

Carlos Alberto Timóteo

**Análise histológica e histomorfométrica do processo de reparo de
defeitos ósseos em ratos diabéticos preenchidos com osso autógeno e
recobertos por membrana de matriz óssea homogênea ou por
membrana de politetrafluoretileno**

Araçatuba – São Paulo

2014

Carlos Alberto Timóteo

**Análise histológica e histomorfométrica do processo de reparo de
defeitos ósseos em ratos diabéticos preenchidos com osso autógeno e
recobertos por membrana de matriz óssea homogênea ou por
membrana de politetrafluoretileno**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para
obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA
(Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia
Bucocomaxilofacial).

Orientador: Prof. Dr. Elio Hitoshi Shinohara

Coorientadora: Prof. Dra. Alessandra
Marcondes Aranega

Araçatuba – São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

T585a

Timóteo, Carlos Alberto.

Análise histológica e histomorfométrica do processo de reparo de defeitos ósseos em ratos diabéticos preenchidos com osso autógeno e recobertos por membrana de matriz óssea homogênea ou por membrana de politetrafluoretileno / Carlos Alberto Timóteo. - - Araçatuba, 2014
67 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Elio Hitoshi Shinohara
Coorientadora: Profa. Alessandra Marcondes Aranega

1. Diabetes mellitus 2. Transplante ósseo 3. Cicatrização
4. Transplante homólogo 5. Transplante autólogo 6. Regeneração tecidual guiada I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Primeiramente à Deus, por estar sempre ao meu lado! A minha fé conduz o meu caminho..

Aos meus pais, Domingos e Domingas “in memoriam”, pelo amor, compreensão e dedicação, vocês foram os responsáveis pela minha formação como ser humano. Não tenho dúvidas que sempre acreditaram em mim!

Eu amo vocês!

Á minha filha Camilla, amor incondicional, que sempre soube aceitar e entender a minha ausência sempre que necessária.....

Agradecimentos especiais

À minha coorientadora, **Professora Doutora Alessandra Marcondes Aranega**, pela grande amizade, carinho, compreensão e ajuda incansável. Exemplo de determinação, competência, dedicação e amor à pesquisa. Sua disposição para o ensino contribuiu marcadamente para a realização desse trabalho. Muito obrigado pela paciência e confiança em mim depositada. Você é muito especial! Essa vitória é nossa.

Ao meu orientador, **Professor Doutor Elio Hitoshi Shinohara**, pelos ensinamentos e principalmente pela amizade, confiança e pela oportunidade de convivência. Muito obrigado!

Ao Professor e amigo **Doutor Idelmo Rangel Garcia Júnior**, um exemplo de equilíbrio e humildade. **Aos professores Osvaldo Magro Filho, Francisley A´vila Souza**. A vocês três agradeço por ter me acolhido, pela confiança em mim depositada e pela contribuição profissional e pessoal. Muito obrigado pela oportunidade de convivência.

À **Professora Doutora Daniela Atili Brandini** pela contribuição e ensinamentos. O que aprendi com você favoreceu muito a conclusão desse estudo. Muito obrigado!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial pela oportunidade de aprendizado.

Aos professores do Departamento de Cirurgia: Professoras Ana Paula e Daniela e ao professor e amigo Francisley, muito obrigado a todos pela oportunidade de convivência e ensinamentos.

Ao professor Celso K. Sonoda, um exemplo de como ser professor, muito obrigado por sempre estar disponível e pronto a ajudar. Muito obrigado pela oportunidade de convívio.

Aos alunos da graduação Luan, Bruno e Tarik, muito obrigado pela ajuda e paciência para com este trabalho e com a minha pessoa.

A todos os colegas da pós-graduação, mestrandos e doutorandos com os quais pude conviver nesse período, vocês foram todos especiais, sem nenhuma exceção. Agradeço muito a vocês e de modo todo especial a mestranda Juliana, incansável durante todo trabalho experimental.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Cleide, Dirce, Gilmar, Bernadete, Antônia, Paulão e Tininha, pela colaboração, carinho e indispensável auxílio durante a realização deste estudo.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp: Valéria e Lilian que sempre me auxiliaram com boa vontade.

As minhas funcionárias Francione e Mariani impossível me ausentar sem o suporte de vocês.

Epígrafe

Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos...

Seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.

Por isso, meu ardente desejo é que você nunca desista de seus sonhos.

Augusto Cury

Lista de figuras

- Figura 1 - ICSM10 - Cavidade preenchida por enxertos sem membrana aos 10 dias – Sem diabetes. H.E. Original 40X. 59
- Figura 2 - ICMH10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 10 dias – Sem diabetes. H.E. Original 40X. 59
- Figura 3 - ICMX10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 10 Dias – sem diabetes. H.E. Original 40X. 60
- Figura 4 - ICSM60 Cavidade preenchida por enxerto e sem recobrimento por membrana aos 60 Dias – Sem diabetes. H.E. Original 40X. 60
- Figura 5 - ICMH60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 60 Dias – Sem diabetes. H.E. Original 40X. 61
- Figura 6 - ICMX60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 60Dias – Sem diabetes. H.E. Original 40X. 61
- Figura 7 - IIDSM10 Cavidade preenchida por enxertos sem membrana aos 10 dias – Com diabetes. H.E. Original 12,5X. 62
- Figura 8 - IIDMH10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 10 dias – Com diabetes. H.E. Original 12,5X 62
- Figura 9 - IIDMX10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 10 Dias – Com diabetes. H.E. Original 12,5X. 63
- Figura 10 - IIDSM60 Cavidade preenchida por enxerto e sem recobrimento por membrana aos 60 Dias – Com diabetes. H.E. Original 12,5X. 63

Figura 11 - IIDMH60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 60 Dias – Com diabetes. H.E. Original 12,5X. 64

Figura 12 - IIDMX60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 60 Dias – Com diabetes. H.E. Original 12,5X. 64

Lista de tabelas

Tabela 1. Grupos diabético e não-diabético sem membrana (SM), com membrana homogênea (MH) e com membrana sintética (MX) nos experimentos aos 10 dias – médias das amostras 75

Tabela 2. Grupos diabético e não-diabético sem membrana (SM), com membrana homogênea (MH) e com membrana sintética (MX) nos experimentos aos 60 dias – médias das amostras 75

Tabela 3. Comparação entre os grupos diabético e não-diabético nos experimentos aos 10 e 60 dias sem membrana (SM), com membrana homogênea (MH) e com membrana sintética (MX). 76

Lista de abreviaturas

STZ	Estreptozotocina
%	Porcentagem
g	Gramma
M	mol
pH	Potencial de hidrogênio iônico
mg	Miligramma
dl	Decilitro
ml	Mililitro
n°	Número
mm	Milímetros
UI	Unidade Internacional
HE	Hematoxilina e eosina
AT	Área total do defeito
AO	Área óssea
PTFe	Politetrafluoretileno
IC	Grupo I sem alterações sistêmicas (Controle)
IID	Grupo II (Diabético)
SM	Sub-grupo com a cavidade foi preenchida com enxerto ósseo, não sendo recoberta por membrana.
MH	Sub-grupo com a cavidade foi preenchida com enxerto ósseo e recoberta por membrana homogêna.
MX	Sub-grupo com a cavidade preenchida com enxerto ósseo foi recoberta por membrana sintética de PTFe.
ICSM10	Cavidade preenchida por enxertos sem membrana aos 10 dias – Sem diabetes

ICMH10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 10 dias – Sem diabetes

ICMX10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 10 Dias – sem diabetes

ICSM60 Cavidade preenchida por enxerto e sem recobrimento por membrana aos 60 Dias – Sem diabetes

ICMH60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 60 Dias – Sem diabetes

ICMX60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 60 Dias – Sem diabetes

IIDSM10 Cavidade preenchida por enxertos sem membrana aos 10 dias – Com diabetes.

IIDMH10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 10 dias – Com diabetes

IIDMX10 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 10 Dias – Com diabetes

IIDSM60 Cavidade preenchida por enxerto sem recobrimento por membrana aos 60 Dias – Com diabetes

IIDMH60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana homogéna aos 60 Dias – Com diabetes

IIDMX60 Cavidade preenchida por enxerto e recoberta por membrana de PTFe aos 60 Dias – Com diabetes

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Introdução	18
Objetivos	24
Material e Método	25
Resultados	30
Discussão	40
Conclusões	46
Referências	47
Anexos	
Anexo A – Normas para publicação	57
Anexo B - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	58
Anexo C - Fotografias das lâminas histológicas	59
Anexo D – Ilustrações da fase cirúrgica da metodologia experimental	65
Anexo E – Ilustrações da análise histométrica	70
Anexo F – Tabelas estatísticas	75

Análise histológica e histomorfométrica do processo de reparo de defeitos ósseos em ratos diabéticos preenchidos com osso autógeno e recobertos por membrana de matriz óssea homogênea ou por membrana de politetrafluoretileno

Histological and histomorphometric analysis of bone repair process in defects of diabetic rats filled with autogenous bone graft covered with homogenous bone matrix membrane or polytetrafluoroethylene membrane

Carlos Alberto Timóteo^{1/} Alessandra Marcondes Aranega ^{2/} Elio Hitoshi Shinohara ³

Aluno de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

²Professora Assistente Doutora do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

³Professor Doutor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*

RESUMO

Proposição: O objetivo deste trabalho foi analisar histologicamente e histomorfometricamente o processo de reparo de defeitos ósseos em ratos diabéticos preenchidos com osso autógeno e recoberto por membranas de matriz óssea homogêna ou politetrafluoretileno expandido (PTFe). **Materiais e métodos:** Para a obtenção da membrana homogêna foram utilizados 40 animais saudáveis, não incluídos no grupo experimental. No experimento foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso aproximado de 250 gramas, divididos em dois grupos: o grupo I (IC), sem alterações sistêmicas (Controle) recebeu injeção de tampão citrato a 0,01M, ph 4,5, pela via endovenosa e o grupo II (Diabético) ou IID recebeu pela mesma via de administração (veia peniana) injeção de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato a 0,01M, ph 4,5, em uma concentração de 35mg/Kg. Após controle glicêmico os ratos sem alterações sistêmicas (grupo controle) e diabéticos foram subdivididos em três subgrupos de experimentos: SM - a cavidade cirúrgica da tíbia esquerda foi preenchida com enxertos ósseos autógenos, não sendo recoberta por membrana, MH - a cavidade também preenchida com enxertos ósseos foi recoberta por membrana homogêna e MX – o recobrimento foi feito com membrana sintética de PTFe. Os animais foram eutanaziados aos 10 e 60 dias e as tíbias foram submetidas ao processamento laboratorial de rotina para análise histológica e histométrica. **Resultados:** Aos 10 dias não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diabéticos e não-diabéticos que tiveram suas feridas recobertas ou não com as membranas. No entanto, nesse tempo, o tecido ósseo do grupo diabético apresentou-se qualitativamente pior se comparado ao do grupo controle. Aos 60 dias constatou-se atraso no processo de reparo ósseo nas feridas recobertas pelas membranas,

se comparado ao grupo sem membrana, independentemente do estado sistêmico. Aos 60 dias as membranas instaladas sobre o defeito ósseo apresentaram respostas satisfatórias com relação à qualidade da neorformação óssea, se comparadas ao não uso, em ambos os grupos. A membrana homogênea estudada mostrou excelente biocompatibilidade tanto em ratos com enfermidade sistêmica quanto nos não-diabéticos, sendo inclusive, incorporada ao novo osso formado. Com relação ao volume ósseo, aos 60 dias foram encontradas diferenças estatisticamente importantes entre os grupos diabético e não-diabético tratados sem Membrana e com Membrana Homogênea. No grupo diabético tratado com membrana homogênea houve uma menor formação óssea se comparada ao não-diabético, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Tais diferenças entre os grupos foram ainda maiores nos tratados sem a membrana, em nível de significância de 1% ($P < 0,01$). **Conclusões:** Ambas as membranas instaladas sobre o defeito ósseo apresentaram respostas satisfatórias com relação à qualidade da neorformação óssea, se comparadas ao não uso, tanto em ratos diabéticos quanto nos não-diabéticos, apesar de terem proporcionado atraso no processo de reparo ósseo. A membrana homogênea estudada mostrou excelente biocompatibilidade, foi incorporada ao novo osso formado nos períodos tardios, foi bem sucedida na regeneração óssea guiada, tanto em ratos diabéticos como nos não-diabéticos.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus, transplante ósseo, cicatrização, transplante homólogo, transplante autólogo, regeneração tecidual guiada.

ABSTRACT

Purpose: To carry out histological and histomorphometric analysis of the bone repair process in diabetic rats filled with autogenous bone graft and covered with homogenous demineralized bone matrix membrane or expanded polytetrafluoroethylene membrane (e-PTF). **Materials and Methods:** In order to obtain the homogenous membrane, 40 healthy animals not included in the experimental group were used. In the experiment 120 male rats (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) weighing approximately 250g were divided into two groups. Group I (IC) had no systemic alterations (Control) and received an intravenous citrate buffer injection at 0.01 M, pH 4.5, while Group II (Diabetic) or IID received an intravenous injection of streptozotocin (Sigma-Aldrich) dissolved in citrate buffer at 0.01M, pH 4.5 in a concentration of 35 mg/kg. After glycemic control, the rats with no systemic alterations (Control group) and the diabetic rats were subdivided into three subgroups, as follows: SM – surgical cavity of left tibia was filled with autogenous bone grafting not covered by membrane; MH - bone grafting covered by homogenous membrane; and MX - bone grafting covered by expanded polytetrafluoroethylene membrane (e-PTFE). The animals were euthanized at 10 and 60 days and the tibiae were submitted to routine laboratorial processing for histological and histomorphometric analysis. **Results:** At 10 days, there were no statistically significant differences between diabetic and non-diabetic rats which had their wounds covered or not covered with the membranes. However, at 10 days the bone tissue of the diabetic group was qualitatively worse in comparison to that of the control group. At 60 days a delay was found in the bone repair process in wounds covered by membranes when compared to the group without membrane, regardless of the systemic state. At 60 days the membranes installed on the bone defect showed satisfactory responses in both

groups regarding the quality of the newly formed bone when compared to non-use. The homogenous membrane studied showed excellent biocompatibility both in rats with systemic disease and in non-diabetic rats, and was even incorporated into the newly formed bone. With respect to bone volume, at 60 days statistically significant differences between the group diabetic and non-diabetic treated without membrane and with homogenous membrane were found. In the diabetic group treated with homogenous membrane there was less bone formation when compared to the group of non-diabetic rats. Such differences between the groups were even greater in the treated without the membrane, at a significance level of 1% ($P < 0.01$). **Conclusions:** Both membranes installed on the bone defect showed satisfactory responses regarding the quality of the newly bone formed when compared to non-use both in diabetic rats and in non-diabetic rats, although they showed delay in the bone repair process. The homogenous membrane studied showed excellent biocompatibility, and was even incorporated into the newly formed bone in the later periods. It was successful in guided bone regeneration both in rats with systemic disease and in non-diabetic rats.

