



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

MARCELO HENRIQUE BURIOLA

**AVALIAÇÃO DINÂMICA DO REPARO ÓSSEO
APÓS A EXODONTIA DE MOLARES DE RATOS**

**Araçatuba - SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

MARCELO HENRIQUE BURIOLA

**AVALIAÇÃO DINÂMICA DO REPARO ÓSSEO
APÓS A EXODONTIA DE MOLARES DE RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin

Coorientador: Prof. Dra. Roberta Okamoto

**Araçatuba - SP
2015**

DEDICATÓRIA

A minha mãe, minha avó e meu irmão: **Malu, Elisa e Daniel;**

para mais essa etapa concluída vocês foram, como sempre, fundamentais. Assim como em toda minha caminhada quando tropecei, vocês incessantemente ali estavam para me estender as mãos. Pelo amor, paciência, compreensão, entendimentos, carinho e dedicação de uma vida. Aprendi que não tenho a necessidade de ser somente alguém com amplo conhecimento de uma área escolhida, mas que preciso ser alguém que faz a diferença na sociedade, sempre levando o bem. Tudo que sou e tudo que tenho devo a vocês. Palavras não existem para declarar a gratidão e o amor. Muito obrigado.

A **Ronaldo;**

que me acompanhou nos momentos mais complexos de todo esse projeto de vida. Seu apoio nessa conquista foi imprescindível. Cresço cada dia com seus ensinamentos, sendo meu exemplo de caráter, conduta e superação. Admiração infinita. Agradeço constantemente por ter te conhecido. De forma indiscutível, meus agradecimentos sinceros.

Aos meus amigos **Letícia, Laura, Laisy, Juliana, Giovanna, Ana Olímpia, João, Juliany;**

que tornaram possível a realização deste trabalho, me incentivando. Com vocês aprendi que tudo tem algo a ser ainda encontrado e que aqui não estamos apenas por uma simples passagem. Obrigado por me proporcionarem momentos especiais tornando irmãos que não possuo e que levarei comigo por toda à vida. Agradecimentos eternos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus;

por iluminar meus passos e ter tornado tudo isso que inicialmente pareceu impossível, possível. Sou infinitamente grato pelas pessoas que colocastes em meu caminho e pelas experiências boas e também as ruins, as quais foram fundamentais no aprendizado até o momento. Obrigado pelas oportunidades de exercitar a humildade, fé e dignidade.

Ao Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Botacin, da Disciplina de Anatomia;

pela paciência, sabedoria e tranquilidade com que conduziu a orientação nesses longos anos de convivência. Por ter confiado e acreditado no meu potencial e feito parte não apenas da minha formação, mas da minha vida. Não foram apenas orientações laboratoriais, mas também pessoais no qual me incentivou a sonhar e querer sempre o meu crescimento pessoal e profissional. A você não dedico e agradeço apenas esse trabalho, mas sim todo o meu amadurecimento. Pouquíssimos instantes difíceis passamos, mas saiba que jamais influenciou negativamente em qualquer aspecto. Aprendi muito com o senhor. Com certeza é e será meu exemplo. Mais uma vez, muito obrigado.

A Profa. Ass. Dra. Roberta Okamoto, da Disciplina de Anatomia;

que contribuiu de forma ilustre para minha formação acadêmica e também para a formação do caráter que hoje possuo. que me acompanhou à parte final dessa caminhada, orientou e ajudou com toda dedicação e carisma contribuindo com meus conhecimentos. Muito obrigado.

Aos amigos **Gustavo Momesso, Kamilla Mirando Prado, Igor Mariotto Beneti, Tàrik Ocon Braga Polo, Ana Claudia Ervolino da Silva, Letícia Pitol Palin, Bruna Gabriela dos Santos Kotake, Marco Aurélio Querubim Rodrigues e Leonardo Perez Faverani,**

que agradeço à cumplicidade, amizade e principalmente o empenho no qual me auxiliaram nesse projeto. Foi uma jornada intensa, sempre com muita alegria, dias de trabalho que com muita parceria tornaram este TCC possível. Obrigado pela confiança, respeito e irmandade. Torço por vocês e tenho certeza que construímos uma amizade sólida e incontestável.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, nas pessoas de seu Diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi e Vice-Diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa do Chefe de Departamento Profa. Adj. Doris Hissako Sumida, que possibilitou a execução de toda parte experimental do presente trabalho com adendo especial às disciplinas de Anatomia e Histologia.

