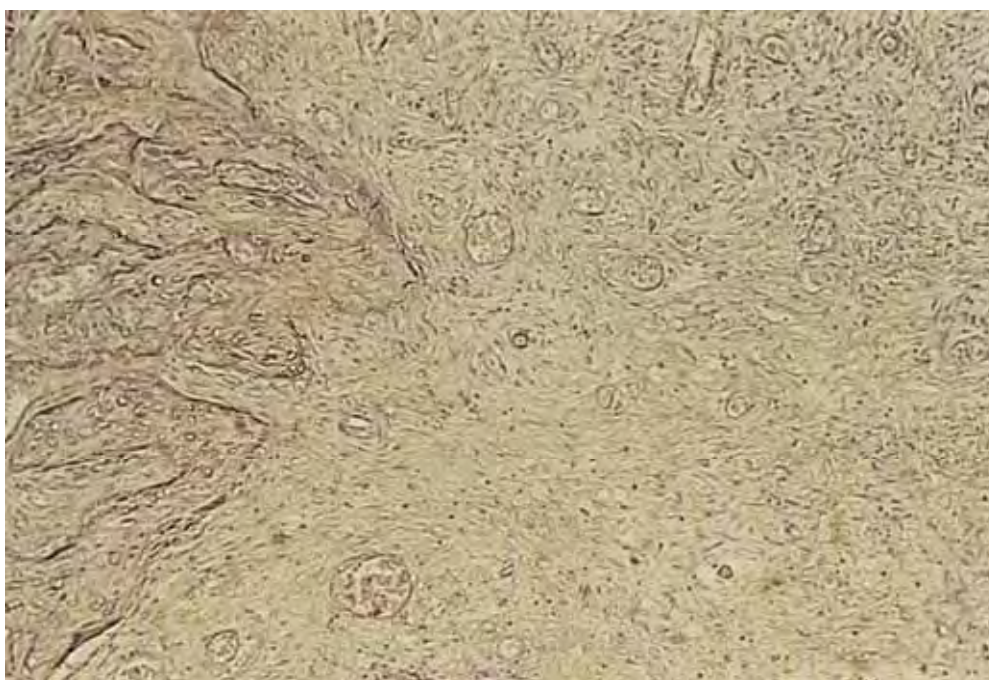


Figura 49 – Grupo III – vidro bioativo terço médio – 7dias RANK 63X. Presença de tecido conjuntivo imaturo em praticamente toda extensão alveolar. Moderada expressão de RANK em osteoblastos.

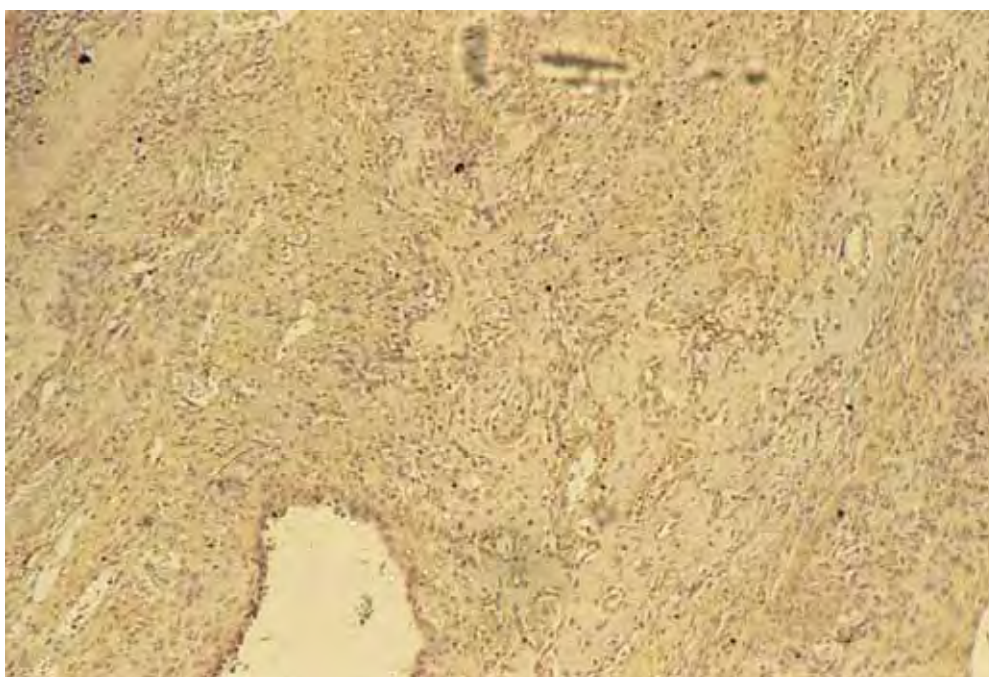


Figura 50 – Grupo III – vidro bioativo terço médio – 7dias RANKL 63X. Células do tecido conjuntivo com discreta marcação para RANKL.

14 dias

Muito semelhante ao grupo I vidro no mesmo período, a RANK expressa discreta imunomarcacão em células semelhantes a osteoblastos.

É observado intensa imunomarcacão nas células do tecido conjuntivo para RANKL. A OPG expressa-se moderadamente nestas mesmas células e também em osteócitos e osteoblastos .

Na matriz extracelular podemos notar moderada imunomarcacão para Osteocalcina, que também se expressa de forma discreta nas trabéculas ósseas neoformadas. Igual ao grupo coágulo no mesmo período e grupo, a TRAP apresenta imunomarcacão moderada em osteoclastos.

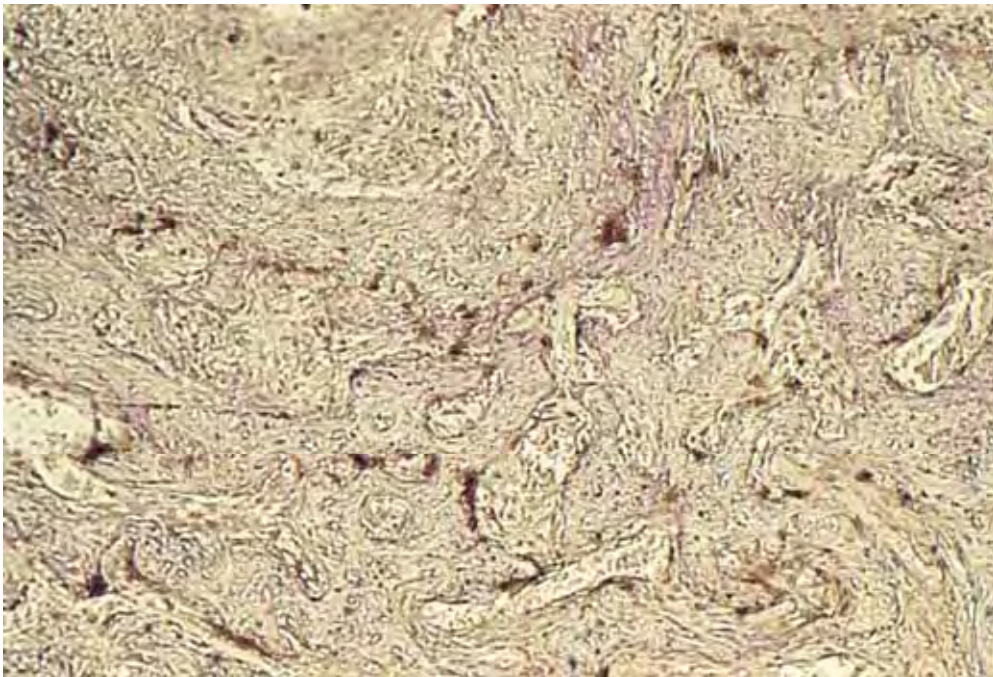


Figura 51 – Grupo III – vidro bioativo terço médio – 14dias TRAP 63X. Moderada expressão de TRAP.

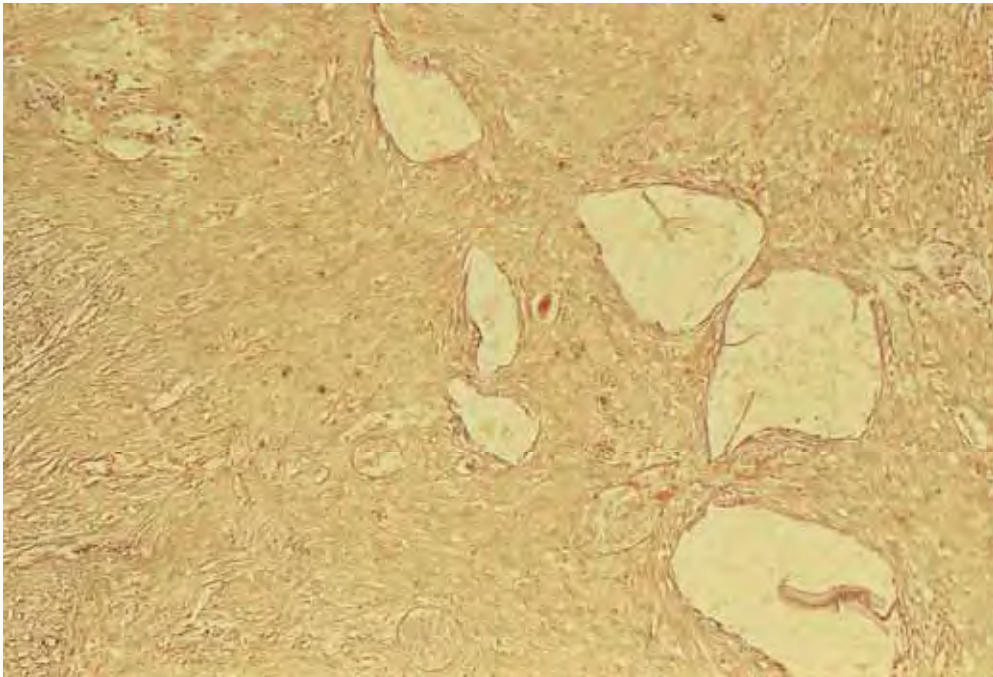


Figura 52 – Grupo III – vidro bioativo terço médio – 14dias OPG 63X. Moderada a intensa expressão de OPG.

28 dias

Mesmo havendo locais próximos ao biomaterial com intensa mineralização ainda podemos notar áreas de tecido conjuntivo na extensão alveolar.

A proteína RANK mostra discreta expressão em células semelhantes a osteoblastos. Já a RANKL mostra positividade de moderada a intensa em osteócitos.

A Osteocalcina apresenta imunomarcacão moderada nas trabéculas ósseas e intensa expressividade na matriz extracelular e no tecido conjuntivo. A OPG tem expressão de discreta a moderada no tecido conjuntivo. Quando comparado ao grupo coágulo no mesmo grupo e período a TRAP apresenta a mesma intensidade de marcações (moderada a intensa).

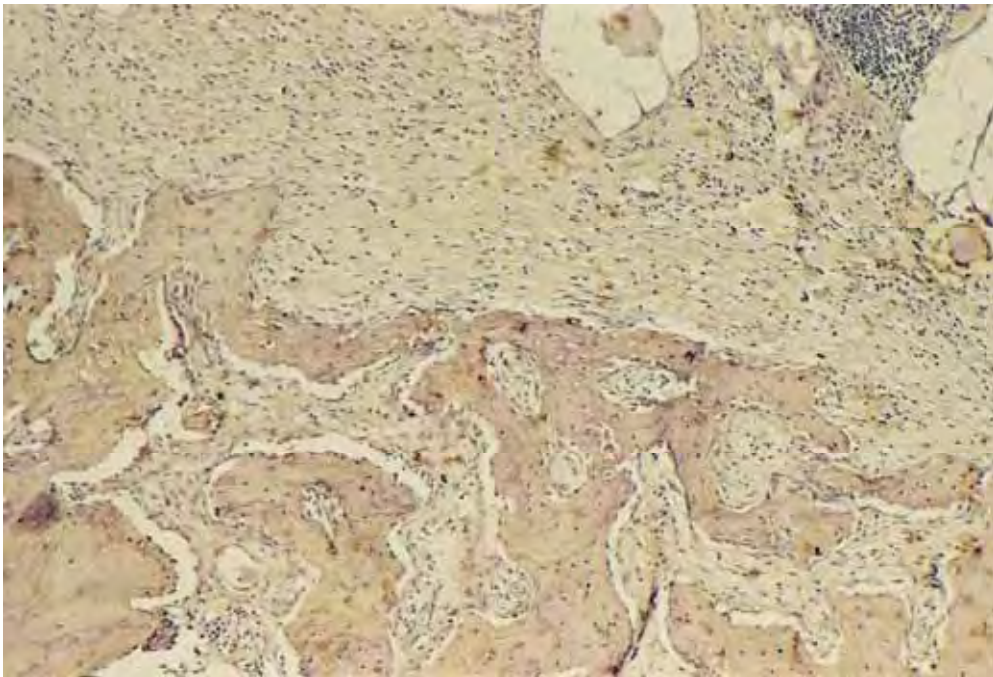


Figura 53 – Grupo III – vidro bioativo terço médio – 28dias Osteocalcina 63X. Intensa expressão de Osteocalcina na matriz extracelular e moderada expressão nas trabéculas ósseas.

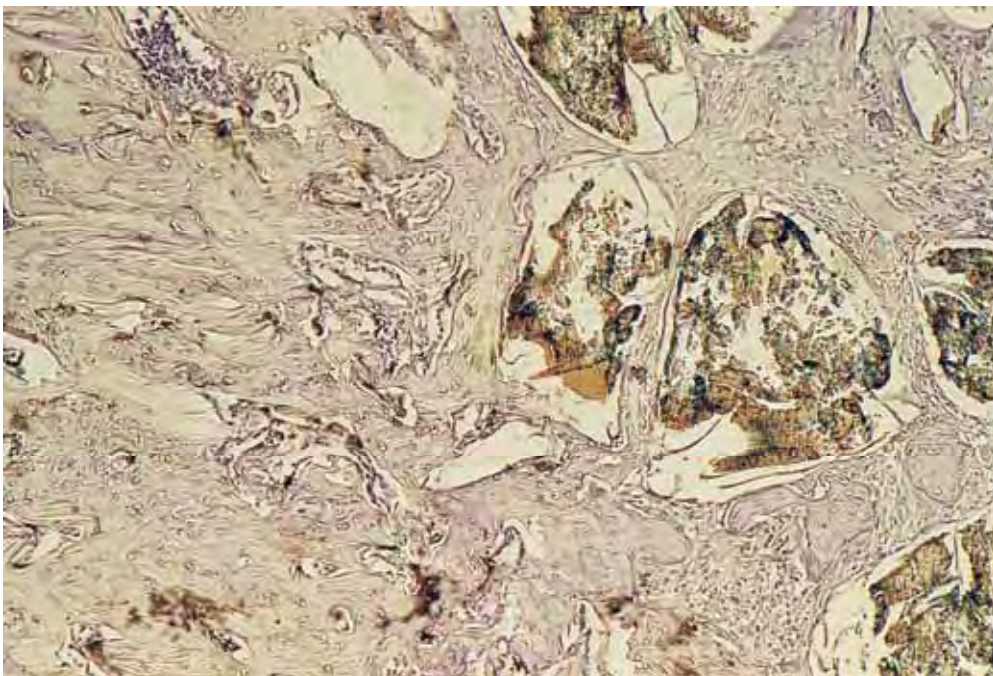


Figura 54 – Grupo III – vidro bioativo terço médio – 28dias TRAP. Moderada-intensa expressão de TRAP.

Os gráficos a seguir ilustram a análise semi quantitativa realizada através da atribuição de scores para cada proteína avaliada em cada grupo, subgrupo e período experimental estudados.

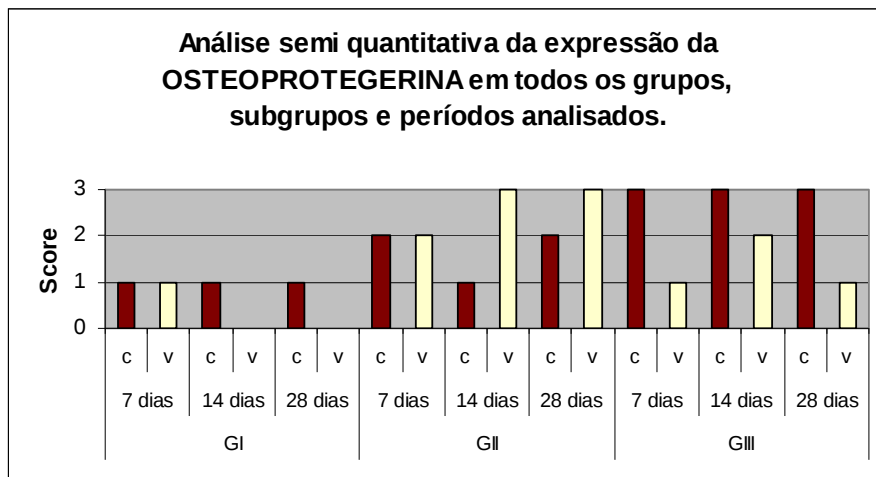


Gráfico 7- Representação gráfica comparativa da expressão de Osteoprotegerina após análise semi quantitativa.

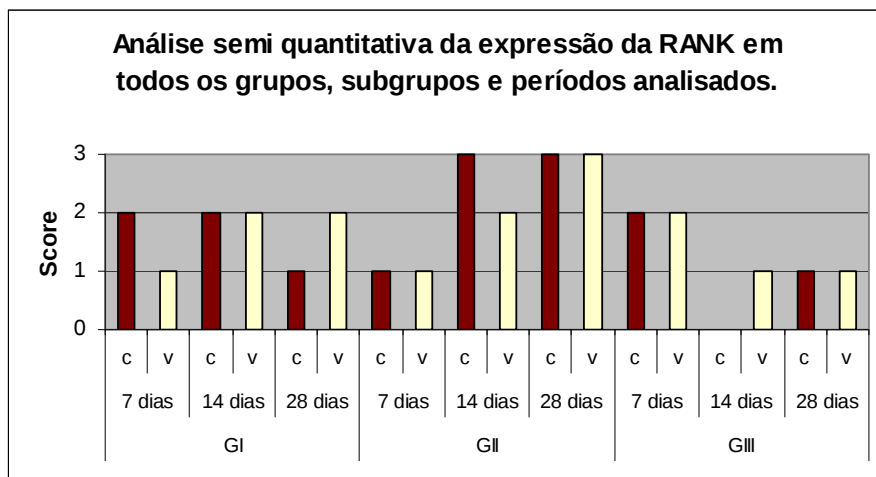


Gráfico 8- Representação gráfica comparativa da expressão de RANK após análise semi quantitativa.

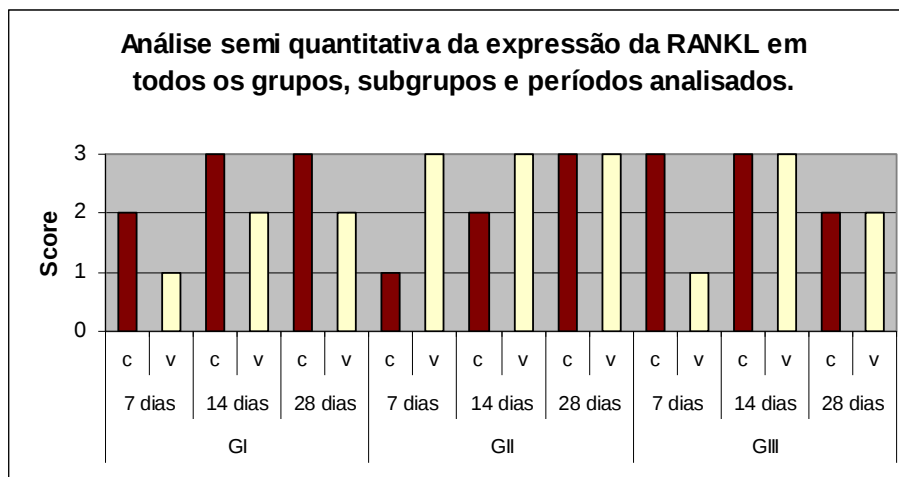


Gráfico 9- Representação gráfica comparativa da expressão de RANKL após análise semi quantitativa.