Key words: Diabetes mellitus, bone transplantation, healing, homologous transplantation, autograft, guided tissue regeneration.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o crescente estilo de vida sedentário e os hábitos alimentares pobres têm contribuído para a escalada simultânea da obesidade e para um consequente aumento do diabetes pelo mundo, tal fenômeno é denominado como *diabesidade epidêmica*¹.

Estima-se que o diabetes afeta aproximadamente 170 milhões de pessoas em todo mundo. Projeta-se que esse número seja dobrado até o ano 2030². Tais dados aliados ao aumento da longevidade, reforçam as possibilidades de que cada vez mais os cirurgiões dentistas estarão sujeitos ao atendimento de pacientes diabéticos.

Mais de 100 fatores fisiológicos contribuem para a deficiência na cicatrização em pessoas com diabetes, incluindo as alterações na resposta angiogênica, na função dos macrófagos, na acumulação de colágeno, na função da barreira epidérmica, na quantidade de tecido de granulação, na proliferação e migração dos fibroblastos ou na cicatrização óssea². Portanto, cuidados especiais para favorecer ou para prevenir que o ato cirúrgico não prejudique ainda mais o processo de reparo cicatricial são essenciais nos pacientes diabéticos, compensados ou não.

A insulina possui um papel crítico na regulação da glicose no sangue. A deficiência desse hormônio, como ocorre no diabetes tipo I, provoca alterações no metabolismo dos carboidratos, envolvendo secundariamente o metabolismo das proteínas e lipídeos³. Estas alterações afetam a resposta inflamatória desencadeando reações desfavoráveis ao processo normal de cicatrização. Como consequência, ocorre atraso do reparo tecidual e aumento da predisposição às infecções^{4,5}. Isso explica o maior risco de complicações das feridas dos pacientes diabéticos, principalmente dos não controlados, quando comparado aos pacientes normais⁶.

Estudos do processo de cicatrização no diabético continuam mostrando apenas uma pequena visão do largo e complexo processo de reparação nesses pacientes. Análises de úlceras diabéticas em humanos revelaram uma expressão diferencial de fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e seus receptores, os quais são cruciais para uma série de fases durante o processo normal de cicatrização de feridas. Uma família de endoproteínases envolvidas na remodelação tecidual também é diferencialmente expressada em feridas crônicas, levando a um colapso disfuncional da matriz extracelular. Macrófagos isolados das feridas de diabéticos exibiram uma diminuição da habilidade de remover células necrosadas resultando num prolongamento da resposta inflamatória⁷.

Um das melhores opções atuais para reabilitar um paciente com edentulismo total ou parcial é a implantologia, por mostrar-se eficaz do ponto de vista estético ou funcional. Por outro lado, a necessidade de aumento de volume e de altura óssea adequada para a instalação de implantes osseointegráveis tem demonstrado ser um desafio dentro da especialidade, especialmente no paciente diabético.

A procura por um substituto ósseo capaz de suprir as exigências físico-biológicas para a reconstrução de defeitos ósseos causados por fatores traumáticos, patológicos e ou fisiológicos tem sido um dos grandes desafios da área médico-odontológica nos últimos tempos. Dentre esses substitutos ósseos estão os enxertos autógenos intra e extra-buciais, os enxertos alógenos, xenógenos e os implantes aloplásticos, com ou sem, o uso de membranas para Regeneração Óssea Guiada (ROG)^{8,9}.

O melhor material para reconstrução dos defeitos ósseos é o enxerto ósseo autógeno por apresentar menor resposta inflamatória, angiogênese e osteogênese em períodos mais recentes, além de possuir propriedades osteoindutivas^{10,11,12}.

O enxerto autógeno tem, portanto, a característica de ser osteogênico por estimular osteoblastos vivos na formação de osso novo, osteocondutivo, por servir como arcabouço para a invasão de vasos provenientes do osso vizinho e osteoindutivo, por estimular células mesenquimais pluripotenciais a se diferenciarem em osteoblastos.

Membranas de vários materiais reabsorvíveis e não-reabsorvíveis tem sido empregadas para minimizar a reabsorção do enxerto, manter ou aumentar o contorno ósseo e prevenir a proliferação ou migração de tecidos menos especializados para a área de reparo ósseo. A biocompatibilidade é a característica mais procurada e importante nessa escolha^{13,14}.

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) segue os mesmos princípios da Regeneração Tecidual Guiada (RTG). Desenvolvida para favorecer e propiciar a cicatrização de feridas, a ROG consiste no uso de uma membrana com características de permeabilidade aos nutrientes, biocompatibilidade, manuseabilidade clínica e capacidade de manutenção do espaço para a regeneração óssea. Diversas análises histológicas, tanto em animais quanto em humanos, têm demonstrado que há formação de novo tecido no espaço mantido pela presença dessas membranas¹⁵⁻²¹.

Os princípios da ROG foram introduzidos nos anos de 1980 e tinha como principal objetivo prevenir o crescimento de tecido conjuntivo para o interior do defeito cirúrgico valendo de uma técnica que empregava membrana em estudos realizados em animais^{22,23}. Na mesma época a ROG foi avaliada em defeitos cirúrgicos em torno de implantes instalados em animais²⁴. Vários estudos sucederam e foram estendidos às pesquisas clínicas. Os materiais utilizados na produção de membranas para ROG devem possuir alguns critérios tais como biocompatibilidade, ser oclusivo para células e tecidos, ter a capacidade de manter o espaço e boa integração tecidual²⁵. Considerando estudos prospectivos realizados por longo tempo, a instalação de implantes com

aumento simultâneo do contorno ósseo e com emprego de carga imediata oferece alta previsibilidade de sucessos, resultados estéticos e boa estabilidade da parede óssea conseguida por meio da ROG²⁶. A biocompatibilidade e a precoce integração tecidual do material utilizado como barreira são os mais importantes fatores para o sucesso na ROG²⁵.

A literatura tem reportado vários trabalhos experimentais que avaliaram a resposta tecidual em torno de membranas reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis utilizadas como barreiras em Regeneração Óssea Guiada (ROG), bem como, o processo de degradação e/ou encapsulação dessas membranas¹⁵⁻²¹. Diferentes respostas teciduais já são esperadas, uma vez que tais membranas são constituídas de materiais diferentes, com tendência à reação de defesa do organismo. Não obstante, é de suma importância que as membranas sejam biocompatíveis, para que sejam indicadas na Regeneração Tecidual Guiada (RTG)²⁷.

O processo de reparo não deve sofrer impedimento ou interferência da excessiva reação inflamatória associada à decomposição e reabsorção ou à encapsulação de membranas utilizadas na ROG. A literatura mostra que a regeneração óssea é muito sensível à resposta inflamatória provocada por membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis²⁷. No entanto, o grau de inibição da osteogênese, provocada por essa reação tecidual, necessita de estudos experimentais que possam comparar tipos diferentes de membranas. Espera-se que a reação tecidual seja diferente diante diferentes tipos de membranas.

Membranas sintéticas reabsorvíveis foram testadas em procedimentos de ROG. Em 2012, os resultados do estudo de Van Leeuwen et al. demonstraram que a membrana de *polyglactin* 910 sofreu colapso e degradou precocemente, levando à

incompleta regeneração óssea²⁸. Van Leeuwen et al. também sugeriram que a *poly (trimethylene carbonate)* parecia adequada para o uso em ROG, com um resultado de análise estatística não mostrando diferença significativa na formação óssea quando comparado aos resultados apresentados com o uso de membrana de PTFe²⁸. Em 2012, Matsumoto et al. demonstraram que uma membrana sintética composta por *poly (lactic acid-co-glycolic acid-co-ε-caprolactone)* apresentou um volume de formação óssea menor quando comparado àquele apresentado com o uso de membrana de PTFe, mas a densidade do osso formado abaixo daquela era semelhante a uma cortical óssea normal e significativamente mais alta do que a densidade do osso formada abaixo da membrana de PTFe²⁹. Mais recentemente, Dahlin et al. avaliaram um hidrogel sintético (*polyethylene glycol*) como barreira e os resultados mostraram-se promissores em relação à biocompatibilidade²⁵. Embora os resultados com membranas sintéticas reabsorvíveis pareçam promissores, a perda das propriedades de manutenção de espaço, a extensiva reação de corpo estranho principalmente nas membranas produzidas com materiais à base de polímero de *lactide* e *glycolide*²⁸, limitam seu uso. Além disso, sabe-se que alguns desses materiais produzem uma quantidade significativa de compostos ácidos durante a degradação no tecido²⁸.

Tecido ósseo de origem humana tem sido atualmente desmineralizado, preservado^{30,31}, e oferecido em várias formas e arquitetura para correção de defeitos ósseos em cirurgia bucal e nas cirurgias de trauma maxilo-facial^{32,33,34}. Tais enxertos estão disponíveis como osso cortical, esponjoso, ou ambos. Esses enxertos homogêneos mostram ainda propriedades osteocondutivas e osteoindutivas de acordo com o modo de preparação e preservação e tem a vantagem de evitar uma cirurgia adicional como

acontece durante o enxerto autógeno para coleta óssea em outra parte do corpo, otimizando o tempo cirúrgico e podendo ser obtido sem limites de quantidade^{32,33,34}.

O processo de esterilização ou desinfecção por gás, radiação e calor seco ou úmido interfere na qualidade do tecido utilizado como enxerto^{35,36}. Já o processo de obtenção da membrana homogênea por meio do ciclo de desmineralização e preservação em glicerina garante a manutenção do conteúdo protéico e evita a sobrevivência de microorganismos patogênicos³⁷. A preservação é também de fundamental importância na proteção celular e na manutenção da vitalidade do tecido e sendo feita com glicerina parece ser um eficiente e seguro procedimento capaz de ser realizado com facilidades por ser uma técnica simples e com uso de poucos recursos³⁷.

Tendo em vista o crescente uso de enxerto ósseo de origem homogênea, é relevante avaliar o processo de reparo de defeito ósseo coberto com membrana homogênea de matriz óssea desmineralizada comparando-a com a membrana de politetrafluoretileno. Além disso, apesar de serem bastante abordados na literatura a ocorrência de atraso no processo de reparo e a predisposição do organismo diabético às infecções^{1-7,15,38}, pouco se conhece da ROG, sob uma análise qualitativa e quantitativa, especialmente no processo de reparo em organismos diabéticos e quando são utilizadas membranas reabsorvíveis ou não-reabsorvíveis.

OBJETIVOS

Este trabalho teve o propósito de analisar histologicamente e histomorfometricamente o processo de reparo de defeitos ósseos em ratos diabéticos preenchidos com osso autógeno e recoberto por membranas de matriz óssea homogênea ou de politetrafluoretileno expandido (PTFe), como barreiras de proteção na regeneração óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araçatuba, foram utilizados 160 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos.

Membrana homogênea

Para a obtenção da membrana homogênea foram utilizados 40 ratos saudáveis, não incluídos no grupo experimental, sendo eutanasiados com dose excessiva de anestésico vinte e três dias antes do procedimento. Após sacrificados os ratos tiveram suas calvárias colhidas. Os ossos foram submetidos ao ciclo de desmineralização por ação do ácido clorídrico (HCl) a 0,4 mol durante 48 horas, em temperatura variando entre 5 e 10 graus Celsius. A solução descalcificadora foi trocada uma vez após 24 horas do início do ciclo de desmineralização³⁹. Posteriormente, as calvárias foram lavadas por um período de 24 horas com água destilada corrente e cortadas ao meio, na sutura sagital, para obtenção de duas hemi-calotas. Com o auxílio de 2 cilindros ajustáveis, as hemi-calotas foram prensadas e suas corticais, internas e externas, separadas, resultando em quatro membranas com aproximadamente 5µm de espessura, as quais foram armazenadas em um recipiente estéril, contendo glicerina a 98% por um período de 20 dias antes da implantação sob a temperatura de 5 a 7 graus Celsius³⁹.

Membrana sintética

Foi utilizada a membrana feita de politetrafluoretileno expandido (Gore-Tex, W.L. Gore & Assoc. Flagstaff, Arizona, USA)

Animais e procedimento cirúrgico

Foram utilizados 120 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso aproximado de 250 gramas, divididos em dois grupos: o grupo I (IC), sem alterações sistêmicas (Controle) recebeu injeção de tampão citrato a 0,01M, ph 4,5, pela via endovenosa e o grupo II (Diabético) ou IID recebeu pela mesma via de administração (veia peniana) injeção de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato a 0,01M, ph 4,5, em uma concentração de 35mg/Kg. Os ratos foram alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S.A.) e água à vontade, exceto nos períodos de jejum.

A estreptozotocina é apropriada para estabelecer e induzir estado diabético⁴⁰.

A verificação do estado diabético foi realizada após cinco dias da administração de estreptozotocina com os ratos em jejum por 14 horas. Por meio de um corte na cauda do animal a dois milímetros de sua extremidade distal foi coletada uma gota de sangue diretamente pelas glicofitas acopladas ao dosador glicêmico automático (Accu-Chek Advantage - Roche Diagnostica Brasil Ltda). Os animais incluídos nesse estudo apresentaram taxa de glicemia superior a 350mg/dl.

A anestesia geral foi realizada com injeção intramuscular de Cloridrato de Xilazina (Coopazine – Coopers Brasil Ltda) e Cloridrato de Cetamina (Vetaset - Fort Dodge), nas dosagens de 0,03mL e 0,07mL para cada 100g de peso corporal, respectivamente. Após tricotomia e antissepsia, com uma lâmina de bisturi nº 15 foi realizada uma incisão linear no sentido longitudinal em cada tíbia e divulsão dos planos cirúrgicos até o perióstio, permitindo o deslocamento e afastamento dos tecidos. Com trefina de 2 mm acoplada em baixa-rotação e sob refrigeração com soro fisiológico foi

preparada uma cavidade cirúrgica na tíbia direita de aproximadamente 2mm de diâmetro e o osso coletado pela trefina foi particulado e armazenado em solução fisiológica. Da mesma forma, outra cavidade foi preparada na tíbia esquerda e o osso coletado foi também particulado e armazenado. A cavidade cirúrgica da tíbia esquerda foi preenchida com os ossos previamente removidos, sendo recobertas ou não por membranas.

