

ALBANIR GABRIEL BORRASCA

**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 tíbia de ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Câmpus de Araçatuba - Unesp, para a obtenção do Grau
de “Mestre em Odontologia” - Área de Cirurgia e
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Marcondes Aranega

ARAÇATUBA - SP

- 2007 -

Dedicatória

A Deus, por estar sempre ao meu lado dando-me força, paciência e iluminando meu caminho..

Aos meus pais, Ivani e Albanir "in memoriam", pelo amor, compreensão e dedicação, vocês foram os responsáveis diretos pela minha educação e formação. Muito obrigado por vocês sempre acreditarem em mim!

Eu amo vocês!

Ao meu irmão, André, um ser humano especial, exemplo de luta e confiança em Deus, uma alma maravilhosa. Obrigado pelo estímulo e presença nas dificuldades e conquistas.

A minha irmã, Silvana in "memoriam", pelo grande amor e carinho que nos sempre dedicou.

A minha namorada, Taísa, por todo o seu amor, apoio e compreensão, especialmente nos momentos de ausência. Você foi muito importante para a conquista de mais esta vitória.

Eu te amo e te admiro muito!

*Obrigado por me fazer
tão feliz!*

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Professor Doutor **Oswaldo Magro Filho**, pela convivência, ensinamentos e principalmente pela amizade, confiança, incentivo e por considerar os alunos da pós-graduação seus verdadeiros amigos, sempre se preocupando conosco e dividindo inúmeros momentos de alegria.

À minha orientadora, 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, contribuindo marcadamente para a minha formação. Muito obrigado pela paciência e confiança em mim depositada e por ter acreditado em mim e ter me proporcionado a realização de um grande sonho.
Você é muito especial! Essa vitória é nossa.

Ao Professor **Idelmo Rangel Garcia Júnior**, um exemplo de equilíbrio e humildade. Agradeço-lhe por ter me acolhido, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos valiosos que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigado pelo aprendizado e pela oportunidade de convivência.

Ao Professor, **Edmur Aparecido Callestini**, a serenidade como orienta seus alunos lhe é peculiar. Muito obrigado pela amizade, conselhos e por seus ensinamentos, os quais foram fundamentais para a minha formação. Você mora no meu coração. "Bons professores educam para uma profissão, professores fascinantes educam para a vida" (Augusto Cury)

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.

Às Faculdades Adamantinenses Integradas – FAI na figura de meus professores e queridos amigos de graduação, essa conquista também é de vocês, pois foi aí que tudo começou.

Ao professor Michel Saad Neto. O senhor é um exemplo concreto e marcante do que é “ser professor”. Aos professores Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah, Tetuo Okamoto e Roberta Okamoto pelos ensinamentos, conselhos e disponibilidade.

Aos professores da Clínica Integrada: Celso Koogi Sonoda, Daniela Brandini, Wilson Roberto Poi e Sônia Regina Panzarini pela atenção e carinho.

Ao amigo Professor, Fellippo Ramos Verri, pela amizade, incentivo, torcida e principalmente pelo apoio nos momentos de dificuldade. Um grande irmão!

Aos colegas do Curso de pós-graduação pela amizade, aprendizado e convivência: Franciley Ávila de Souza, Jéssica Lemos Gulinelli, Thallita Pereira Queiroz, Camila Benez Ricieri, Flávia Priscila Pereira, Marcos Heidy Guskuma (Marcão), Abrahão, Rodolfo, Paulo Faria, Eleonor Álvaro Garbin Junior, André Dotto Sottovia, Leandro de Carvalho Cardoso, Walter Betoni Junior,

Carolina Chiantelli Cláudio e Thaís Silveira Rodrigues. Obrigado pelos momentos agradáveis compartilhados.

Ao amigo Jonatas Caldeira Esteves pela equipe que formamos junto com a Professora Alessandra, o meu muito obrigado.

Não poderia esquecer da nossa querida Cleide, meu muito obrigado pela ajuda nos momentos de dificuldade. Você é muito especial para mim.

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

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp: Ana Cláudia, Izamar, Cláudio, Ivone, Cláudia, Luzia, Marina, Ana Paula, Fernando e Cláudio Junior, pela atenção e disposição com que nos atendem.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp: Marina, Valéria e Diogo que sempre nos auxiliam com boa vontade e alegria.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior), pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa e a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

.... Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde.

E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.

Dalai Lama

Lista de Abreviaturas

%	Porcentagem
g	Grama
M	Mol
pH	Potencial de hidrogênio iônico
mg	Miligrama
dl	Decilitro
ml	Mililitro
nº	Número
mm	Milímetros
UI	Unidade Internacional
HE	Hematoxilina e eosina
AT	Área total
AON	Área de osso neoformado
ICG10D	Grupo controle coágulo aos 10 dias
ICG30D	Grupo controle coágulo aos 30 dias
IIDG10	Grupo diabético coágulo aos 10 dias
IIDG30	Grupo diabético coágulo aos 30 dias
ICE10D	Grupo controle enxerto aos 10 dias
ICE30D	Grupo controle enxerto aos 30 dias
IIDE10D	Grupo diabético enxerto aos 10 dias
IIDE30D	Grupo diabético enxerto aos 30 dias

Sumário

Resumo	10
Abstract	10
1 Introdução	11
2 Proposição	12
3 Material e Método	12
4 Resultados	14
4.1 - Figuras resultados histológicos	17
4.2 - Tabela resultado estatístico	21
5 Discussão	23
6 Conclusão	25
Referências	26
Anexos	29
Anexo A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)	30
Anexo B - Normas para publicação	31
Anexo C - Ilustrações da fase cirúrgica da metodologia experimental	34
Anexo D - Ilustrações da análise histométrica	40
Anexo E - Tabelas estatísticas	46
Anexo F - Figuras	52

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 tíbia de ratos

Process of bone repair of surgical cavities filled out or not with autogenous bone and covered by a membrane of a demineralized homogenous bone matrix in diabetics. Histomorphometric evaluation in tibia of rats.

Albanir Gabriel Borrasca¹/Alessandra Marcondes Aranega²/Osvaldo Magro Filho³/Idelmo Rangel Garcia Júnior⁴

¹Aluno de Mestrado 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.

⁴Professor Doutor do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

RESUMO

Proposição: O objetivo deste trabalho foi avaliar, qualitativa e quantitativamente, o comportamento da membrana de matriz óssea homogênea desmineralizada e conservada em glicerina no processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas preenchidas com osso autógeno realizadas em tíbias de ratos diabéticos. **Material e Métodos:** Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com aproximadamente 250 gramas divididos em dois grupos: o grupo I (Controle) recebeu injeção de tampão citrato, pela via endovenosa e o grupo II (Diabético) recebeu pela via intravenosa injeção de estreptozotocina dissolvida no tampão citrato para induzir o diabetes. Após controle glicêmico, anestesia, depilação e antisepsia foi realizada uma incisão longitudinal nas regiões antero-laterais de cada tibia. Após exposição das tíbias, duas cavidades cirúrgicas de 2mm de diâmetro foram preparadas com trefina em baixa-rotação refrigerada, uma no membro posterior direito e outra no membro posterior esquerdo, sendo a primeira preenchida com o osso autógeno particulado coletado durante a realização das duas cavidades e a segunda preenchida com coágulo sanguíneo e ambas recobertas pela membrana. Aos 10 e 30 dias pós-operatórios os animais foram eutanaziados e as peças obtidas foram processadas laboratorialmente para a realização de cortes semi-seriados com seis micrômetros de espessura e corados pela hematoxilina e eosina para análise histomorfométrica. **Resultados e Conclusão:** Concluiu-se que a reparação óssea foi maior com o emprego dos enxertos ósseos no grupo controle, embora as diferenças não foram estatisticamente significantes em nenhum período estudado e que, aos 30 dias, o processo de reparo das tíbias preenchidas por enxerto do grupo controle foi qualitativamente mais favorável que das tíbias sob o mesmo tratamento do grupo diabético embora tais diferenças não tenham sido estatisticamente significantes e a membrana foi biocompatível em todos os grupos analisados.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes mellitus, transplante homólogo, transplante autólogo, regeneração tecidual guiada

ABSTRACT

Purpose: The aim of this study was to evaluate histomorphometric the behavior of membrane of a demineralized homogenous bone matrix and preserved in glycerin in the process of bony repair of surgical cavities filled out with autogenous bone accomplished in tibias of diabetic rats. **Materials and Methods:** Forty male rats weighing approximately 250 g were selected and assigned to two groups, as follows. Group I (Control) received a citrate buffer injection intravenously while Group II (Diabetic) received an intravenous injection of streptozotocin dissolved in citrate buffer to induce diabetes. After glycemic control, anesthesia, shaving and antisepsis, a longitudinal incision was made in the anterolateral areas of each tibia. After exhibition of the tibias, two surgical cavities of 2mm of diameter were prepared with trefina in refrigerated low-rotation, one in the right posterior member, other in the left subsequent member, being the first filled out with particulate autogenous bone collected during the accomplishment of the two cavities and second filled out with sanguine coagulum and both covered with the membrane. Ten and thirty days postoperatively, the animals were euthanized and the anatomical pieces were submitted to routine laboratorial processing and serially sectioned to obtain 6- μ m-thick sections, which were stained by hematoxylin and eosin for histomorphometric analysis. **Results and Conclusions:** We concluded in the ended of the bony repair was larger with the employment of the bone grafts in the group control, although the differences don't have statistics significance in any studied period and that to the 30 days, the process of repair of the tibias filled out by graft of the group control it was more favorable quality than of the tibias under the same treatment of the diabetic group although such differences have not been statistics significance and the membrane was biocompatible in all the analyzed groups.

KEYWORDS: Diabetes mellitus, homologous transplantation, autologous transplantation, guided tissue regeneration.

INTRODUÇÃO

O diabetes é uma das moléstias mais comumente encontradas na população em geral^{1,2}. Com a crescente longevidade, obesidade e o sedentarismo do indivíduo, a prevalência da doença tem aumentado constantemente³, o que significa que a possibilidade da assistência odontológica de pacientes com tal enfermidade é cada vez maior.

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 lesado⁴.

A insulina possui um papel crítico na regulação da glicose no sangue. A deficiência desse hormônio provoca alterações no metabolismo dos carboidratos, envolvendo secundariamente o metabolismo das proteínas e lipídeos⁵. 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^{6,7}. Isso justifica o maior risco de complicações das feridas dos pacientes diabéticos, principalmente dos não controlados, quando comparado aos pacientes normais⁸. Portanto, cuidados que favoreçam ou não prejudiquem ainda mais o processo de reparação dos tecidos são fundamentais para os indivíduos portadores do diabetes.

A procura por um substituto ósseo capaz de suprir às 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. Diversas são as possibilidades relatadas na literatura, dentre elas podemos citar os enxertos autógenos intra e extra-bucais, os enxertos alógenos, xenógenos e os implantes aloplásticos, sem ou com a utilização de membranas para regeneração óssea guiada^{9,10}.

Em função da superior compatibilidade tecidual, o melhor material para reconstrução dos defeitos ósseos é o enxerto ósseo autógeno por apresentar resposta inflamatória mínima, angiogênese e osteogênese em períodos mais recentes, além de possuir propriedades osteoindutivas^{11,12,13}.

Visando minimizar a reabsorção do enxerto, manter ou aumentar o contorno ósseo e prevenir a migração ou a proliferação de tecidos menos especializados para área em processo de reparação óssea,^{9,10} têm sido empregadas membranas de diversos materiais, reabsorvíveis ou não reabsorvíveis, sendo a biocompatibilidade uma das características mais almejadas para sua escolha.^{14,15}

Tecido ósseo de origem bovina e humana têm sido atualmente desmineralizados, conservados^{16,17} e comercializados em várias formas para a correção dos defeitos ósseos em cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial^{18,19,20}. Há uma crescente procura pelos enxertos alógenos, fornecidos em diversas formas e arquiteturas, como enxertos corticais, medulares ou ambos. Tais enxertos possuem características de osteocondução e de osteoindução, conforme o modo de preparação e conservação e apresentam como vantagem a ausência de dano ao sítio doador, a otimização do tempo cirúrgico e podem ser obtidos sem limitação de quantidade de material^{18,19,20}.

O processo de obtenção da matriz óssea, através de ciclos de desmineralização, assegura a conservação do conteúdo protéico e impossibilita a sobrevivência de microorganismos patogênicos, preocupação importante nos dias

atuais, já que a esterilização ou a desinfecção por meio de gases, radiações, calor seco ou úmido interfere na qualidade do tecido a ser implantado^{21,22}. A conservação também possui fundamental importância na proteção celular e na manutenção da vitalidade do tecido e a glicerina parece ser um procedimento eficiente, seguro e passível de ser realizado em qualquer centro, mesmo com poucos recursos técnicos e financeiros²³.