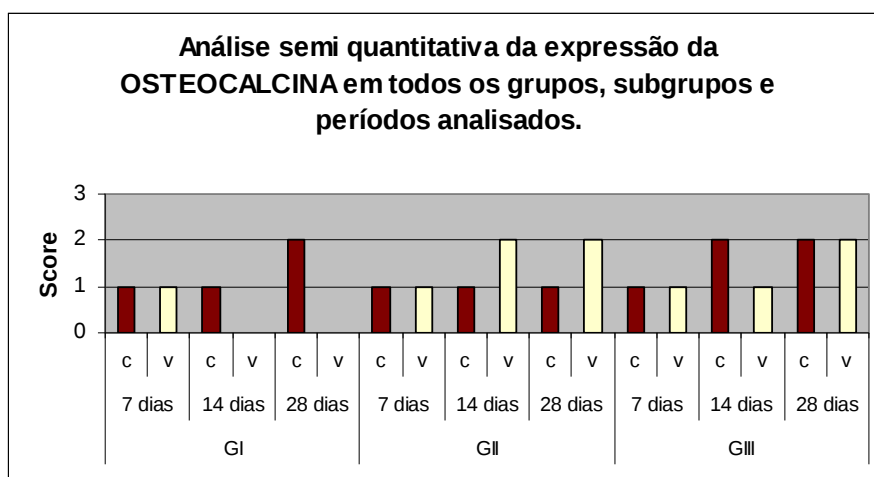


Gráfico 10- Representação gráfica comparativa da expressão de Osteocalcina após análise semi quantitativa.

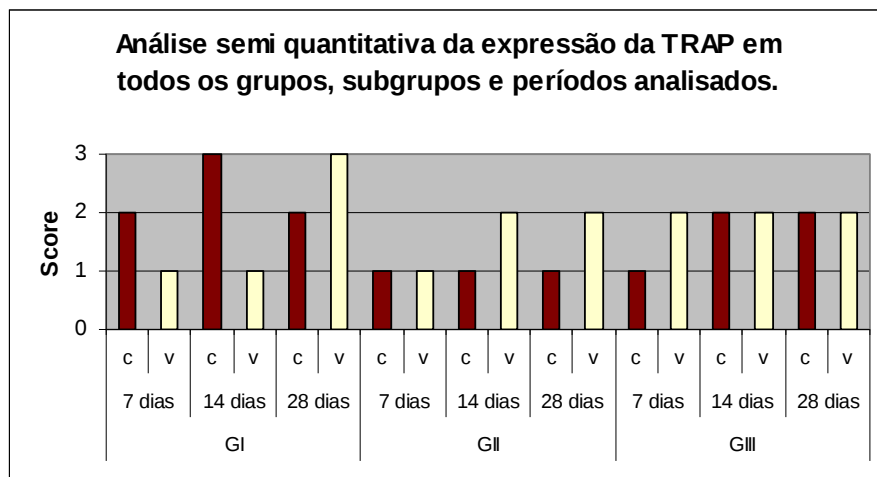


Gráfico 11- Representação gráfica comparativa da expressão de TRAP após análise semi quantitativa.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O processo de reparo alveolar constitui-se numa sequência de eventos que envolvem respostas dinâmicas com o único objetivo de formar tecido ósseo preenchendo a cavidade óssea formada após a exodontia, mantendo a homeostasia mineral do organismo^{3,37}. Este processo encontra-se completo aos 28 dias, com o alvéolo preenchido completamente por tecido ósseo, a crista alveolar remodelada e o epitélio da mucosa gengival totalmente regenerado, em modelo experimental de rato³⁸.

Estudos até então realizados mostram que o melhor material a preencher o alvéolo dental pós exodontia e que permite as melhores respostas durante o processo de reparo alveolar consiste no coágulo sanguíneo^{3,39}. Junto à interferência de materiais quanto às respostas do processo de reparo alveolar, outro aspecto a ser considerado de grande relevância consiste no estado sistêmico do paciente. Várias patologias participam do dia a dia de grande parte da população e dentre estas patologias, destacamos o diabetes mellitus. A alteração no metabolismo do açúcar provocado por esta patologia leva a uma variação sistêmica que vai desde o processo de vascularização até a taxa de mineralização óssea⁵⁻¹³. Sabe-se que o paciente diabético também apresenta comprometimento quanto à imunidade, possuindo uma maior predisposição à ocorrência de infecções e processos inflamatórios.

A literatura indica que em modelos de diabetes mellitus, induzido experimentalmente pela injeção de aloxana ou estreptozotocina, ocorre uma queda na taxa de mineralização óssea e há um retardo na cronologia do

processo de reparo alveolar⁴⁻⁹. Entretanto, há necessidade de se buscar alternativas que possam melhorar as condições de reparo ósseo neste quadro. Portanto, o estudo de respostas celulares produzidas por biomateriais e a possibilidade de melhora no quadro do reparo ósseo nesta situação pode vir a ser uma alternativa viável para se utilizar nestes pacientes.

Em função destas necessidades, este trabalho foi idealizado com o objetivo de comparar as respostas biológicas envolvidas no processo de reparo alveolar em ratos não diabéticos, diabéticos não controlados e diabéticos controlados frente a duas situações: com o alvéolo preenchido por coágulo sanguíneo e com o alvéolo preenchido por um biomaterial, neste caso, o vidro bioativo, sendo utilizado como tentativa de melhorar as respostas teciduais em situação sabidamente comprometida.

Os resultados mostram que o grupo não diabético coágulo sanguíneo obtiveram as melhores respostas quanto ao processo de formação óssea. A presença da alteração sistêmica em ratos com alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo promoveu uma taxa de formação óssea significativamente menor comparado ao grupo não comprometido sistemicamente preenchido também com coágulo sanguíneo; essa resposta era esperada, uma vez que estudos na literatura relatam esta mesma resposta⁴⁻⁹.

Com relação às respostas imunoistoquímicas, destacamos que foram avaliadas as imunomarcações para diferentes proteínas envolvidas em respostas biológicas específicas e importantes dentro da cronologia do processo de reparo alveolar. Assim, foram avaliadas as respostas de sinalização celular quanto ao processo de remodelação óssea, ou seja, a relação entre formação e reabsorção óssea a partir da avaliação da

imunomarcção dos novos membros da Família dos Fatores de Necrose Tumoral (OPG, RANK e RANKL); foi avaliada também a Osteocalcina, proteína não colagenosa presente na matriz orgânica do tecido ósseo que caracteriza a etapa de mineralização óssea, principalmente quando se avalia a sua presença na trabécula óssea neoformada. Com o objetivo de melhor caracterizar estas respostas, foram avaliadas também as imunomarcações para a TRAP, enzima presente em osteoclastos ativos, identificando assim o processo de reabsorção óssea em andamento. As diferentes proteínas avaliadas (OPG, RANK, RANKL e Osteocalcina) permitiram avaliar as células de origem mesenquimal em diferentes estágios, desde o estágio de fibroblastos até a caracterização como osteoblastos e osteócitos, também permitindo que se avaliasse o grau de maturação do tecido ao longo da cronologia do processo de reparo alveolar.

Nos animais não diabéticos coágulo sanguíneo, a imunomarcção para RANK apresentou-se intensa aos 14 dias, caracterizando-se pelas marcações positivas em células semelhantes a osteoblastos localizadas ao redor das trabéculas ósseas neoformadas. Este aspecto, bastante intrigante, foi confirmado em experimentos anteriores no nosso laboratório⁴⁰, no qual foi realizada a mesma observação, ou seja, a presença de RANK em células, semelhantes a osteoblastos em atividade de síntese ao redor das trabéculas ósseas neoformadas. Vale destacar que estudos de Petit et al (2006)⁴¹ mostraram anteriormente a presença de RANK em células com morfologia semelhante a osteoblastos em experimentos no qual foi avaliada a imunomarcção das proteínas da Família do Fator de Necrose Tumoral em áreas de erosão óssea em pacientes que apresentavam artrite reumatóide. Nos experimentos do nosso laboratório, vários testes comprovaram a especificidade

tanto das marcações observadas como também do anticorpo utilizado⁴⁰. É importante notar que a imunomarcação para RANK apresenta o seu pico de expressão aos 14 dias, etapa em que há uma maior atividade metabólica das células envolvidas neste processo³⁷ e aos 28 dias, quando o processo de reparo alveolar se completa, há um decréscimo na presença de marcações positivas para esta proteína nas células do tecido ósseo.

Com relação à Osteoprotegerina (OPG) e RANKL, foi observado no grupo de ratos não diabéticos, coágulo sanguíneo, que a RANKL, proteína presente em células do tecido ósseo e que sinaliza o processo de reabsorção óssea, apresenta uma maior expressão ao final do processo de reparo alveolar. Com relação à Osteoprotegerina, foi observada uma expressão discreta ao longo de todos os períodos avaliados, no entanto, foi observado que com o passar do tempo, as células que apresentavam marcação positiva para esta proteína possuíam um maior grau de diferenciação, onde nas etapas iniciais do reparo ósseo (até os 14 dias) esta proteína apresentava-se expressa em células do tecido conjuntivo (fibroblastos). Já aos 28 dias, ao final do processo de reparo alveolar, foram observadas imunomarcações para Osteoprotegerina em osteócitos, células que caracterizam uma maior maturidade do tecido ósseo. As marcações discretas que caracterizam a Osteoprotegerina podem ser justificadas por sua natureza de receptor solúvel, onde muitas vezes, não é detectada na célula no momento em que se faz o processamento imunoistoquímico.

A imunomarcação para Osteocalcina mostrou-se discreta nas etapas iniciais da cronologia do processo de reparo e mostrou-se moderada aos 28 dias, etapa em que há uma maior mineralização das trabéculas ósseas

neoformadas.

A TRAP caracteriza a reabsorção óssea marcando osteoclastos em atividade. Considerando que o processo de reparo alveolar envolve predominantemente a resposta de formação de tecido ósseo, inicialmente houve a idéia de que a TRAP estaria pouco presente, principalmente nas etapas iniciais. Entretanto, desde os 7 dias pós exodontia, foram observados vários osteoclastos com marcação positiva para TRAP presentes nas bordas do alvéolo dental. Aos 14 dias, há a maior quantidade de osteoclastos com marcação TRAP positiva observados, tanto ao redor do alvéolo dental, como também junto às trabéculas ósseas neoformadas. Aos 28 dias, foi observada uma diminuição nas marcações de osteoclastos positivos para TRAP. Este resultado mostrou que mesmo num processo que se caracteriza principalmente pela deposição óssea, ou seja, o predomínio da formação óssea, há necessidade de disponibilização de cálcio e fosfato com o objetivo de garantir a homeostasia mineral; por este motivo consideramos que a imunomarcação expressiva para TRAP pode ter um papel muito importante neste sentido. Vale destacar que aos 14 dias foi observada a maior expressão da TRAP durante o processo de reparo alveolar, mais uma vez a etapa em que há o predomínio de atividade metabólica celular, em que foram detectadas várias proteínas presentes nas células que atuam nas respostas envolvidas no reparo alveolar.

A colocação do vidro bioativo no interior do alvéolo dental promoveu alterações significativas quanto a taxa de formação óssea e também quanto às imunomarcações das proteínas. A presença do vidro bioativo promoveu uma menor taxa de formação óssea durante o processo de reparo alveolar. O vidro bioativo mostrou-se um material biocompatível e que sofreu incorporação junto

ao tecido ósseo neoformado. Esta biocompatibilidade do biovidro, permitindo a formação de tecido ósseo e a proliferação de células osteoblásticas em contato com este biomaterial foi relatado em estudos anteriores da literatura⁴²⁻⁶¹. Em nossos resultados pouco osso foi formado ao redor das partículas do biomaterial e uma outra informação importante é que este tecido ósseo apresentou uma menor maturidade quando comparado às características do tecido ósseo observadas no grupo não diabéticos coágulo sanguíneo. Portanto, apesar de biocompatível, o biomaterial utilizado induz a uma menor taxa de formação óssea e uma menor maturação do tecido ósseo formado. Estudos presentes na literatura confirmam este achado^{62,63} mostrando que qualquer material introduzido num alvéolo em condições normais provoca um atraso na cronologia do processo de reparo alveolar. É importante destacar que grande parte dos artigos que avaliam a interferência do biovidro sobre a viabilidade e proliferação osteoblástica são experimentos *in vitro*^{42-61,64,65} sendo poucos estudos disponíveis que realizam metodologias *in vivo*, em animais experimentais^{62,63,66}. Os experimentos *in vitro* são importantes principalmente por mostrarem o comportamento do biomaterial junto à atividade celular. Quanto aos experimentos *in vivo*, vale destacar que são importantes pois mostrarão a resposta biológica no organismo vivo, devendo-se considerar todos os mecanismos alternativos existentes nas células, tecidos e sistemas que podem interagir, além das respostas celulares individuais, o que resulta em vias alternativas que são recrutadas sempre no intuito de garantir a homeostasia celular

Quanto às imunomarcações é possível notar um decréscimo geral em todas as proteínas avaliadas neste estudo no grupo vidro, ratos não diabéticos.

Portanto, após a colocação do vidro bioativo no alvéolo, foi observado que as células tiveram uma atividade metabólica reduzida, que pode ser justificado pela menor expressão das diferentes proteínas que sinalizam respostas biológicas do tecido ósseo, quando comparado ao grupo coágulo sanguíneo.

A presença da alteração sistêmica (grupo diabético não controlado) onde o alvéolo foi preenchido com coágulo sanguíneo, promoveu também uma taxa de formação óssea significativamente menor do que o grupo não diabético coágulo sanguíneo, compatível com a literatura⁴⁻⁹. A avaliação imunoistoquímica mostrou, entretanto, que a atividade celular encontrava-se aumentada para as proteínas RANK, RANKL e OPG, que apresentaram uma marcação positiva crescente conforme houve a evolução na cronologia do processo de reparo alveolar. No entanto, foi observada uma redução na imunomarcação para Osteocalcina também ao longo da cronologia do processo de reparo alveolar. Este aspecto é de grande relevância quando se considera que a taxa de mineralização óssea é reduzida em diabéticos, destacando-se que a Osteocalcina é considerada um marcador da mineralização do tecido ósseo⁶⁷. Vale destacar que estudos anteriores mostram que a concentração plasmática de Osteocalcina constitui-se num marcador eficaz para a taxa de mineralização de tecido ósseo em animais portadores do diabetes melitus⁶⁸⁻⁷⁰. A ferramenta metodológica utilizada neste trabalho (técnica imunoistoquímica) permite a preservação da citoarquitetura do tecido analisado, aspecto importante a ser considerado, pois a Osteocalcina, um indicador do turnover ósseo, é sintetizada por osteoblastos e incorporada na matriz óssea pela ligação da hidroxiapatita por uma reação cálcio dependente⁷¹. Somente uma pequena porção desta proteína é liberada na

corrente sanguínea⁷². A sua marcação diretamente no tecido ósseo, como observada em nossos estudos, permite uma melhor análise do seu papel desempenhado junto à precipitação de cálcio sobre a matriz orgânica do tecido.

Quanto ao metabolismo ósseo, é importante considerar que apesar de os fatores de necrose tumoral estarem com as imunomarcações aumentadas neste grupo, a Osteocalcina apresentava-se reduzida. Deve-se considerar a atuação de mecanismos intrínsecos de feedback celular que, na tentativa de compensar a queda na disponibilidade de Osteocalcina, poderiam estar desencadeando um aumento na disponibilização destas outras proteínas na tentativa de melhorar a mineralização quando em presença desta alteração sistêmica. Esta consideração precisa ser melhor investigada em estudos futuros.

Ainda quanto ao metabolismo ósseo durante o diabetes, outro achado importante em nossos resultados consistiu na imunomarcação para a TRAP durante o processo de reparo alveolar. Em ratos diabéticos, houve uma diminuição quanto à imunomarcação para esta enzima, quando comparado aos animais não diabéticos. Relatos na literatura mostram que no diabetes é observada uma redução no turnover ósseo em função da queda na expressão de marcadores para reabsorção, como a TRAP e neoformação, como a osteocalcina ou a fosfatase alcalina no plasma sanguíneo. Esta redução no turnover ósseo resulta na diminuição no metabolismo ósseo e consequentemente na taxa de mineralização óssea^{73,74}.

A aplicação do vidro bioativo no alvéolo de ratos diabéticos não controlados pouco alterou a quantidade de tecido ósseo formado quando comparado ao grupo não diabético que também recebeu o vidro no alvéolo.

Deve-se considerar o aspecto físico da partícula do vidro bioativo que ocupa um espaço no interior do alvéolo no qual não se permite a formação óssea, dificultando a avaliação nas quantidades de osso formado. No entanto, é importante destacar mais uma vez que o vidro bioativo não promoveu respostas de rejeição do tecido ósseo, mostrando-se bem incorporado ao tecido ósseo em formação^{54,64,65}.

Não foi observado o aumento na densidade de tecido ósseo no interior do alvéolo dental como observado quando este mesmo biomaterial foi implantado no alvéolo de ratas osteoporóticas³⁶. Um fator que precisa ser considerado é o período experimental que finaliza a nossa análise, aos 28 dias pós exodontia, uma vez que em ratos controle, ao término deste período o processo de reparo alveolar já se encontra completo. No entanto, considerando-se que a presença de um material no interior do alvéolo promove um atraso na cronologia do processo de reparo e considerando-se também as respostas físico-químicas induzidas pelas partículas do vidro bioativo que têm uma latência maior para desencadear suas possíveis respostas osteoindutoras e osteocondutoras, haveria necessidade de se avaliar períodos mais tardios, como 42 dias pós exodontia. Destacamos que nos experimentos a que nos referimos anteriormente³⁶, a avaliação do processo de reparo após o implante do vidro em ratas osteoporóticas foi realizado aos 42 dias pós exodontia.

Quanto às proteínas avaliadas na imunoistoquímica, foi observado que com a presença do vidro bioativo no interior do alvéolo, houve uma expressão ainda maior das proteínas avaliadas, tanto nos membros do Fator de Necrose Tumoral como também a Osteocalcina. O aumento na expressão da Osteocalcina em presença do vidro bioativo foi observado anteriormente em

experimentos *in vitro*⁷⁵. As respostas celulares parecem estar ainda mais aumentadas após a introdução do vidro bioativo no grupo de animais diabéticos não controlados. No entanto, o aumento nas respostas celulares não foi suficiente para melhorar a taxa de formação óssea, visto que não houve aumento na quantidade de osso formado após a colocação do vidro bioativo nos ratos diabéticos. É importante destacar que quanto ao grau de maturação celular durante o desenvolvimento do processo de reparo alveolar, é possível notar que as células envolvidas nas respostas do grupo diabético não controlado vidro bioativo mostraram um grau de maturação maior do que o observado no grupo diabético não controlado coágulo sanguíneo. Foi observada também uma maior imunomarcagem para Osteoprotegerina principalmente aos 14 e 28 dias. Entretanto, não é possível relacionar o aumento de Osteoprotegerina com um possível aumento na formação óssea, o que realmente não foi observado, uma vez que a RANKL, proteína que sinaliza a reabsorção óssea, também se apresentou marcada intensamente em todos os períodos avaliados para este grupo experimental.