Ao **Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, pela ajuda laboratorial, nos esclarecimentos de inúmeras dúvidas que emergiram para o desenvolvimento deste, na análise de resultados e fotomicrografias. Pela sabedoria. Muito obrigado.

A **Profa. Ass. Dra. Mariza Akemi Matsumoto**, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, por seus ensinamentos, paciência, incentivo e confiança ao longo das supervisões das minhas atividades. Muito obrigado.

Ao **Dr. Alexandre Rodrigues Freire** e **Profa. Dra. Ana Claudia Rossi** juntamente com o **Laboratório de Pesquisa em Mecanobiologia** da **Faculdade de Piracicaba - UNICAMP**

pois todo esse trabalho não seria realizado sem vossa imensa ajuda. Vocês contribuíram muito com minha formação. Educação, honestidade, companheirismo e palavras tornaram o ambiente de trabalho algo fantástico. Com certeza coisas boas os aguardam no futuro. Obrigado!

À **Dra. Lamis Meorin Nogueira**,

que me ensinou passos laboratoriais e participou ativamente dos meus primeiros passos científicos. Ajudou e colaborou com tudo. Mesmo estando distante, em alguns períodos, foi sempre lembrada. Sou muito grato a você. Obrigado.

Aos **Servidores do Departamento de Ciências Básicas**, André Luís Mattos Piedade, Arnaldo César dos Santos, Eliseide Maria Ferreira Silva Navega que contribuíram com respeito e humildade não só para a realização desta pesquisa, mas também para com minha formação. Em especial agradeço a **José Ari Gualberto Junqueira** que também fez parte dos meus conhecimentos adquiridos de Anatomia e que ofereceu imagens de alta qualidade para ilustrar algumas aulas durante a graduação, assim como peças anatômicas, nas quais pude estudar de forma profunda. Obrigado.

Enfim, aos **animais** desse experimento, meu profundo respeito.

BURIOLA, MH. **Avaliação dinâmica do reparo ósseo após a exodontia de molares de ratos**. 2015. f. 77. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Aracatuba, 2015.

RESUMO

O reparo ósseo alveolar é resultante do processo de osteogênese que resulta na mineralização do tecido ósseo formado. Apresenta a cronologia e os eventos bem definidos na literatura e por esse motivo constitui-se em excelente modelo de estudo para a caracterização do metabolismo do tecido ósseo. O uso de membranas e a regeneração óssea guiada consistem em manobra que tem como principal objetivo manter o volume do tecido ósseo, o que acarretaria num suporte mais adequado para a instalação de implantes. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar, por meio de parâmetros 3D, histológicos e imunoistoquímicos, o tecido ósseo formado durante seu processo de reparo, após a instalação de membranas em molares superiores de ratos. (Os procedimentos experimentais realizados neste projeto foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo 00494-2013)). Assim, foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus*, albinos, Wistar), machos, (200-300 gramas, anestesiados com quetamina e xilazina) submetidos à exodontia do 1º molar superior direito e 1º molar superior esquerdo. Do lado direito, após a exodontia e compressão com gaze estéril, foi instalada a membrana de matriz óssea colágena sobre o alvéolo que na sequência foi suturado (com fio de seda 4.0). No lado esquerdo, após a exodontia e a compressão com a gaze, as bordas do alvéolo foram suturadas (com fio de seda 4.0). Aos 14 e 28 dias após a exodontia, 5 animais por período, tiveram as hemi-maxilas, com os alvéolos em reparação, removidas para processamento histológico. Os cortes histológicos foram submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina ou ao processamento para a análise imunoistoquímica dos marcadores da fosfatase alcalina e da osteocalcina. O restante dos animais (2) teve os alvéolos em reparação removidos para avaliação por microtomografia computadorizada (Skyscan, Be). Os cortes escaneados foram reconstruídos para posterior avaliação pelos programas CTan, CTvol, CTvox, Data Viewer (parâmetros 3D), que permitiram a caracterização do tecido ósseo formado no interior do alvéolo na presença e na ausência da membrana para regeneração óssea guiada. A análise dos cortes corados com H/E apenas do grupo de 14 dias com membrana intra alveolar, apresentou um infiltrado inflamatório pouco mais acentuado que a amostra, os grupos com 28 dias apresentavam aspectos histológicos compatíveis com o período. A análise imunoistoquímica demonstrou intensa produção de fosfatase alcalina no grupo 14 dias com membrana, e nos outros apresentou produção moderada. Já a presença da osteocalcina mostrou ser mais intensa no grupo sem membrana com 14 dias, e no grupo com membrana aos 28 dias. Os parâmetros da reconstrução 3D mostraram não haver diferenças significantes ($p \leq 0,05$) entre os volumes ósseos em nenhum dos tempos analisados. Enquanto as trabéculas ósseas, dos animais com 28 dias com membrana, eram significativamente ($p \leq 0,05$) mais delgadas que no grupo sem membrana. Tais resultados nos permitem concluir que a membrana parece causar leve atraso no processo inicial de reparação alveolar, porém, mesmo apresentando trabéculas mais delgadas ao final do processo estas têm uma maior maturidade óssea.