Por ser pouco conhecida a utilização de procedimentos de enxertia óssea associada à regeneração guiada em organismos diabéticos e pelo crescente uso de preparados ósseos de origem homogênea, torna-se relevante avaliar, histomorfometricamente, o processo de reparo ósseo de área enxertada com osso autógeno protegida com membrana de matriz óssea homogênea desmineralizada e conservada em glicerina em animais portadores da enfermidade sistêmica conhecida como Diabetes mellitus.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da membrana

Para a obtenção da membrana foram utilizados 20 animais saudáveis, não incluídos no grupo experimental que foram sacrificados com dose excessiva de anestésico vinte e três dias antes do procedimento. Os roedores doaram suas calvárias, e os ossos foram levados para o ciclo de desmineralização por ação do ácido clorídrico (HCl) a 0,4 mol durante 48 horas, em temperatura variando entre 5° e 10° graus centígrados. A solução descalcificadora foi trocada a cada 24 horas²⁴. 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, separaram-se, 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 centígrados²⁴.

Animais e procedimento cirúrgico

Após aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus Araçatuba, foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, com peso aproximado de 250 gramas, alimentados com ração sólida (Ração Ativada Produtor-Anderson & Clayton S. A.) e água à vontade, exceto nos períodos de jejum. Os animais foram divididos em grupo I (Controle) e grupo II (Diabético), ambos com 20 animais cada, sendo no grupo II realizada a injeção de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) dissolvida em tampão citrato a 0,01M, pH 4,5, em uma concentração de 35mg/Kg na veia peniana dos ratos. A verificação do estado diabético no grupo II foi realizada após cinco dias da administração de estreptozotocina e/ou do tampão citrato e imediatamente antes do sacrifício, por meio de corte da cauda do animal a dois milímetros de sua extremidade distal para coleta de uma gota de sangue levada até as glicofitas acopladas ao dosador glicêmico automático (Accu-Chek Advantage (Roche Diagnostica Brasil Ltda). Os animais incluídos no grupo II apresentavam 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 membro posterior estendidas até o periósteo, 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 no membro posterior direito de aproximadamente 2mm de diâmetro e o osso coletado pela trefina foi particulado e armazenado em soro-fisiológico. Da mesma forma, outra cavidade foi preparada no membro inferior esquerdo e o osso coletado foi também particulado e armazenado. A cavidade cirúrgica do membro esquerdo foi preenchida com coágulo sangüíneo e recoberta pela membrana e a cavidade da tíbia direita foi preenchida com os ossos previamente removidos e recobertos pela membrana. Os tecidos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos simples por meio de fio de nylon 5.0, estabilizando 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 sacrificados aos 10 e 30 dias pós-operatórios por dose excessiva do mesmo anestésico utilizado no procedimento cirúrgico e as peças foram fixadas em formoldeído a 10%.

Preparação dos espécimes e avaliação histomorfométrica

As tíbias obtidas foram submetidas ao processamento laboratorial de rotina para a obtenção de cortes semi-seriados 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 seguiu-se a metodologia de Esteves (2005), na qual utilizou-se o “software” ImageLab 2001 (Diracom 3). Para a captura das imagens dos cortes histológicos, utilizou-se de uma câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada a um microscópio (Carl Zeiss – Axiolab) conectado ao computador, num aumento de 4 vezes . O corte histológico mais centralizado foi selecionado, no sentido longitudinal do defeito cirúrgico de cada animal. Para a análise histométrica, foi realizada a individualização e delimitação da área do defeito correspondente à região da cortical da tíbia. Esta área foi denominada Área Total (AT). Dentro da Área Total (AT), realizou-se a delimitação das áreas correspondentes ao osso neoformado, de cuja subtração da área total obteve-se área de osso neoformado (AON). Sempre usando os recursos do “software” Imagelab, procedeu-se ao cálculo da Área Total (AT) anteriormente delimitada, transferindo os valores medidos para uma “Planilha de Cálculos”, sendo o valor da Área Total (AT) considerado como 100% da área total analisada. A seguir, o cálculo da área de Osso Neoformado (AON), anteriormente delimitada, também foi realizada, transferindo os valores medidos para outra “Planilha de Cálculos”. O valor de AON foi calculado como uma porcentagem de AT, da seguinte forma:

Medida de AT = 100% da área analisada

⇓

$$\text{AON\%} = \frac{100 \times \text{AON}}{\text{AT}}$$

Os valores de AON de cada animal foram usados para o cálculo das médias e dos desvios-padrões de cada grupo: ICG (Controle – coágulo), ICE (Controle – enxerto), IIDG (Diabético – coágulo) e IIDE (Diabético – enxerto).

Análise estatística

Com os dados obtidos pela análise histométrica, inicialmente foi aplicado a cada grupo experimental o Teste de Aderência à Curva Normal através do programa GMC 7.7 (Programa estatístico elaborado pelo Prof. Geraldo Maia Campos da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, em ambiente DOS). Como a distribuição amostral não foi paramétrica, selecionou-se o teste de Kruskal-Wallis, sendo os cálculos realizados também pelo “software” GMC.

RESULTADOS HISTOLÓGICOS

- **ICG10** (Controle com cavidade preenchida por coágulo sanguíneo 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 semelhante ao tecido intertrabecular, contendo também poucas células multinucleadas compatíveis com osteoclastos. Algumas pontes de união óssea entre a membrana e o trabeculado ósseo podem ser identificadas, sendo a união predominantemente aposicional, apesar das áreas de reabsorção existentes. Adjacente e abaixo da membrana, no interior da loja cirúrgica, cuja porção corresponderia à cortical da tíbia, observam-se trabéculas ósseas imaturas, entremeadas por amplos espaços intertrabeculares ocupados por tecido conjuntivo bem vascularizado, com feixes de fibras colágenas, ainda em organização, elevado número de fibroblastos ao lado de moderado número de células inflamatórias, sendo estas constituídas especialmente por linfócitos e macrófagos. Junto às bordas do tecido ósseo neoformado observam-se numerosos osteoblastos, na maioria dispostos paralelamente às suas margens (Figura 1).
- **IIDG10** (Diabético com cavidade preenchida por coágulo sanguíneo aos 10 dias): De forma semelhante ao grupo anterior, na área superficial, há a membrana óssea, mais preservada no grupo diabético. Entre o osso pré-existente nas bordas do defeito, algumas células semelhantes a condrócitos aparecem com frequência neste grupo, apesar de terem sido observadas em pequenas áreas e em alguns espécimes também do grupo controle. As trabéculas ósseas desse grupo, em quantidade e espessura semelhante ao respectivo grupo controle, apresentam fibras colágenas mais esparsas. O espaço intertrabecular é semelhante ao controle sendo o tecido conjuntivo mais vascularizado e há poucos feixes de fibras colágenas. Junto às bordas das trabéculas ósseas neoformadas observam-se alguns osteoblastos com disposição irregular (Figura 2).

- **ICE10** (Controle com cavidade preenchida por enxerto ósseo autógeno aos 10 dias): Superficialmente, a membrana óssea homogênea delgada possui união óssea com predomínio aposicional entre a membrana e o trabeculado ósseo neoformado. Abaixo desta, no interior da loja cirúrgica, observam-se trabéculas ósseas imaturas unidas aos enxertos ósseos particulado. O tecido conjuntivo entre as trabéculas e as partículas ósseas é semelhante ao grupo controle e em todos os espécimes estudados as partículas ósseas encontram-se revascularizadas e incorporadas. (Figura 3). Foram raras as áreas que apresentaram alguma atividade osteoclástica junto as partículas ósseas.
- **IIDE10** (Diabético com cavidade preenchida por enxerto ósseo autógeno aos 10 dias): A cavidade cirúrgica é recoberta, superficialmente, pela membrana óssea de forma semelhante aos grupos anteriores. No seu interior, trabéculas ósseas delgadas e imaturas e partículas ósseas podem ser observadas. O tecido conjuntivo entre as trabéculas e as partículas ósseas é bem vascularizado, com alguns feixes de fibras colágenas. Em todos os espécimes diabéticos que receberam osso particulado aos 10 dias houve incorporação dos fragmentos ósseos. Nota-se neoformação óssea a partir das próprias bordas das partículas ósseas, sendo esta menos intensa nesse grupo quando comparado ao respectivo controle (Figura 4). Observam-se numerosos osteoblastos dispersos ou agrupados nos espaços intertrabeculares. Ao redor das partículas, tais células mostram-se menos organizadas no grupo diabético em relação ao não diabético.
- **ICG30** (Controle com cavidade preenchida por coágulo sanguíneo aos 30 dias): A loja cirúrgica, em todos os espécimes, encontra-se reparada superficialmente pela membrana, estando esta incorporada a um tecido ósseo bem desenvolvido. Ao observar os limites proximal e distal da membrana, verifica-se que, embora haja união óssea em suas bordas com o osso pré-existente, há a formação de um espaço entre a membrana e o osso, contendo estruturas semelhantes às observadas no canal medular. O tecido ósseo neoformado no interior da ferida cirúrgica é mais espesso junto às bordas da loja cirúrgica diminuindo à medida que se aproxima de sua área central. As trabéculas ósseas encontram-se mais espessas e desenvolvidas quando comparadas aos 10 dias pós-operatórios e estão rodeadas por osteoblastos e amplos espaços intertrabeculares com numerosas células do sangue, típicas da medula óssea. Com o posicionamento da membrana e considerando a distância entre as corticais e o canal medular, observa-se que há aumento da espessura da tíbia abaixo desta. (Fig. 5)
- **IIDG30** (Diabético com cavidade preenchida por coágulo sanguíneo aos 30 dias): Como no respectivo grupo controle, superficialmente a membrana recobre o defeito cirúrgico na maioria dos espécimes e está incorporada ao tecido ósseo pré-existente da tíbia por suas bordas, havendo a formação de um espaço entre a membrana e o osso. A neoformação óssea é maior nas bordas da ferida e, apesar do trabeculado ósseo estar mais desenvolvido no grupo de 30 dias, a espessura da área do defeito reparada por osso torna-se menor quando comparada à do grupo de 10 dias. Com relação ao respectivo grupo controle, observa-se inferioridade no trabeculado ósseo, uma vez que este é mais delgado e imaturo no diabético. Há amplos espaços intertrabeculares contendo osteoblastos rodeando as trabéculas ósseas e inúmeras células do sangue, típicas da medula óssea (Figura 6).

- **ICE 30** (Controle com cavidade preenchida por enxerto ósseo autógeno aos 30 dias): Superficialmente, a membrana óssea recobre todo o defeito no osso e se encontra incorporada ao tecido ósseo neoformado. O espaço formado entre a membrana e o osso pré-existente é menor com relação ao grupo do coágulo e estruturas semelhantes às observadas no canal medular são também observadas nesse grupo. O trabeculado ósseo também é mais espesso e adiantado em relação aos demais grupos devido à incorporação das partículas ósseas inseridas neste (Figura 7). O aumento da espessura da tíbia pode ser observado na região recoberta com a membrana óssea quando comparada à espessura da região adjacente sem a membrana.
- **IIDE30** (Diabético com cavidade preenchida por enxerto ósseo autógeno aos 30 dias): O espaço formado entre a membrana óssea incorporada e o osso pré-existente é maior com relação ao respectivo grupo controle e semelhante aos grupos controle e diabético sem os enxertos ósseos aos 30 dias. Esse espaço, contendo estruturas semelhantes às observadas no canal medular, possui continuidade com os espaços intertrabeculares da área do defeito cirúrgico e com o canal medular propriamente dito. A neoformação óssea é maior junto às bordas da loja cirúrgica diminuindo à medida que se aproxima de sua área central. As trabéculas ósseas no interior do defeito ósseo encontram-se delgadas e imaturas e estão rodeadas por osteoblastos e amplos espaços intertrabeculares contendo numerosas células do sangue, típicas da medula óssea (Figura 8). Qualitativamente, a estrutura óssea neoformada desse grupo é mais desenvolvida com relação à do grupo diabético com coágulo e mais imatura com relação à do grupo controle com enxerto. Embora as partículas ósseas estejam incorporadas e vitais nesse grupo, as trabéculas unidas a elas são mais delgadas que no respectivo controle e parte de suas lacunas osteocíticas parecem estar vazias.



Figura 1 - ICG10 – Superficialmente, membrana (M) contendo áreas de reabsorção (R) e de união (U) ao osso neoformado. Profundamente, trabéculas ósseas imaturas (TI) são entremeadas por amplos espaços intertrabeculares (EI). H.E. Original 63X.