O controle do diabetes representado pelo grupo diabético controlado mostrou respostas de formação óssea próximas, porém menores significativamente quando comparadas ao grupo não diabéticos, quando se considera o alvéolo dental preenchido por coágulo sanguíneo. Com relação às proteínas avaliadas pela imunoistoquímica, foi observada uma redução na imunomarcagem para RANK e RANKL. Quanto a esta última proteína, houve um pico de expressão para a RANKL aos 14 dias, no entanto, aos 28 dias houve diminuição na sua expressão no grupo diabético controlado. A Osteoprotegerina novamente apresentou-se intensamente marcada durante

todas as etapas do processo de reparo alveolar para este grupo diabético controlado coágulo sanguíneo. Associada à maior imunomarcção para OPG, a Osteocalcina também apresentou uma imunomarcção crescente ao longo da cronologia do processo de reparo alveolar. No entanto, foi observada também imunomarcção na matriz extracelular do tecido conjuntivo, mostrando que este tecido formado no interior do alvéolo apresentava-se pouco maduro.

No grupo diabético controlado que recebeu vidro bioativo, foi observada uma taxa de tecido ósseo formado semelhante aos grupos não diabético e diabético não controlado vidro bioativo.

As imunomarcções avaliadas mostraram uma menor atividade celular quanto à expressão destas proteínas sinalizadoras durante a evolução do processo de reparo alveolar para o grupo diabético controlado vidro bioativo. As respostas celulares observadas neste grupo foram muito semelhantes às observadas no grupo não diabético vidro bioativo, mostrando uma menor imunomarcção para praticamente todas as proteínas avaliadas, principalmente quanto à RANK e RANKL. A Osteocalcina mostrou uma imunomarcção de moderada a discreta até os 28 dias pós exodontia e apresentou-se tanto nas trabéculas neoformadas como também na matriz extracelular do tecido conjuntivo, caracterizando mais uma vez que o tecido envolvido nas respostas do processo de reparo alveolar neste grupo encontrava-se num menor estágio de maturação. Quanto à TRAP, foi observada uma maior imunomarcção aos 28 dias e mais uma vez consideramos que seria importante a avaliação em períodos mais tardios inclusive para avaliar se neste estágio, seriam observados osteoclastos junto ao biomaterial realizando o processo de reabsorção óssea.

É importante destacar que a alteração sistêmica avaliada em nosso trabalho promove alterações significativas quanto à imunomarcção destas proteínas, mostrando que há um aumento nas respostas celulares que sinalizam formação e reabsorção óssea. Vale destacar que nos grupos em que se induziu o diabetes experimental foram os que permitiram a maior visualização de imunomarcções para a OPG. No entanto, RANK e RANKL também mostraram uma maior imunomarcção e por este motivo mais uma vez foi observado que a sinalização celular não mostrava predominância para a formação óssea e sim para o equilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea. Devemos considerar que a alteração sistêmica induzida pelo diabetes poderia levar à ativação de mecanismos intrínsecos nas células que resultaria na maior atividade metabólica, numa tentativa de compensar as alterações no metabolismo ósseo induzida pelo diabetes. No entanto, devemos destacar que estas alterações de sinalização não foram suficientes para resultar numa maior resposta de formação de tecido ósseo, o que foi observado de fato, já que a taxa de formação óssea nos ratos diabéticos foi significativamente menor do que nos ratos não diabéticos.

A introdução do vidro bioativo no interior do alvéolo dental resultou em atraso na cronologia do processo de reparo, atraso no grau de maturação do tecido ósseo neoformado e uma menor resposta celular quanto à expressão dos sinalizadores exceto quando o vidro bioativo foi introduzido no alvéolo de ratos diabéticos não controlados. Provavelmente há uma interação entre o biomaterial e as alterações celulares induzidas pela patologia sistêmica, no entanto, mais uma vez ressaltamos que esta provável interação não foi suficiente para resultar numa melhor taxa de formação óssea. Talvez a

associação de outros biomateriais possam induzir a uma melhor resposta quanto ao tecido ósseo formado. O espaço físico ocupado pelo vidro bioativo no interior do alvéolo foi um fator que prejudicou o processo de formação óssea.

O vidro bioativo é descrito como um biomaterial com propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. Estudos na literatura falam da sua latência em promover estas respostas celulares⁷⁶ e talvez uma possível causa da não observação de respostas melhores ao implante deste biomaterial tenha sido o período de análise ainda precoce, não permitindo que o vidro desencadeasse todas estas respostas celulares. A biocompatibilidade deste material pôde ser comprovada em nossos estudos uma vez que houve uma resposta inflamatória inicial, observada aos 7 dias pós operatórios, no entanto, no decorrer do processo de reparo, houve uma incorporação maciça do biomaterial junto ao tecido ósseo em formação. Portanto, apesar de ter promovido uma menor taxa de formação óssea, o vidro bioativo não desencadeou reações de rejeição tecidual o que permite que seja um material de escolha dentro das suas limitações.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Frente às limitações experimentais impostas pelos métodos utilizados neste trabalho, é possível concluir que:

- a alteração sistêmica diabetes mellitus promove alterações significativas na taxa de formação óssea;
- o tratamento do diabetes com insulina promove uma recuperação parcial nas respostas envolvidas tanto na taxa de formação óssea como também nas sinalizações celulares avaliadas pela imunoistoquímica,
- o coágulo sanguíneo ainda é considerado o melhor material para ser mantido no interior do alvéolo dental, permitindo respostas celulares que levam à formação de um tecido ósseo maduro dentro do período de 28 dias, quando o processo de reparo alveolar encontra-se praticamente concluído em ratos;
- as marcações imunoistoquímicas mostraram que o processo de reparo alveolar ocorrendo com ausência de interferências sistêmicas e biomateriais introduzidos no alvéolo, levam a respostas sinalizadoras de proteínas envolvidas nos processos de formação, reabsorção, remodelação e vascularização relacionados aos eventos descritos na cronologia;
- a indução do diabetes leva a um aumento na imunomarcagem de proteínas conhecidas como novos membros do fator de necrose tumoral, entretanto, também causa uma redução na Osteocalcina, conhecida como marcador da mineralização óssea;

- a introdução do vidro bioativo no interior do alvéolo levou a uma redução nas respostas sinalizadoras das células envolvidas no processo de reparo alveolar, resultando numa menor imunomarcção para as proteínas avaliadas neste projeto, exceto no grupo de diabéticos não controlados;
- o vidro bioativo atrasa o processo de reparo alveolar.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1-) Teitelbaum ST. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000; 289: 1504-1508.
- 2-) Cotran RS. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders, 1994.
- 3-) Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados à clínica. São Paulo: Panamericana, 1987, 139p.
- 4-) Grandini AS, Migliorini RH, Okamoto T. Processo de reparo em feridas de extração dental em ratos com diabetes aloxânico: estudo histológico. Bol Fac Farm Odont Rib Preto 1970;7(1):47-71.
- 5-) Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. J Oral Maxillofac Surg 1996;54(9):1087-91.
- 6-) Grandini SA. The effect of partial pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction: histological study in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1978;45(2):190-9.
- 7-) McMillan MD. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats - part I: macroscopic observations. N Z Dent J 1970;66(305):239-47.
- 8-) McMillan MD. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats - part II: macroscopic observations. N Z Dent J 1971;67(307):23-31.
- 9-) Aranega AM. Análise histomorfométrica da reparação de alvéolos infectados após extração dental em ratos diabéticos controlados e não

controlados. Araçatuba, 2001. Tese (Doutorado em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

10-) Fahey TJ, Sadaty A, Jones WG, Barber A, Smoller B, Shires GT. Diabetes impairs the inflammatory response to wound healing. *J Surg Res* 1991;50(4):308-13.

11-) Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dyke TE. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient: a case report. *J Periodontol* 1991;62:394-401.

12-) Schneir M, Bowersox J, Ramamurthy N, Yavelow J, Murray J, Edlin-Folz E, Golub L. Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes: tissue specific effects on collagen metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1979;583(1):95-102.

13-) Schneir M, Ramamurthy N, Golub L. Skin collagen metabolism in the streptozotocin-induced diabetic rat: enhanced catabolism of collagen formed both before and during the diabetic state. *Diabetes* 1982;31(5):426-31.

14-) Moreira-Gonzalez A, Lobocki C, Barakat K, Andrus L, Bradford M, Gilsdorf M, Jackson I. Evaluation of 45S5 bioactive glass combined as a bone substitute in the reconstruction of critical size calvarial defects in rabbits. *J Craniofac Surg* 2005; 16: 63-70.

15-) Hench LL, Splinter RJ, Allen WC, Greenlee TK. Bonding mechanism at the interface of the ceramic prosthetic materials. *Biomed Mater Res Symp* 1972;2:117-41.

16-) Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J. Biomed Mater Res (Symposium)* 1973;4:25-42.

- 17-) Hench LL, Paschall HA. Histochemical responses at a biomaterial's interface. J Biomed Mater Res 1974;5:49-64.
- 18-) Gross U, Strunz V. The interface of various glasses and glass ceramics with a bony implantation bed. J Biomed Mater Res. 1985;19:251-71.
- 19-) Wagle N, Do NN, Yu J, Borke JL. Fractal analysis of the PDL-bone interface and implications for orthodontic tooth movement. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2005;127:655-61; quiz 754.
- 20-) Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. Clin Oral Implants Res. 2001;12:270-8.
- 21-) Shapoff CA, Alexander DC, Clark AE. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. Compend Contin Educ Dent. 1997;18:352-4, 356, 358.
- 22-) Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. Biomed Mater Res. 1973;7:25-42.
- 23-) Schepers E, de Clercq M, Ducheyne P, Kempeneers R. Bioactive glass particulate material as a filler for bone lesions. J Oral Rehabil. 1991;18:439-52.
- 24-) Gross JS. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. Compend Contin Educ Dent. 1997;18:1013-8, 1020-2, 1024.
- 25-) Allan I, Newman H, Wilson M. Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria. Biomaterials. 2001;22:1683-7.
- 26-) Allan I, Newman H, Wilson M. Particulate Bioglass reduces the viability of bacterial biofilms formed on its surface in an in vitro model. Clin Oral Implants Res. 2002;13:53-8.

- 27-) Schepers EJ, Ducheyne P. Bioactive glass particles of narrow size range for the treatment of oral bone defects: a 1-24 month experiment with several materials and particle sizes and size ranges. *J Oral Rehabil.* 1997;24:171-81.
- 28-) Schepers EJ, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: a new material for the repair of bone defects. *Implant Dent.* 1993;2:151-6.
- 29-) Stanley HR, Hall MB, Clark AE, King 3rd CJ, Hench LL, Berte JJ. Using 45S5 bioglass cones as endosseous ridge maintenance implants to prevent alveolar ridge resorption: a 5-year evaluation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997; 12: 95-105.
- 30-) Yilmaz S, Efeoglu E, Kiliç AR. Alveolar ridge reconstruction and/or preservation using root form bioglass cones. *J Periodontol* 1998; 25: 832-839.
- 31-) Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Klokkevevold PR; Kenney EB, Dimitrijevic B, Nedic M, Jancovic, S, Orsini, M. Influence of bioactive glass on changes in alveolar process dimensions after exodontia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 581-586.
- 32-) Froum S, Cho S, Rosenberg E, Rohrer M, Tarnow D. Histological comparison of healing extraction sockets implanted with bioactive glass or demineralized freeze-dried bone allograft: a pilot study. *J Periodontol* 2002;73: 94-102.
- 33-) Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002; 17: 249-257.
- 34-) Sy IP. Alveolar ridge preservation using a bioactive glass particulate in extraction site defects. *Gen Dent* 2001; 50: 66-68.

- 35-) Thronsdon RR, Sexton B. Grafting mandibular third molar extraction sites: A comparison of bioactive glass to a nongrafted site. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Oral Endod* 2002; 94: 413-419.
- 36-) Teofilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol* 2004;49(9):755-62.
- 37-) Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Fac Odontol Araçatuba* 1973;2(2):153-69.
- 38-) Okamoto T, Fialho ACV. Estudo comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. *Rev Odont UNESP* 1990;19:63-74.
- 39-) Okamoto T, Okamoto R, Alves Rezende MC, Gabrielli MF. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. *Braz Dent J.* 1994;5(2):85-92.
- 40-) Cláudio-Coutinho CC. Expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratos. Estudo imunoistoquímico. Araçatuba, 2005. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 41-) Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallesse EM. RANKL protein is expressed at the pannus–bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006;45:1068–1076.
- 42-) Tsigkou O, Jones JR, Polak JM, Stevens MM. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass® conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomater* 2009;30(21):3542–3550.

- 43-) Leu A, Kent Leach J. Proangiogenic Potential of a Collagen/Bioactive glass Substrate. *Pharm Res.* 2008;25(5):1222-9.
- 44-) Au AY, Au RY, Al-Talib TK, Eves B, Frondoza CG. Consil bioactive glass particles enhance osteoblast proliferation and maintain extracellular matrix production in vitro. *Biomed Mater Res A* 2008;86(3):678-84.
- 45-) Karpov M, Laczka M, Leboy PS, Osyczka AM. Sol-gel bioactive glasses support both osteoblast and osteoclast formation from human bone marrow cells. *J Biomed Mater Res A.* 2008 Mar 1;84(3):718-26.
- 46-) Aina V, Perardi A, Bergandi L, Malavasi G, Menabue L, Morterra C, Ghigo D. Cytotoxicity of zinc-containing bioactive glasses in contact with human osteoblasts. *Chem Biol Interact.* 2007 May 1;167(3):207-18.
- 47-) Levy S, Van Dalen M, Agonafer S, Soboyejo WO. Cell/surface interactions and adhesion on bioactive glass 45S5. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(1):89-102.
- 48-) Jones JR, Tsigkou O, Coates EE, Stevens MM, Polak JM, Hench LL. Extracellular matrix formation and mineralization on a phosphate-free porous bioactive glass scaffold using primary human osteoblast (HOB) cells. *Biomaterials* 2007;28(9):1653-63.
- 49-) Vaahtio M, Peltola T, Hentunen T, Ylänen H, Areva S, Wolke J, Salonen JI. The properties of biomimetically processed calcium phosphate on bioactive ceramics and their response on bone cells. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17(11):1113-25.
- 50-) Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med* 2006;17(11):967-78.

- 51-) Hattar S, Loty S, Gaisser D, Berdal A, Sautier JM. Effects of 58S sol-gel glasses on a temporal expression of bone markers during mouse osteoblastic differentiation. J Biomed Mater Res A 2006;15:76(4):811-9.
- 52-) Valerio P, Guimarães MH, Pereira MM, Leite MF, Goes AM. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. J Mater Sci Mater Med 2005;16(9):851-6.
- 53-) Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. Biomaterials 2005;26(18):3873-9.
- 54-) Foppiano S, Marshall SJ, Marshall GW, Saiz E, Tomsia AP. The influence of novel bioactive glasses on *in vitro* osteoblast behavior. J Biomed Mater Res A 2004;71(2):242-9.
- 55-) Gough JE, Clupper DC, Hench LL. Osteoblast responses to tape-cast and sintered bioactive glass ceramics. J Biomed Mater Res A 2004;69(4):621-8.
- 56-) Lossdörfer S, Schwartz Z, Lohmann CH, Greenspan DC, Ranly DM, Boyan BD. Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. Biomaterials. 2004 Jun;25(13):2547-55.
- 57-) Gough JE, Jones JR, Hench LL. Nodule formation and mineralisation of human primary osteoblasts cultured on a porous bioactive glass scaffold. Biomaterials 2004;25(11):2039-46.
- 58-) Josset Y, Nasrallah F, Jallot E, Lorenzato M, Dufour-Mallet O, Balossier G, Laurent-Maquin D. Influence of physicochemical reactions of bioactive glass on the behavior and activity of human osteoblasts in vitro. J Biomed Mater Res A 2003;67(4):1205-18.

- 59-) Hattar S, Berdal A, Asselin A, Loty S, Greenspan DC, Sautier JM. Behaviour of moderately differentiated osteoblast-like cells cultured in contact with bioactive glasses. *Eur Cell Mater* 2002;4:61-9.
- 60-) Silver IA, Deas J, Erecinska M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. *Biomaterials* 2001; 22:175-185.
- 61-) Oliva A, Salerno A, Locardi B, Riccio V, Della Ragione F, Iardino P, Zappia V. Behaviour of human osteoblasts cultured on bioactive glass coatings. *Biomaterials* 1998;19(11-12):1019-25.
- 62-) Calixto RF, Teófilo JM, Brentegani LG, Lamas-Carvalho TL. Grafting of tooth extraction socket with inorganic bovine bone or bioactive glass particles: comparative histometric study in rats. *Implant Dent* 2007;16(3):260-9.
- 63-) Leles JLR. Reparo alveolar após implante de vidro bioativo: avaliação histológica em macacos. Araçatuba, 2006. Tese (Doutorado em Odontologia) Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.
- 64-) Vallet-Regí M, Rámila A, Padilla S, Muñoz B. Bioactive glasses as accelerators of apatite bioactivity. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(3):580-5.
- 65-) Bosetti M, Zanardi L, Hench L, Cannas M. Type I collagen production by osteoblast-like cells cultured in contact with different bioactive glasses. *J Biomed Mater Res A* 2003;64(1):189-95.
- 66-) Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res* 2007;18(3):311-8.

- 67-) Oliveira, PT.; Zalzal, SF.; Irie, K.; Nanci, A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 51(5):633-641, 2003.
- 68-) Kim DJ, Park BL, Koh JM, Kim GS, Kim LH, Cheong HS, et al. Methionine synthase reductase polymorphisms are associated with serum osteocalcin levels in postmenopausal women. *Exp Mol Med* 2006;38(5):519-24.
- 69-) Di Carlo C, Tommaselli GA, Gargano V, Sammartino A, Bifulco G, Tauchmanova L, et al. Effects of estrogen-progestin therapy on serum levels of RANKL, osteoprotegerin, osteocalcin, leptin, and ghrelin in postmenopausal women. *Menopause* 2007;14(1):38-44.
- 70-) Fujii H, Hamada Y, Fukagawa M. Bone formation in spontaneously diabetic Torii-newly established model of non-obese type 2 diabetes rats. *Bone* 2008;42(2):372-9.
- 71-) Dickson IR (1993). Bone. "Connective tissue and its heritable disorders" (Royce P and Steinmann B, Eds.), pp.249-285, Wiley-Liss. New York.
- 72-) Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ. New biochemical marker for bone metabolism. *J Clin Invest* 1980;66:878-883.
- 73-) Herrero S, Calvo OM, García-Moreno C, Martín E, San Román JI, Martín M, García-Talavera JR, Calvo JJ, del Pino-Montes J. Low bone density with normal bone turnover in ovariectomized and streptozotocin-induced diabetic rats. *Calcif Tissue Int* 1998;62(3):260-5.
- 74-) Suzuki K, Ishida H, Takeshita N, Taguchi Y, Sugimoto C, Nosaka K, Seino Y. Circulating levels of tartrate-resistant acid phosphatase in rat models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 1998;12(3):176-80.

75-) Varanasi VG, Saiz E, Loomer PM, Ancheta B, Uritani N, Ho SP, Tomsia AP, Marshall SJ, Marshall GW. Overexpression of osteocalcin gene and matrix proteins by osteoblasts exposed to bioactive glass ions. *Acta Biomater.* 2009 Jun 2.

76-) Trindade-Suedam IK. Estudo comparativo dos resultados de enxerto de vidro bioativo e osso autógeno, associados ou não ao plasma rico em plaquetas, em seio maxilar de coelho: análise fractal, densitométrica e histomorfométrica. Araraquara, 2007. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista.