Os animais foram divididos em 3 sub-grupos:

Sub-grupo (SM) - a cavidade foi preenchida com enxerto ósseo, não sendo recoberta por membrana.

Sub-grupo (MH) - a cavidade foi preenchida com enxerto ósseo e recoberta por membrana homogênea.

Sub-grupo (MX) – a cavidade preenchida com enxerto ósseo foi recoberta por membrana sintética de PTFe.

Os tecidos de todos os sub-grupos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos simples por meio de fio de nylon 5.0, buscando-se estabilizar a musculatura e a membrana.

No pós-operatório imediato, cada animal recebeu dose única pela via intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Fort Dodge Saúde Animal Ltda). Os animais foram eutanaziados aos 10 e 60 dias pós-operatórios por dose excessiva do mesmo anestésico utilizado no procedimento cirúrgico e as peças foram fixadas em formaldeído a 10%.

Preparação dos espécimes e análises histológica e histométrica

As tíbias obtidas foram submetidas ao processamento laboratorial de rotina para a obtenção de cortes semiseriados no sentido longitudinal da peça com seis micrômetros de espessura e corados pelas técnicas da hematoxilina e eosina (HE) e Tricrômico de Masson para análise histológica e histométrica.

Na análise histológica, parâmetros morfológicos foram descritos qualitativamente no processo de reparo como: revascularização, reabsorção e remodelação do enxerto, presença de células ósseas, osteogênese a partir da borda do defeito, reabsorção ou incorporação da membrana sobre os enxertos ósseos e sobre o osso pré-existente e neoformado.

Para análise histométrica, foi selecionado um corte mais central de cada espécime e cada corte foi capturado com uma câmera digital (Axio Cam MRC 5, Zeiss) conectada a um microscópio de luz (Zeiss) e salvo como uma imagem digitalizada no computador, com aumento de 6,3X. Um examinador calibrado e cego ao estudo realizou a análise histométrica da área óssea (AO) presente no interior do defeito originalmente criado, cuja dimensão da área total selecionada foi adquirida por meio de duas linhas perpendiculares ao longo eixo da tíbia, que tangenciavam as margens das bordas proximal e distal do defeito e por outras duas linhas paralelas ao longo eixo da tíbia, tangentes à cortical externa e a cortical interna, formando uma área retangular para a quantificação. Os dados foram obtidos em pixels e convertidos em porcentagem. Em todo esse processo de análise foi utilizado o software image F.

Para padronizar a análise histométrica. A área total do defeito foi considerada 100% da área analisada. A área de osso (AO) dentro da área total foi calculada pelo delineamento de cada unidade óssea separadamente, fazendo-se a somatória dessas

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

Os valores de AO de cada animal foram usados para o cálculo das médias e dos desvios-padrões de cada grupo.

Análise estatística

Os dados obtidos pela análise quantitativa foram analisados usando o software IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA) para $\alpha=0.05$.

Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste U de **Mann-Whitney**. Os dados foram expressos como média das porcentagens \pm DP.

RESULTADOS

Resultados histológicos

Os resultados obtidos foram descritos em função do tempo decorrido entre o procedimento cirúrgico e a eutanásia dos animais (10 ou 60 dias) e das ocorrências histomorfológicas observadas nos diferentes grupos:

Grupo ICSM- Animais sem alteração sistêmica, com cavidade preenchida por enxertos ósseos e não recoberta por membrana.

Grupo IIDSM- Animais com Diabetes mellitus, com cavidade preenchida por enxertos ósseos, não sendo recoberta por membrana.

Grupo ICMH- Animais sem alteração sistêmica, com cavidade preenchida por enxertos ósseos e recoberta por membrana homogênea.

Grupo IIDMH- Animais com Diabetes mellitus, com cavidade preenchida por enxertos ósseos e recoberta por membrana homogênea.

Grupo ICMX- Animais sem alteração sistêmica, com cavidade preenchida por enxertos ósseos e recoberta por membrana sintética de PTFe.

Grupo IIDMX- Animais com Diabetes mellitus, com cavidade preenchida por enxertos ósseos e recoberta por membrana sintética de PTFe.

Resultados 10 dias

ICSM10 (Grupo sem alteração sistêmica, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e sem recobrimento por membrana aos 10 dias)

Superficialmente na área estudada, cápsula fibrosa delgada, contendo fibras colágenas dispostas paralelamente ao longo eixo da tíbia, fibroblastos, alguns vasos sanguíneos e

discreto número de células inflamatórias podem ser vistos na maioria dos espécimes. Abaixo da cápsula, no interior da loja cirúrgica, observam-se trabéculas ósseas imaturas, com amplos espaços intertrabeculares. Alguns fragmentos de tecido ósseo, correspondentes aos enxertos ósseos, podem ser identificados. O tecido conjuntivo entre as trabéculas é bem vascularizado, com numerosos feixes de fibras colágenas, ainda em organização, elevado número de fibroblastos e moderado número de células inflamatórias, sendo estas constituídas especialmente por macrófagos e linfócitos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado observam-se numerosos osteoblastos e intensa aposição óssea. Em todos os espécimes estudados o enxerto ósseo encontra-se revascularizado e incorporado sendo encontrada discreta atividade osteoclástica em suas bordas. A neoformação óssea adjacente às bordas dos enxertos ósseos é caracterizada por trabéculas ósseas finas e imaturas. O espaço intertrabecular nessa região medular é amplo e com grande quantidade de vasos sanguíneos. (Anexo – figura 1).

IIDSM10 (Grupo diabético, com a cavidade preenchida por enxertos ósseos e sem recobrimento por membrana aos 10 dias)

Superficialmente, cápsula fibrosa delgada recobre a cavidade contendo fibroblastos, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório crônico. Abaixo da cápsula, no interior da loja cirúrgica, observam-se fragmentos de tecido ósseo rodeados por finas trabéculas ósseas imaturas, sendo rara a atividade osteoclástica ao redor dos fragmentos. O tecido conjuntivo entre as trabéculas é bem vascularizado e há moderado número de células inflamatórias, sendo estas constituídas especialmente por macrófagos e linfócitos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado observam-se osteoblastos com padrão mais desorganizado que o respectivo grupo controle. (Anexo – figura 2).

ICMH10 (Grupo sem alteração sistêmica, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana homogênea aos 10 dias)

Superficialmente, a membrana óssea homogênea delgada recobre todo o defeito ósseo criado e contém, em seu interior, alguns espaços sendo invadidos por tecido conjuntivo bem vascularizado, com numerosos feixes de fibras colágenas em organização, elevado número de fibroblastos e intenso número de células inflamatórias, sendo estas constituídas especialmente por macrófagos e linfócitos. Algumas pontes de união óssea entre a membrana e o trabeculado ósseo podem ser identificadas, sendo a união predominantemente aposicional. Adjacente e abaixo da membrana, no interior da loja cirúrgica, cuja porção corresponderia à cortical da tíbia, observam-se trabéculas ósseas imaturas unidas aos enxertos ósseos e entremeadas por amplos espaços intertrabeculares ocupados por tecido conjuntivo bem vascularizado, com feixes de fibras colágenas em organização, elevado número de fibroblastos ao lado de moderado número de células inflamatórias, especialmente linfócitos e macrófagos. Em todos os espécimes estudados os enxertos ósseos encontram-se revascularizados e incorporados. São discretas as áreas que apresentam alguma atividade osteoclástica junto aos enxertos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado observam-se numerosos osteoblastos, na maioria dispostos paralelamente as suas margens. (Anexo – figura 3).

IIDMH10 (Grupo diabético, com cavidade preenchida por enxerto ósseo autógeno e recoberta por membrana homogênea aos 10 dias).

A cavidade cirúrgica é recoberta, superficialmente, pela membrana óssea e seu interior é invadido por tecido conjuntivo, de forma semelhante ao respectivo grupo controle. Logo abaixo da membrana notam-se trabéculas ósseas delgadas e imaturas, com amplos

espaços intertrabeculares, além de alguns fragmentos de tecido ósseo, correspondentes aos enxertos ósseos. O tecido conjuntivo entre as trabéculas e o enxerto ósseo é bem vascularizado e o infiltrado inflamatório é discretamente maior que o respectivo grupo controle.

Em todos os espécimes diabéticos que receberam os enxertos, aos 10 dias, houve incorporação dos fragmentos ósseos, sendo a neoformação óssea a partir das próprias bordas dos enxertos menos intensa nesse grupo quando comparado ao respectivo controle. Observa-se numerosos osteoblastos dispersos ou agrupados nos espaços intertrabeculares. Ao redor dos enxertos, tais células mostram-se menos organizadas no grupo diabético em relação ao não-diabético. (Anexo - Figura 4).

ICMX10 (Grupo sem alteração sistêmica, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana sintética de PTFe aos 10 dias)

A membrana recobre todo o defeito ósseo criado e abaixo dela há, em alguns espécimes, delgada camada de tecido conjuntivo contendo fibras colágenas dispostas paralelamente a ela. Contudo, em outros, a neoformação óssea parece ocorrer adjacente à membrana, com ausência de tecido conjuntivo interposto. Abaixo dessa camada, há a formação de trabéculas ósseas imaturas justapostas aos enxertos ósseos e entremeadas por amplos espaços ocupados por tecido conjuntivo bem vascularizado, da mesma forma que no grupo da membrana homogênea. Em todos os espécimes estudados os enxertos ósseos encontram-se revascularizados e incorporados, com pequena atividade osteoclástica e intensa atividade osteoblástica, uma vez que há numerosos osteoblastos agrupados, com núcleos globosos, além dos aprisionado pela matriz osteóide. (Anexo – figura 5).

IIDMX10 (Grupo diabético, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana sintética de PTFe aos 10 dias).

A membrana de PTFe recobre todo o defeito ósseo criado e abaixo dela há neoformação óssea ocorrendo adjacente à membrana na maioria dos espécimes, ocorrendo em menor extensão que no respectivo grupo controle. Abaixo dessa camada, há a formação de trabéculas ósseas imaturas mais delgadas que o respectivo controle, unindo o tecido ósseo neoformado com os fragmentos ósseos enxertados. Os amplos espaços intertrabeculares são ocupados por tecido conjuntivo bem vascularizado. Apesar dos fragmentos ósseos estarem sendo incorporados, há pequena atividade osteoclástica e os osteoblastos dispõem-se ao redor das trabéculas de forma mais desorganizada que o respectivo grupo controle. (Anexo – figura 6).

Resultados 60 dias

ICSM60 (Grupo sem alteração sistêmica, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo, sem recobrimento por membrana aos 60 dias).

Quando comparada a área das bordas do defeito ósseo, a área reparada é facilmente identificada pelo padrão de ossificação ainda em processo de remodelação. O defeito ósseo está totalmente reparado por osso, contudo, todos os espécimes apresentam seus enxertos ósseos ainda em processo de remodelação. Quase todos os fragmentos ósseos encontram-se unidos à cortical, mesmo os que invadem o interior do canal medular. Grandes espaços medulares, contendo células hematopoiéticas, próprias do canal medular, preenchem a região óssea analisada. (Anexo – figura 7).

IIDSM60 (Grupo diabético, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo, sem recobrimento por membrana aos 60 dias).

O defeito ósseo está totalmente reparado por osso, contudo, os espécimes desse grupo apresentam o osso neoformado com padrão de ossificação mais desorganizado que do respectivo grupo controle. O osso neoformado que recobre a cavidade é delgado e está unido aos enxertos ósseos por delgadas pontes ósseas. Os fragmentos ósseos ainda estão em processo de remodelação com padrão menos desenvolvido que o grupo anterior. Os espaços medulares também contêm as células hematopoiéticas, próprias do canal medular. (Anexo – figura 8).

ICMH60 (Grupo sem alteração sistêmica, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana homogênea aos 60 dias).

A membrana óssea recobre toda a região analisada e se encontra incorporada ao tecido ósseo neoformado. Áreas de reabsorção podem ser vistas no interior da membrana, sem, contudo, apresentarem células multinucleadas. A membrana permanece aderida às bordas do defeito ósseo e ao leito neoformado abaixo dela. Em quase todos os animais há formação de um espaço entre a membrana e o osso adjacente, sendo preenchido por células próprias do canal medular. Apesar de ser possível observar o aparente aumento na espessura óssea da tíbia, são amplos os espaços medulares na área óssea neoformada, se comparados ao grupo correspondente sem membrana (ICSM60). Os enxertos ósseos apresentam-se unidos e incorporados à área óssea neoformada e à membrana. (Anexo – figuras 9).

IIDMH60 (Grupo diabético, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana homogênea aos 60 dias).

A membrana óssea recobre todo o defeito estudado e se encontra incorporada ao tecido ósseo neoformado por delgadas pontes ósseas ou por delgada camada de osso justaposto. Em todos os animais há formação de um espaço entre a membrana e o osso adjacente, sendo preenchido por células próprias do canal medular, de forma semelhante ao respectivo grupo controle. A membrana também permanece aderida às bordas do defeito ósseo e mantém sobrecontorno da tíbia na área do defeito. Apesar da membrana óssea homogênea ser incorporada à área óssea neoformada, áreas de reabsorção da membrana podem ser identificadas. Os enxertos ósseos apresentam-se em processo de remodelação mais atrasado se comparado ao grupo controle. (Anexo – figura 10).

ICMX60 (Grupo sem alteração sistêmica, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana de PTFe aos 60 dias):

Quando comparado ao grupo correspondente sem membrana, aos 60 dias, observa-se discreto atraso no processo de remodelação dos enxertos ósseos. Superficialmente, a membrana sintética, sem indícios de desintegração, recobre toda a região analisada. Abaixo dela, há uma delgada camada de osso neoformado. Em maior aumento, pode-se perceber que há uma tênue camada de tecido conjuntivo celularizado na linha de união entre a membrana e o osso em quase toda a extensão da membrana, sendo que nas extremidades da membrana o tecido conjuntivo é mais fibroso e espesso. Abaixo da área óssea adjacente à membrana, há persistentes e amplos espaços intertrabeculares contendo células hematopoiéticas, próprias do canal medular. Comparado ao grupo da membrana homogênea, o tecido ósseo neofomado do grupo da membrana sintética é mais imaturo e os espaços intertrabeculares são mais amplos. (Anexo – figura 11).

IIDMX60: (Grupo diabético, com a cavidade preenchida por enxerto ósseo e recoberta por membrana de PTFe aos 60 dias).