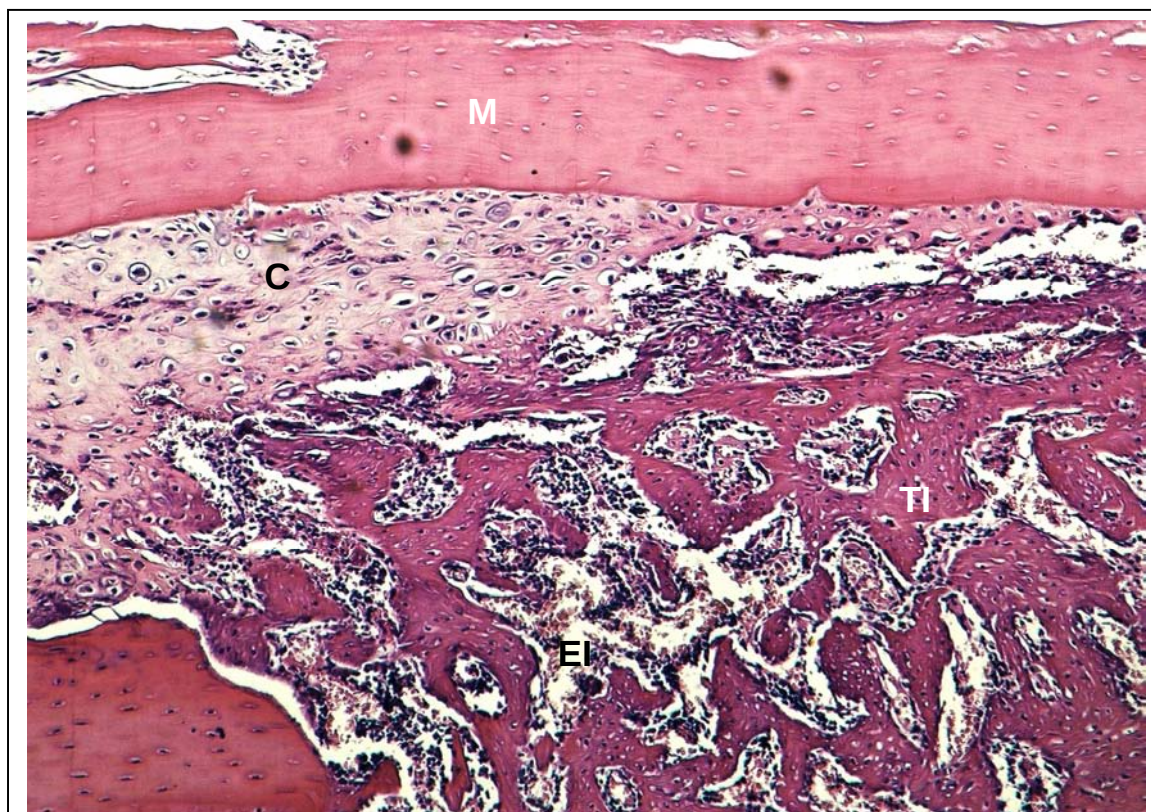


Figura 2 - IIDG10 - Superficialmente, membrana (M) recobrindo o defeito ósseo. Abaixo desta e lateralmente, algumas áreas com células semelhantes a condrócitos (C). Profundamente, trabéculas ósseas imaturas (TI) são entremeadas por amplos espaços intertrabeculares (EI).

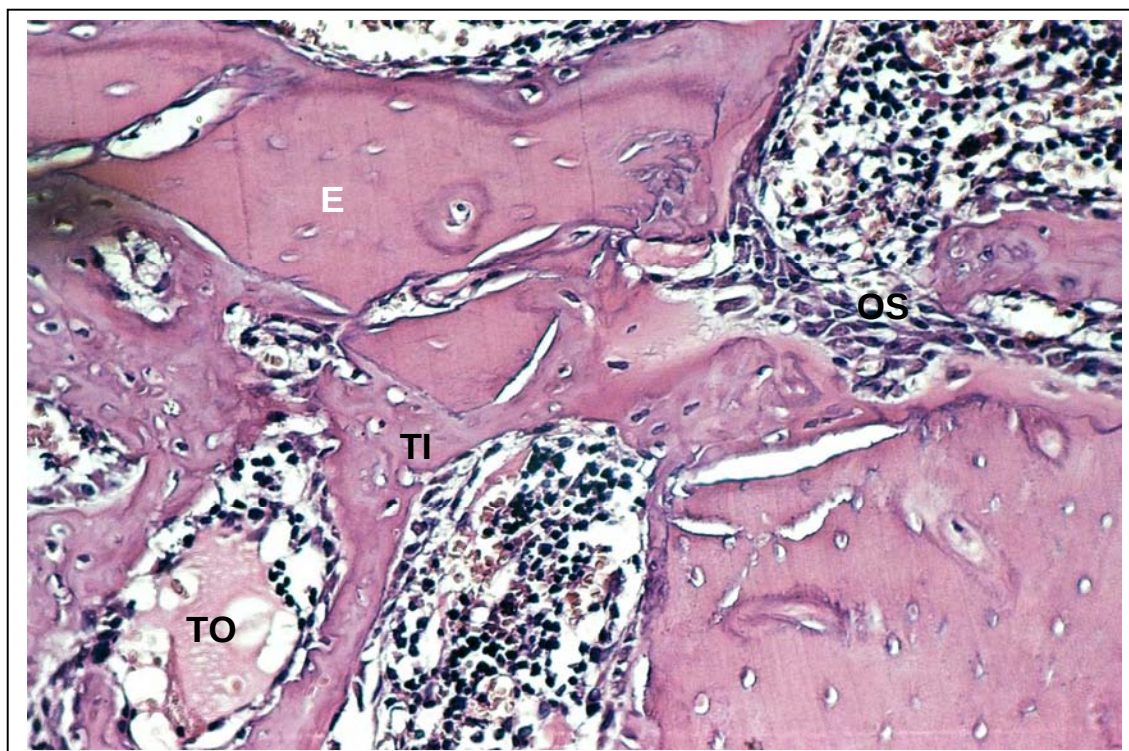


Figura 3 - ICE10 – Enxertos ósseos (E) encontram-se revascularizados e incorporados, havendo tecido osteóide (TO) unindo-os às trabéculas ósseas imaturas (TI). Grande atividade osteoblástica pode ser observada na região (OS). H.E. Original 160X.

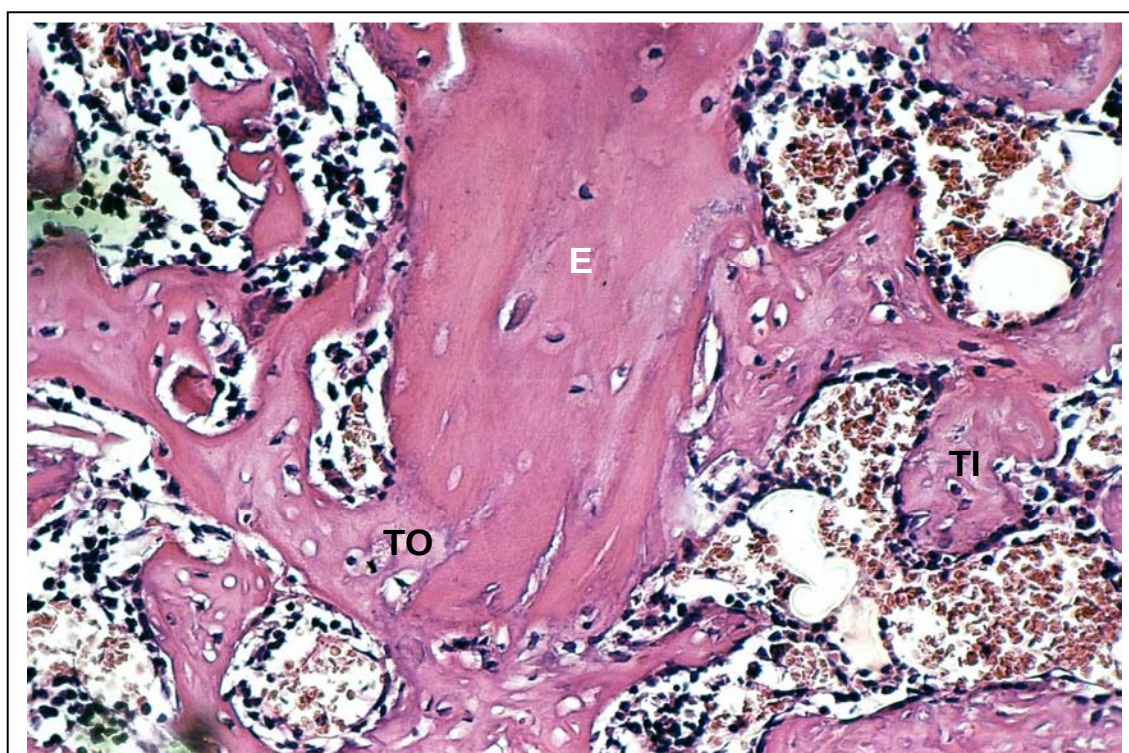


Figura 4 - IIDE10 – Enxertos ósseos (E) encontram-se revascularizados e incorporados, havendo tecido osteóide (TO) unindo-os às trabéculas ósseas imaturas (TI). H.E. Original 160X.

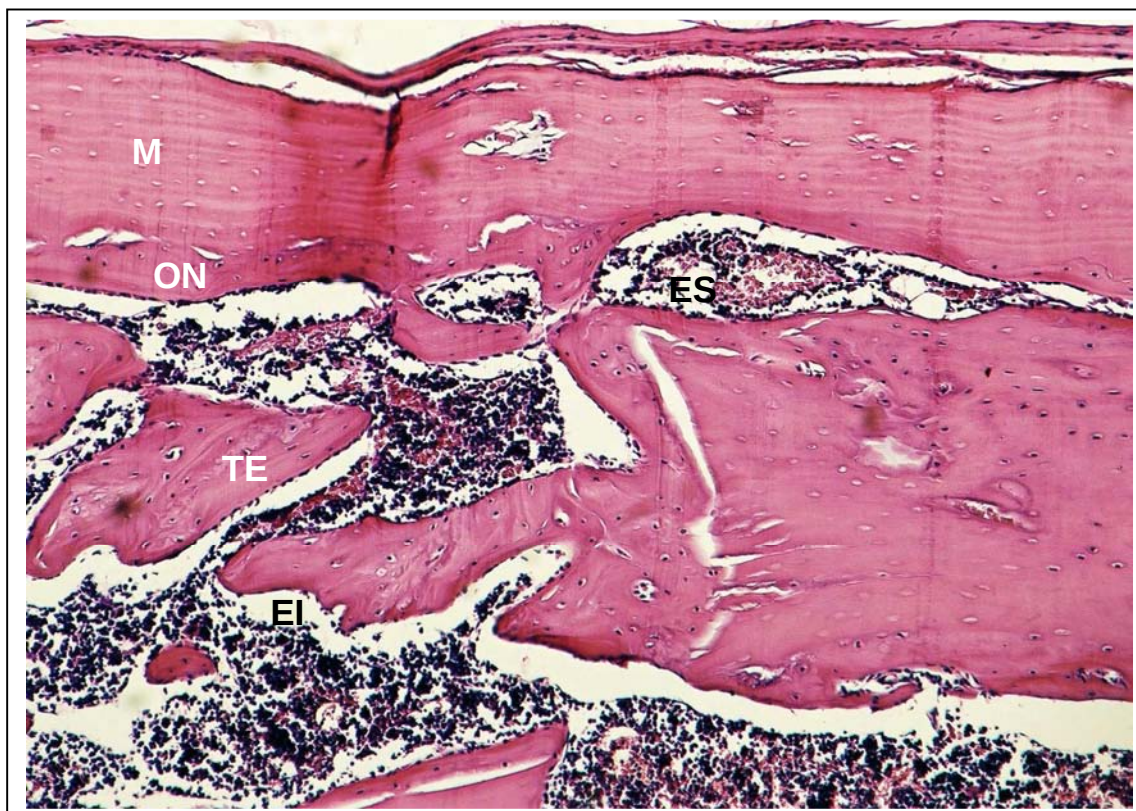


Figura 5 - ICG30 - Superficialmente, membrana (M) incorporada a algumas áreas de osso neoformado (ON). Lateralmente à área do defeito e abaixo da membrana, amplos espaços (ES) são formados. Profundamente, trabéculas ósseas espessas (TE) são entremeadas por amplos espaços intertrabeculares (EI). H.E. Original 63X.



Figura 6 - IIDG30 –Superficialmente, membrana (M) recobre totalmente área do defeito cirúrgico e abaixo desta, amplos espaços (ES) são formados. Profundamente, trabéculas ósseas delgadas (TD) são entremeadas por amplos espaços intertrabeculares (EI). H.E. Original 63X

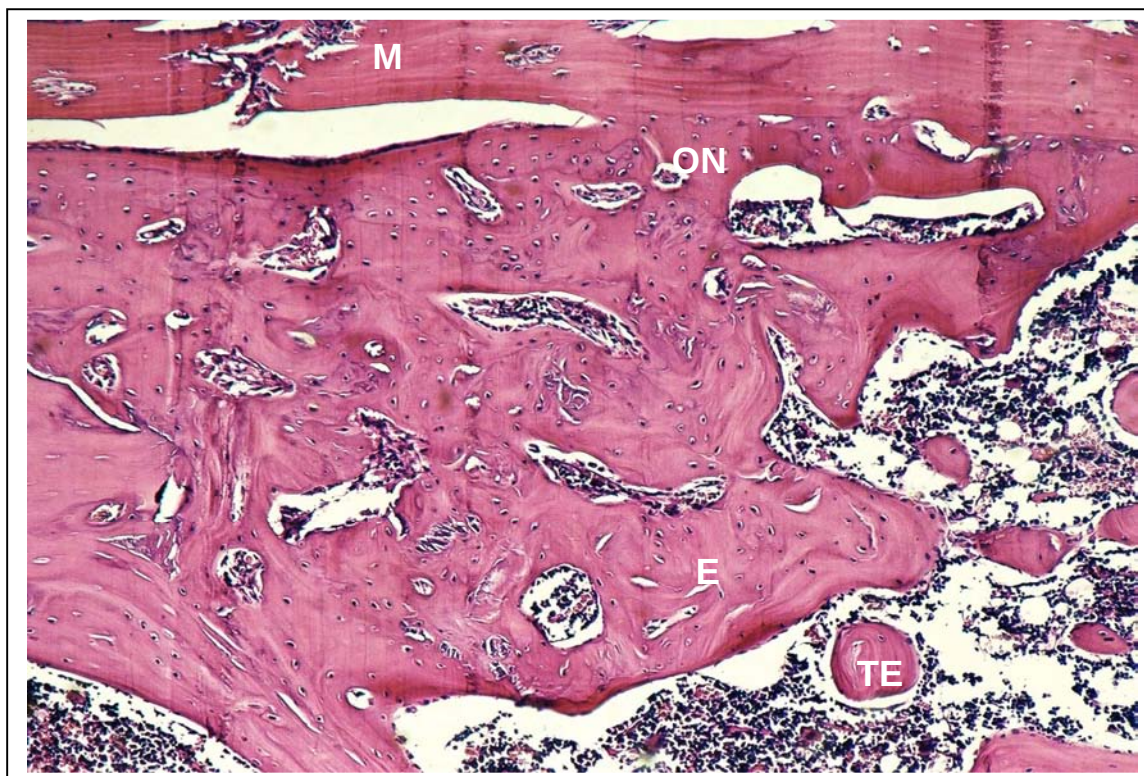


Figura 7 - ICE30 – Superficialmente a membrana (M) é unida a algumas áreas de osso neoformado (ON). Profundamente e nas bordas do defeito cirúrgico, trabéculas ósseas espessas (TE) incorporam os enxertos ósseos (E). H.E. Original 63X.