Anexo

ANEXO

ANEXO A: Cópia do Certificado de aprovação do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "*ANÁLISE DA DINÂMICA DO PROCESSO DE REPARO DE ALVÉOLOS PREENCHIDOS COM VIDRO ATIVO (PERIOGLASS®) EM RATOS NÃO DIABÉTICOS CONTROLADOS E NÃO CONTROLADOS. ESTUDO HISTOLÓGICO, HISTOMÉTRICO E IMUNOISTOQUÍMICO*" sob responsabilidade do *Prof. Dra Roberta Okamoto, Carolina Chiantelli, Cláudio Coutinho, Alessandra Marcondes Arenga, Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah, Edilson Ervolino, Prof Dr Roelf Justino Cruz Rizzolo, Prof Dr Tetuo Okamoto* está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 31/08/2008 de acordo com o protocolo 2008-003206.

Araçatuba, 31 de Outubro de 2008

Prof.ª Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

ANEXO B: Normas para publicação na revista Bone.

BONE

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment



ISSN:8756-3282

Imprint: ELSEVIER

Guide for Authors

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment Official Journal of the International Bone and Mineral Society.

BONE provides a peer-reviewed, interdisciplinary forum for monthly publication of original, experimental, and clinical studies, along with review articles on normal and pathological processes occurring in bone and other tissues affecting calcium metabolism. Additionally, well-documented case reports are invited.

Submissions of manuscripts

Manuscripts must be submitted on BONE's submission and review Web site, <http://ees.elsevier.com/bone>. If you have a preference, please indicate which editor or associate editor you would like to process your manuscript according to their expertise. The Editors, however, reserve the right to select a different editor or associate editor to monitor the review process, as the expertise of the proposed editor or associate editor should closely match the subject matter of the manuscript. Please also suggest five possible reviewers. When recommending reviewers, authors should avoid naming more than one scientist from any one institution or from closely related scientists/institutions. For each reviewer, please provide name of institution, telephone number, and e-mail address. Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work is carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder. Manuscripts are published in English only.

For questions regarding submission, please contact:

Bone editorial office
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495, USA
Telephone: (619) 699-6782
Fax: (619) 699-6211
Email: bone@elsevier.com

English editing. The following individuals or services are members of the (United States) Council of Science Editors or other professional organizations and have expressed interest in helping authors of manuscripts submitted to BONE with English editing. Authors may contact these individuals or services directly by mail, phone, fax, or e-mail. All financial arrangements are strictly between the two parties. BONE neither endorses nor recommends any specific individual or service. Professional editing, while often recommended by reviewers, does not ensure acceptance or publication of a manuscript.

Diana B. Mathis, ELS, 5559 Raleigh Street, Pittsburgh, PA 15217-1534, USA; telephone: 412-521-6346; fax: 412-422-5082; e-mail: dbmathis@fyi.net

Lynda Charters, Medical International, P.O. Box 5966, Marlboro, MA 01752, USA; telephone: 508-788-0726; fax: 508-788-0742; e-mail: medintl@aol.com

MedEdit, USA, 15101 Magnolia Boulevard, E24, Sherman Oaks, CA 91403, USA; telephone: 818-986-1715; fax: 818-986-5507; e-mail: adawson@hsc.usc.edu

Karin Mesches, Ph.D., SciTechEdit International, 7012 East Mountain Brush Circle, Highlands Ranch, CO 80130, USA; fax: 303-773-6660; e-mail: editor@scitechedit.com; Web page: <http://www.scitechedit.com>

Gary D. Novack, Ph.D., Member, AMWA, PharmaLogic Development, Inc., 17 Bridgegate Drive, San Rafael, CA 94903, USA; telephone: 415-472-2181; fax: 415-472-2183; e-mail: gary_novack@pharmalogic.com; Web page: www.pharmalogic.com

Rhana Pike (Ms), ELS, Sydney, NSW 2001, Australia; telephone: 61-2-9569-7831; e-mail: rhana@australianeditor.com.

Susan Erickson, 130 Winchester Street, Brookline, MA 02446, USA; telephone: 617-731-3415; e-mail: ghanap@ozemail.com.au
Language Polishing:

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact

authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor take responsibility for any products, good or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions <http://www.elsevier.com/termsconditions>

Only one revision will be permitted. A subsequent revision will be treated as a new submission.

Conflict of interest policy. Authors are required to disclose commercial or similar relationships to products or companies mentioned in or related to the subject matter of the article being submitted. Sources of funding for the article should be acknowledged on the title page. Affiliations of authors should include corporate appointments relating to or in connection with products or companies mentioned in the article, or otherwise bearing on the subject matter thereof. Other pertinent financial relationships, such as consultancies, stock ownership, or other equity interests or patent-licensing arrangements, should be disclosed in the cover letter at the time of submission. Such relationships may be disclosed in the journal at the discretion of the editor-in-chief in footnotes appearing on the title page. Questions about this policy should be directed to the editor-in-chief.

Copyright. Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a "Journal Publishing Agreement" (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Ethics:

When human subjects are used, manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject, with the approval of the appropriate local ethics committee, and in compliance with national legislation and the Code of Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>].

When experimental animals are used, the materials and methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimise pain or discomfort, and that the experiments were conducted in accordance with

international standards on animal welfare as well as being compliant with local and national regulations. Studies are expected to be compliant with minimal standards as defined by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy

Elsevier facilitates author response to the NIH voluntary posting request (referred to as the NIH "Public Access Policy"; see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, 12 months after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding and that you intend to respond to the NIH policy request, along with your NIH award number to facilitate processing. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after formal publication. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly with PubMed Central, and any such posting is prohibited.

Expedited review for Rapid Communications provides authors the opportunity to rapidly publish data they consider particularly novel or valuable to the scientific community. If accepted, the paper will be inserted into the next available issue still in press (usually after approximately 3 months), provided that it is a maximum of 4000 words printed pages and does not require extensive revisions. Authors should note that acceptance criteria for this category are significantly more stringent.

Editorials, Reviews, and Minireviews. Although these are most often by invitation, authors who wish to express their opinion or write reviews about scientific matters of interest to the community can submit such manuscripts to BONE. Editorials and minireviews should be 2000-3000 words printed pages and not require extensive revisions to be acceptable for publication. Sponsored supplements and/or commercial reprints: for more information please contact Elsevier Life Sciences Commercial Sales, Radarweg 29, 1043 NX, Amsterdam, The Netherlands; phone (+31) (20) 4852939/2059; email: LSCS@elsevier.com.

Nomenclature

For *chemical nomenclature*, follow the Subject Index of Chemical Abstracts, capitalize trade names, and give manufacturers' or suppliers' names and addresses. Give the meaning of an abbreviation the first time it appears. Define a nonstandard abbreviation when it first appears in the text. For detailed text entry instructions, see <http://www.elsevier.com/locate/guidepublication>

For manuscripts dealing with *bone histomorphometry*, please use the

nomenclature approved by the American Society for Bone and Mineral Research (Parfitt AM, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry nomenclature, symbols and units: report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Min Res 1987;2:595-610).

For DXA nomenclature and decimal digits. The ISCD Official Position is as follows. DXA Nomenclature u DXA - not DEXA. u T-score - not T score, t-score, or t score u Z-score - not Z score, z-score, or z score DXA Decimal Digits Preferred number of decimal digits for DXA reporting: u BMD: 3 digits (example, 0.927 g/cm²) u T-score: 1 digit (example, -2.3) u Z-score: 1 digit (example, 1.7) u BMC: 2 digits (example, 31.76 g) u Area: 2 digits (example, 43.25 cm²) u % reference database: Integer (example, 82%)

For manuscripts dealing with *osteoclast differentiation and osteoclast function*, please use the Proposed Standard Nomenclature for New Tumor Necrosis Factor Members Involved in the Regulation of Bone Resorption (Report of the ASBMR President's Committee on Nomenclature. Bone 2000;27:761-4).

For manuscripts dealing with *bone markers*, please use the Recommendation for Bone Marker Nomenclature and Abbreviations (position paper, Committee of Scientific Advisors, International Osteoporosis Foundation. Bone 2001;28:575-6).

Preparation of manuscripts

Papers should be *double spaced* with at least 1-inch (2.5 cm) margins. Number all pages consecutively. Type tables, footnotes, and figure legends double spaced on separate pages.

The *title page* should show the paper's title, authors, and the complete names of institutions where work was done. Please include the name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom correspondence and proofs are to be sent.

Each manuscript should include an *abstract* of not more than 350 words, intelligible to the general reader without reference to the text. List 5 *keywords* on a separate sheet for use by indexing and abstract services. Manuscript text should follow standard arrangement: *Introduction, Materials and methods, Results, and Discussion*.

Acknowledgments should be on a separate page at the end of the text.

References should be cited in the text by a number in square brackets and listed at the end of the paper in numerical order. Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. Include full article titles and abbreviate journal titles according to the List of Journals Indexed in Index Medicus. Format references as shown in the examples below.

[1] Brockstedt H, Kassem M, Ericksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Age- and sex-related changes in the iliac cortical bone mass and remodeling. *Bone* 1993;14:681-91.

[2] Coccia PF. Bone marrow transplantation for osteoporosis. In: Forman SJ, Blume KG, Thomas ED, editors. *Bone marrow transplantation*. Boston, MA: Blackwell; 1993; 874, 882.

[3] Lacowicz, J. R. *Principles of fluorescence*. New York: Plenum; 1983, p. 112-53.

Tables. Type each table on a separate page at the end of the manuscript, cite in order in the text, and number consecutively with Arabic numerals. Each table should have a title typed above it. Indicate table footnotes by superscript lowercase letters.

Figures must be self-explanatory, titled, cited in order in the text, and numbered consecutively with Arabic numerals. On separate pages, type figure titles with their (brief) legends. Figures should not be embedded in text. Several figures may be grouped into a plate on one page. Lettering on micrographs should be clearly legible. Letters 2 mm high are recommended. Limit the field of micrographs to structures specifically discussed in the report. Symbols and areas of special interest should not be close to the edges. Give figure magnification in the legends and on the figures (micrometer scale). Symbols (minimum 3 mm height) used on micrographs must be explained in the figure legends. For detailed artwork instructions, see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Color Figures If together with your accepted article, you submit usable color figures, then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> [Please note: Because of technical complications that can arise in converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print), please submit in addition usable black-and-white files corresponding to all the color illustrations.]

Authors should not that a request to revert from full colour to colour only in the electronic publication at the stage of typesetting and proof correction, will require separate editorial agreement, with possible re-review if necessary, and may significantly delay publication of your manuscript.

Color cover photos. Authors are encouraged to include a color image of any subject in relation to their submitted manuscript for use as cover of the issue in which their manuscript will appear. If the image is also used as

illustration within the original manuscript, the costs of the specific plate will be waived.

Supplementary material:

Electronic supplementary material is now accepted to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: ➡ <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our Corporate Website at ➡ <http://www.elsevier.com/authors> .

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author. To avoid delay in publication, only necessary changes may be made, and corrections should be returned promptly.

Offprints:

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF offprint by default, but can choose to receive 50 paper copies instead.

Author enquiries:

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at ➡ <http://www.elsevier.com/locate/bone>. You can track accepted articles at ➡ <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Disclaimer:

Whilst every effort is made by the publishers and editorial board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the publishers, the editorial board and editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability.

ANEXO C: Ilustração da indução do diabetes.



Fig. 01- Indução de anestesia geral por via intramuscular.



Fig. 02- Frasco de Streptozotocina.

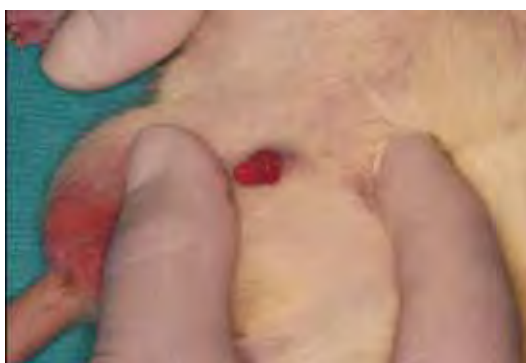


Fig. 03- Exposição do pênis do animal.



Fig. 04- Localização da veia peniana do animal.



Fig. 05- Injeção direta na veia peniana do animal.

ANEXO D: Ilustração da técnica de extração dental em ratos.



Fig. 01 – Instrumental utilizado para realização de exodontia (Okamoto e Russo, 1973).



Fig. 02 – Manobra de luxação



Fig. 03 – Adaptação do instrumental.



Fig. 04 – Exodontia



Fig. 05 – Vidro Bioativo Perioglass®.



Fig. 06- Adaptação do biomaterial dentro do alvéolo.



Fig. 07 – Sutura



Fig. 08 – Alvéolo suturado

ANEXO E: Ilustração da realização da histometria utilizando o software Imagelab 2000 (Diracon 3).

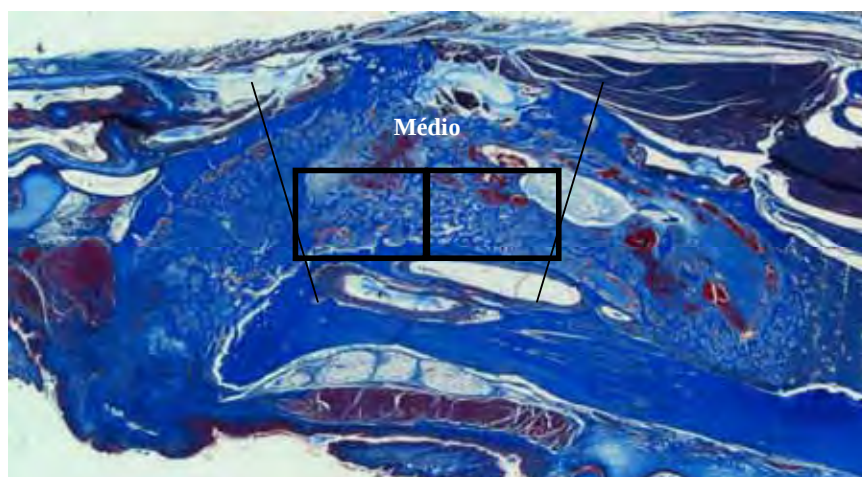


Fig. 01- Alvéolo em toda sua extensão (Tricrômico de Masson). Destaque dos campos localizados no terço médio lingual do alvéolo onde será realizada a histometria.

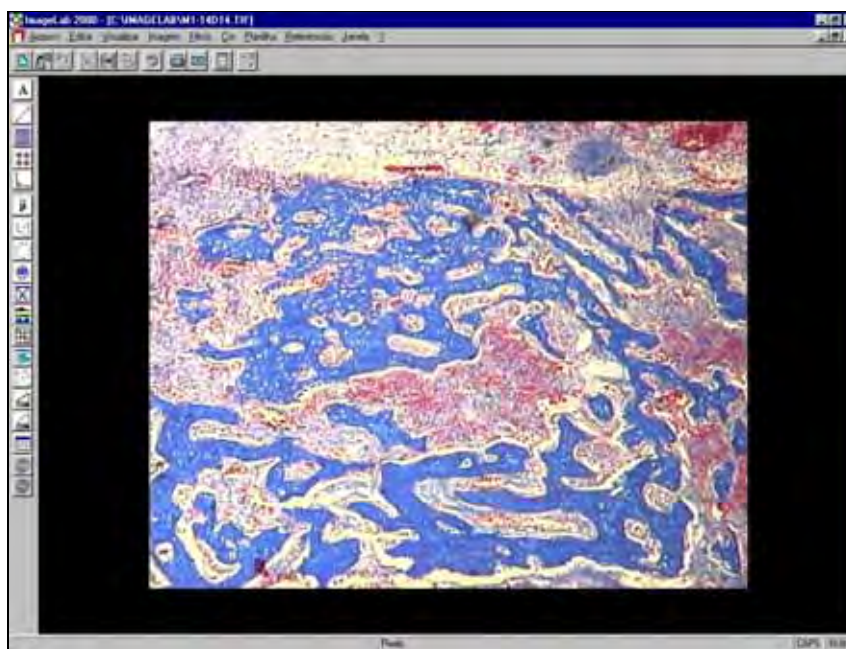


Fig. 02- Imagem capturada em aumento de 10X e transferida para o software Imagelab 2000.

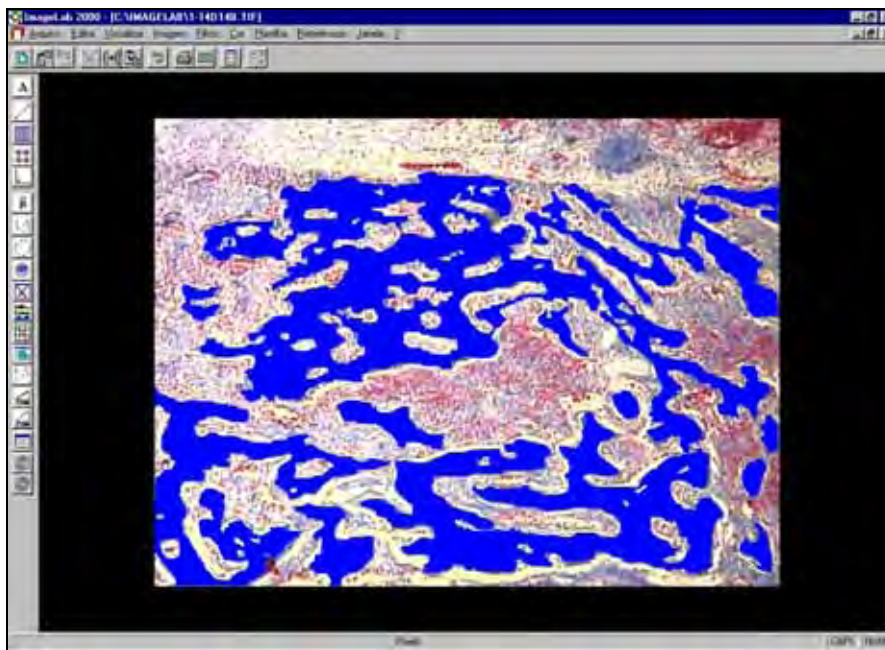


Fig. 03- Região de tecido ósseo selecionado manualmente com utilização do mouse.

Microsoft Excel - M1-14d14										
C37 231,380584716796										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
4	Largura:	Altura:								
5	720	540								
6										
7	Pixel									
8	Unidade:	Largura:	Altura:							
9	px	1,000000	1,000000							
10										
11	Dados Estatísticos									
12		MORFOMETRIA			ABSORÇÃO DE COR			Densidade		
13		Área	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	da estrutura	Diâm. Transv.	DIÂMETROS
14	Número:	15	15	0	15	15	15	15	0	Diâm. Maior
15	Soma:	137244,656	15898,612	0,000	15287871,109	17861782,696	27506079,523	19849,914	0,000	Diâm. Me
16	Média:	9149,644	1059,907	#DIV/0!	1018191,407	1190785,513	1833738,635	132,328	#DIV/0!	
17	Desvio Padrão:	16842,907	1815,478	#DIV/0!	1952916,478	2271090,683	3456063,336	25,570	#DIV/0!	
18	Valor Máximo:	60003,078	6723,523	0,000	7195669,000	8279092,500	12381072,000	166,746	0,000	
19	Valor Mínimo:	1,000	4,000	0,000	62,000	84,000	49,000	65,000	0,000	
20	Significância 5%:	8523,513	918,740	#DIV/0!	988291,928	1149307,006	1748973,670	12,940	#DIV/0!	
21	Significância 1%:	11201,820	1207,432	#DIV/0!	1298838,751	1510448,921	2298546,321	17,006	#DIV/0!	
22										
23										
24	Dados Individuais									
25	Número:	15								
26	Estrutura:	Área	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm. Maior
27	15	1,000	4,000		62,000	84,000	49,000	65,000	0,000	
28	14	983,000	192,024		100784,289	108053,750	148031,141	121,014	47,202	
29	13	3859,616	410,535		393556,313	492195,781	841656,625	149,187	106,217	
30	12	828,500	121,841		83829,320	91571,156	128075,094	122,098	42,000	
31	11	618,616	115,883		56859,719	60643,773	89555,680	111,571	41,000	
32	10	33231,117	3052,761		3278792,750	3976965,750	6446604,000	137,445	416,000	
33	9	2818,000	338,652		335986,469	400320,156	613909,563	159,713	125,300	
34	8	701,500	107,012		72896,773	80494,828	119566,438	129,702	31,000	
35	7	19669,082	2262,841		2220682,250	2692583,000	4328142,500	156,615	282,312	
36	6	1058,500	221,238		123883,859	134807,531	191061,328	141,632	68,476	
37	Soma:	987,118	231,381		135018,972	168284,978	246988,008	136,726	92,000	

Fig. 04- Planilha de cálculos do Imagelab 2000.