Palavras-chave: Alvéolo Dental. Regeneração tecidual guiada. Processamento de Imagem Assistida por Computador.

BURIOLA, MH. **Dynamic evaluation of bone repair after molar extractions in rats.** 2015. f. 77. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Aracatuba, 2015.

ABSTRACT

Alveolar bone repair is the result of the osteogenesis process that occurs after the mineralization of the bone tissue formed. It presents a well-defined chronology and events in literature and therefore, it is an excellent experimental model that allows us to characterize the bone metabolism. The use of membranes for guided bone regeneration consists of a technique, whose principal aim is to maintain the bone tissue that could result in a more adequate support for implants installation. Therefore, the aim of this research is to evaluate through 3D, histological and immunohistochemical parameters, bone tissue formed during the alveolar bone repair process, after membrane installation in upper molars of rats. The experimental proceedings were submitted and approved by the Ethical Committee in the Use of Animals (Protocol 00494-2013). Twelve male rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), weighing 200-300 grams, were anesthetized with ketamine and xylazine, and submitted to the extraction of the upper first molar of both sides. On the right side, after the extraction and compression with sterile gauze, the membrane was installed on the dental socket and in the sequence, it was sutured with silk thread 4.0. On the left side, after the extraction and compression with the sterile gauze, the dental socket was sutured with the 4.0 silk thread. At 14 and 28 days after the extraction, 10 animals per period had the maxillas along with the healed dental socket, removed to undergo histological proceeding. The histological sections were stained with hematoxylin and eosin and submitted to immunohistochemistry processing for the analysis of alkaline phosphatase and osteocalcin markers. The remaining animals (2) had the dental healing sockets removed for the evaluation through computerized microtomography (Skyscan, Be). The scanned slices were reconstructed and evaluated using the programs CTan, CTvol, CTvox, Data Viewer (3D parameters) that allowed performing the characterization of the bone tissue formed into the dental socket in the presence or absence of the membrane for guided bone regeneration. The evaluation of the sections stained with HE showed that only at day 14 the group with the membrane presented an increased inflammatory infiltrate in comparison to the control group. This inflammatory infiltrate was concentrated around the membrane. At day 28, the histological aspects were compatible with the period of evaluation. The immunohistochemical analysis showed an intense production of alkaline phosphatase at day 14 in the group with membrane, while in the control group it presented a moderate production. The presence of osteocalcin was more intense in the control group at day 14, and in the group with membrane at day 28. The parameters of 3D reconstruction showed that there are no significant differences ($p \leq 0.05$) considering the bone volume in none of the between the groups in the analysed periods. Bone trabeculae of the animals that used the membrane at day 28 were significantly ($p \leq 0.05$) thinner than in control group. These results allow us to conclude that the membrane seems to cause a discreet delay in the initial process of alveolar bone repair, otherwise, even presenting thinner trabeculae at the end of the process, they present a more mature bone revealed by the mineral precipitation observed in the immunolabeling results.