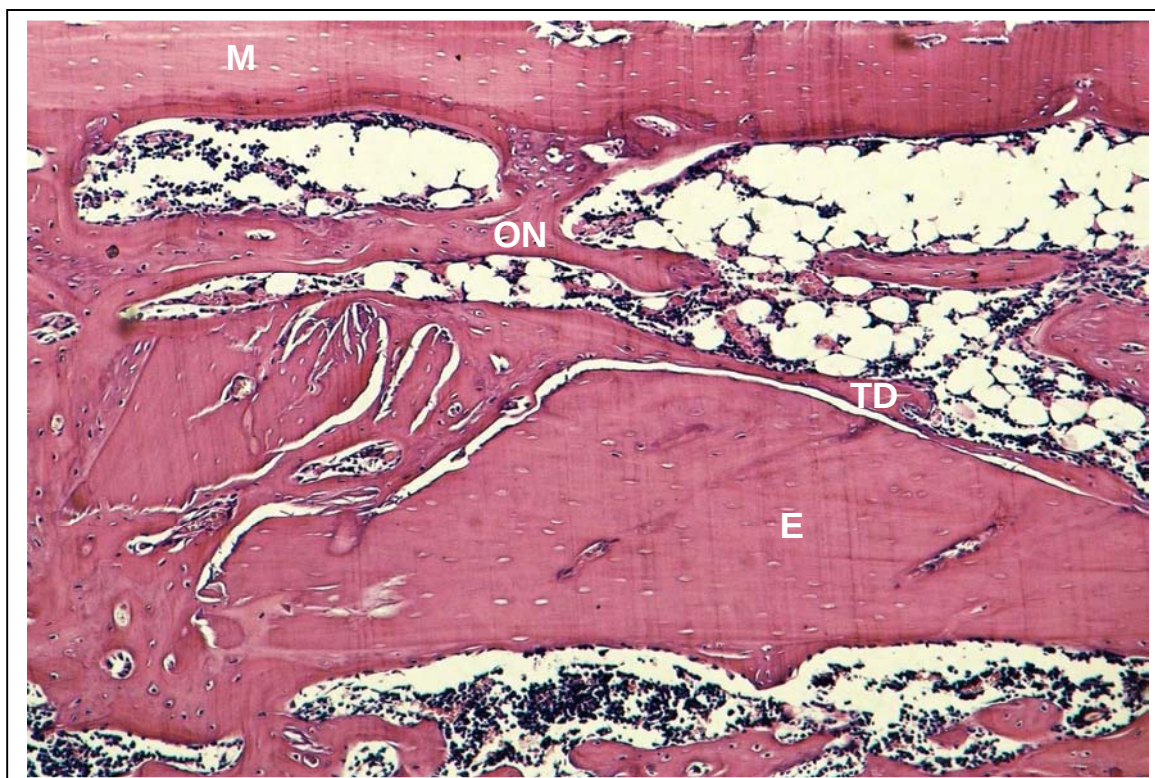


Figura 8 - ICE30 – Superficialmente a membrana (M) é unida a algumas áreas de osso neoformado (ON). Profundamente e nas bordas do defeito cirúrgico, trabéculas ósseas delgadas (TD) incorporam Os enxertos ósseos (E). H.E. Original 63X.

RESULTADOS HISTOMÉTRICOS E ESTATÍSTICOS

RESULTADOS HISTOMÉTRICOS

Na análise histométrica, obtiveram-se os cálculos da Área Total (AT) e da área de osso neoformado (AON) em cada um dos cortes analisados. Os valores de AON de cada animal foram usados no Teste de Aderência à curva Normal, o qual resultou em distribuição amostral anormal e no cálculo das médias de cada grupo analisado (ICG10, IIDG10, ICE10, IIDE10, ICG30, IIDG30, ICE30, IIDE30), como representado pela tabela 1. O teste estatístico aplicado foi o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 1 - Quantidade de área de osso neoformado por grupo (AON).

	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
ICG10	47,5729	8,8838	3,3578
IIDG10	51,3429	7,5812	2,8654
ICE10	51,1133	5,6436	1,8812
IIDE10	50,0967	8,4545	2,8182
ICG30	55,4056	9,4622	3,1541
IIDG30	30,0800	11,2013	3,9603
ICE30	61,4088	10,6603	3,7690
IIDE30	49,3288	9,7627	3,4517

1) Comparando a área óssea da ferida cirúrgica em tibia de animais controles, verificou-se que os melhores resultados quantitativos são dos grupos que receberam os enxertos, tanto aos 10 (ICE10=51,11%) como aos 30 dias pós-operatórios (ICE30=61,40%), quando comparados aos grupos preenchidos por coágulo sanguíneo (ICG10=47,57% e ICG30=55,41%, respectivamente. Apesar da superioridade qualitativa dos enxertos, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados os valores de ICG10 com ICE10 ($p.H0=49,14\%$) ICG30 com ICE30 ($p.H0=28,98\%$), em nível de 5%.

2) Com relação aos grupos diabéticos, o comportamento entre os períodos analisados diferiu. O preenchimento da área óssea por osso foi discretamente superior no grupo preenchido por apenas coágulo (IIDG10=51,34%) quando comparado ao do grupo enxertado (IIDE10=50,09%) no período de 10 dias, embora tais diferenças não sejam significantes em nível de 5% ($p.H0=79,13\%$). Por outro lado, no período de 30 dias, a superioridade do uso dos enxertos (IIDE30=49,33%) em relação ao coágulo (IIDG30,08%) foi também observada, sendo tais diferenças estatisticamente significantes em nível de 1% ($p.H0=0,63\%$).

3) Ao serem analisadas as áreas ósseas presentes em feridas cirúrgicas preenchidas apenas com coágulo sanguíneo de ratos controles e diabéticos, verifica-se uma discreta superioridade do grupo diabético em relação ao grupo controle aos 10 dias pós-operatórios (IIDG10 = 51,34% e ICG10 = 47,57%), não sendo significantes tais diferenças em nível de 5% ($p.H0=27,74\%$). Contudo, aos 30 dias, os resultados são invertidos, havendo uma reparação

óssea significativamente ($p.H0=0,53$; $\alpha=0,01\%$) mais acentuada no grupo controle (ICG30 = 55,41%) com relação ao diabético (IIDG30= 30,08%).

4) Comparando a reparação óssea entre os grupos que receberam os enxertos ósseos em suas feridas cirúrgicas, verifica-se que o diabetes interferiu negativamente na área óssea quantificada, pois, tanto aos 10 como aos 30 dias pós-operatórios, o grupo controle obteve valores superiores, apesar de tais diferenças não serem estatisticamente significantes em nível de 5% ($p.H0=82,53\%$ e $p.H0=5,87\%$, respectivamente).

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 indutores²⁵. Tal processo depende das fases de revascularização, incorporação, substituição e remodelação para o restabelecimento da arquitetura do osso hospedeiro²⁶. Sabe-se que o melhor material para reconstrução dos defeitos ósseos é o enxerto ósseo autógeno e quando este é utilizado na forma particulada^{27,28,29,30} é rapidamente revascularizado por liberar uma quantidade maior de fatores de diferenciação e crescimento nos estágios iniciais da regeneração. Por outro lado, exibe uma atividade osteoclástica mais intensa, resultando em uma maior reabsorção, quando comparado ao enxerto em bloco³¹. A maior limitação de sua particulação é a instabilidade imediata de seus fragmentos, pois a imobilidade do enxerto dificilmente é obtida quando não há proteção com barreiras biológicas ou com paredes ósseas²⁹.

A superioridade qualitativa no uso dos enxertos pôde ser observada nesse trabalho em ambos períodos estudados quando a enfermidade sistêmica diabetes não estava presente. 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 torna-se mais favorável e rápida com o uso dos enxertos ósseos autógenos, embora tais diferenças não possam ser apontadas com significância estatística.

A técnica da regeneração óssea guiada pode ser aplicada com sucesso na reparação de defeitos ósseos ao redor de implantes dentais e reconstruções alveolares³², porém quando as membranas são instaladas objetivando o aumento vertical dos defeitos, freqüentemente, invaginam ou colabam devido à pressão gerada pelos tecidos moles sobre elas. Diante disso, em tais circunstâncias, as membranas são instaladas sobre algum material de preenchimento³³ capaz de promover suporte para resistir à pressão exercida pelos tecidos moles sobre elas³⁴, o que, no caso deste trabalho, optou-se pelo preenchimento das cavidades pelo enxerto autógeno particulado, no grupo enxertado, por ser este considerado o mais ideal dentre outros tipos de enxertos ou implantes. Para que pudesse ser verificado o comportamento isolado da membrana acrescentou-se o grupo da membrana sobre o coágulo sanguíneo. Apesar da neoformação óssea ter sido maior no grupo tratado com enxerto, verificou-se que em todos os grupos as membranas mantiveram suas posições, não colabaram e foram incorporada por osso neoformado tanto no grupo enxertado como no coágulo e foram incorporadas aos enxertos no grupo enxertado.

Nos períodos iniciais da reparação, algumas áreas das membranas apresentaram espaços, ou áreas em reabsorção, porém, em muitos pontos houve a formação de pontes ósseas ligando-as ao trabeculado ósseo neoformado. Em suas bordas, as membranas foram incorporadas ao osso pré-existente. Em períodos tardios, grande parte das membranas foram incorporadas ao trabeculado ósseo neoformado, foram unidas aos enxertos por pontes ósseas e parcialmente foram reabsorvidas, sendo substituídas por osso neoformado ou por espaços medulares. Enfim, as membranas não provocaram reação inflamatória intensa ou reações tipo corpo estranho que gerassem sua expulsão. Como foram empregadas em cavidades ósseas não foi possível determinar seu potencial osteoindutor, pois as cavidades seriam, de qualquer forma, preenchidas por osso. Entretanto, foi possível observar que tais membranas

proporcionaram o aumento da espessura óssea da tíbia o que significa uma vantagem no restabelecimento dos contornos ósseos.³⁵ Por outro lado, a formação de espaços medulares abaixo destas, persistentes aos 30 dias, comprometeu o ganho de volume ósseo interno na cortical da tíbia o que parece ser uma desvantagem nesse período estudado, apesar de tais espaços ainda estarem em processo de remodelação óssea.

Apesar de alguns autores terem observado até mesmo ausência de osteogênese quando o osso homogêneo orgânico é empregado em alvéolos de ratos³⁶, outros defendem suas vantagens sobre a neoformação óssea ao comparar o enxerto homogêneo desmineralizado ao mineralizado³⁷. Há até quem defenda o poder de osteoindução da matriz óssea homogênea desmineralizada²⁴, o que nos leva a concordar que é necessário o estudo dessa membrana em área que normalmente não contém osso para responder à dúvida do caráter osteoindutivo da membrana. O que já está bastante discutido é que o fato da membrana ter sido homogênea e ter sido submetida ao ácido clorídrico e à glicerina, provavelmente, tornou-a mais biocompatível com relação às membranas sintéticas estudadas pela literatura e até mesmo ao enxerto homogêneo sem qualquer tratamento³⁸, embora o objetivo desse trabalho não tenha sido a sua comparação com outros materiais e sim seu comportamento em animais controles e diabéticos, o que resultou em semelhança.