Superficialmente, a membrana sintética recobre toda a região analisada, estando justaposta a uma delgada camada de osso neoformado, sem indícios de desintegração. Comparado ao respectivo grupo controle da membrana de politetrafluoretileno, o grupo diabético apresenta atraso no processo de neoformação óssea, na maturação das trabéculas e na remodelação dos enxertos ósseos. A camada óssea abaixo da membrana é delgada, predominando sua união aos espaços medulares e não ao osso neoformado em várias regiões da ferida cirúrgica. Quando adjacente ao osso, a membrana possui abaixo dela uma tênue faixa de tecido conjuntivo, constituída por fibrilas com alguns fibroblastos. Esse tecido é mais espesso nas extremidades da membrana sintética. Há amplos espaços intertrabeculares contendo células hematopoiéticas, próprias do canal medular, abaixo da membrana e, quando comparado o grupo diabético da membrana sintética com o grupo diabético da membrana homogênea, histologicamente, a ferida do grupo da membrana homogênea encontra-se mais fechada e o osso neoformado é mais desenvolvido (Anexo – figura 12).

Resultados histométricos e estatísticos

Aos 10 dias não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diabéticos e não-diabéticos que tiveram suas feridas recobertas ou não com as membranas.

Aos 10 dias, o grupo diabético sem membrana apresentou uma área óssea maior se comparada a do seu respectivo grupo não-diabético, embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significantes.

A quantidade óssea dos grupos da membrana sintética aos 10 e 60 dias foi bastante semelhante, tanto no grupo diabético, como no grupo não diabético, mas a significância de seus resultados foi observada quando os respectivos grupos da membrana sintética foram comparados aos demais grupos, com membrana ou sem membrana.

Aos 60 dias foram encontradas diferenças estatisticamente importantes entre os grupos diabético e não-diabético tratados sem Membrana e com Membrana Homógena. No grupo diabético tratado com membrana homógena houve uma menor formação óssea se comparada ao não-diabético, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Tais diferenças entre os grupos foram ainda maiores nos tratados sem a membrana, em nível de significância de 1% ($P < 0,01$).

Aos 60 dias, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos diabético e não-diabético tratados com membrana sintética, embora no grupo não-diabético tenha sido quantificada uma maior área óssea.

A quantidade de osso formado no grupo da membrana sintética, aos 60 dias, foi menor em relação aos grupos da Membrana Homógena ou Sem Membrana, tanto no grupo sem a enfermidade sistêmica como no grupo com diabetes mellitus.

Os dados foram analisados usando o software IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA) em $\alpha=0.05$.

O teste U de *Mann-Whitney* foi utilizado para a comparação entre os grupos. Os dados foram expressos como média de porcentagem \pm DP. Tabelas:1, 2 e 3.

DISCUSSÃO

O reparo de defeitos ósseos é um bom modelo para estudo da regeneração óssea, pois qualquer lesão óssea ativa a regeneração local pela liberação de fatores de crescimento e indutores⁴². Este processo depende das fases de revascularização, incorporação, substituição e remodelação para o restabelecimento da arquitetura do osso hospedeiro⁴¹. Sabe-se que o melhor material para reconstrução dos defeitos ósseos é o enxerto ósseo autógeno e quando este é utilizado na forma particulada^{43,24,44,45}, é rapidamente revascularizado, libera uma quantidade maior de fatores de diferenciação e crescimento nos estágios iniciais da regeneração e exibe uma atividade osteoclástica mais intensa, resultando em uma maior reabsorção quando comparado ao enxerto em bloco⁴⁶. A maior limitação da utilização do enxerto na forma particulada é a instabilidade imediata de seus fragmentos, pois o deslocamento desses fragmentos dificilmente é evitado quando não há proteção com barreiras biológicas ou com paredes ósseas do próprio defeito⁴⁴.

Diante de tais dificuldades a técnica da regeneração óssea guiada pode ser aplicada com sucesso na reparação de defeitos ósseos ao redor de implantes dentais e reconstruções alveolares⁴⁷, porém quando as membranas são instaladas objetivando o aumento vertical dos defeitos, frequentemente, elas invaginam ou colabam devido à pressão gerada pelos tecidos moles sobre elas. Nessas circunstâncias, as membranas são instaladas sobre algum material de preenchimento⁴⁸ capaz de promover suporte para resistir à essa pressão⁴⁹. No caso deste estudo optou-se pelo preenchimento de todas as cavidades pelo enxerto autógeno particulado, por ser este considerado o mais ideal

dentre outros tipos de enxertos ou implantes e para que fosse analisado o reparo ósseo e o comportamento das membranas sobre os enxertos em ratos diabéticos e não-diabéticos.

Nos períodos iniciais da reparação, houve abaixo das membranas homogêneas, a formação de pontes ósseas unindo-as ao trabeculado ósseo neoformado. Nos períodos tardios, grande parte dela foi totalmente incorporada ao trabeculado ósseo neoformado.

Pode-se observar que ambos os tipos de membrana proporcionaram o aumento da espessura óssea da tíbia, embora a formação dos espaços medulares abaixo delas fossem persistentes aos 60 dias, tanto nos grupos com, quanto nos grupos sem enfermidade sistêmica. Contudo, os espaços foram ainda maiores quando os animais eram diabéticos, tendo o pior resultado o grupo diabético tratados com membrana de politetrafluoretileno. Figura 12.

Apesar desse estudo mostrar um aparente ganho em altura com o uso das membranas, o volume ósseo no interior da cavidade cirúrgica foi em média menor quando os resultados dos tratados com membranas no grupo diabético forem comparados aos tratados com membranas no grupo controle (não-diabéticos), nos períodos iniciais essa diferença não foi estatisticamente significativa, mas aos 60 dias, ela mostra estatisticamente significativa entre os ratos diabéticos e os não-diabéticos tratados com membrana homogênea. Quando comparados os dois grupos tratados sem membrana as diferenças são ainda mais significantes nesse período. Tabelas 1, 2 e 3. Contudo, o restabelecimento do contorno ósseo⁵⁰ ainda é uma vantagem para o uso das membranas.

Com relação à qualidade óssea, embora não fossem encontradas diferenças estatisticamente significantes quanto à quantidade óssea presente aos 10 dias nos grupos estudados, verificou-se que junto às bordas do tecido ósseo neoformado ou dos enxertos do grupo sem enfermidade sistêmica e sem membrana que havia numerosos

osteoblastos, bem organizados e com intensa aposição óssea. Esse padrão de organização foi perdido, consideravelmente, nos grupos diabéticos.

A literatura mostra que a regeneração óssea é muito sensível à resposta inflamatória provocada por membranas reabsorvíveis e não-reabsorvíveis²⁷. No entanto, o grau de inibição da osteogênese, provocada por essa reação tecidual, necessita de estudos experimentais que possam comparar tipos diferentes de membranas. Espera-se que a reação tecidual seja diferente diante de diferentes tipos de membranas.

Observou-se, com esse trabalho, que apesar de ambas as membranas serem biocompatíveis, houve um atraso no processo de reparo ósseo nas feridas recobertas pelas membranas, independentemente do estado sistêmico, sendo algumas diferenças estatísticas visíveis nos grupos tardios. Tabelas 1, 2, e 3.

Com relação aos tipos de união tecidual existentes entre o osso neoformado e a membrana homogênea ou a membrana de politetrafluoretileno, observa-se que, desde os tempos iniciais, a membrana homogênea une-se ao osso neoformado adjacente sem qualquer tipo de tecido interposto, sendo que esta união inicial se dá por pontes ósseas que se espessam ao longo de toda a cavidade. No tempo tardio, 60 dias, não é possível delimitar a linha de união existente entre a membrana óssea homogênea e o osso neoformado, exceto por uma ausência dos núcleos dos osteócitos na porção interna da membrana. Com relação aos grupos da membrana sintética, essa união entre o osso neoformado e a membrana se dá por uma camada óssea bastante delgada, podendo ser visualizada, em maior aumento, uma camada bem delgada de fibrilas interposta na linha de união. Especialmente no grupo diabético verifica-se que muitos espaços intertrabeculares, contendo células próprias do canal medular, permanecem abaixo dessa membrana, sem contudo, apresentar células gigantes multinucleadas do tipo fagocitárias.

Apesar de alguns estudos terem demonstrado até mesmo ausência de osteogênese quando osso homogêneo orgânico foi empregado em alvéolos de ratos⁵¹, outros estudos mostram suas vantagens sobre a neoformação óssea ao comparar o enxerto homogêneo desmineralizado ao mineralizado⁵². Há também estudo que sugere a capacidade de osteoindução da matriz óssea homogênea desmineralizada³⁹. Diante de tais hipóteses seria necessário o estudo dessa membrana em área que normalmente não contém osso para responder à dúvida do caráter osteoindutivo da membrana estudada. Como foram empregadas em cavidades ósseas, não foi estudado o potencial osteoindutor da membrana homogênea, pois as cavidades seriam, de qualquer forma, preenchidas por osso.

Um estudo realizado por Pigossi em 1964 demonstrou que o fato da membrana ser homogênea e de ter sido submetida ao ciclo de desmineralização pelo ácido clorídrico e à preservação em glicerina, provavelmente, torna-a mais biocompatível com relação à membrana sintética e até mesmo ao enxerto homogêneo sem qualquer tratamento³⁷. Embora o objetivo desse trabalho não tenha sido a comparação da membrana homogênea com o enxerto homogêneo e sim a análise do reparo ósseo em ratos diabéticos e o comportamento das duas membranas em organismos sem ou com essa enfermidade sistêmica nesse estudo nenhuma das membranas provocaram reação inflamatória intensa ou reações tipo corpo estranho que gerassem sua expulsão.

Todas as fases do processo de reparo ósseo são decorrentes de eventos inflamatórios, que, por sua vez, são controlados por inúmeros fatores que podem modificar os elementos celulares, a inflamação serve para destruir, diluir, ou imobilizar o agente agressor, mas com o tempo ela deflagra uma série de acontecimentos que, tanto quanto possível, curam e reconstituem o tecido lesado⁵³. O Diabetes mellitus produz atraso no reparo alveolar, devido a uma deficiência na proliferação fibroblástica,

osteoblástica e conseqüentes reflexos na produção de substância fundamental amorfa, fibras colágenas e matriz orgânica⁵⁴.

No grupo diabético o resultado foi bastante controvertido nesse trabalho e deve ser discutido com cautela. Aos 10 dias não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diabéticos e não-diabéticos que tiveram suas feridas recobertas ou não com as membranas. Aos 10 dias, o grupo diabético sem membrana apresentou uma área óssea maior se comparada a do seu respectivo grupo não-diabético, embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significantes.

No entanto a incorporação dos enxertos ósseos em todos os espécimes analisados associada ao desenvolvimento de um trabeculado bem organizado ao redor dos fragmentos ósseos implantados demonstram que a reparação óssea é favorável com o uso dos enxertos ósseos autógenos.

A dificuldade na análise histométrica dos grupos dos 10 dias pode ser um dos fatores que tentam explicar alguns achados contraditórios. As trabéculas ósseas desses grupos encontram-se espalhadas por todo o defeito ósseo criado, possuindo espessura e quantidade semelhante às do grupo controle. Contudo, as fibras colágenas do grupo diabético, apesar de mais delgadas, são também mais dispersas em toda a cavidade cirúrgica. As suas trabéculas também apresentam-se mais porosas, contendo osteoblastos recém aprisionados, devido as suas lacunas osteocíticas serem mais amplas, o que torna o tecido ósseo do grupo diabético qualitativamente pior se comparado ao do grupo controle. Figuras 1 a 6.

Com o avanço da ciência, órgãos e tecidos doados tendem a ser melhor utilizados. Bancos de tecido ósseo podem conquistar esse espaço desenvolvendo estudo

na área de reconstrução óssea, mas a maioria deles continuam oferecendo os tecidos para uso na forma “in natura”, ainda não se interessaram em desenvolver produtos homogêneos como ocorre, por exemplo, como as membranas bovinas, osso de origem bovina ou com material aloplástico. Por enquanto, não há ainda uma membrana homogênea com resultados clínicos comprovados para uso em humanos, contudo a chance de isso ocorrer no futuro é totalmente possível.

A membrana estudada mostrou excelente biocompatibilidade tanto em ratos com enfermidade sistêmica quanto nos não-diabéticos. A membrana homogênea não foi reconhecida como corpo estranho inclusive foi incorporada ao novo osso formado. Observa-se, também, que algumas lacunas osteocíticas ou espaços medulares no interior da membrana estavam preenchidas por células, mas não havia presença de células multinucleadas do tipo fagocitárias. A membrana homogênea cumpriu o papel na regeneração óssea guiada, permaneceu sobre o defeito aos 60 dias, não impedindo a neoformação e remodelação óssea abaixo dela, pelo contrário, manteve-se incorporada durante todo o processo. Houve atraso no processo de cicatrização tanto no grupo diabético quanto no não-diabético com o uso de membranas, mas os defeitos foram preenchidos com osso autógeno e cabe discussão. É importante enfatizar que qualquer material colocado num defeito ósseo interfere com o processo de reparo tecidual. Ambas as membranas instaladas sobre o defeito ósseo apresentaram respostas satisfatórias com relação à qualidade da neoformação óssea, se comparadas ao não uso, em ambos os grupos, o que indica excelente resultado.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pelo presente estudo, pode-se concluir que:

1. A qualidade da neoformação óssea foi satisfatória tanto nos ratos diabéticos quanto nos não-diabéticos com o uso das membranas, apesar de ambas as membranas terem proporcionado atraso no reparo ósseo se comparado ao não uso.
2. A membrana homogênea estudada mostrou excelente biocompatibilidade, foi incorporada ao novo osso formado nos períodos tardios e foi bem sucedida na regeneração óssea guiada, tanto nos ratos diabéticos como nos não-diabéticos.

REFERÊNCIAS

1. Maitra A. O Sistema Endócrino. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran. *Bases patológicas das doenças*. 8^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010:1138-54.
2. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 2007;117(5):1219-22.
3. Grandini SA: The effect of parcial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent to tooth extraction. Histologic study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;45(2):190-9.
4. Iacopino AM: Diabetic periodontitis: possible lipid induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Dis* 1995;1(4): 214-29.
5. Lalla RV, D' Ambrosio JA: Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2001;132(10):1425-32.
6. Rosenberg CS: Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurs Clin North Am* 1990;25(1):247-61.
7. Hines KM, Ashfaq S, Davidson JM, Opalenik SR, Wikswo JP, McLean JA. Biomolecular signatures of diabetic wound healing by structural mass spectrometry. *Anal Chem* 2013;85(7):3651-9.