ANEXO F: Tabelas contendo os pesos (gramas) e taxas glicêmicas (mg/dl) dos animais dos grupos controle, diabético não controlado e diabético controlado, com suas respectivas médias.

GRUPO CONTROLE

GRUPO 7 DIAS – COÁGULO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G1C1	298	92	G1C1	346	133	G1C1	359	90
G1C2	268	125	G1C2	306	151	G1C2	330	98
G1C3	280	93	G1C3	327	118	G1C3	354	94
G1C4	231	101	G1C4	282	127	G1C4	298	107
G1C5	294	77	G1C5	350	119	G1C5	370	109

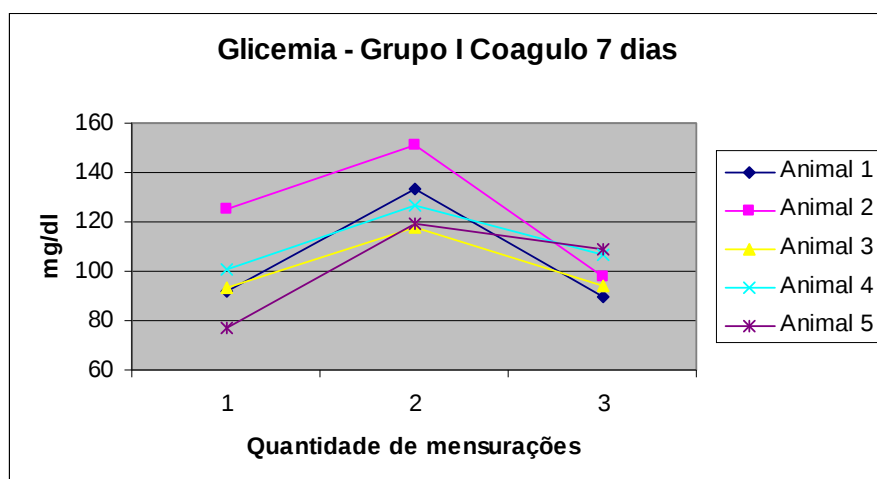
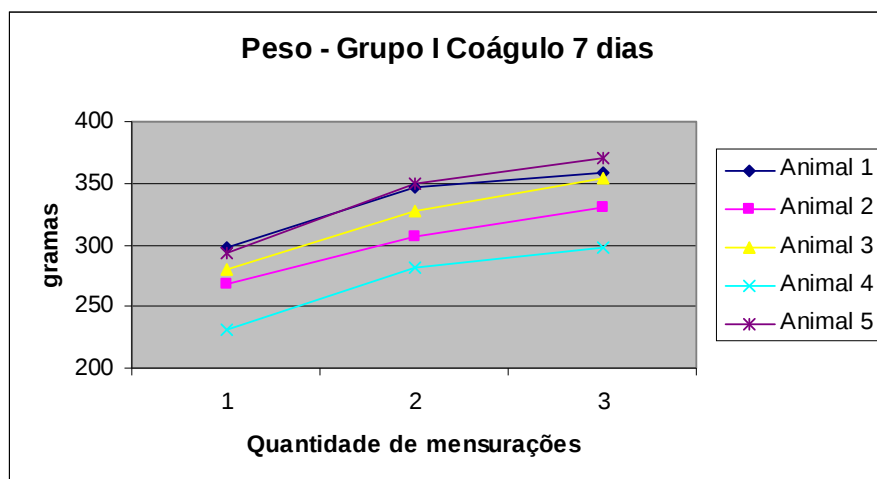
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G1C1	334,3	105
G1C2	301,3	124,6
G1C3	320,3	101,6
G1C4	270,3	111,6
G1C5	338	101,6

Valor Médio = 312,8g 108,7 mg/dl

Grupo I

Coágulo 7 dias



GRUPO CONTROLE

GRUPO 7 DIAS – VIDRO BIOATIVO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G1V1	288	110	G1V1	330	150	G1V1	320	101
G1V2	306	98	G1V2	332	134	G1V2	328	89
G1V3	307	93	G1V3	352	138	G1V3	353	103
G1V4	337	101	G1V4	391	143	G1V4	422	97
G1V5	278	93	G1V5	320	123	G1V5	342	107

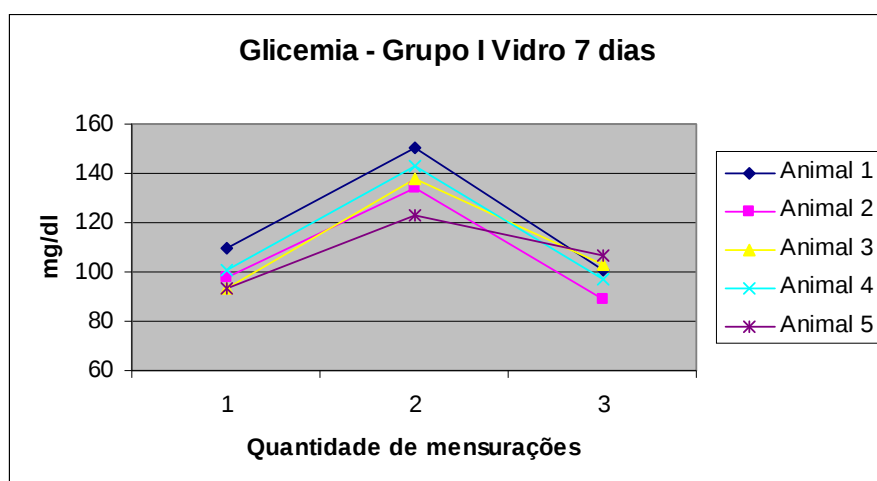
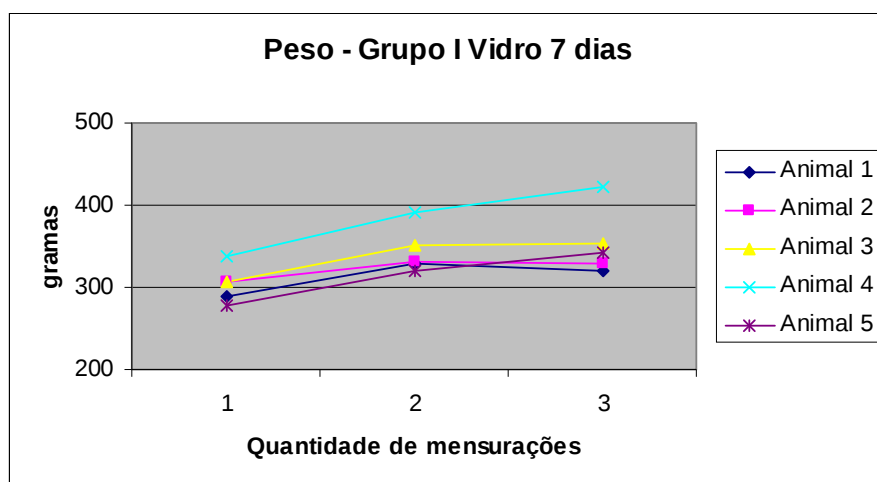
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G1V1	312,6	120,3
G1V2	322	107
G1V3	337,3	111,3
G1V4	383,3	113,6
G1V5	313,3	107,6

Valor Médio = 333,7g 111,9 mg/dl

Grupo I

Vidro 7 dias



GRUPO CONTROLE

GRUPO 14 DIAS – COÁGULO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G1C1	308	112	G1C1	360	133	G1C1	425	106
G1C2	277	72	G1C2	328	95	G1C2	376	105
G1C3	248	70	G1C3	305	114	G1C3	362	106
G1C4	273	72	G1C4	326	112	G1C4	329	100
G1C5	289	83	G1C5	328	110	G1C5	329	91

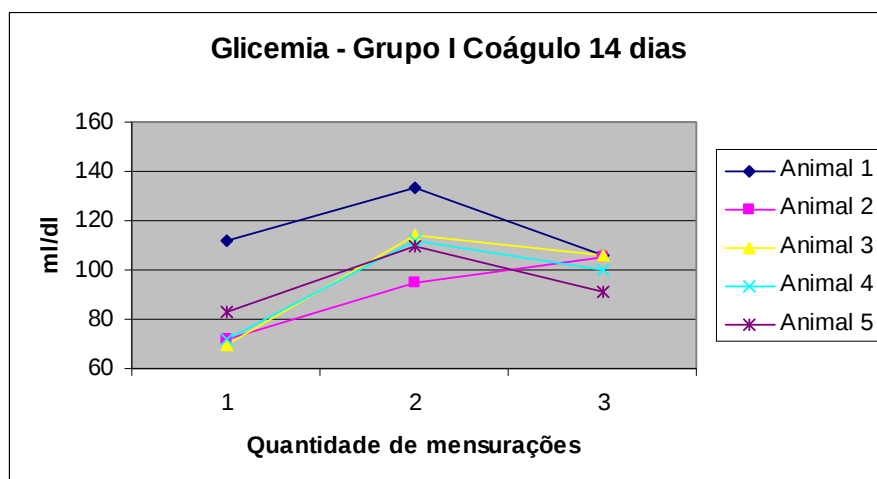
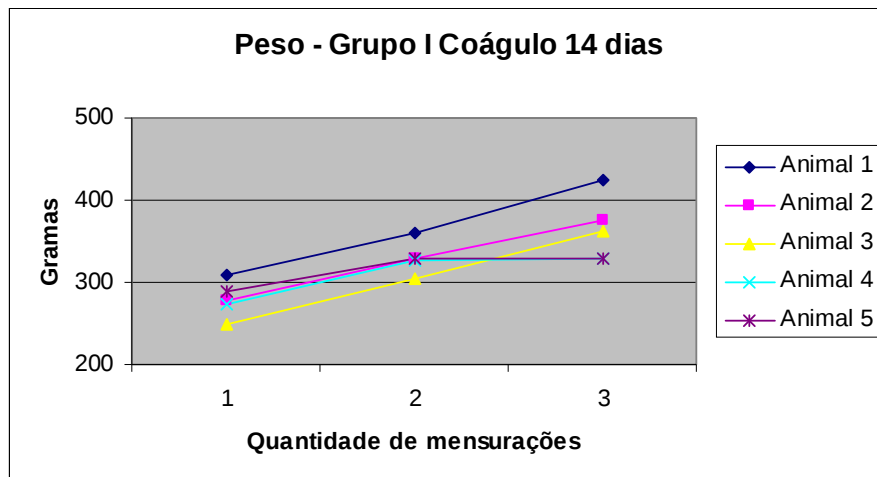
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G1C1	364,3	77
G1C2	327	90,6
G1C3	305	96,3
G1C4	309,3	94,6
G1C5	315,3	94,6

Valor Médio = 324,1g 90,62 mg/dl

Grupo I

Coágulo 14 dias



GRUPO CONTROLE

GRUPO 14 DIAS – VIDRO BIOATIVO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G1V1	280	102	G1V1	344	140	G1V1	332	87
G1V2	325	90	G1V2	394	125	G1V2	280	104
G1V3	238	86	G1V3	294	110	G1V3	380	98
G1V4	279	100	G1V4	320	112	G1V4	384	94
G1V5	329	90	G1V5	376	101	G1V5	415	119

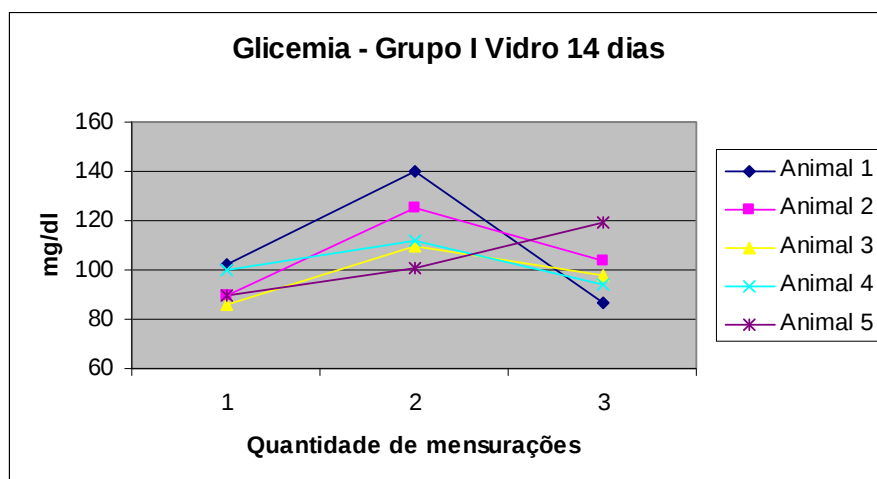
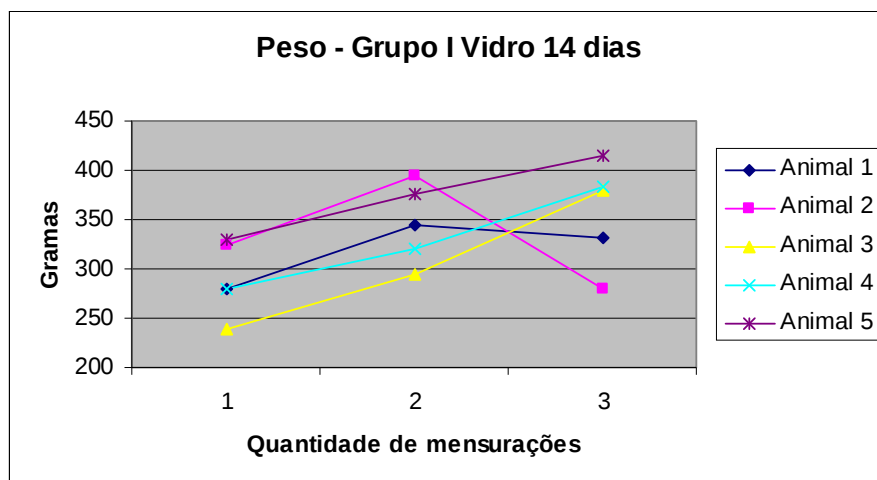
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G1V1	318,6	109,6
G1V2	333	106,3
G1V3	304	98
G1V4	327,6	102
G1V5	373,3	103,3

Valor Médio = 331,3g 103,8 mg/dl

Grupo I

Vidro 14 dias



GRUPO CONTROLE

GRUPO 28 DIAS – COÁGULO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G1C1	258	93	G1C1	306	128	G1C1	376	100
G1C2	315	90	G1C2	370	130	G1C2	452	99
G1C3	316	94	G1C3	374	124	G1C3	424	113
G1C4	336	90	G1C4	389	95	G1C4	433	112
G1C5	340	86	G1C5	396	98	G1C5	438	111

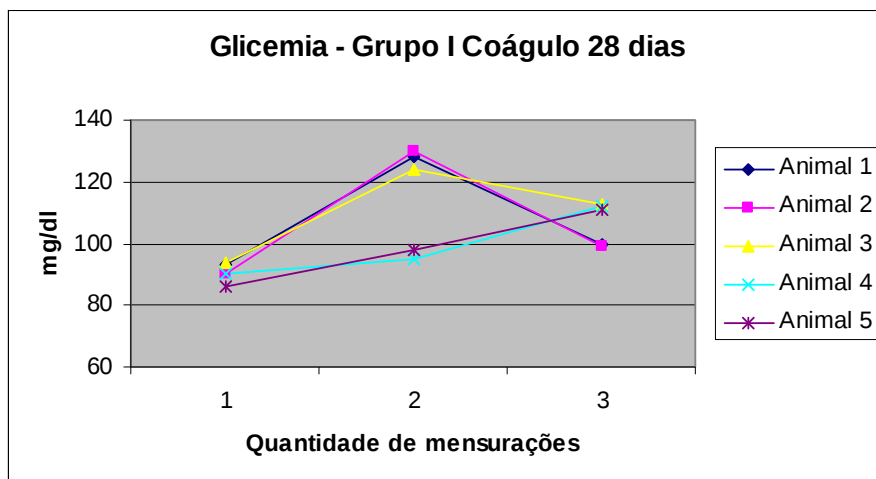
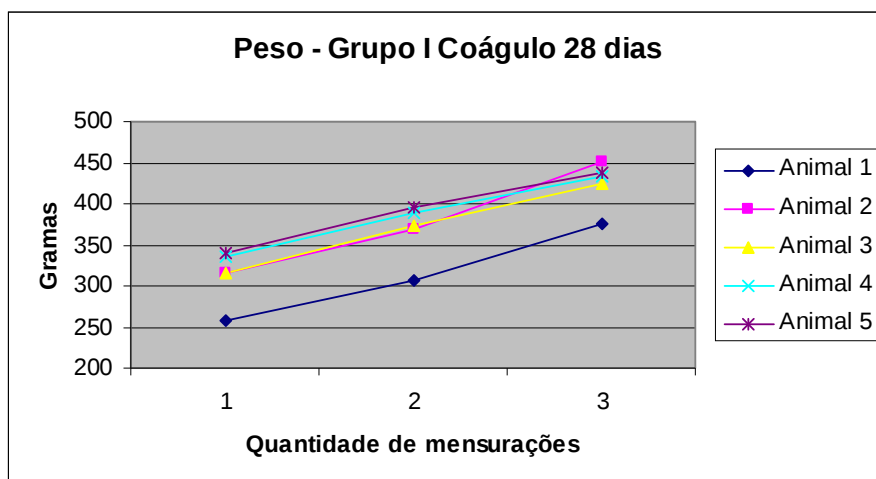
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G1C1	313,3	107
G1C2	379	106,3
G1C3	371,3	110,3
G1C4	386	99
G1C5	391,3	98,3

Valor Médio = 368,1g 104,14 mg/dl

Grupo I

Coágulo 28 dias



GRUPO CONTROLE

GRUPO 28 DIAS – VIDRO BIOATIVO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G1V1	272	80	G1V1	317	106	G1V1	374	101
G1V2	312	96	G1V2	366	105	G1V2	444	97
G1V3	275	115	G1V3	320	94	G1V3	373	98
G1V4	292	97	G1V4	335	131	G1V4	428	111
G1V5	310	87	G1V5	359	144	G1V5	476	93