É notório que o Diabetes mellitus produz atraso do reparo alveolar, devido à deficiência na proliferação fibroblástica, osteoblástica e conseqüentes reflexos na produção de substância fundamental amorfa, fibras colágenas e matriz orgânica³⁹, como também observado por esse trabalho ao serem comparados os grupos IIDE10 e ICE10, IIDE30 e ICE30, apesar da similaridade estatística e os grupos IIDG30 e ICG30 com diferenças significantes. No entanto resultados obtidos com este trabalho no grupo diabético são controvertidos e, portanto, devem ser discutidos com cautela. Apesar da superioridade do uso dos enxertos autógenos ser apontada de forma significativa no período mais tardio da análise (IIDE30 > IIDG30), o grupo diabético que recebeu o enxerto apresentou área óssea menor no período de 10 dias quando comparado ao grupo diabético que recebeu apenas o coágulo (IIDE10 < IIDG10). Da mesma forma inesperada, o grupo diabético aos 10 dias preenchido por coágulo teve resultados superiores ao respectivo grupo controle (IIDG10 > ICG10). Ambas situações contrariam toda a literatura com relação à vantagem do uso dos enxertos autógenos ao não uso e com relação à desvantagem da enfermidade sistêmica a sua ausência em qualquer período estudado, apesar de tais diferenças observadas não terem sido estatisticamente significantes.

A dificuldade na análise histométrica deste grupo poderia ser um dos fatores considerados capaz de que tentariam explicar os resultados contraditórios. As trabéculas ósseas do grupo diabético preenchido com coágulo (IIDG10), observadas nas respectivas lâminas, estão bastante espalhadas por todo o defeito ósseo criado e possuem espessuras e quantidades semelhantes quando comparadas às do grupo controle (ICG10). Por outro lado, ao microscópio óptico percebe-se que as trabéculas ósseas do grupo diabético possuem fibras colágenas mais espessadas entre si, o que caracterizam a porosidade maior de tais trabéculas. Admitem-se falhas na quantificação, pois, por serem trabéculas ainda imaturas e delgadas, a delimitação da área gerou resultados bastante similares, porém superiores ao grupo dos enxertos ou ao grupo sem enfermidade sistêmica no período analisado. Dessa forma, a similaridade quantitativa de tais resultados, a insignificante superioridade do tratamento com coágulo sobre o enxerto ou do estado

diabético sobre o não diabético não podem ser considerados resultados relevantes neste trabalho, uma vez que foi observada inferioridade qualitativa no grupo IIDG10 com relação aos demais grupos.

É importante salientar que há possibilidade de sucesso na utilização de procedimentos de enxertia óssea associada à regeneração guiada em organismos diabéticos, sendo significativamente vantajosa a utilização dos enxertos ósseos particulados com relação ao preenchimento por coágulo sanguíneo e que o uso da membrana homogênea desmineralizada mostrou ser biocompatível tanto no animal controle como no diabético.

CONCLUSÃO

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

1. Comparando o tratamento das feridas cirúrgicas com ou sem enxerto particulado, a reparação óssea com o uso do enxerto ósseo foi melhor no grupo controle aos 10 e 30 dias e no grupo diabético aos 30 dias, embora tenham sido encontradas diferenças significantes apenas no grupo diabético.
2. Comparando o estado diabético com o controle nas cavidades tratadas por coágulo sanguíneo, a reparação óssea do grupo controle aos 30 dias foi qualitativa e quantitativamente melhor..
3. Comparando o estado diabético com o controle nos animais tratados com enxerto, o processo de reparo do grupo controle foi qualitativamente mais favorável que o do diabético, embora não existam diferenças estatísticas em ambos períodos analisados.
4. O uso da membrana homogênea desmineralizada mostrou ser biocompatível na forma empregada, cumprindo satisfatoriamente o princípio da regeneração óssea guiada.

REFERÊNCIAS

1. Zagury L: Conceitos atuais na prevenção do diabetes tipo 2. *Diabetes News*. (2004); 1(1): 5-9.
2. American Diabetes Association. All about diabetes. Disponível em: www.diabetes.org/about-diabetes.jsp. [Consulta 02 de Setembro 2006].
3. Lerario AC: Diabetes mellitus tipo2. *Diabetes News*. (2004); 1(1): 20-5.
4. Cotran, R. S. Inflamação e Reparo. In: Cotran R. et. al. *Robbins Patologia Estrutural e Funcional*. 5a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.
5. Grandini SA: The effect of partial-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.
6. 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.
7. Lalla RV, D' Ambrosio JA: Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc*. (2001); 132(10): 1425-32.
8. Rosenberg CS: Wound healing in the patient with diabetes mellitus. *Nurs Clin North Am*. (1990); 25(1): 247-61.
9. Ruedi TP, Basset CAL: Repair and remodeling in milipore isolated defects in cortical boné. *Acta Anat*. 1967, v 68, 509-531.
10. Dahlin C: Scientific background of guided bone regeneration. In: Buser, D. *Guided bone regeneration – In: Implant Dentistry*. Chicago, Quintessence Publishing Co, Inc, p 31-48, 1994
11. Bell WH: Current concepts of bone grafting. *J. Oral Surg.*, v.26, n.2, p.118-24, 1968.
12. Stroud SW, Fonseca RJ, Sanders GW, Burkers Jr EJ: Healing of interpositional autologous boné grafts after total maxillary osteotomy. *J. Oral Surg.*, v.38, n.12, p.878-85, 1980.
13. Fonseca RJ, Clark PJ, Burkes Jr EJ, Baker RD: Revascularization and healing of onlay particulate autologous bone grafts in primates. *J. Oral Surg.*, v.38, n.8, p. 572-7, 1980.
14. 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 Jan-Feb;9(1):13-29
15. Gottlow J. Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results. *J Periodontol*. 1993 Nov;64(11 Suppl):1157-65. Review
16. 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 Nov;13(6):881-91
17. Vail TB, Trotter GW, Powers BE. Equine demineralized bone matrix: relationship between particle size and osteoinduction. *Vet Surg*. 1994 Sep-Oct;23(5):386-95
18. 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 May;6(3):238-44

19. 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 Dec;23(6 Pt 2):395-8.
20. Lytle JL. Freeze-dried demineralized bone in dental implant reconstruction. *J Calif Dent Assoc.* 1994 May;22(5):47-51. Review.
21. Marx RE, Carlson ER: Tissue banking safety: caveats and precautions for the oral and maxillofacial surgeon. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Dec;51(12):1372-9.
22. Mellonig JT, Prewett AB, Moyer MP. HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol.* 1992 Dec;63(12):979-83.
23. Pigossi N. Implantação de dura-máter homogênea conservada em glicerina. Estudo experimental em cães. *Arq Cirurg Clin Exp.* 1964. 27. P.213-47
24. Rangel-Garcia IJ. Implante homogêneo 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.
25. Schenk RK. Regeneração óssea: bases biológicas. In: Buser D, Dahlin C, Schenk RK. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo, Quintessence, 1996, p. 49-100.
26. 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.
27. 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 v.31, p 149-153
28. 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 v.4 p.19-25.
29. Rissolo AR, Bennet J. Bone grafting anf its essential role in implant dentistry. *Dent Clin North Am.* 1998 v42, n. 1 p.91-116.
30. Zide MF. Autogenous bone harvest and bone compacting for dental implants. *Compendium.* 2000 v.21, n 7. P. 585-90.
31. 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 histologyc and stereologic study in rabbit rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002 v.17 n.4 p. 498-506.
32. Jovanovic SA, Spiekermann H, Richter EJ. Bone regeneration around titanium dental implants in dehiscd defect sites: a clinical study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1992 v.7 p.233-245.
33. 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 v.9 p.137-50.
34. 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 v.15 p. 364-73.

35. 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 v.8 n.2 p.82-89
36. 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 v.1 n.1 p.83-90.
37. 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 v.9 p. 305-13
38. Aaboe M. Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes. *Clin Oral Implants Res.* 1998. v. 9 n.5 p. 313-320.
39. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of Tooth Extraction Sockets in Experimental Diabetes Mellitus. *J. Oral Maxillofac Surg.*, v. 54, p. 1087-91, 1996.

Anexos

Anexo A -

Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA)



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

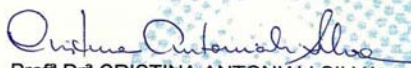


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO DE CAVIDADES CIRÚRGICAS PREENCHIDAS COM OSSO AUTÓGENO E RECOBERTAS POR MEMBRANAS DE MATRIZ ÓSSEA HOMÓGENA DESMINERALIZADA E CONSERVADA EM GLICERINA EM TÍBIA DE RATOS DIABÉTICOS" sob responsabilidade de Prof Dr OSVALDO MAGRO FILHO e colaboração de Profa Dra. ALESSANDRA MARCONDES ARANEGA, Dra. ROBERTA OKAMOTO e ALBANIR GABRIEL BORRASCA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado AD REFERENDUM pela CEEA de acordo com o protocolo nº 2007-007842.

Araçatuba, 23 de outubro de 2007.


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA

Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-3200.

Anexo B –

Normas para publicação de artigo em Revista

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants

Author Guidelines

Submit manuscripts via JOMI's online submission service:

www.manuscriptmanager.com/jomi

Manuscripts should be uploaded as a PC 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 concerned with reports of basic or clinical research, clinical applications of implant research and technology, proceedings of pertinent symposia or conferences, quality review papers, and matters of education related to the implant 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 according to these guidelines will be returned to the author before review.

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 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.** Page 2 of the manuscript should include the article title, a maximum of 300-word abstract, and a list of key words not to exceed 6. Abstracts for basic and clinical research articles must be structured with the following sections: (1) Purpose, (2) Materials and Methods, (3) Results, and (4) Conclusions. Abstracts for all other types of articles (ie, literature reviews, clinical reports, technologies, and case reports) should not exceed 250 words and need not be structured.
- **Introduction.** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only pertinent references. Clearly state the working hypothesis.
- **Materials and Methods.** Present materials and methods in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
- **Results.** Present results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables or illustrations; emphasize only important observations.
- **Discussion.** Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or Results section. Relate observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations.
- **Conclusions.** Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.
- **Acknowledgments.** Acknowledge persons who have made substantive contributions to the study. Specify grant or other financial support, citing the name of the supporting organization and grant number.
- **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, city, state, and country should be included parenthetically at first mention.

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. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: A 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1987;2:69-75.

Book reference style:

1. Skalak R. Aspects of biomechanical considerations. In: Brånemark P-I, Zarb GA, Albrektsson T (eds). *Tissue-Integrated Protheses: Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence, 1985:117-128.

ILLUSTRATIONS AND TABLES

- All illustrations must be numbered and cited in the text in order of appearance.
- Illustrations and tables should be embedded in a PC Word document.
- All illustrations and tables should be grouped at the end of the text.
- Original slides or high-resolution images must be sent to the Publisher's office upon acceptance of the article.
- *Note that article acceptance is pending the receipt of acceptable original art.*

Black & white—Submit three sets of high-quality glossy prints. Should the quality prove inadequate, negatives will be requested as well. Photographs should be unmounted and untrimmed.

Radiographs—Submit the original radiograph as well as two sets of prints.

Color—Color is used at the discretion of the publisher. No charge is made for such illustrations. Original slides (35-mm transparencies) must be submitted, plus two sets of prints made from them. When a series of clinical images is submitted, tonal values must be uniform. When instruments and appliances are photographed, a neutral background is best.

Drawings—Figures, charts, and graphs should be professionally drawn and lettered large enough to be read after reduction. High-resolution (at least 300 dpi) laser-printed art is acceptable (no photocopies, please); also provide electronic file if possible.

Electronic Files—May be accepted if original figures (as specified above) are unavailable. Resolution must be at least 300 dpi; files saved in .tiff or .eps format are preferred.

Legends—Figure legends should be grouped on a separate sheet and typed double-spaced.

MANDATORY SUBMISSION FORM

The Mandatory Submission Form (published in issues 1 and 4 and accessible at www.quintpub.com) must be signed by all authors and faxed to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634)

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. When such waivers are not supplied, faces will be masked to prevent identification.
- Permissions and waivers should be faxed along with the Mandatory Submission Form to the JOMI Manuscript Editor (630 736 3634).

REPRINTS

If reprints are desired, they may be ordered from the publisher. Authors receive a discount of 40% on quantities of 100 or 200 reprints.

Anexo C -

Ilustrações da fase cirúrgica da metodologia experimental



Fig. 1 - Calvária de animais doadores após completa remoção de tecido mole circunvizinho.



Fig. 2 - Calvária devidamente recortada e procesada.

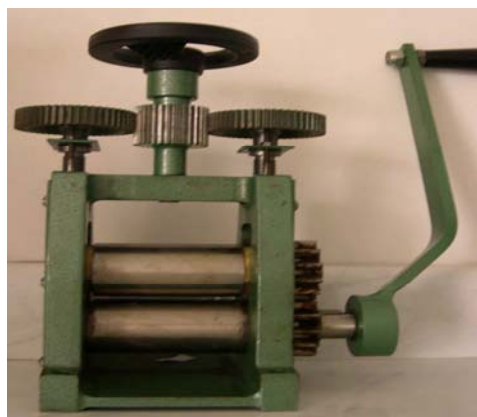


Fig. 3 - Cilindros de precisão ajustáveis utilizados para a realização da “clivagem” das corticais internas e externas da calvária



Fig. 4 - Ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) mantidos em gaiolas no Biotério e Centro Cirúrgico “Ilídio Teodoro”



Fig. 5 - Ratos machos com peso corporal aproximado de 250 gramas.