8. Ruedi TP, Basset CAL: Repair and remodeling in milipore isolated defects in cortical bone. *Acta Anat* 1967;68:509-531.
9. Dahlin C: Scientific background of guided bone regeneration. In: Buser, D. *Guided bone regeneration – In: Implant Dentistry*. Chicago: Quintessence Publishing, 1994:31-48.
10. Bell WH: Current concepts of bone grafting. *J. Oral Surg* 1968;26(2):118-24.
11. Stroud SW, Fonseca RJ, Sanders GW, Burkers Jr EJ: Healing of interpositional autologous bone grafts after total maxillary osteotomy. *J. Oral Surg* 1980;38(12):878-85.
12. Fonseca RJ, Clark PJ, Burkes Jr EJ, Baker RD: Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primates. *J. Oral Surg* 1980;38(8):572-7.
13. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9(1):13-29.
14. Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol* 1993;64(11):1157-65.

15. Esteves JC; Aranega AM; Borrasca AG; Fattah CM; Garcia-Júnior IR. Repair process of surgical defects filled with autogenous bone grafts in tibiae of diabetic rats. *J Appl Oral Sci* 2008;16(5):316-20.
16. Zellin G, Gritli-Linde A, Linde A: Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials* 1995;16:601-609.
17. Schliephake H et al. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. *Clinical Oral Implants Research* 2000;11: 230-241.
18. Notice JR. FH, Machado MAN, Stefani CM, Sallum EA, Sallum AW. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs. Part I. A clinical investigation. *Clinical Oral Research* 2001-a;12(2):115-120.
19. Notice JR. FH, Machado MAN, Stefani CM, Sallum EA. Absorbable versus nonabsorbable membranes and bone grafts in the treatment of ligature-induced peri-implantitis defects in dogs: A Histometric Investigation. *The international Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2001;16(5):646-652.
20. Sandberg E, Dahlin C, Linde A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: An experimental study in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993;51:1106-1114.

- 21 – Borrasca AG. Processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas preenchidas ou não com osso autógeno e recobertas por membrana de matriz óssea homogênea em diabéticos. Análise histomorfométrica em tibia de ratos. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2007.
22. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* 1988;81(5):672-6.
23. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1990; 24(1):13-9.
24. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1989;4:19-25.
25. Dahlin C, Johansson A, Hoffman M, Molenberg A. Early biocompatibility of poly (ethylene glycol) hydrogel barrier materials for guided bone regeneration. An in vitro study using human gingival fibroblasts (HGF-1). *Clin Oral Implants Res* 2014; 25(1):16-20.
26. Buser D, Chappuis V, Kuchler U, Bornstein MM, Wittneben JG, Buser R, et al. Long-term Stability of Early Implant Placement with Contour Augmentation. *J Dent Res* 2013; 92:176S-182S originally published online 24 October 2013.
27. Zhao S, Pinholt EM, Madsen JE, Donath K. Histological evaluation of different biodegradable and non-biodegradable membranes implanted subcutaneously in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2000;28:116-122.

28. van Leeuwen AC, Huddleston Slater JJR, Gielkens PFM, De Jong JR, Grijpma DW, Bos RRM. Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly(trimethylene carbonate) barrier membranes. *Acta Biomaterialia* 2012;8:1422–1429.
29. Matsumoto G, Hoshino J, Kinoshita Y, Sugita Y, Kubo K, Maeda H, et al. Evaluation of guided bone regeneration with poly(lactic acid-co-glycolic acid-co- $\hat{\mu}$ -caprolactone) porous membrane in lateral bone defects of the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012; 27(3):587-94.
30. Feighan JE, Davy D, Prewett AB, Stevenson S. Induction of bone by a demineralized bone matrix gel: a study in a rat femoral defect model. *J Orthop Res* 1995;13(6):881-91.
31. Vail TB, Trotter GW, Powers BE. Equine demineralized bone matrix: relationship between particle size and osteoinduction. *Vet Surg* 1994;23(5):386-95.
32. Ono I, Gunji H, Kaneko F, Saito T, Kuboki Y. Efficacy of hydroxyapatite ceramic as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein. *J Craniofac Surg* 1995;6(3):238-44.
33. Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone matrix (DBM) and coral as bone graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;23(6 Pt 2):395-8.

34. Lytle JL. Freeze-dried demineralized bone in dental implant reconstruction. J Calif Dent Assoc 1994;22(5):47-51.
35. Marx RE, Carlson ER: Tissue banking safety: caveats and precautions for the oral and maxillofacial surgeon. J Oral Maxillofac Surg 1993;51(12):1372-9.
36. Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. J Periodontol 1992;63(12):979-83.
37. Pigossi N. Implantação de dura-máter homogêna conservada em glicerina. Estudo experimental em cães. Arq Cirurg Clin Exp 1964;27:213-47
38. Lu H, Kraut D, Gerstenfeld L, Graves D. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. Endocrinology 2003;144:346-52.
39. Rangel-Garcia IJ. Implante homogêno de matriz óssea desmineralizada no espaço subcutâneo dorsal e alvéolo dental: Estudo histológico em ratos. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 1997.
40. Covington DS, Xue H, Pizzini R, Lally KP, Andrassy RJ. Streptozotocin and alloxan are comparable agents in the diabetic model of impaired wound healing. Diabetes Res 1993;23(2):47-53.

41. Anderson et al. End point results of processed heterogenous, autogenous and homogenous bone transplants in the human: a histologic study, clinical orthopedics. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1964.
42. Schenk RK. Regeneração óssea: bases biológicas. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Quintessence, 1996:49-100.
43. Hislop WS, Finlay PM, Moos KF. A preliminary study in to the uses anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. Br J Oral Maxillofac Surg 1993;31:149-153.
44. Rissolo AR, Bennet J. Bone grafting and its essential role in implant dentistry. Dent Clin North Am 1998;42(1):91-116.
45. Zide MF. Autogenous bone harvest and bone compacting for dental implants. Compendium 2000;21(7):585-90.
46. Pallesen L, Aaabo M, Hjorting-Hansen E, Nattestad A, Melsen F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit rabbit calvarium. Int J Oral Maxillofac Implants 2002;17(4):498-506.
47. Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscenced defect sites: a clinical study. Int J Oral Maxillofac Implants 1992;7:233-245.

48. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk R. Evaluation of filling material in membrane protected bone defects. *Clin Oral Implants Res* 1998;9:137-50.
49. Schliephake H, Dard M, Planck H, Hierlemann H, Stern U. Alveolar ridge repair using resorbable membranes and autogenous bone particles with simultaneous placement of implants: An experimental pilot study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2000;15:364-73.
50. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D, Taylor A, Gottlow J, Nyman S. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier: an experimental study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* 1997;8(2):82-89.
51. Sanches MG, Okamoto T, Carvalho ACP. Processo de reparo em feridas de extração dental após implante de osso anorgânico: estudo histológico em ratos. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1972;1(1):83-90.
52. Becker W, Leckholm U, Dahlin C, Becker BE, Donath K. The effect of clinical loading on bone regenerated by GTAM barriers: A study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994;9:305-13.
53. Cotran, R. S. *Inflamação e Reparo*. In: Cotran R. et. al. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 5a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

54. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of Tooth Extraction Sockets in Experimental Diabetes Mellitus. *J Oral Maxillofac Surg* 1996;54:1087-91.

ANEXOS

Anexo - A

Normas para publicação do artigo em revista

JOMI

The International Journal of
ORAL & MAXILLOFACIAL IMPLANTS

GUIDELINES FOR AUTHORS

MANUSCRIPT SUBMISSION

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi
Manuscripts should be uploaded as a Word (doc) file with tables and figures preferably embedded at the end of the document.
No paper version is required.

Acceptable material. Original articles are considered for publication on the condition they have not been published or submitted for publication elsewhere (except at the discretion of the editors). Articles on implant or tissue engineering (TE) basic or clinical research, clinical applications of implant/TE research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant/TE field are invited.

Number of authors. Authors listed in the byline should be limited to four. Secondary contributors can be acknowledged at the end of the article. (Special circumstances will be considered by the editorial chairman.)

Review/editing of manuscripts. Manuscripts will be reviewed by the editorial chairman and will be subjected to blind review by the appropriate section editor and editorial staff consultants with expertise in the field that the article encompasses. The publisher reserves the right to edit accepted manuscripts to fit the space available and to ensure conciseness, clarity, and stylistic consistency, subject to the author's final approval.

Adherence to guidelines. Manuscripts that are not prepared in accordance with these guidelines will be returned to the author before review.

ONLINE ONLY ARTICLES

All technology and case reports will appear in online format only. Articles are listed in the issue's Table of Contents and abstracts are printed in the issue. Full text of articles is available online.

MANUSCRIPT PREPARATION

The journal will follow as much as possible the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Group) in regard to preparation of manuscripts and authorship (Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997;126:36-47). See <http://www.icmje.org>

• **Manuscripts** should be double-spaced with at least a one-inch margin all around. Number all pages. Do not include author names as headers or footers on each page.

• **Title page.** Page 1 should include the title of the article and the name, degrees, title, professional affiliation, and full address of all authors. Phone, fax, and e-mail address must also be provided for the corresponding author, who will be assumed to be the first-listed author unless otherwise noted. If the paper was presented before an organized group, the name of the organization, location, and date should be included.

• **Abstract/key words.** The abstract should include a maximum of 350 words. A list of key words should be provided, not to exceed six. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following four sections: Purpose, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Abstracts of short communications should also be structured but should be a maximum of 250 words. For all other types of articles (ie, literature reviews, technical and case reports), abstracts should not exceed 250 words and need not be structured.

• **Article text.** Currently there is no article page limit (within reason).

• **Acknowledgments.** Persons who have made substantive contributions to the study can be acknowledged at the end of the article. Also specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.

• **Legends.** Figure legends should be typed as a group at the end of the manuscript. Detailed legends are encouraged. For photomicrographs, specify original magnification and stain.

• **Tables.** Each table should be logically organized, typed on a separate page at the end of the manuscript, and numbered consecutively. Table title and footnotes should be typed on the same page as the table.

• **Abbreviations.** The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

• **Trade names.** Generic terms are to be used whenever possible, but trade names and manufacturer name should be included parenthetically at first mention.

• **Numbers.** Per SI convention, authors are requested to use decimal points rather than commas for fractional numbers.

REFERENCES

• All references must be cited in the text, numbered in order of appearance.

• The reference list should appear at the end of the article in numeric sequence.

• Do not include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

• Avoid using abstracts as references.

• Provide complete information for each reference, including names of all authors (up to six). If the reference is to part of a book, also include title of the chapter and names of the book's editor(s).

Journal reference style:

1. Waasdorp J, Reynolds MA. Allogeneic bone only grafts for alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25:525-531.

Book reference style:

1. Wikesjo UME, Hanisch O, Sigurdsson TJ, Caplanis N. Application of rhBMP-2 to alveolar and periodontal defects. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE (eds). *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Chicago: Quintessence, 1999:269-286.

ARTICLE ACCEPTANCE

Article acceptance is pending receipt of images judged to be of sufficient quality for publication (see the guidelines below). Once a manuscript is accepted, authors should submit high-resolution digital image files (by email or on disk) to:

Managing Editor

JOMI
Quintessence Publishing Co, Inc
4350 Chandler Drive
Hanover Park, IL 60133

Email: jomi.submit@quintbook.com

The disk/package should be labeled with the first author's name, shortened article title, and article number.

DIGITAL IMAGES/ACCEPTED ARTICLES

When preparing final images to send, consider the following points:

- Resolution must be at least 300 dpi when the image is 3 inches wide.
- Images saved in TIFF format are preferred, but JPG or EPS files are acceptable.
- Images grouped together must be saved as individual files.
- Images containing type should either be saved as a layered file or provided along with a second file with type removed.
- Line art (graphs, charts, drawings) should be provided as vector art (AI or EPS files)
- Please do not embed images into other types of documents (eg, Word, Excel, PowerPoint, etc).

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and can be uploaded as a separate document with the article submission, or it can be mailed (see address above) or faxed (830-736-3634) to the JOMI Managing Editor.

PERMISSIONS AND WAIVERS

- Permission of author and publisher must be obtained for the direct use of material (text, photos, drawings) under copyright that does not belong to the author.
- Waivers must be obtained for photographs showing persons, otherwise faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Managing Editor (830-736-3634).

REPRINTS

Reprints can be ordered from the publisher. Authors receive a 40% discount on quantities of 100 or 200.

Anexo – B**Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)**

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Análise histológica e histomorfométrica do processo de reparo ósseo em defeitos ósseos preenchidos com osso autógeno e recobertos por membrana de matriz óssea homogênea ou por membrana de politetrafluoretileno em ratos diabéticos" sob responsabilidade do Pesquisador **ELIO HITOSHI SHINOHARA** e colaboração de Alessandra Marcondes Aranega, Juliana Zorzi Colete e Carlos Alberto Timóteo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o protocolo **2012-01099**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Histological and histomorphometric analysis of the process of bone repair with autogenous bone graft covered with homogenous bone matrix membrane or expanded polytetrafluoroethylene membrane in diabetic rats", protocol number **2012-01099**, under responsibility of **ELIO HITOSHI SHINOHARA** and with collaboration of Alessandra Marcondes Aranega, Juliana Zorzi Colete and Carlos Alberto Timóteo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Ervolino
CEUA Vice-Coordenador

Anexo – C - Fotografias das lâminas histológicas

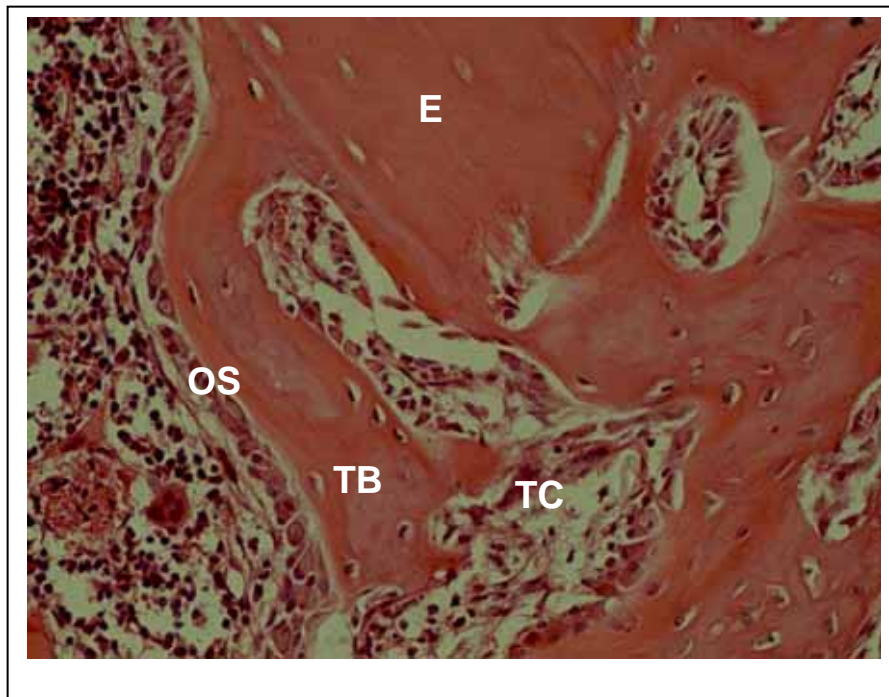


Figura 1 - ICSM10 – Enxertos ósseos (E) estão sendo incorporados por meio de trabéculas (TB) neoformadas. Camada de osteoblastos bem organizada (OS). O tecido conjuntivo entre as trabéculas contém fibras colágenas ainda em organização, com fibroblastos, células inflamatórias, especialmente, macrófagos e linfócitos. H.E. Original 40X.