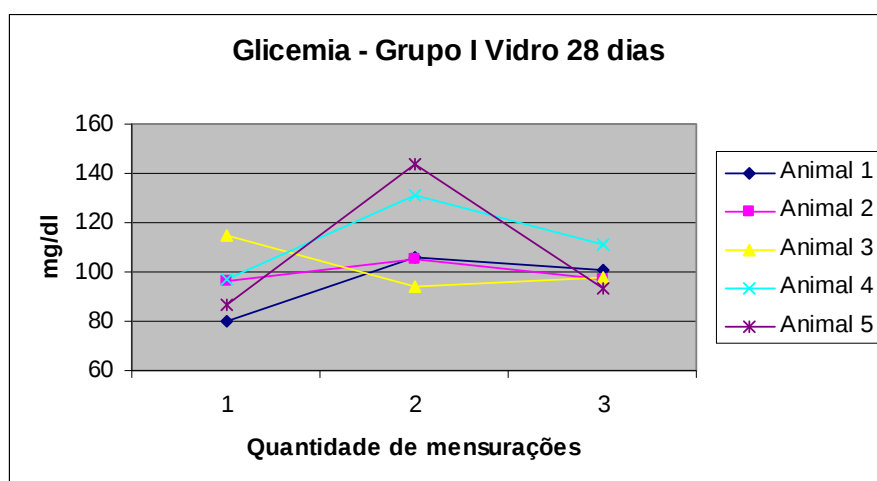
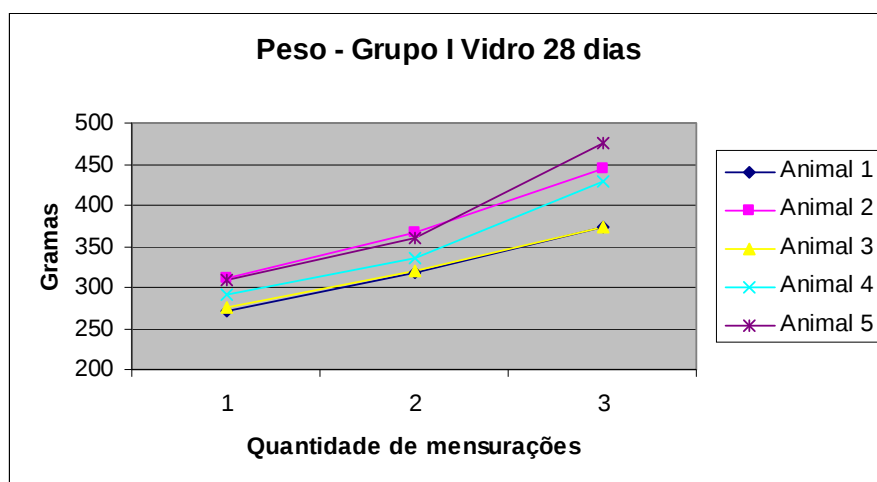
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G1V1	321	95,6
G1V2	374	99,3
G1V3	322,6	102,3
G1V4	351,6	113
G1V5	381,6	108

Valor Médio = 350,1g 103,64 mg/dl

Grupo I

Vidro 28 dias



GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO

GRUPO 7 DIAS – COÁGULO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G2C1	238	442	G2C1	225	380	G2C1	202	500
G2C2	272	500	G2C2	266	500	G2C2	264	500
G2C3	274	428	G2C3	267	398	G2C3	270	500
G2C4	252	473	G2C4	256	500	G2C4	241	500
G2C5	272	444	G2C5	285	405	G2C5	292	467

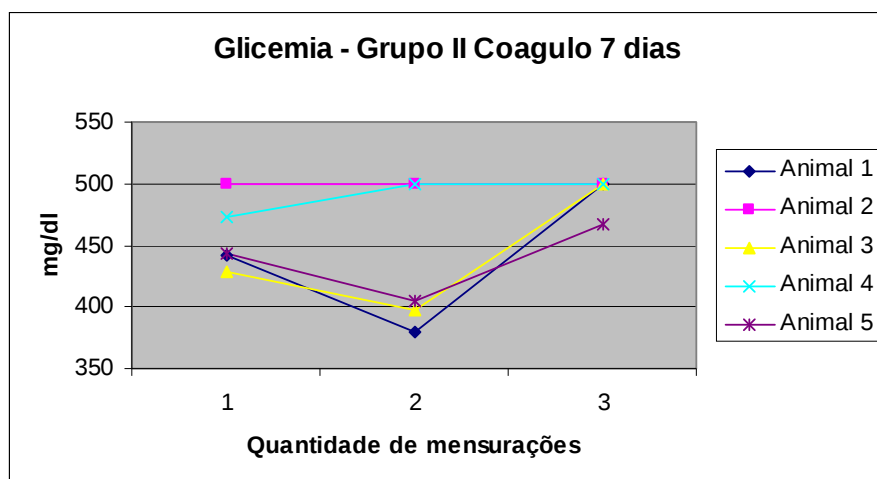
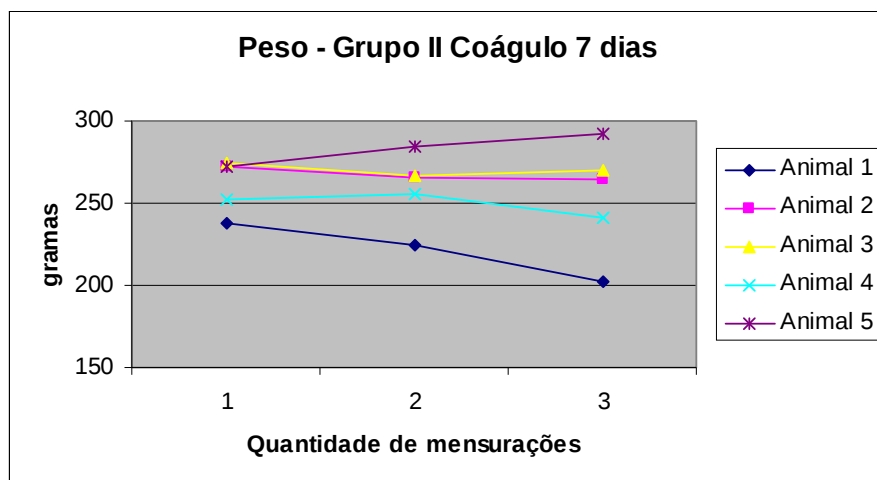
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G2C1	221,6	440,6
G2C2	267,3	500
G2C3	270,3	442
G2C4	249,6	491
G2C5	283	438,6

Valor Médio = 258,36g 462,4 mg/dl

Grupo II

Coágulo 7 dias



GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO

GRUPO 7 DIAS – VIDRO BIOATIVO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G2V1	259	500	G2V1	370	401	G2V1	268	500
G2V2	222	472	G2V2	200	500	G2V2	202	500
G2V3	228	500	G2V3	243	500	G2V3	254	500
G2V4	242	500	G2V4	230	453	G2V4	227	500
G2V5	269	468	G2V5	273	500	G2V5	279	500

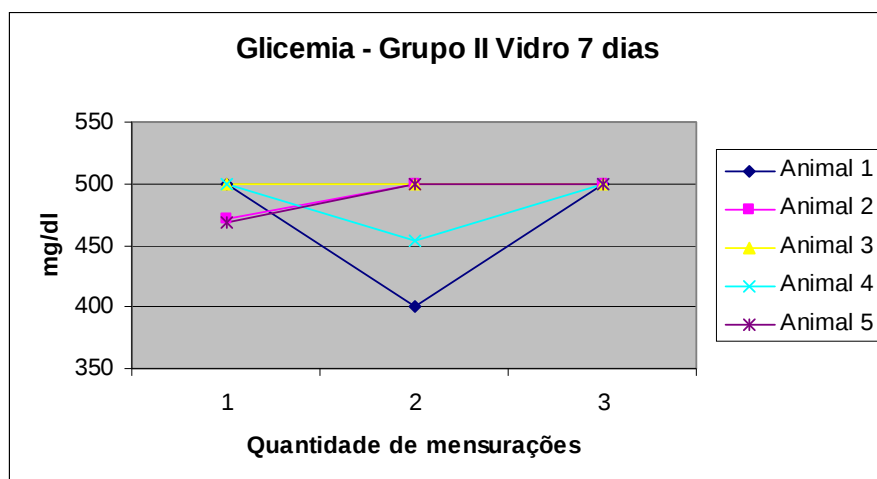
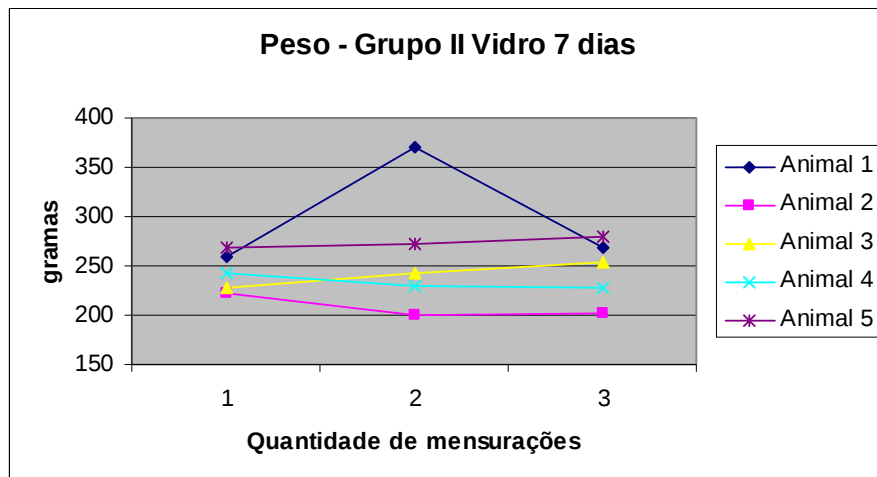
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G2V1	299	467
G2V2	208	490,6
G2V3	241,6	500
G2V4	233	484,3
G2V5	273,6	489,3

Valor Médio = 251g 486,2 mg/dl

Grupo II

Vidro 7 dias



GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO

GRUPO 14 DIAS – COÁGULO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G2C1	240	450	G2C1	258	500	G2C1	276	500
G2C2	242	409	G2C2	238	500	G2C2	236	500
G2C3	263	435	G2C3	264	500	G2C3	256	500
G2C4	261	500	G2C4	269	500	G2C4	263	500
G2C5	238	474	G2C5	237	500	G2C5	250	500

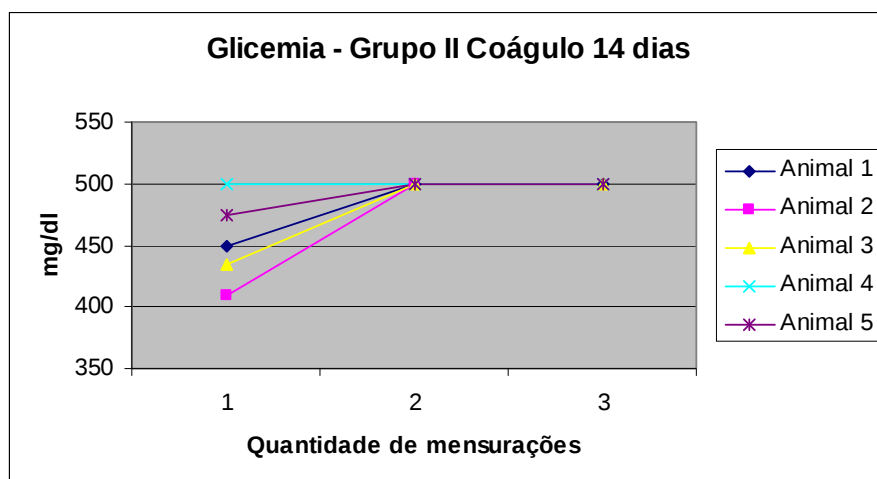
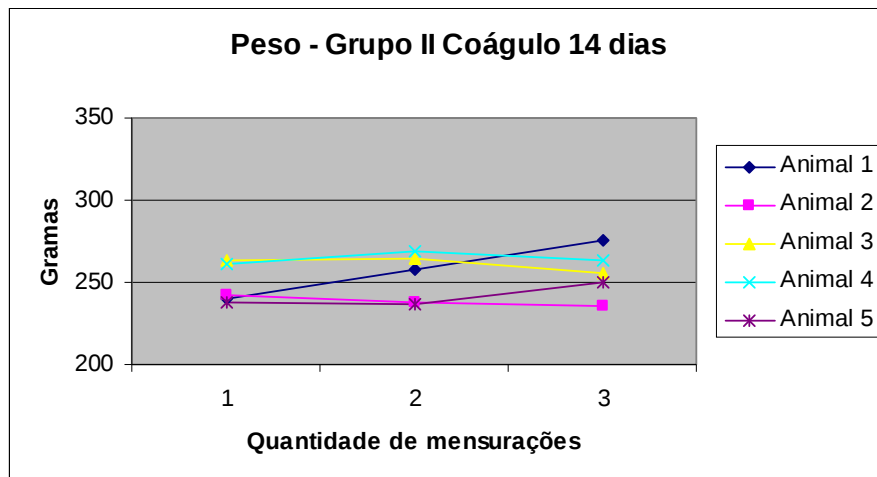
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G2C1	258	483,3
G2C2	238,6	469,6
G2C3	261	478,3
G2C4	264,3	500
G2C5	241,6	491,3

Valor Médio = 252,7g 484,5 mg/dl

Grupo II

Coágulo 14 dias



GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO

GRUPO 14 DIAS – VIDRO BIOATIVO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G2V1	272	455	G2V1	277	500	G2V1	273	500
G2V2	225	500	G2V2	234	500	G2V2	226	500
G2V3	232	377	G2V3	280	500	G2V3	218	500
G2V4	267	472	G2V4	281	500	G2V4	304	500
G2C5	232	500	G2C5	277	500	G2C5	306	500

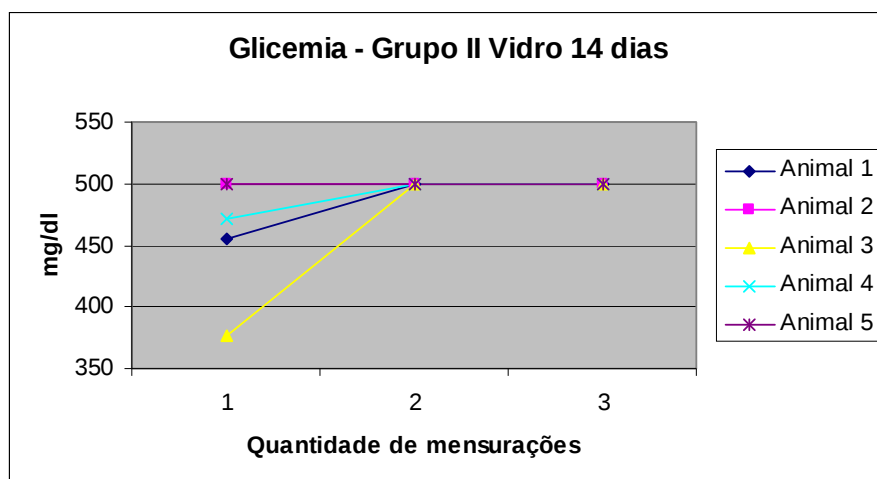
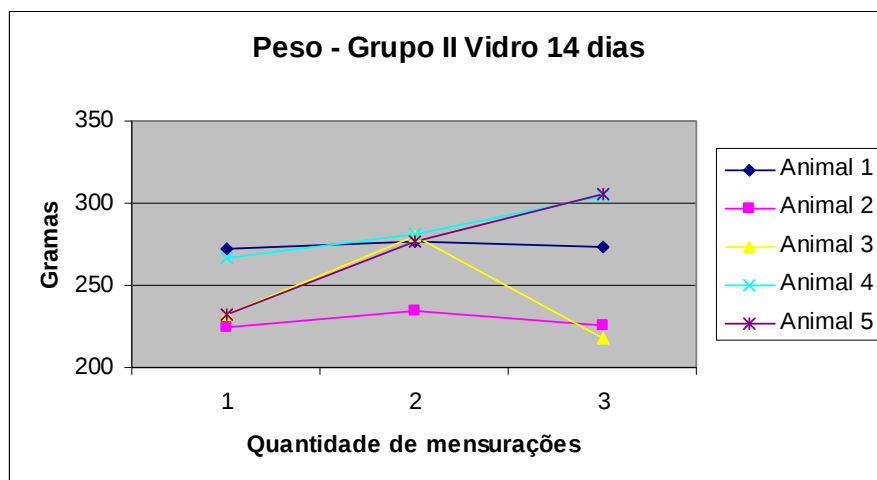
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G2V1	274	485
G2V2	228,3	500
G2V3	243,3	459
G2V4	284	490,6
G2C5	271,6	500

Valor Médio = 260,2g 486,2 mg/dl

Grupo II

Vidro 14 dias



GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO

GRUPO 28 DIAS – COÁGULO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G2C1	246	327	G2C1	268	453	G2C1	321	463
G2C2	250	393	G2C2	262	376	G2C2	308	436
G2C3	262	413	G2C3	281	500	G2C3	318	373
G2C4	241	499	G2C4	242	449	G2C4	284	449
G2C5	248	500	G2C5	253	476	G2C5	251	500

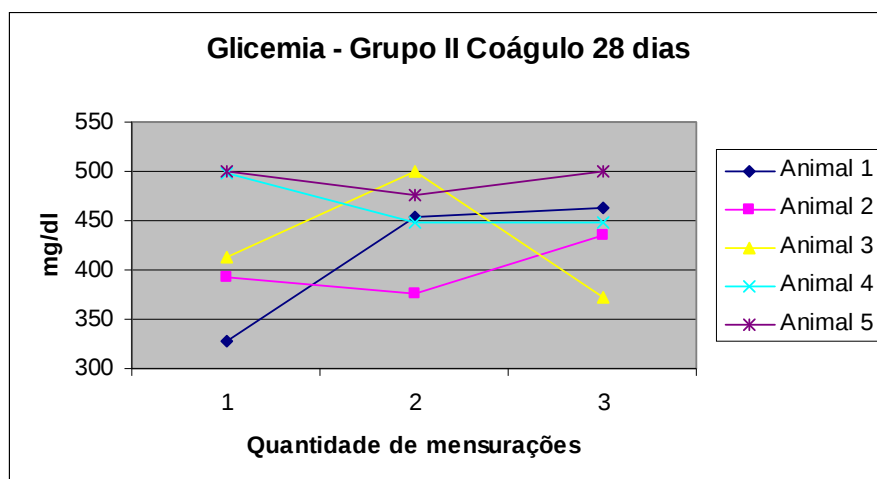
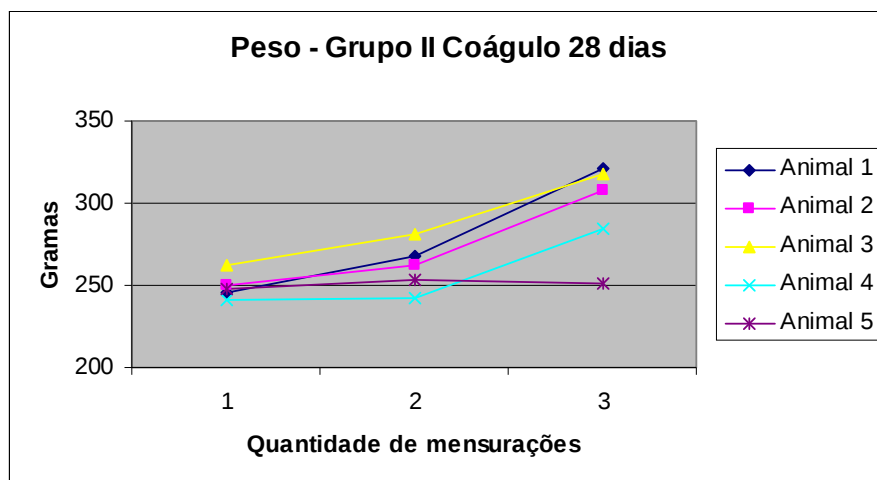
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G2C1	278,3	414,3
G2C2	273,3	401,6
G2C3	287	428,6
G2C4	255,6	465,6
G2C5	250,6	492