Fig. 6 - Órgão genital do animal.



Fig. 7 - Frasco com tampão citrato 0,01M, pH 4,5.



Fig. 8 - Frasco com estreptozotocina.



Fig. 9 - Localização da veia peniana.

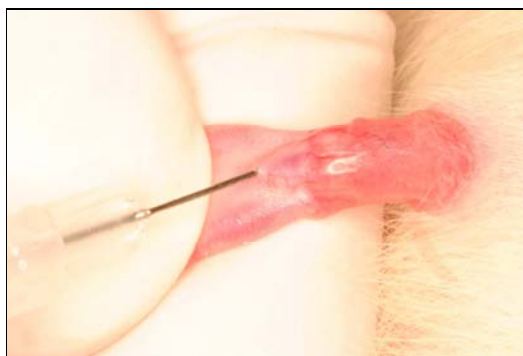


Fig. 10 - Injeção da estreptozotocina.

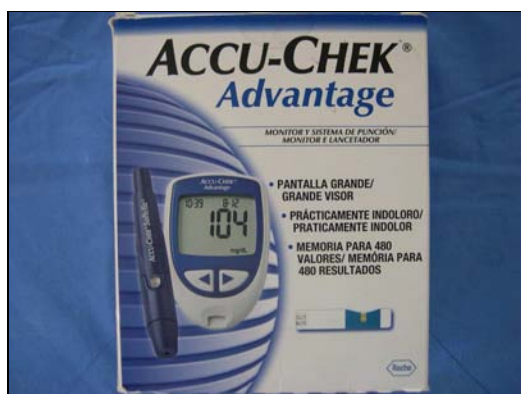


Fig. 11 - Sistema de monitorização automática de glicemia - Accu-Chek Advantage.

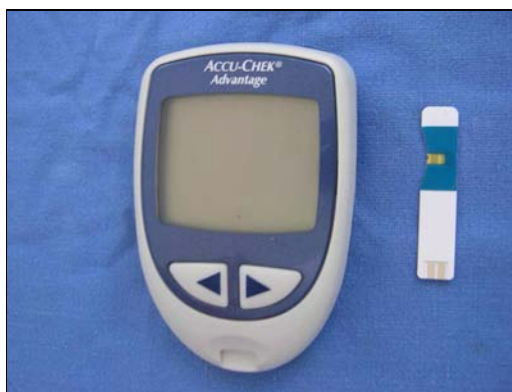


Fig. 12 - Medidor automático e tira de teste.



Fig. 13 - Corte com tesoura a cerca de 02mm da extremidade da cauda do rato para a coleta de sangue.



Fig. 14 - Coleta de sangue.

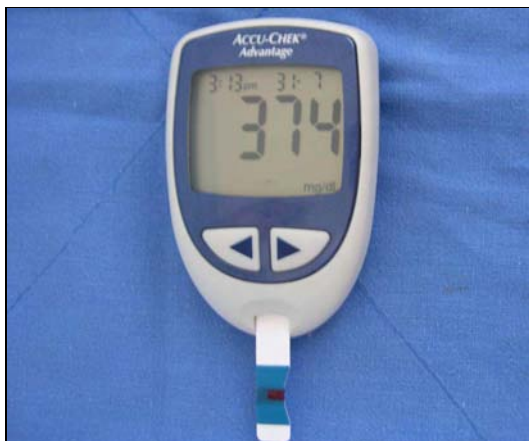


Fig. 15 - Determinação da glicemia.



Fig. 16 - Cloridrato de Xilazina e cloridrato de Cetamina.



Fig. 17 - Anestesia por via intramuscular.



Fig. 18 - Membro posterior tricotomizado e antissepsia realizada.



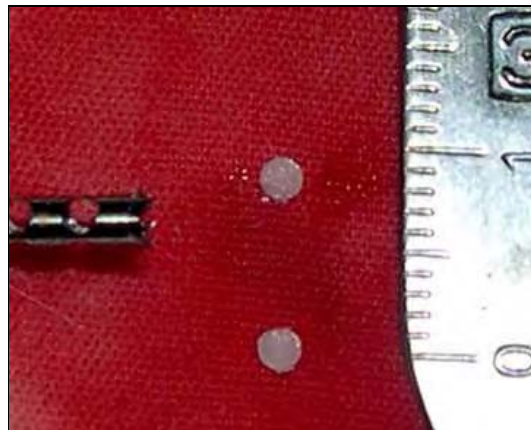
Fig. 19 - Incisão.



Fig. 20 - Afastamento tecidos e exposição da tibia.



Fig. 21 - Cavidade preparada preenchida com coágulo.



e Fig. 22 - Enxertos obtidos.



Fig. 23 - Cavidade preenchida com enxerto particulado.



Fig. 24 - Membrana acomodada e devidamente estabilizada.



Fig. 25 - Sutura finalizada.



Fig. 26 - Penicilina G benzatina (20.000 U.I.).

Anexo D -

ANEXO D - Ilustrações da análise histométrica

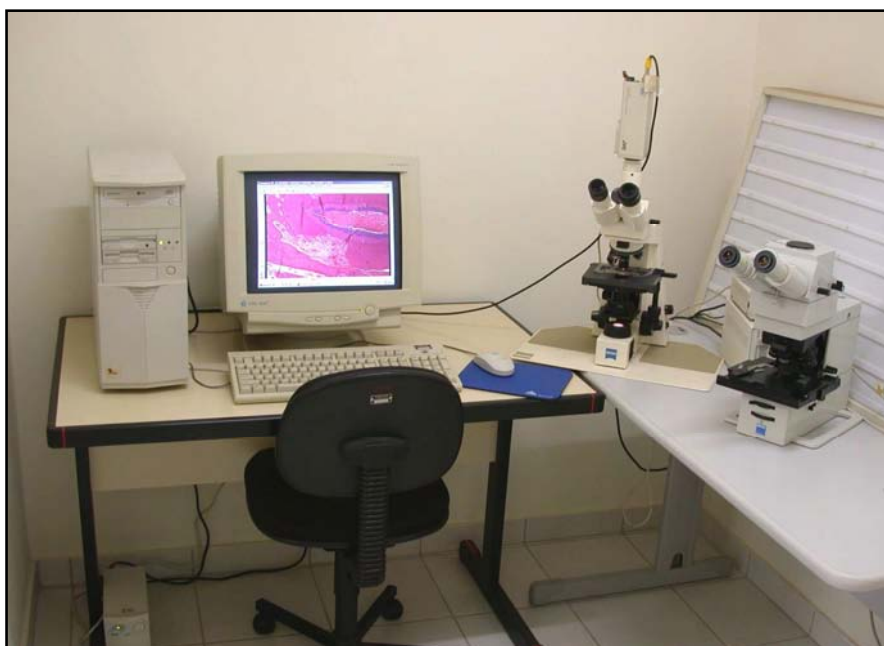


Fig. 1 - Equipamento utilizado na captação das imagens histológicas. Câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio *Carl Zeiss* (AxioLab) e conectada ao computador.

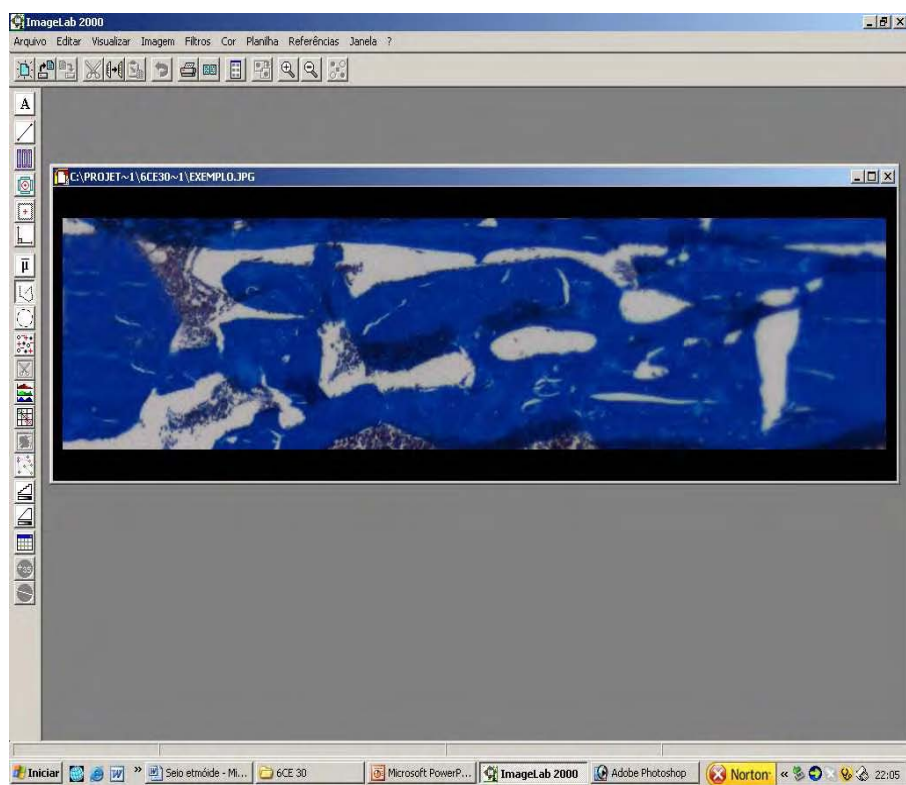


Fig. 2 - Programa ImagLab 2000. Fotomicrografia da região do defeito cirúrgico.

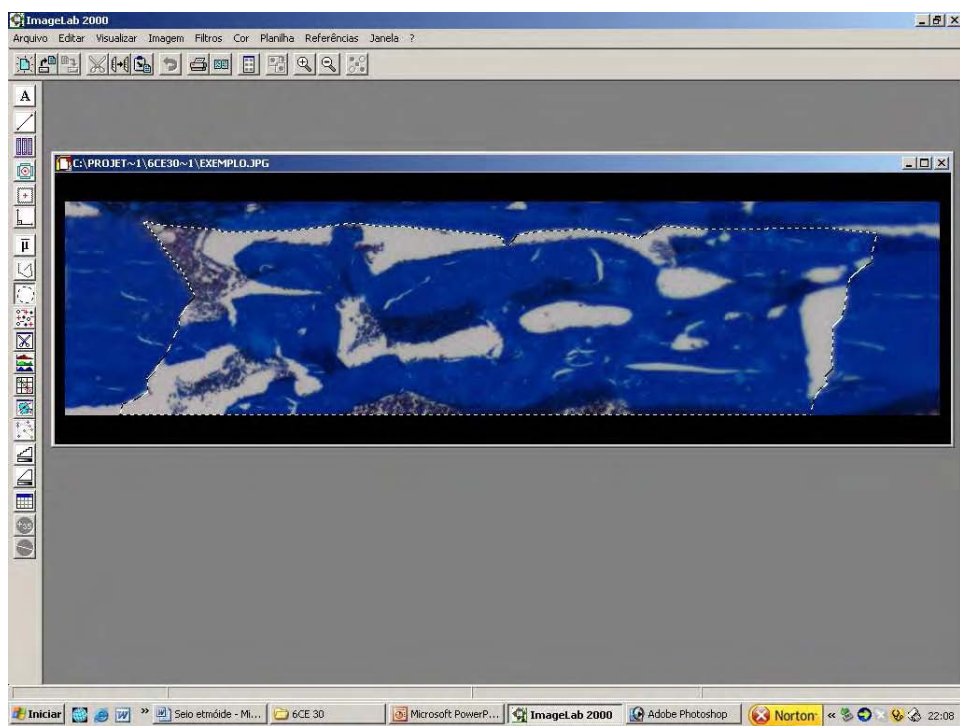


Fig. 3 - Seleção da Área Total (AT) do defeito cirúrgico.