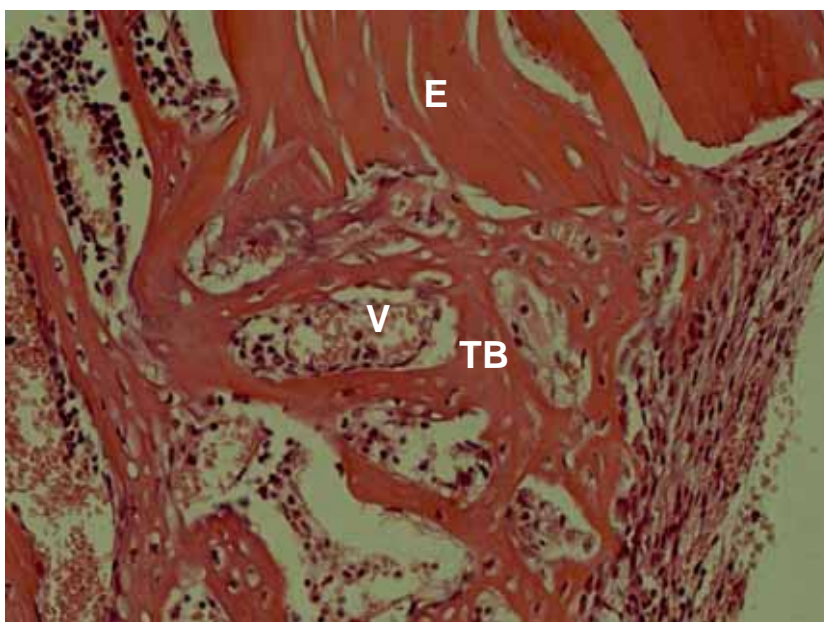


Figura 2 - IIDS M10 – Enxertos ósseos (E) estão sendo incorporados por meio de trabéculas ósseas mais finais. O tecido conjuntivo contém fibras colágenas finas e grande quantidade de vasos neoformados. H.E. Original 40X.

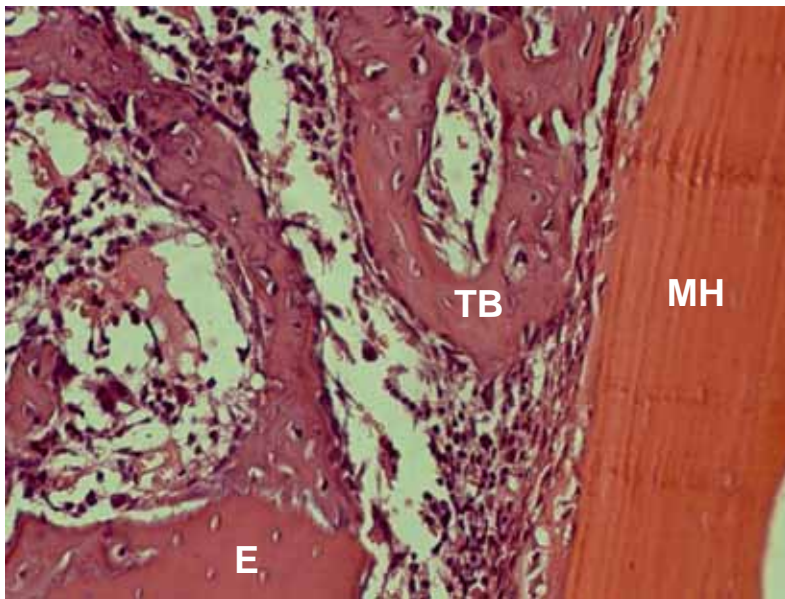


Figura 3 – ICMH10 – A membrana homogênea (MH) recobre a cavidade e o enxerto ósseo (E) está sendo incorporado por meio de trabéculas ósseas delgadas. H.E. Original 40X.

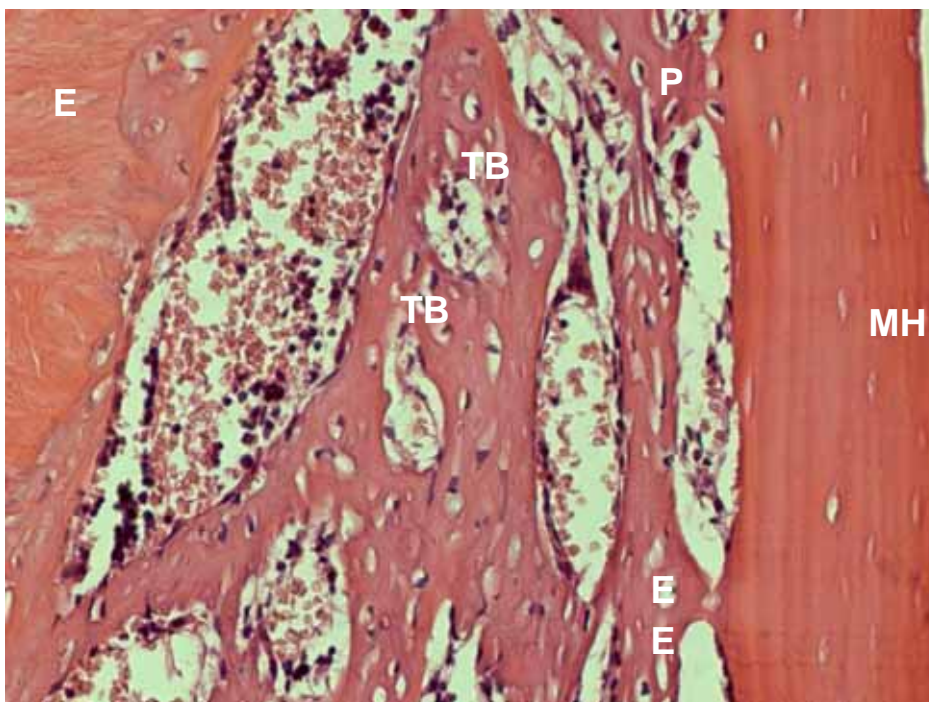


Figura 4 – IIDMH10 – A membrana homogênea (MH) recobre a cavidade e está sendo incorporada às trabéculas ósseas neoformadas (TB) por pontes ósseas (P) e os enxertos ósseos (E) estão sendo incorporados por meio de trabéculas ósseas delgadas. H.E. Original 40X.

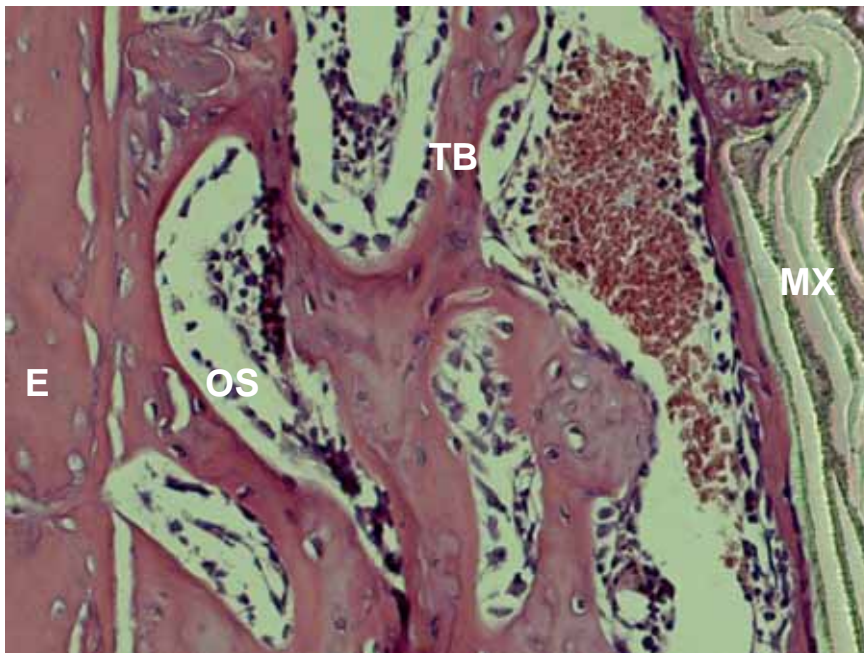


Figura 5 – ICMX10 – A membrana de PTFe (MX) recobre a cavidade e está sendo justaposta ao trabeculado neoformado. Os enxertos ósseos (E) estão sendo incorporados por meio de trabéculas ósseas delgadas (TB). Camada de osteoblastos (OS) em organização. H.E. Original 40X.

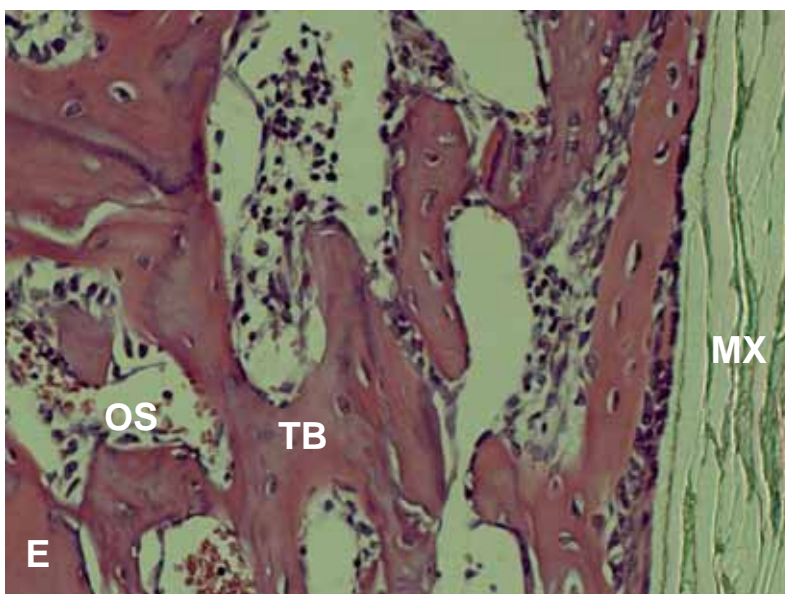


Figura 6 – IIDMX10 – A membrana de PTFe (MX) recobre a cavidade e está sendo justaposta ao trabeculado neoformado. Os enxertos ósseos (E) estão sendo incorporados por meio de trabéculas ósseas delgadas (TB). Camada de osteoblastos (OS) sem organização. H.E. Original 40X.

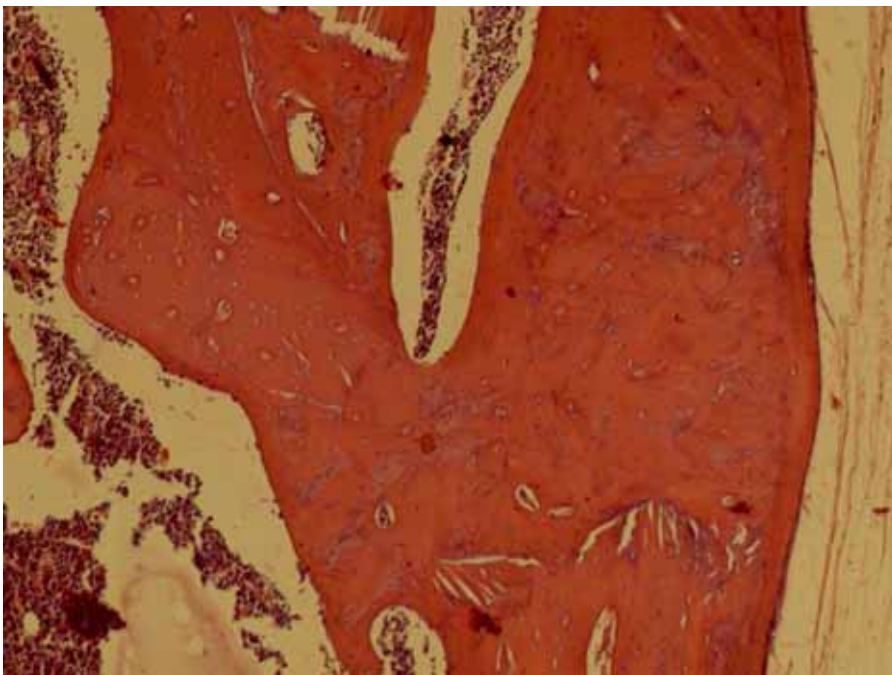


Figura 7 – ICSM60 – Fechamento da cavidade com tecido ósseo maduro, estando os enxertos ósseos incorporados. H.E. Original 12,5X.

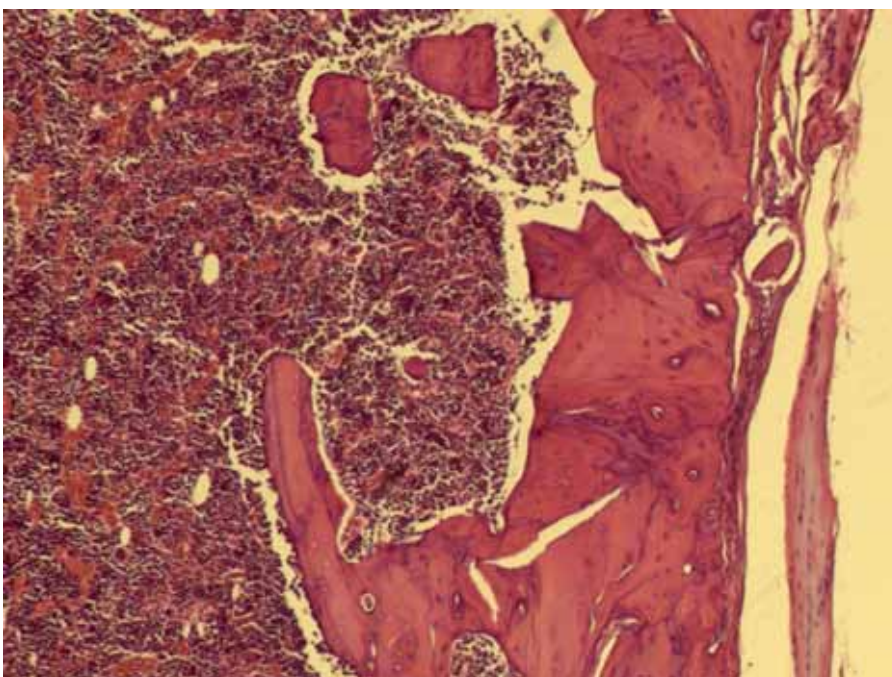


Figura 8 – IIDSM60 – Fechamento da cavidade com tecido ósseo pouco espesso e em processo de remodelação, estando os enxertos ósseos sendo incorporados. H.E. Original 12,5X.