Valor Médio = 268,9g 440,42 mg/dl

Grupo II

Coágulo 28 dias



GRUPO DIABÉTICO NÃO CONTROLADO

GRUPO 28 DIAS – VIDRO BIOATIVO

1ª GLICEMIA			2ª GLICEMIA			3ª GLICEMIA		
	PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA		PESO	GLICEMIA
G2V1	265	472	G2V1	273	440	G2V1	270	397
G2V2	280	500	G2V2	279	500	G2V2	318	453
G2V3	272	500	G2V3	265	403	G2V3	312	500
G2V4	219	500	G2V4	213	380	G2V4	235	377
G2V5	227	474	G2V5	200	453	G2V5	205	453

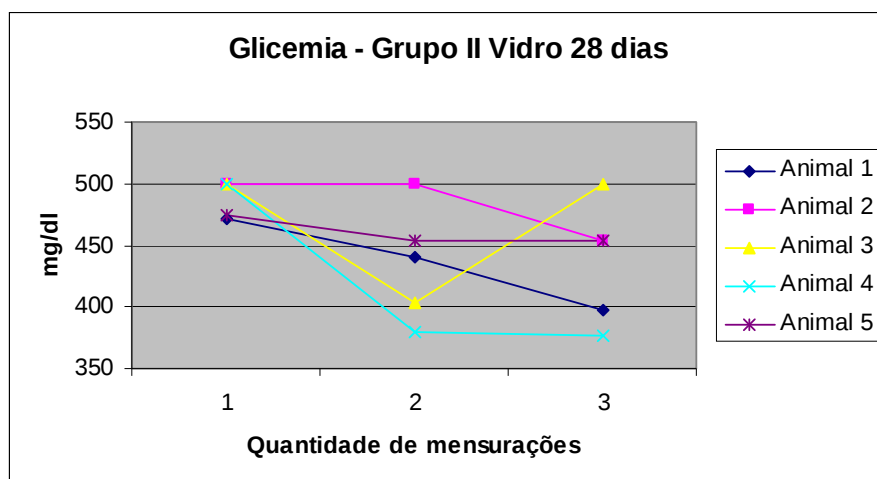
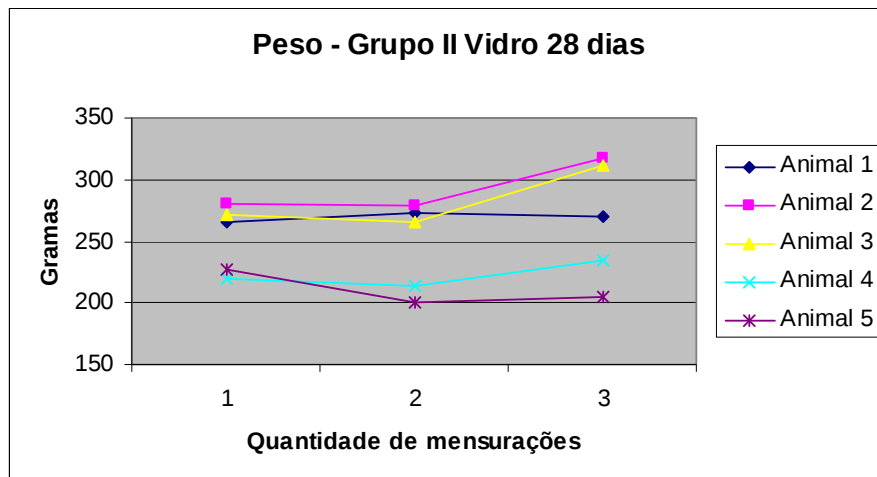
MÉDIAS

	PESO	GLICEMIA
G2V1	269,3	436,3
G2V2	292,3	484,3
G2V3	283	467,6
G2V4	222,3	419
G2V5	210,6	460

Valor Médio = 255,5g 453,4 mg/dl

Grupo II

Vidro 28 dias



GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO

GRUPO 7 DIAS – COÁGULO

G3C1

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	286	499
14/07/08		303
16/07/08		222
18/07/08		185
19/07/08	334	168
21/07/08		280
23/07/08		182
25/07/08		178
27/07/08	348	164

MÉDIA G3C1 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
322,6	174.6

G3C2

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	272	486
14/07/08		286
16/07/08		190
18/07/08		188
19/07/08	318	184
21/07/08		266
23/07/08		165
25/07/08		172
27/07/08	336	173

MÉDIA G3C2 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
308,6	170

G3C3

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	269	472
14/07/08		333
16/07/08		258
18/07/08		199
19/07/08	319	188
21/07/08		200
23/07/08		183
25/07/08		164
27/07/08	337	170

MÉDIA G3C3 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
308,3	172,3

G3C4

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	277	500
14/07/08		396
16/07/08		201
18/07/08		196
19/07/08	321	183
21/07/08		216
23/07/08		170
25/07/08		166
27/07/08	343	171

MÉDIA G3C4 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
313,6	169

G3C5

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	283	500
14/07/08		444
16/07/08		287
18/07/08		202
19/07/08	325	193
21/07/08		209
23/07/08		152
25/07/08		161
27/07/08	339	158

MÉDIA G3C5 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
315,6	157

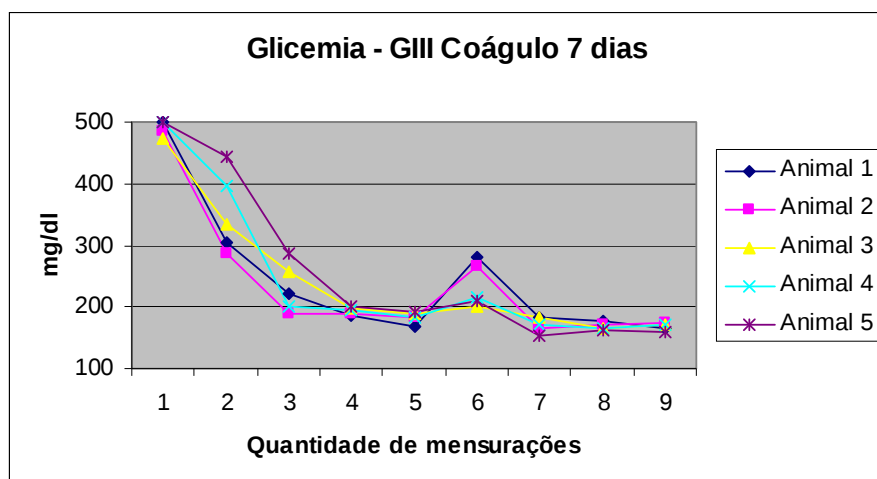
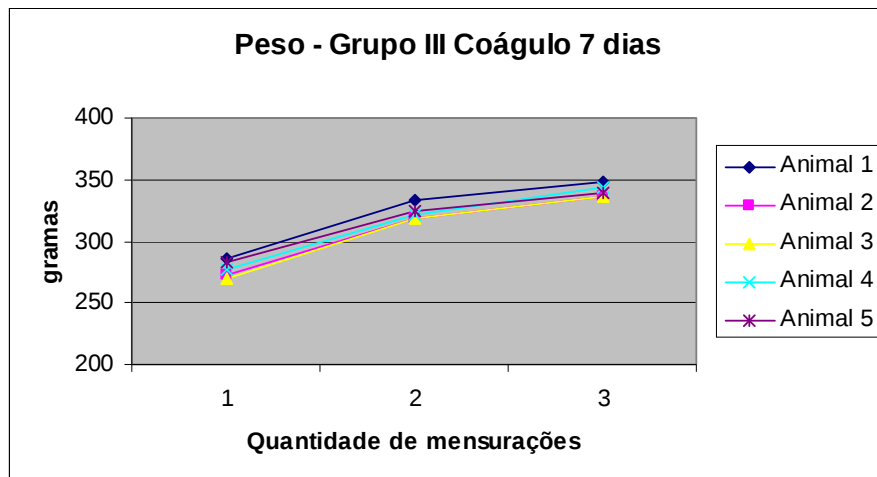
MÉDIAS

	Média do Peso (g)	Média da Glicemia (mg/dl)
G3C1	322,6	174,6
G3C2	308,6	170
G3C3	308,3	172,3
G4C4	313,6	169
G5C5	315,6	157

Valor médio = 313,74g 168,58 mg/dl

Grupo III

Coágulo 7 dias



GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO

GRUPO 7 DIAS – VIDRO BIOATIVO

G3V1

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	262	488
14/07/08		333
16/07/08		265
18/07/08		244
19/07/08	306	181
21/07/08		211
23/07/08		177
25/07/08		185
27/07/08	326	165

MÉDIA G3V1 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
298	175,6

G3V2

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	254	492
14/07/08		444
16/07/08		356
18/07/08		288
19/07/08	301	174
21/07/08		224
23/07/08		156
25/07/08		165
27/07/08	318	152

MÉDIA G3V2 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
291	157,6

G3V3

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	255	500
14/07/08		401
16/07/08		256
18/07/08		174
19/07/08	294	166
21/07/08		253
23/07/08		171
25/07/08		185
27/07/08	309	185

MÉDIA G3V3 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
286	180,3

G3V4

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	283	500
14/07/08		380
16/07/08		199
18/07/08		175
19/07/08	323	181
21/07/08		334
23/07/08		166
25/07/08		168
27/07/08	336	177

MÉDIA G3V4 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
314	170,3

G3V5

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	271	500
14/07/08		331
16/07/08		258
18/07/08		180
19/07/08	298	185
21/07/08		245
23/07/08		156
25/07/08		163
27/07/08	308	169

MÉDIA G3V5 – 7 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
292,3	162,6

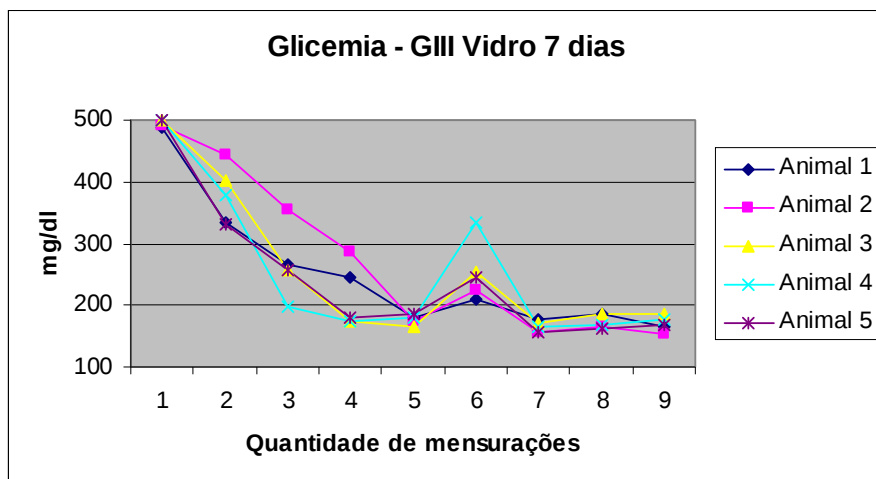
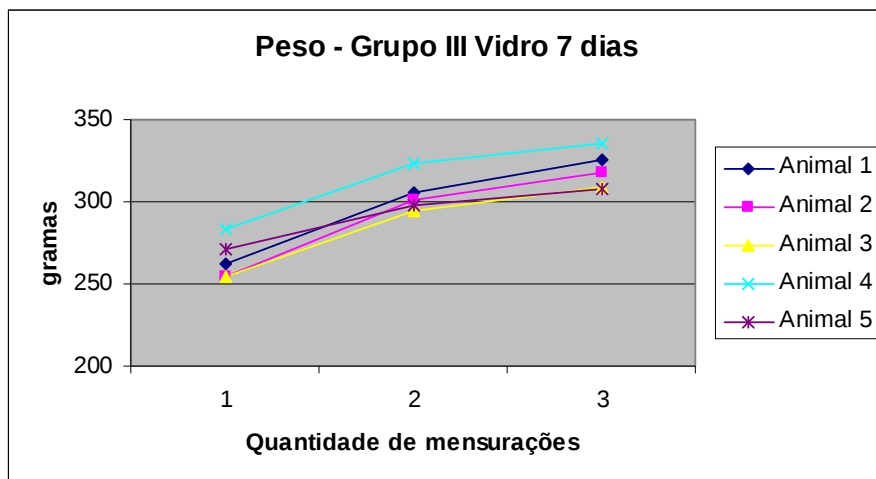
MÉDIAS

	Média do Peso (g)	Média da Glicemia (mg/dl)
G3C1	298	175,6
G3C2	291	157,6
G3C3	286	180,3
G4C4	314	170,3
G5C5	292,3	162,6

Valor médio = 296,26g 169,2 mg/dl

Grupo III

Vidro 7 dias



GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO

GRUPO 14 DIAS – COÁGULO

G3C1

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	286	500
14/07/08		448
16/07/08		206
18/07/08		190
19/07/08	328	186
21/07/08		285
23/07/08		162
25/07/08		168
27/07/08		175
29/07/08		166
31/07/08		142
02/08/08		185
03/08/08	364	177

MÉDIA G3C1 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
326	167,8

G3C2

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	267	462
14/07/08		332
16/07/08		201
18/07/08		199
19/07/08	305	194
21/07/08		301
23/07/08		185
25/07/08		180
27/07/08		184
29/07/08		172
31/07/08		177
02/08/08		180
03/08/08	349	182

MÉDIA G3C2 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
307	180

G3C3

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	255	500
14/07/08		356
16/07/08		225
18/07/08		188
19/07/08	322	174
21/07/08		374
23/07/08		185
25/07/08		182
27/07/08		175
29/07/08		183
31/07/08		164
02/08/08		160
03/08/08	372	171

MÉDIA G3C3 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
316,3	174,2

G3C4

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	264	500
14/07/08		325
16/07/08		196
18/07/08		170
19/07/08	317	174
21/07/08		301
23/07/08		182
25/07/08		180
27/07/08		181
29/07/08		175
31/07/08		179
02/08/08		166
03/08/08	361	160

MÉDIA G3C4 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
314	174,7

G3C5

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	251	474
14/07/08		209
16/07/08		175
18/07/08		179
19/07/08	286	160
21/07/08		275
23/07/08		154
25/07/08		168
27/07/08		169
29/07/08		171
31/07/08		164
02/08/08		169
03/08/08	324	161

MÉDIA G3C5 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
287	165,1

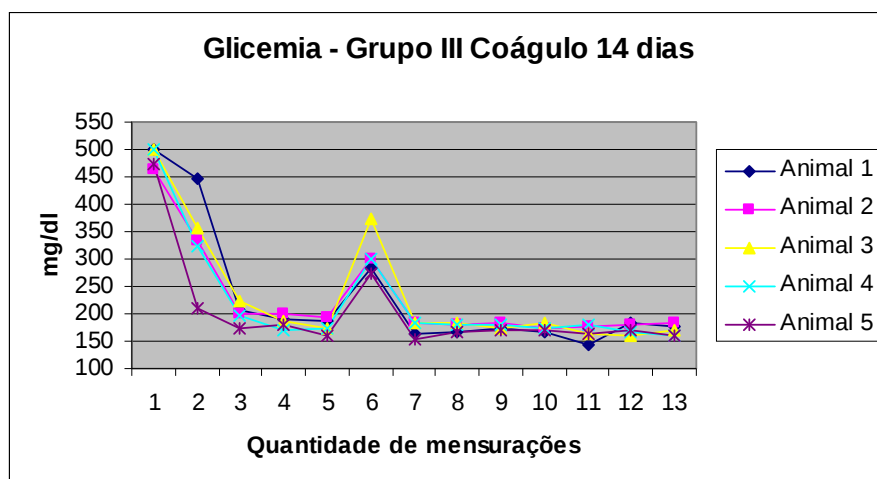
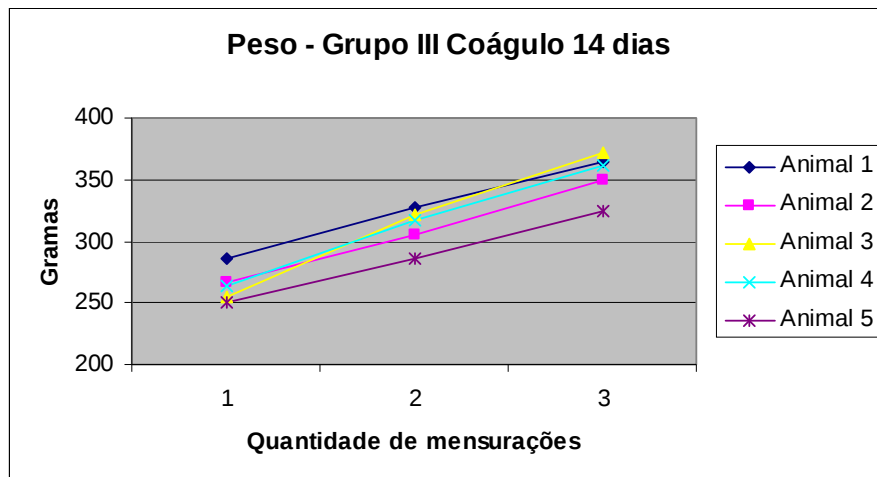
MÉDIAS

	Média do Peso (g)	Média da Glicemia (mg/dl)
G3C1	326	167,8
G3C2	307	180
G3C3	316,3	174,2
G4C4	314	174,7
G5C5	287	165,1

Valor médio = 308,86g 172,3 mg/dl

Grupo III

Coágulo 14 dias



GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO

GRUPO 14 DIAS – VIDRO BIOATIVO

G3V1

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	258	472
14/07/08		205
16/07/08		190
18/07/08		193
19/07/08	293	189
21/07/08		276
23/07/08		175
25/07/08		174
27/07/08		182
29/07/08		189
31/07/08		177
02/08/08		179
03/08/08	335	180

MÉDIA G3V1 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
295,3	179,4

G3V2

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	267	500
14/07/08		425
16/07/08		368
18/07/08		284
19/07/08	305	190
21/07/08		385
23/07/08		186
25/07/08		181
27/07/08		174
29/07/08		180
31/07/08		177
02/08/08		179
03/08/08	349	181

MÉDIA G3V2 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
307	179,7

G3V3

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	269	500
14/07/08		445
16/07/08		336
18/07/08		248
19/07/08	318	188
21/07/08		389
23/07/08		196
25/07/08		188
27/07/08		184
29/07/08		188
31/07/08		189
02/08/08		175
03/08/08	359	178

MÉDIA G3V3 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
315,3	185,4

G3V4

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	271	499
14/07/08		319
16/07/08		279
18/07/08		170
19/07/08	322	174
21/07/08		308
23/07/08		162
25/07/08		168
27/07/08		170
29/07/08		169
31/07/08		145
02/08/08		178
03/08/08	351	170

MÉDIA G3V4 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
314,6	166

G3V5

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	265	500
14/07/08		395
16/07/08		318
18/07/08		185
19/07/08	311	145
21/07/08		298
23/07/08		136
25/07/08		145
27/07/08		168
29/07/08		160
31/07/08		154
02/08/08		168
03/08/08	335	161