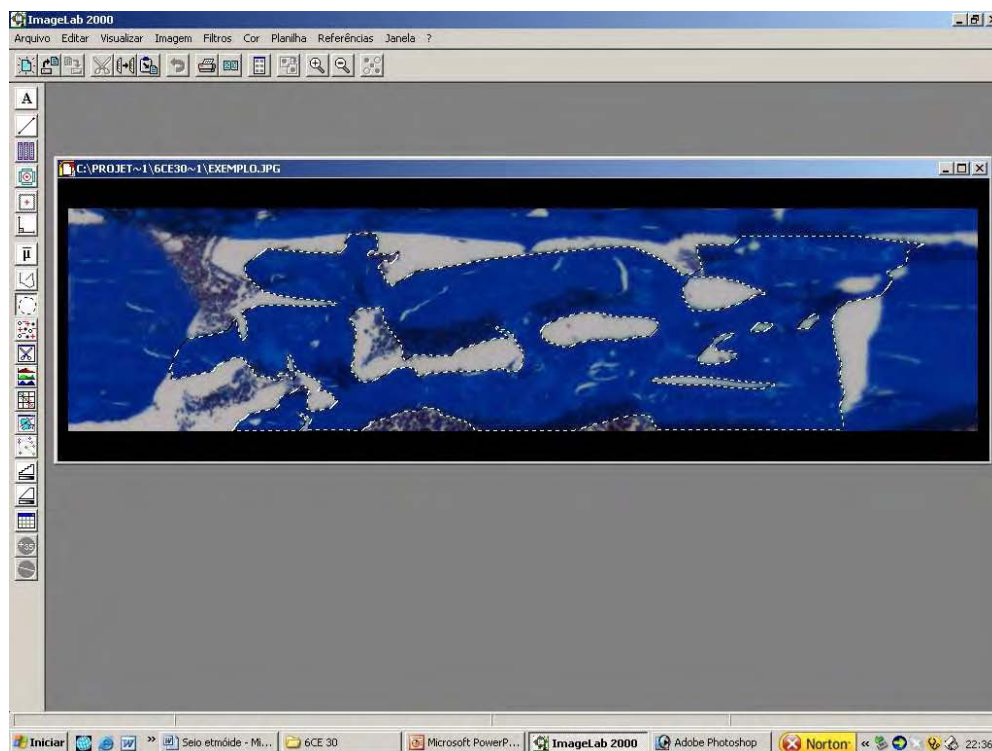


Fig 6- Seleção da área de tecido ósseo Neoformado (AON)

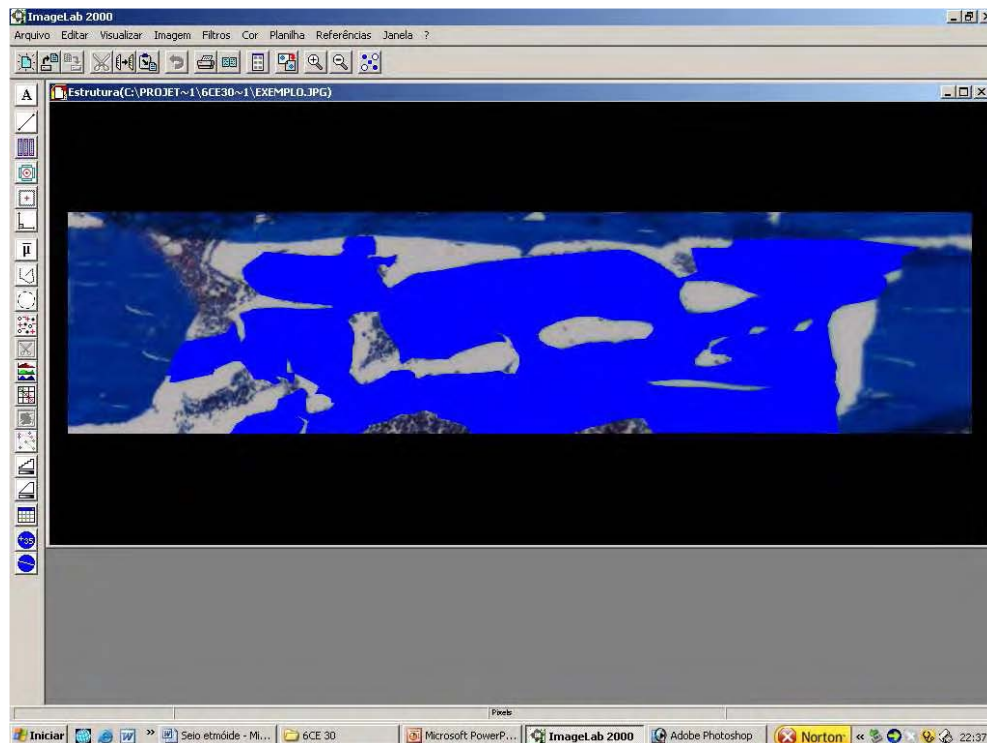


Fig. 7 - Seleção da área de tecido ósseo neoformado (AON)

ImageLab 2000

Arquivo Editar Visualizar Imagem Filtros Cor Planilha Referências Janela ?

Estrutura(C:\PROJET~1\6CE30~1\EXEMPLO.JPG)

	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
4	Altura:		%de regiões:	47.4%							
5	458		em relação a	área total da imagem							
6											
7			Densidade	R	6.879						
8	Altura:		ótica média	G	43.499						
9	1.000000		das áreas	B	127.667						
10			marcadas	Média	59.348						
11											
12	MORFOMETRIA			ABSORÇÃO DE COR			Densidade	DIÂMETROS		CENTRO DE MASSA	
13	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm. Maior	Diâm. Menor	X	Y
14	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0
15	9152.071	0.000	2800413.000	17708748.000	51974732.000	59.348	0.000	1557.000	407.000	0.000	0.000
16	9152.071	#DIV/0!	2800413.000	17708748.000	51974732.000	59.348	#DIV/0!	1557.000	407.000	#DIV/0!	#DIV/0!
17	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
18	9152.071	0.000	2800413.000	17708748.000	51974732.000	59.348	0.000	1557.000	407.000	0.000	0.000
19	9152.071	0.000	2800413.000	17708748.000	51974732.000	59.348	0.000	1557.000	407.000	0.000	0.000
20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
21	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
22											
23											
24											
25											
26	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm. Maior	Diâm. Menor	X	Y
27	9152.071		2800413.000	17708748.000	51974732.000	59.348		1557.000	407.000		
28											
29											
30											
31											
32											
33											
34											
35											
36											
37											
38											

Pixel

Iniciar Seio etmóide - Mi... 6CE 30 Microsoft PowerP... ImageLab 2000 Adobe Photoshop Norton 22:37

Fig. 8- Planilha de dados do programa exibindo o valor percentual referente à Área Óssea Neoformada (AON) anteriormente selecionada.

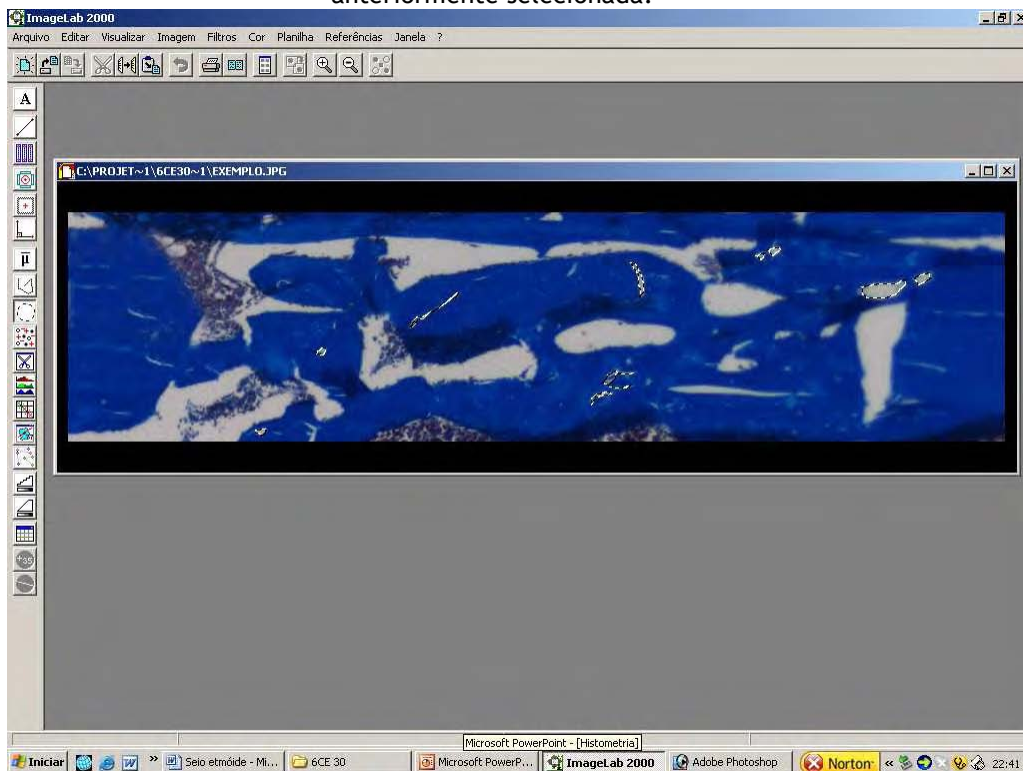


Fig. 9 - Seleção das áreas correspondentes aos espaços intertrabeculares (EI)

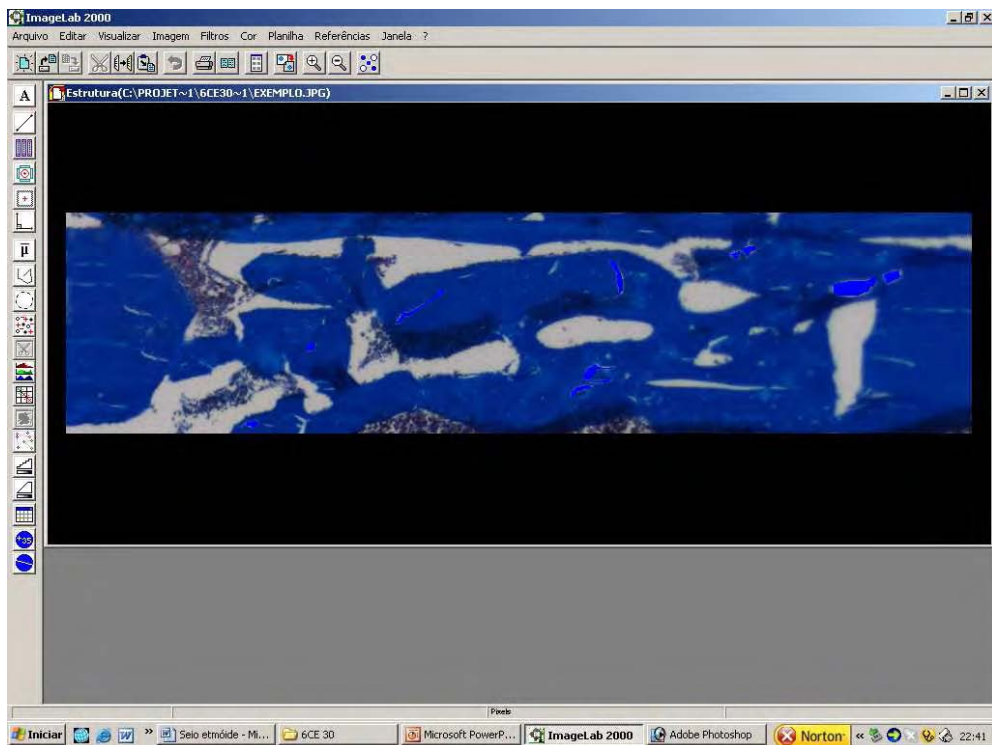


Fig. 10 - Seleção das áreas correspondentes aos espaços intertrabeculares (EI)

Estrutura(C:\PROJET~1\6CE30~1\EXEMPLO.JPG)												
4	Altura:			% de regiões:	0.8%							
5	458			em relação a	área total da imagem							
6												
7				Densidade	R	0.949						
8	Altura:			óptica média	G	40.812						
9	1.000000			das áreas	B	133.746						
10				marcadas	Média	58.502						
11												
12	MORFOMETRIA		ABSORÇÃO DE COR			Densidade	DIÂMETROS		CENTRO DE MASSA			
13	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	da estrutura	Diâm. Transv.	Diâm. Maior	Diâm. Menor	X	Y	
14	1	0										
15	357.071	0.000	6920.373	297543.031	975073.375	58.502	0.000	99.000	77.000	0.000	0.000	
16	357.071	#DIV/0!	6920.373	297543.031	975073.375	58.502	#DIV/0!	99.000	77.000	#DIV/0!	#DIV/0!	
17	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
18	357.071	0.000	6920.373	297543.031	975073.375	58.502	0.000	99.000	77.000	0.000	0.000	
19	357.071	0.000	6920.373	297543.031	975073.375	58.502	0.000	99.000	77.000	0.000	0.000	
20	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
21	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	
22												
23												
24												
25												
26	Perímetro	Fator de forma	R	G	B	Densidade	Diâm. Transv.	Diâm. Maior	Diâm. Menor	X	Y	
27	357.071		6920.373	297543.031	975073.375	58.502		99.000	77.000			
28												
29												
30												
31												
32												
33												
34												
35												
36												
37												
38												
39												

Fig. 11 - Planilha de dados do programa exibindo o valor percentual referente aos Espaços Intertrabeculares (IE) anteriormente selecionados.

Anexo E -

ANEXO E - Tabelas da análise estatística baseada nos dados obtidos na análise histométrica

Tabela 1 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. ICG10.