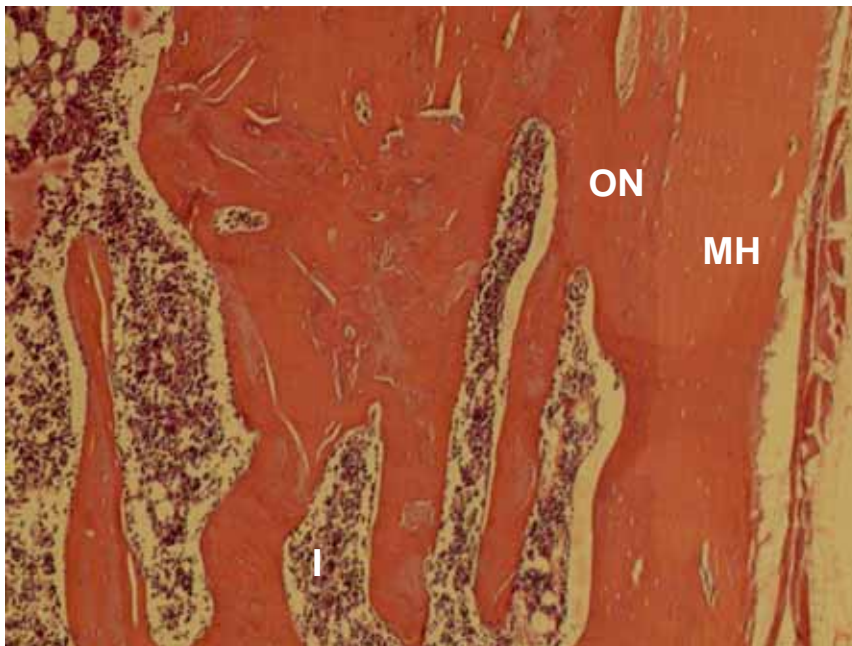


Figura 9 – ICMH60 – Superficialmente, a membrana homogêna (**MH**) recobre a ferida e é incorporada ao osso neoformado (**ON**). Permanência de espaços intertrabeculares (**I**) amplos abaixo da área obliterada. H.E. Original 12,5X.

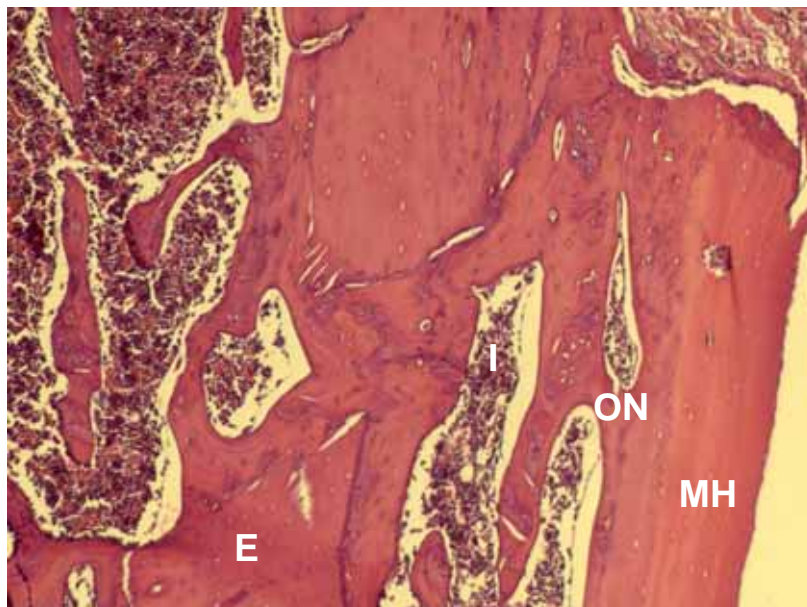


Figura 10 – IIDMH60 – Superficialmente, a membrana homogêna (**MH**) recobre a ferida e é incorporada ao osso neoformado (**ON**). Permanência de espaços intertrabeculares (**I**) amplos abaixo da área obliterada e fragmentos dos enxertos ósseos (**E**) em processo de incorporação e remodelação. H.E. Original 12,5X.

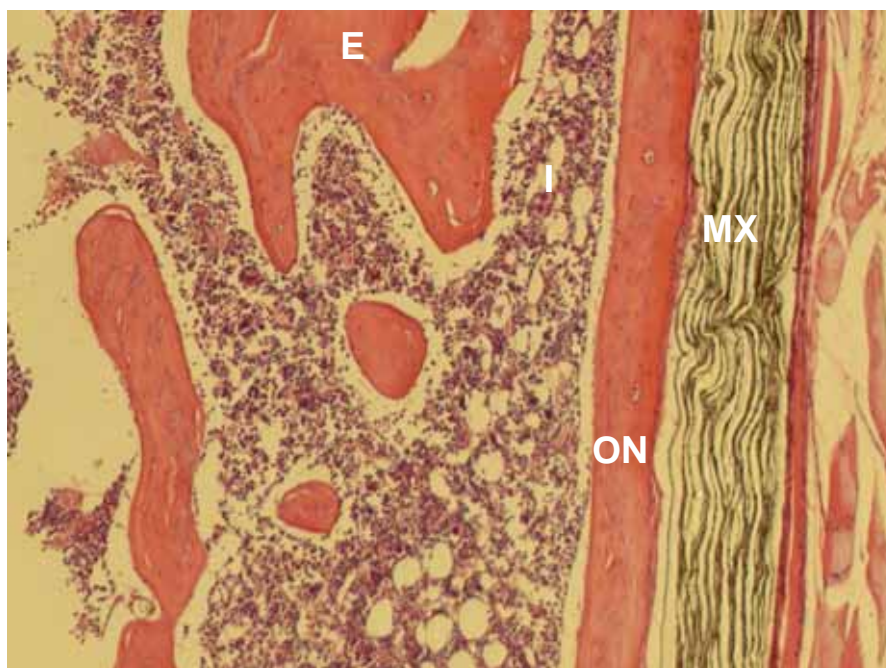


Figura 11 – ICMX60 – Superficialmente, a membrana de PTFe (**MX**) recobre a ferida e está justaposta ao osso neoformado (**ON**). Permanência de espaços intertrabeculares (**I**) amplos abaixo da área obliterada e fragmentos dos enxertos ósseos (**E**) em processo de incorporação e remodelação. H.E. Original 12,5X.

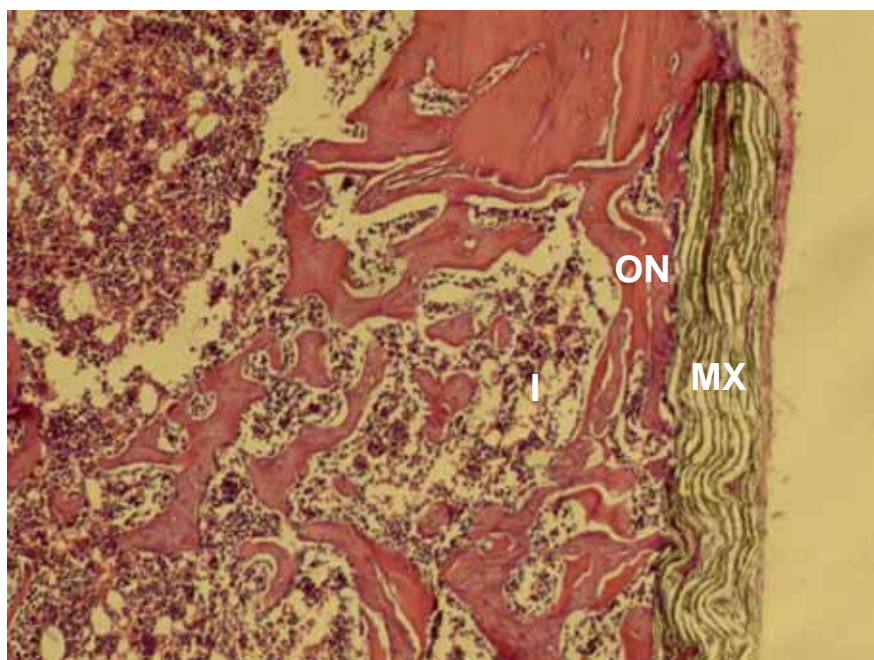


Figura 12 – IIDMX60 – Superficialmente, a membrana de PTFe (**MX**) recobre a ferida e abaixo dela há trabéculas ósseas finas (**ON**). Permanência de espaços intertrabeculares (**I**) amplos abaixo da área obliterada. H.E. Original 12,5X.

Anexo – D

Ilustrações da fase cirúrgica da metodologia experimental



Figura 13 – Ratos machos com peso aproximado de 250 gr



Figura 14 - Cloridrato de xilazina
Cloridrato de cetamina



Figura 15 - Anestesia intramuscular



Figura 16 – Tíbia Tricomizada
e antissépsia realizada



Figura 17 – Incisão



Figura 18 – Exposição da tíbia



Figura 19 – Cavidade na tíbia

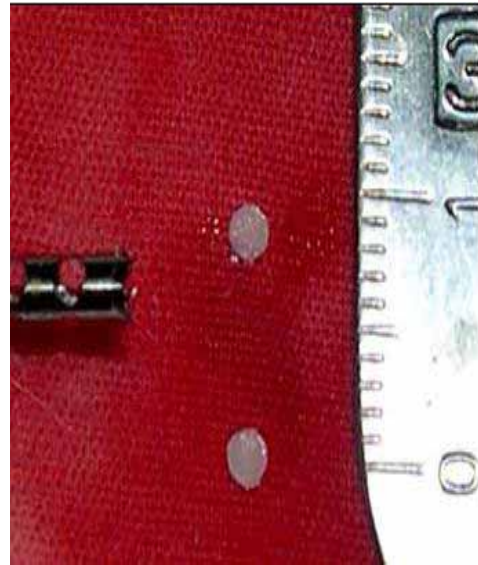


Figura 20 – Osso autógeno colhido



Figura 21 – Tíbia esquerda preenchida



Figura 22 – Membrana na posição/sutura



Figura 23 – Sutura finalizada



Figura 24 – Penicilina G benzatina
(20.000 U.I.).



Figura 25 – Calvária

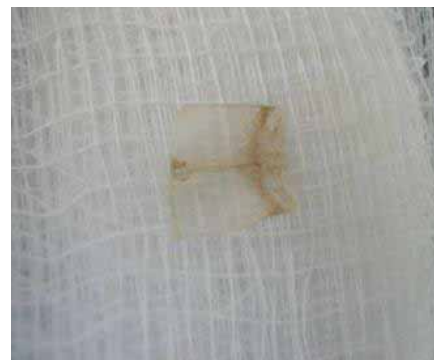


Figura 26 – Membrana homogêna



Figura 27 – Cilindros ajustáveis



Figura 28 – Produtor membrana sintética



Figura 29 – Estreptozotocina

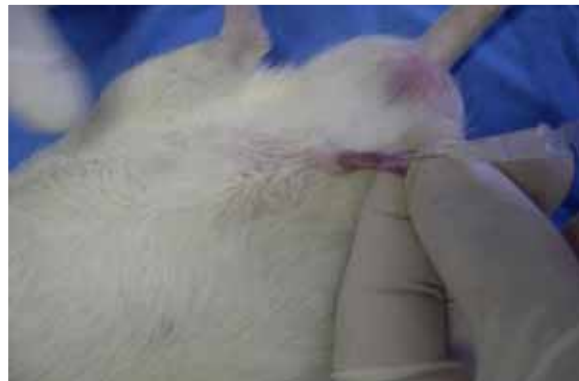


Figura 30 – Aplicação de Estreptozotocina na veia peniana



Figura 31 - Sistema de monitorização Automática de glicemia – Accu-Chek Advantage.