MÉDIA G3V5 – 14 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
303,6	156

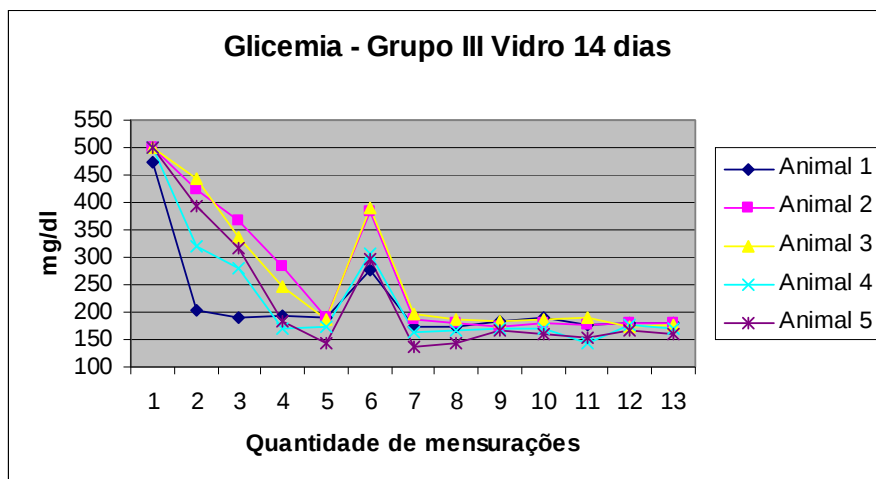
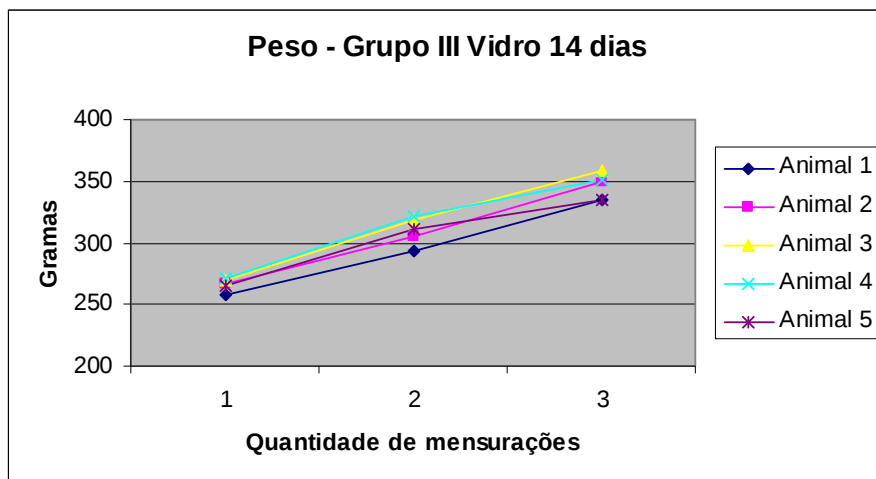
MÉDIAS

	Média do Peso (g)	Média da Glicemia (mg/dl)
G3V1	295,3	179,4
G3V2	307	179,7
G3V3	315,3	185,4
G4V4	314,6	166
G5V5	303,6	156

Valor médio = 307,16g 173,3 mg/dl

Grupo III

Vidro 14 dias



GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO

GRUPO 28 DIAS – COÁGULO

G3C1

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	285	500
14/07/08		446
16/07/08		221
18/07/08		198
19/07/08	323	195
21/07/08		385
23/07/08		182
25/07/08		181
27/07/08		175
29/07/08		182
31/07/08		177
02/08/08		165
04/08/08		183
06/08/08		177
08/08/08		166
10/08/08		174
12/08/08		171
14/08/08		179
16/08/08		183
17/08/08	388	184

MÉDIA G3C1 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
332	177

G3C2

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	282	472
14/07/08		400
16/07/08		288
18/07/08		199
19/07/08	322	165
21/07/08		385
23/07/08		203
25/07/08		185
27/07/08		172
29/07/08		180
31/07/08		183
02/08/08		184
04/08/08		183
06/08/08		183
08/08/08		164
10/08/08		178
12/08/08		154
14/08/08		166
16/08/08		164
17/08/08	406	160

MÉDIA G3C2 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
336,6	175,6

G3C3

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	259	500
14/07/08		412
16/07/08		388
18/07/08		216
19/07/08	295	203
21/07/08		402
23/07/08		211
25/07/08		195
27/07/08		166
29/07/08		169
31/07/08		185
02/08/08		171
04/08/08		170
06/08/08		186
08/08/08		181
10/08/08		154
12/08/08		166
14/08/08		165
16/08/08		172
17/08/08	378	183

MÉDIA G3C3 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
310,6	176,7

G3C4

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	264	500
14/07/08		335
16/07/08		302
18/07/08		211
19/07/08	302	184
21/07/08		401
23/07/08		190
25/07/08		189
27/07/08		175
29/07/08		173
31/07/08		145
02/08/08		154
04/08/08		158
06/08/08		149
08/08/08		156
10/08/08		154
12/08/08		159
14/08/08		157
16/08/08		162
17/08/08	373	159

MÉDIA G3C4 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
313	162,8

G3C5

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	249	500
14/07/08		274
16/07/08		195
18/07/08		161
19/07/08	291	176
21/07/08		319
23/07/08		145
25/07/08		168
27/07/08		160
29/07/08		172
31/07/08		183
02/08/08		186
04/08/08		172
06/08/08		170
08/08/08		165
10/08/08		154
12/08/08		169
14/08/08		166
16/08/08		158
17/08/08	362	150

MÉDIA G3C5 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
300,6	165,5

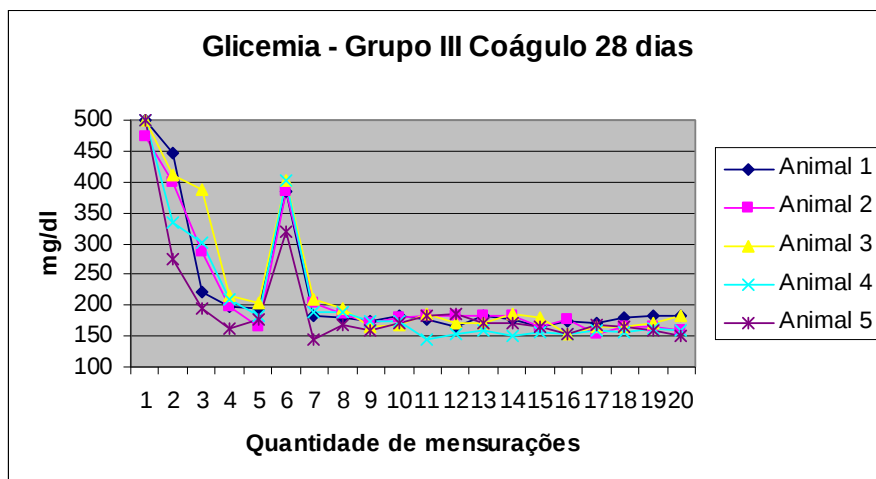
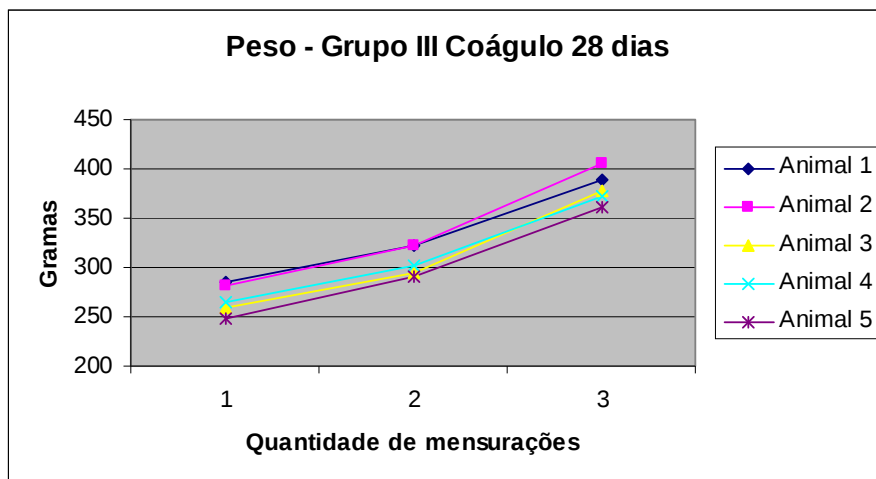
MÉDIAS

	Média do Peso (g)	Média da Glicemia (mg/dl)
G3C1	332	177
G3C2	336,6	175,6
G3C3	310,6	176,7
G4C4	313	162,8
G5C5	300,6	165,5

Valor médio = 318,56 171,52 mg/dl

Grupo III

Coágulo 28 dias



GRUPO DIABÉTICO CONTROLADO

GRUPO 28 DIAS – VIDRO BIOATIVO

G3V1

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	263	500
14/07/08		212
16/07/08		165
18/07/08		178
19/07/08	306	149
21/07/08		345
23/07/08		123
25/07/08		145
27/07/08		149
29/07/08		150
31/07/08		156
02/08/08		159
04/08/08		151
06/08/08		148
08/08/08		156
10/08/08		159
12/08/08		152
14/08/08		150
16/08/08		168
17/08/08	381	169

MÉDIA G3V1 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
316,6	152,5

G3V2

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	283	500
14/07/08		412
16/07/08		366
18/07/08		214
19/07/08	314	164
21/07/08		331
23/07/08		185
25/07/08		189
27/07/08		195
29/07/08		174
31/07/08		173
02/08/08		170
04/08/08		185
06/08/08		165
08/08/08		166
10/08/08		178
12/08/08		193
14/08/08		184
16/08/08		182
17/08/08	374	171

MÉDIA G3V2 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
323,6	179,2

G3V3

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	263	448
14/07/08		259
16/07/08		165
18/07/08		121
19/07/08	297	123
21/07/08		351
23/07/08		166
25/07/08		164
27/07/08		148
29/07/08		132
31/07/08		165
02/08/08		172
04/08/08		179
06/08/08		182
08/08/08		141
10/08/08		149
12/08/08		150
14/08/08		132
16/08/08		166
17/08/08	368	168

MÉDIA G3V3 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
309,3	158,1

G3V4

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	278	500
14/07/08		412
16/07/08		339
18/07/08		236
19/07/08	302	189
21/07/08		381
23/07/08		195
25/07/08		190
27/07/08		200
29/07/08		164
31/07/08		184
02/08/08		186
04/08/08		192
06/08/08		154
08/08/08		145
10/08/08		140
12/08/08		168
14/08/08		170
16/08/08		161
17/08/08	364	166

MÉDIA G3V4 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
314,6	172,5

G3V5

Data	Peso	Glicemia
12/07/08	252	500
14/07/08		307
16/07/08		281
18/07/08		164
19/07/08	281	120
21/07/08		274
23/07/08		125
25/07/08		145
27/07/08		148
29/07/08		40
31/07/08		168
02/08/08		142
04/08/08		141
06/08/08		149
08/08/08		163
10/08/08		168
12/08/08		154
14/08/08		151
16/08/08		150
17/08/08	369	157

MÉDIA G3V5 – 28 DIAS	
Peso (g)	Glicemia (mg/dl)
300,6	150

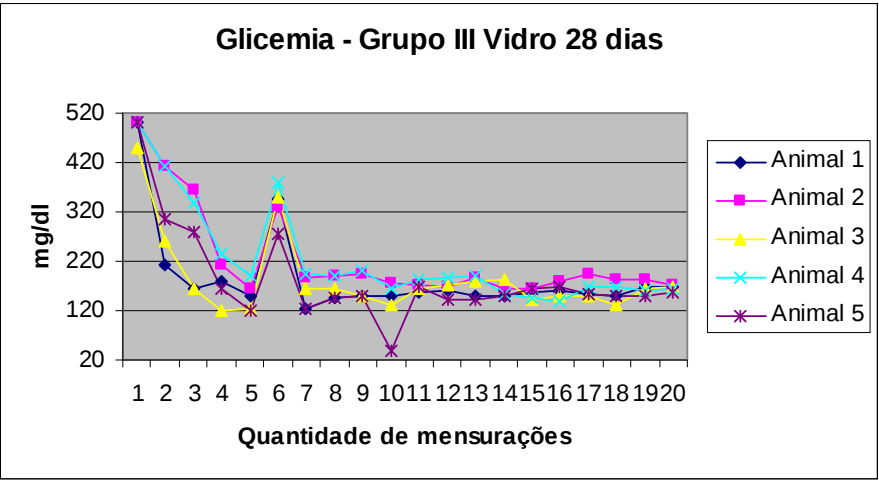
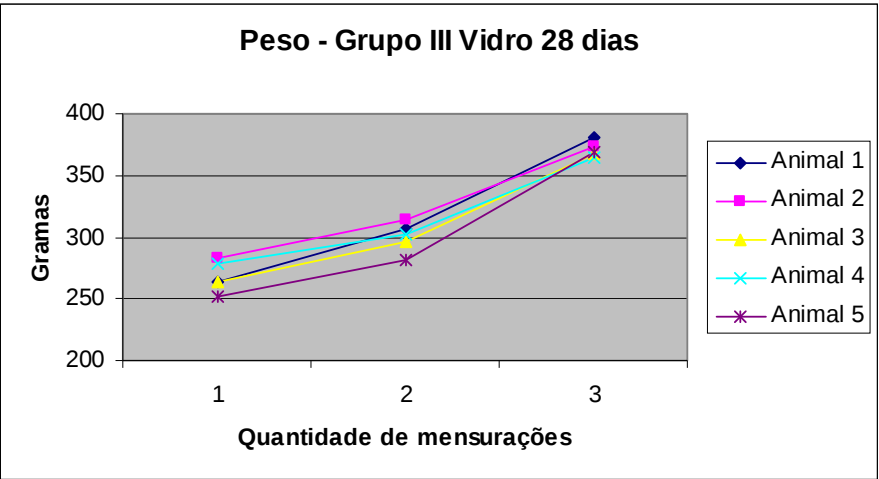
MÉDIAS

	Média do Peso (g)	Média da Glicemia (mg/dl)
G3C1	316,6	152,5
G3C2	323,6	179,2
G3C3	309,3	158,1
G4C4	314,6	172,5
G5C5	300,6	150

Valor médio = 312,94g 162,46 mg/dl

Grupo III

Vidro 28 dias



ANEXO G: Tabelas contendo os dados da análise qualitativa e semi quantitativa realizadas nas lâminas reagidas para imunohistoquímica.

GRUPO I - COÁGULO

	7 dias	14 dias	28 dias
RANK	Moderada (cél. semelhantes a osteoblastos).	Moderada a intensa (cél. semelhantes a osteoblastos).	Discreta (células semelhantes a osteoblastos e osteócitos)
RANKL	Moderada (osteoblastos e osteócitos).	Intensa (osteoblastos, osteócitos e fibroblastos).	Intensa (osteócitos).
OPG	Discreta (fibroblastos).	Discreta (fibroblastos).	Discreta (osteócitos).
Osteocalcina	Discreta (células e trabéculas ósseas).	Discreta (trabéculas ósseas neoformadas).	Moderada (trabéculas ósseas neoformadas).
TRAP	Moderada (osteoclastos).	Intensa (osteoclastos).	Moderada (osteoclastos).

GRUPO II - COÁGULO

	7 dias	14 dias	28 dias
RANK	Discreta (células semelhantes a osteoblastos).	Intensa (células semelhantes a osteoblastos).	Intensa (células semelhantes a osteoblastos e osteócitos)
RANKL	Discreta (células do tecido conjuntivo).	Moderada (células do tecido conjuntivo e osteócitos).	Intensa (osteoblastos e osteócitos e células do tecido conjuntivo).
OPG	Moderada (células do tecido conjuntivo).	Discreta a moderada (células do tecido conjuntivo e osteoblastos).	Moderada (osteoblastos e osteócitos).
Osteocalcina	Discreta (matriz extracelular).	Discreta (tecido conjuntivo). Ausente (trabéculas neoformadas).	Discreta (trabéculas ósseas neoformadas).
TRAP	Discreta (osteoclastos).	Discreta (osteoclastos).	Discreta (osteoclastos).

GRUPO III- COÁGULO

	7 dias	14 dias	28 dias
RANK	Moderada (células semelhantes a osteoblastos e tecido conjuntivo).	Ausente.	Ausente a Discreta (células semelhantes a osteoblastos e células do tecido conjuntivo).
RANKL	Intensa (tecido conjuntivo e osteoblastos).	Intensa (osteoblastos e osteócitos).	Moderada (osteócitos).
OPG	Intensa (osteoblastos e células do tecido conjuntivo).	Intensa (osteoblastos e osteócitos).	Intensa (osteoblastos e osteócitos).
Osteocalcina	Discreta (tecido conjuntivo).	Moderada a Intensa (trabéculas neoformadas e matriz extracelular no tecido conjuntivo).	Moderada (trabéculas neoformadas e matriz extracelular no tecido conjuntivo).
TRAP	Discreta (osteoclastos).	Moderada (osteoclastos).	Moderada (osteoclastos).

GRUPO I – VIDRO BIOATIVO

	7 dias	14 dias	28 dias
RANK	Discreta a Moderada (tecido conjuntivo).	Moderada (células do tecido conjuntivo).	Moderada (osteócitos).
RANKL	Moderada (osteócitos no osso pré-existente e em células do tecido conjuntivo).	Moderada (osteoblastos, osteócitos e células do tecido conjuntivo).	Moderada a Intensa (osteoblastos, osteócitos e células do tecido conjuntivo).
OPG	Discreta (células do tecido conjuntivo).	Ausente.	Ausente.
Osteocalcina	Discreta (trabeculado ósseo em formação).	Ausente (trabéculas neoformadas).	Ausente a discreta (trabéculas neoformadas).
TRAP	Discreta (osteoclastos).	Discreta (osteoclastos)	Intensa (junto ao biomaterial e nas trabéculas ósseas).

GRUPO II – VIDRO BIOATIVO

	7 dias	14 dias	28 dias
RANK	Discreta a Moderada (cél. semelhantes a osteoblastos, osteócitos e células do tecido conjuntivo).	Moderada a intensa (cél. semelhantes a osteoblastos e células do tecido conjuntivo)	Intensa (células semelhantes a osteoblastos e osteócitos).
RANKL	Intensa (células do tecido conjuntivo).	Intensa (osteoblastos e osteócitos).	Intensa (osteoblastos e células do tecido conjuntivo).
OPG	Moderada (osteoblastos e células do tecido conjuntivo).	Intensa (osteoblastos e células do tecido conjuntivo).	Intensa (tecido conjuntivo, osteoblastos e osteócitos).
Osteocalcina	Discreta (trabéculas ósseas neoformadas).	Moderada (matriz extracelular no tecido conjuntivo) e Ausente (nas trabéculas neoformadas).	Ausente (trabéculas ósseas neoformadas); Moderada (osteoblastos) e Discreta (matriz extracelular do tecido conjuntivo).
TRAP	Discreta (osteoclastos).	Moderada (osteoclastos).	Moderada (osteoclastos).

GRUPO III – VIDRO BIOATIVO

	7 dias	14 dias	28 dias
RANK	Moderada (células semelhantes a osteoblastos).	Discreta (células semelhantes a osteoblastos).	Discreta (células semelhantes a osteoblastos).
RANKL	Discreta (células do tecido conjuntivo).	Intensa (células do tecido conjuntivo).	Moderada a Intensa (osteócitos).
OPG	Discreta (células do tecido conjuntivo, osteoblastos e osteócitos).	Moderada (células do tecido conjuntivo, osteoblastos e osteócitos).	Discreta a Moderada (células do tecido conjuntivo).
Osteocalcina	Discreta (algumas trabéculas ósseas neoformadas).	Discreta (trabéculas ósseas neoformadas) e Moderada (matriz extracelular no tecido conjuntivo).	Moderada (trabéculas ósseas neoformadas). Intensa (matriz extracelular no tecido conjuntivo).
TRAP	Moderada (osteoclastos).	Moderada (osteoclastos).	Moderada a intensa (osteoclastos).