A. Frequência por intervalos de classe:

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	14,29	14,29	42,86	28,57	0,00	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	25,9	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,0000%	

Tabela 2 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. ICE10

A. Frequência por intervalos de classe:

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	11,11	22,22	33,33	33,33	0,00	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	16,13	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,2900%	

Tabela 3 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. IIDG10

A. Frequência por intervalos de classe:

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	14,29	14,29	42,86	28,57	0,00	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	25,09	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,0000%	

Tabela 4 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. IIDE10

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	11,11	33,33	11,11	44,44	0,00	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	52,59	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,0200%	

Tabela 5 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. ICG30

A. Frequência por intervalos de classe:

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	00,00	22,22	55,56	11,11	11,11	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	24,83	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,0100%	

Tabela 6 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. ICE30**A. Freqüência por intervalos de classe:**

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	00,00	37,50	37,50	25,00	0,00	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	18,28	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,1100%	

Tabela 7 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. IIDG30**A. Freqüência por intervalos de classe:**

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	00,00	25,00	62,50	30,00	12,50	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	51,78	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,0200%	

Tabela 8 - Teste de aderência à curva normal: Valores originais. IIDE30**A. Freqüência por intervalos de classe:**

Intervalos de classe:	M-3s	M-2s	M-1s	Méd.	M+1s	M+2s	M+3s
Curva normal:	0,44	5,40	24,2	39,89	24,20	5,40	0,44
Curva experimental:	0,00	00,00	25,00	37,50	25,00	12,50	0,00

B. Cálculo do Quiquadrado:

Graus de liberdade	4	Interpretação:
Valor do Quiquadrado	14,93	A distribuição amostral testada não é normal.
Probabilidade de HO	0,4800%	

Tabelas do Teste de Kruskal Wallis

Tabela 9 – Cruzamento dos grupos ICG10 e ICE10

Valor de Kruskal-Wallis calculado	0,4734				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	0,47				
Probabilidade de HO para este valor	49,14%				
Não-Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CG 10 x CE 10	1,6508	5,2424	7,2758	10,1182	ns

Tabela 10 – Cruzamento dos grupos ICG30 e ICE30

Valor de Kruskal-Wallis calculado	1,1204				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	1,12				
Probabilidade de HO para este valor	28,98%				
Não-Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
CG30 x CE30	2,5972	5,2079	7,2021	9,9539	ns

Tabela 11 – Cruzamento dos grupos IIDG10 e IIDE10

Valor de Kruskal-Wallis calculado	0,0700				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	0,07				
Probabilidade de HO para este valor	79,13%				
Não-Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
DG10 x DE10	0,6349	5,3147	7,3761	10,2577	ns

Tabela 12 – Cruzamento dos grupos IIDG30 e IIDE30

Valor de Kruskal-Wallis calculado	7,4559				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	7,46				
Probabilidade de HO para este valor	0,63%				
Significante ao nível de 1 % ($\alpha = 0,01$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
DG30 x DE30	6,5000	3,7483	5,2021	7,2344	1%

Tabela 13 – Cruzamento dos grupos IIDG10 e ICG10

Valor de Kruskal-Wallis calculado	1,1796				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	1,18				
Probabilidade de HO para este valor	27,74%				
Não-Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
DG10 x CG10	2,4286	4,8358	6,7799	9,5828	ns

Tabela 14 – Cruzamento dos grupos IIDG30 e ICG30

Valor de Kruskal-Wallis calculado	7,7870				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	7,79				
Probabilidade de HO para este valor	0,53%				
Significante ao nível de 1% ($\alpha = 0,01$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
DG30 x CG30	6,8472	3,8692	5,3507	7,3952	1%

Tabela 15 – Cruzamento dos grupos IIDE10 e ICE10

Valor de Kruskal-Wallis calculado	0,0487				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	0,05				
Probabilidade de HO para este valor	82,53%				
Não-Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
DE10 x CE10	0,5556	5,4915	7,5664	10,4002	ns

Tabela 16 – Cruzamento dos grupos IIDE30 e ICE30

Valor de Kruskal-Wallis calculado	3,5735				
Valor de χ^2 para 1 grau de liberdade	3,57				
Probabilidade de HO para este valor	5,87%				
Não-Significante ao nível de 5 % ($\alpha = 0,05$)					
Comparação entre as médias dos postos das amostras					
Amostras comparadas (duas a duas)	Diferença entre médias	Valores críticos (α)			Significância
		0,05	0,01	0,001	
DE30 x CE30	4,5000	4,6130	6,4023	8,9034	ns

Anexo F -

ANEXO F - Figuras

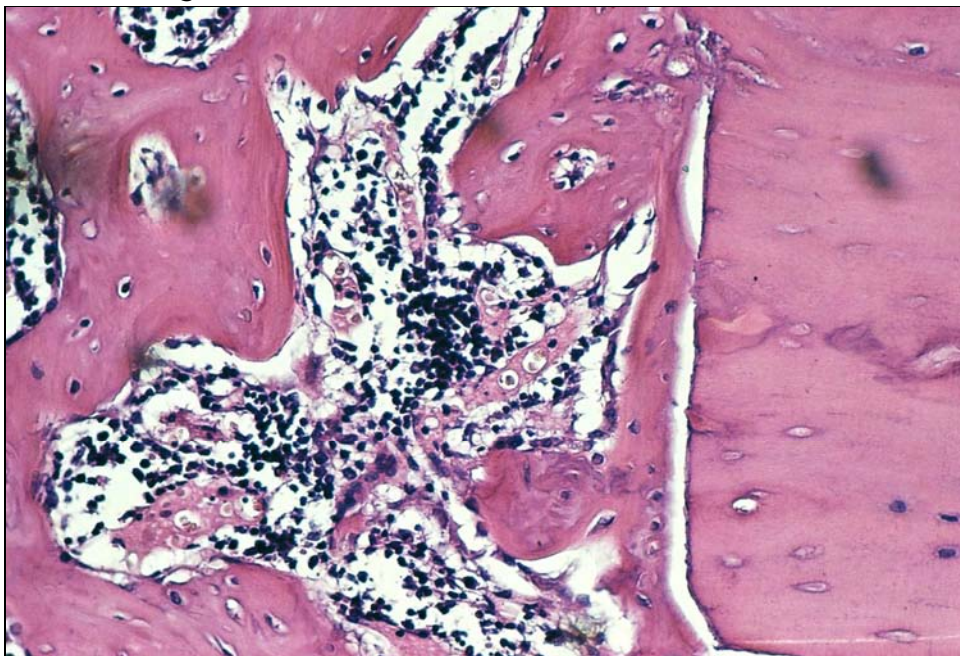


Fig. 1. ICG10 - Junto à borda da área cirúrgica observam-se trabéculas ósseas imaturas e amplos espaços intertrabeculares contendo osteoblastos em atividade osteogênica. H.E. 63x.

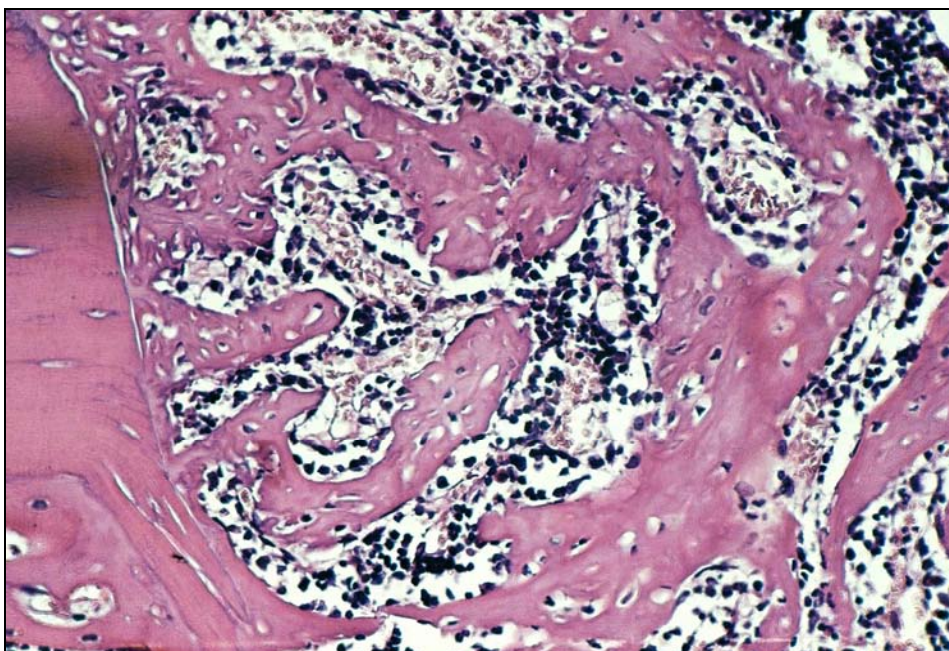


Fig. 2. IIDG10 - Junto à borda da área cirúrgica observam-se trabéculas ósseas imaturas e espaços intertrabeculares com numerosos capilares. H.E. 160x.

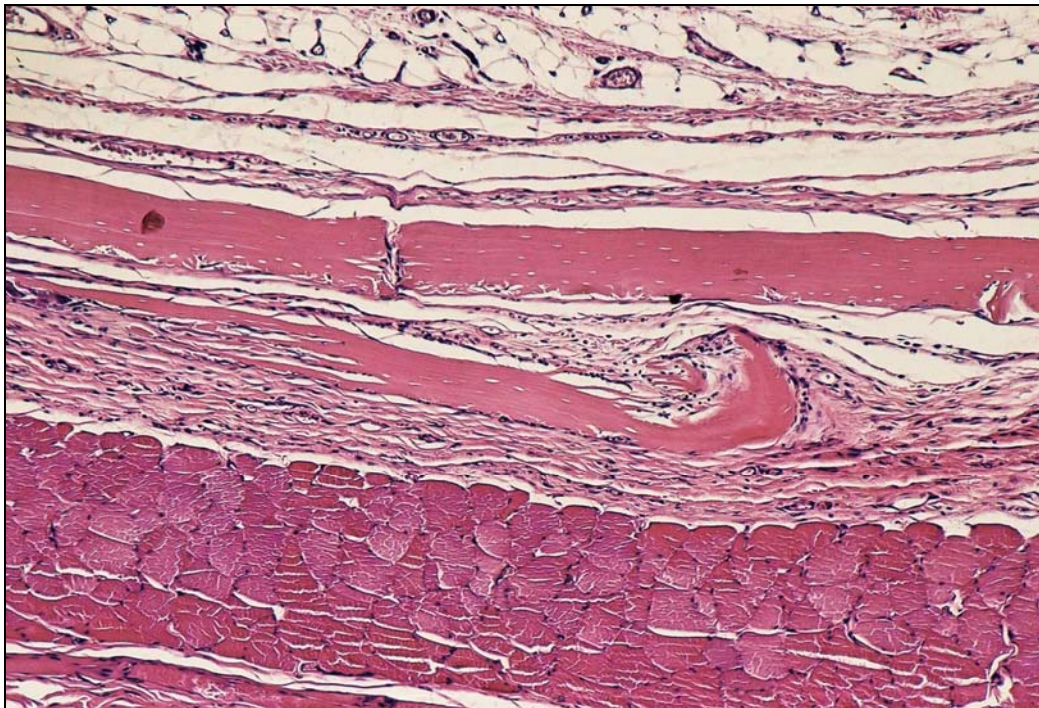


Fig. 3. Membrana implantada em tecido subcutâneo. Profundamente há área de neoformação óssea. H.E. 63x.

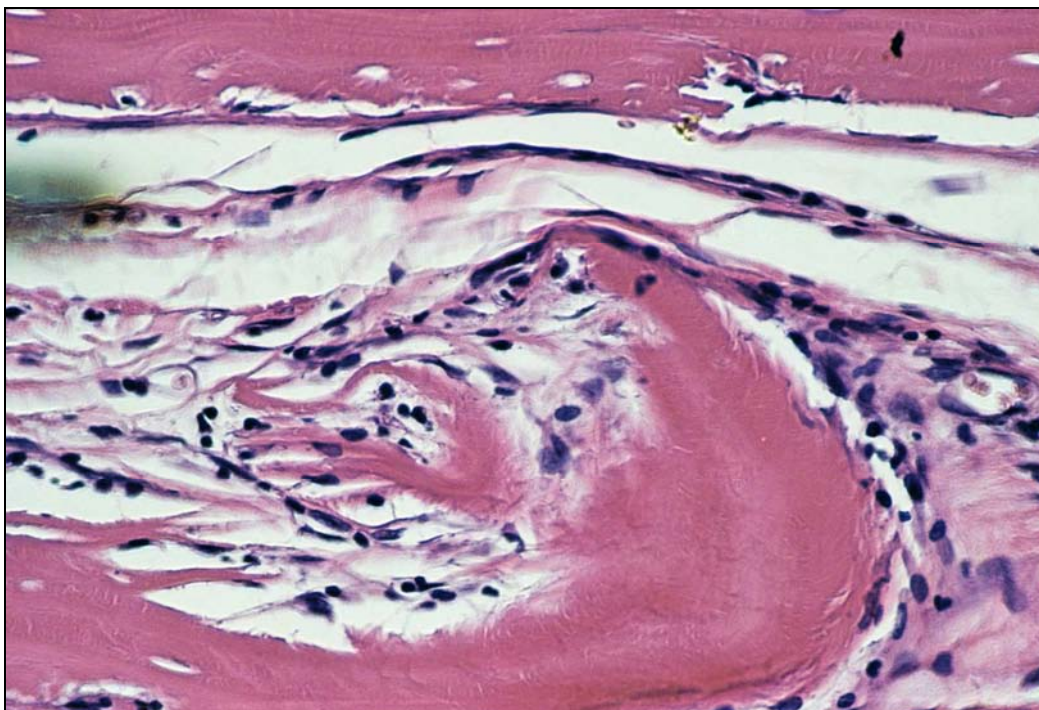


Fig. 4. Tecido osteóide com osteoblastos em atividade adjacente à membrana implantada em tecido subcutâneo. H.E. 400x.