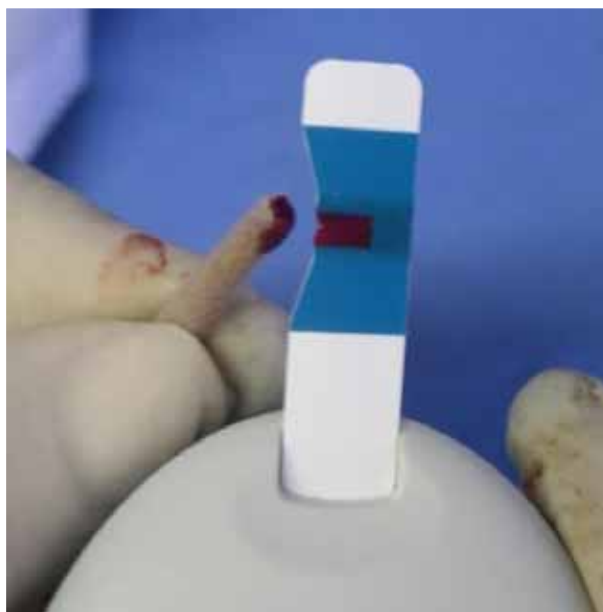


Figura 32 – Coleta de sangue / tira de teste



Figura 33 – Determinação da glicemia

Anexo – E

Ilustrações da análise histométrica

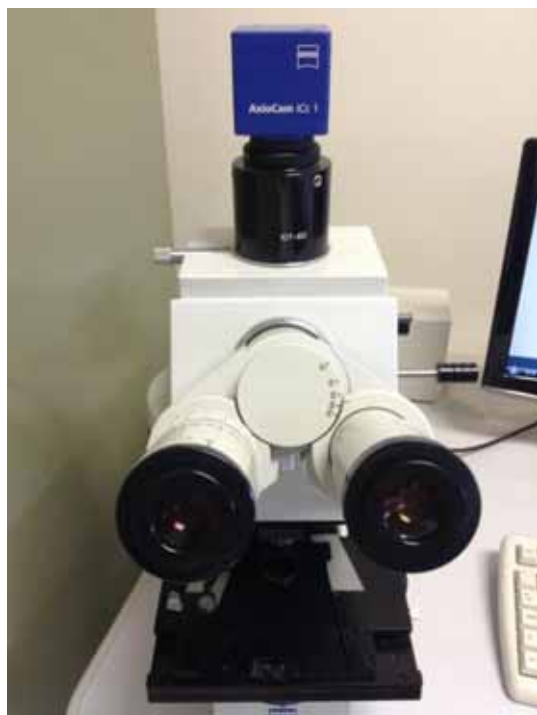


Figura 34 - Câmara acoplada ao microscópio

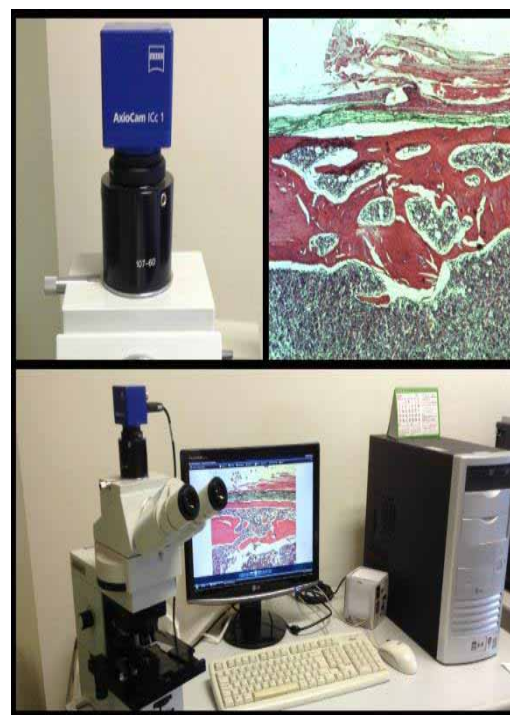


Figura 35 - Equipamento para captura

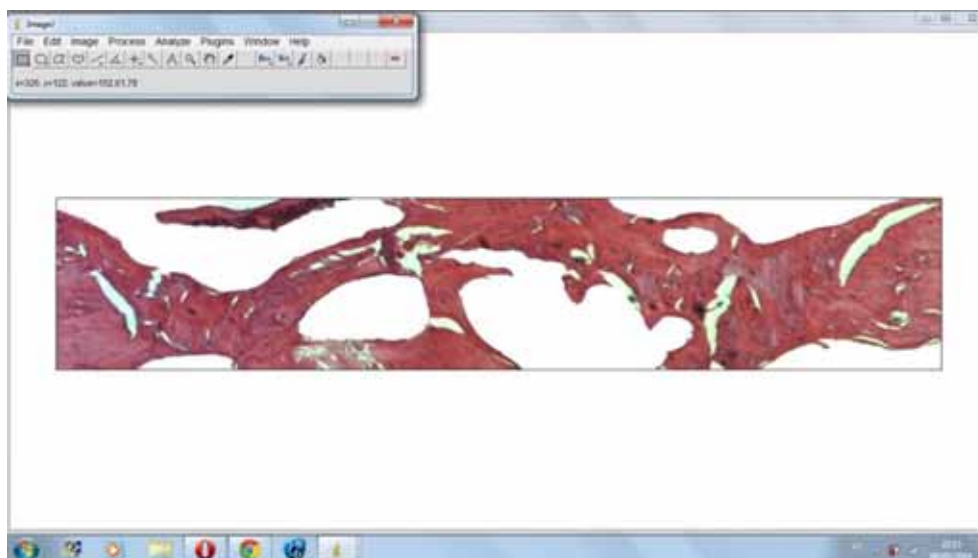


Figura 36 - Mensuração 1

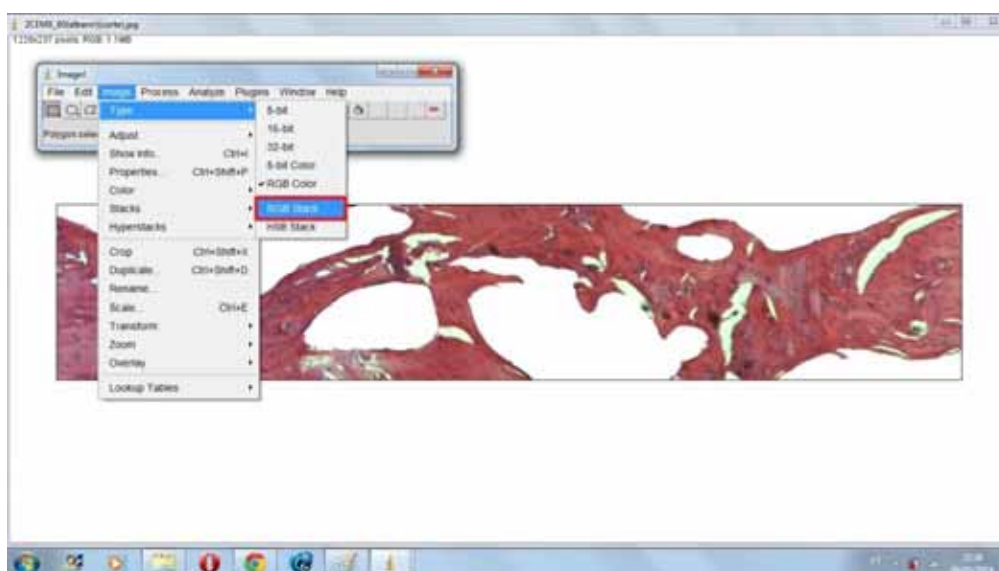


Figura 37 - Mensuração 2

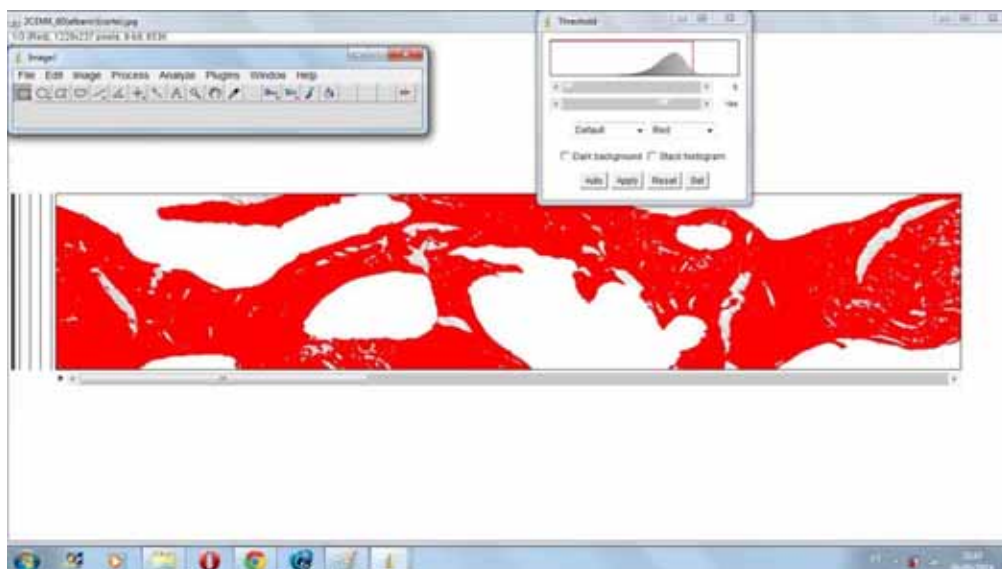


Figura 38 - Mensuração 3

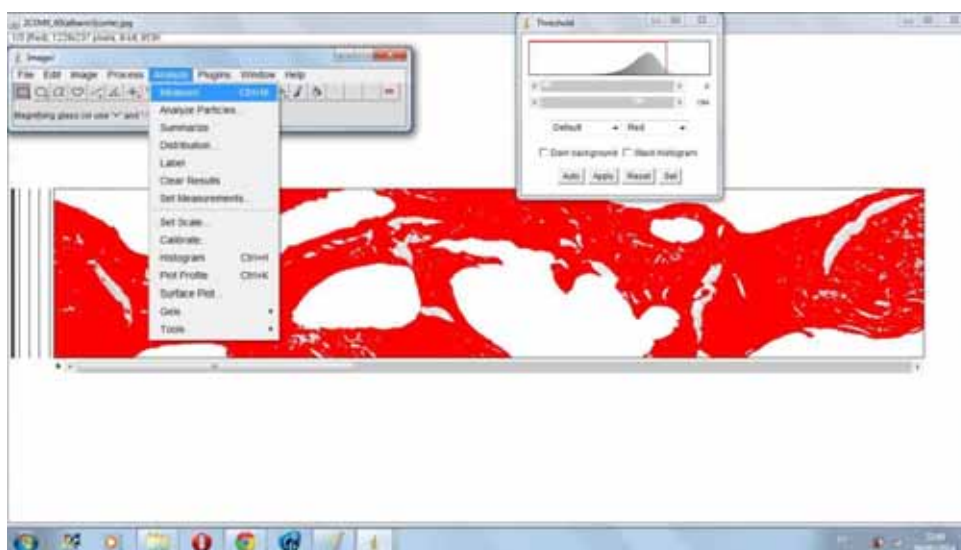


Figura 39 - Mensuração 4



Figura 40 - Mensuração 5



Figura 41 - Microscópio acoplado ao PC

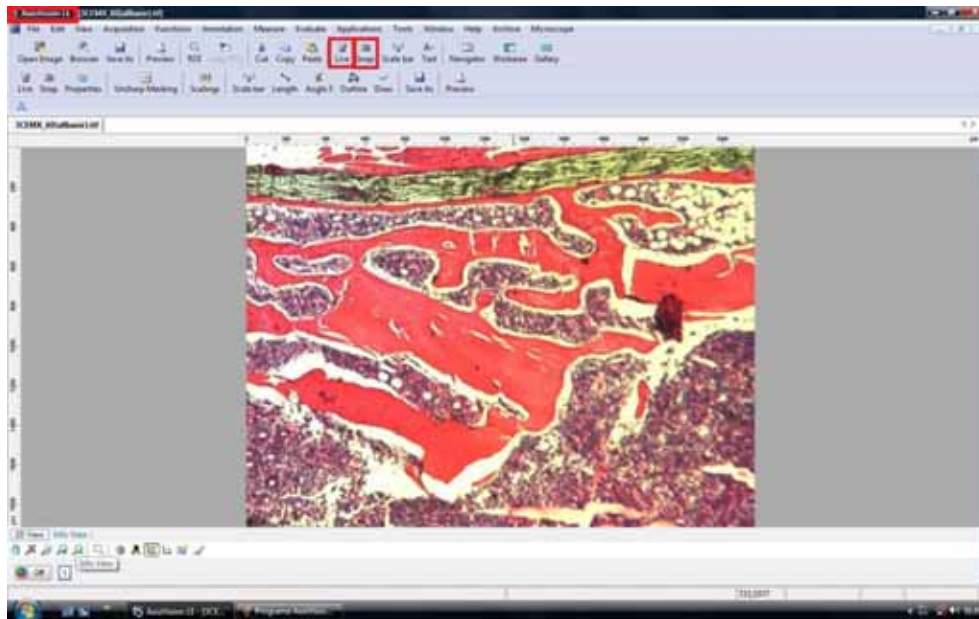


Figura 42 - Programa AxioVisionLE-aul

Anexo - F

Tabelas da análise estatística

Tabela 1. Grupos diabético e não-diabético sem membrana (SM), com membrana homogênea (MH) e com membrana sintética (MX) nos experimentos aos 10 dias – médias das amostras

Grupos estatísticos					
	<u>Grupos</u>	<u>N</u>	<u>Média</u>	<u>Desvio padrão</u>	<u>Erro padrão da média</u>
<u>SM_10</u>	<u>Não Diabético</u>	<u>10</u>	<u>55,3811</u>	<u>12,70354</u>	<u>4,01721</u>
	<u>Diabético</u>	<u>15</u>	<u>60,066</u>	<u>7,03695</u>	<u>1,81693</u>
<u>MH_10</u>	<u>Não Diabético</u>	<u>8</u>	<u>51,7631</u>	<u>8,49405</u>	<u>3,0031</u>
	<u>Diabético</u>	<u>9</u>	<u>46,5067</u>	<u>12,83629</u>	<u>4,27876</u>
<u>MX_10</u>	<u>Não Diabético</u>	<u>10</u>	<u>52,699</u>	<u>6,12055</u>	<u>1,93549</u>
	<u>Diabético</u>	<u>11</u>	<u>52,4175</u>	<u>7,60696</u>	<u>2,29358</u>

Tabela 2. Grupos diabético e não-diabético sem membrana (SM), com membrana homogênea (MH) e com membrana sintética (MX) nos experimentos aos 60 dias – médias das amostras

Grupos Estatísticos					
	<u>Grupos</u>	<u>N</u>	<u>Média</u>	<u>Desvio padrão</u>	<u>Erro padrão da média</u>
<u>SM_60</u>	<u>Não Diabético</u>	<u>9</u>	<u>73,0499</u>	<u>8,31279</u>	<u>2,77093</u>
	<u>Diabético</u>	<u>9</u>	<u>59,7144</u>	<u>11,22828</u>	<u>3,74276</u>
<u>MH_60</u>	<u>Não Diabético</u>	<u>9</u>	<u>72,3139</u>	<u>13,64655</u>	<u>4,54885</u>
	<u>Diabético</u>	<u>10</u>	<u>59,9406</u>	<u>5,06749</u>	<u>1,60248</u>
<u>MX_60</u>	<u>Não Diabético</u>	<u>9</u>	<u>57,5159</u>	<u>10,65465</u>	<u>3,55155</u>
	<u>Diabético</u>	<u>9</u>	<u>52,0864</u>	<u>12,32352</u>	<u>4,10784</u>

Tabela 3. Comparação entre os grupos diabéticos e não-diabéticos nos experimentos aos 10 e 60 dias sem membrana (SM), com membrana homogênea (MH) e com membrana sintética (MX).

Tratamento	Grupos		Valor de P
	Não Diabéticos Média (DP)	Diabéticos Média (DP)	
SM 10	55,4 (12,7)	60,1 (7,0)	0,177
MH 10	51,7 (8,5)	46,5 (12,8)	0,321
MX 10	52,7 (6,1)	52,4 (7,6)	0,654
SM 60	73,0 (8,3)	59,7 (11,2)	0,011*
MH 60	72,3 (13,6)	59,9 (5,0)	0,043*
MX 60	59,7 (7,6)	52,1 (12,3)	0,243

Tabela 3. Os valores de P são para comparação entre os dois grupos. Teste U de Mann-Whitney foi utilizado para variáveis contínuas. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão.*P<.05; **P<.001.