Keywords: Tooth socket. Guided Tissue Regeneration. Image Processing, Computer-Assisted.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Procedimento cirúrgico em rato. (A, B) Início do procedimento cirúrgico com visualização dos molares (C), região de molares superiores do rato, extração utilizando de instrumental adaptado (D).	34
Figura 2	Membrana Biológica de origem bovina Gen Derm.	34
Figura 3	Análise morfométrica utilizando o software CTAnalyzer A linha vermelha indica o slice correspondente a metade do número de slices do alvéolo em reparação. As linhas pretas indicam os slices correspondentes à região de interesse que foi analisada.	35
Figura 4	Análise morfométrica utilizando o software CTAnalyzer. O quadrado em vermelho indica a região de interesse, o qual foi posicionado na parte central do alvéolo em reparação.	35
Figura 5	Posicionamento da peça durante o escaneamento. O quadro vermelho indica o alvéolo em processo de reparação.	36
Figura 6	14 DCM (A), 14 DSM (B), 28 DCM (C) e 28 DSM (D). Mudança da escala de cores para melhor visualização da densidade óssea.	39
Figura 7	Reconstrução tridimensional do alvéolo com 14 DCM (A) e 14 DSM (B), reconstrução tridimensional 28 DCM (C) e 28 DSM (D).	39
Figura 8	Alvéolo do grupo 14 DSM (A, B; 400x) com tecido osteóide e 14 DCM (D; 100x, porção da membrana (*) com infiltrado inflamatório intenso), (E; 400x, região em maior aumento do quadro existente na figura D, com presença do infiltrado inflamatório intenso e presença de osteoclastos). Região do alvéolo de 28 DSM (C; 400x) e 28 DCM (F; 400x) tecido ósseo preenchendo todo o alvéolo com trabéculas bem estruturadas. (Coloração H/E).	43
Figura 9	Região do alvéolo 14 DSM (A, B; expressão da fosfatase alcalina), 14 DCM (D; presença da membrana), (E; maior expressão da fosfatase alcalina). Região do alvéolo de 28 DSM (C), 28 DCM (F) presença de fosfatase alcalina. (Imunoistoquímica).400x.	44
Figura 10	Região do alvéolo 14 DSM (A, B; moderada expressão de osteocalcina), 14 DCM (D; presença da membrana), (E; expressão de osteocalcina). Região do alvéolo de 28 DSM (C), 28 DCM (F; moderada expressão de osteocalcina). (Imunoistoquímica). 400x.	45

Lista de quadros

Quadro 1	Valores obtidos através da MicroCT para Volume ósseo neoformado dos grupos: 14 DCM e 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM e Espessura do trabeculado ósseo neoformado dos grupos: 14 DCM e 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM.	40
Quadro 2	Valores obtidos após reamostragem dos grupos de 14 DCM e 14 DSM, e 28 DCM e 28 DSM.	40
Quadro 3	Teste de Kruskal-Wallis para o volume ósseo neoformado.	41
Quadro 4	Resultados do teste de Bonferroni relativo a comparação entre os valores médios, dos diferentes grupos, nos diferentes tempos de análise, para o volume ósseo neoformado.	41
Quadro 5	Teste de Kruskal-Wallis para espessura do trabeculado ósseo neoformado.	42
Quadro 6	Resultados do Teste de Bonferroni, relativo à comparação entre os valores médios, dos diferentes grupos, nos diferentes tempos de análise, para a espessura do trabeculado neoformado.	42
Quadro 7	Escore para lâminas 14 DSM e 28 DSM e 14 DCM e 28 DCM para (ALP)	44
Quadro 8	Escore para lâminas 14 DSM e 28 DSM e 14 DCM e 28 DCM para (OC).	45

Lista de Gráficos

- Gráfico 1** Distribuição de Wilcoxon para os valores de volume ósseo em 14 DCM, 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM. **41**
- Gráfico 2** Distribuição de Wilcoxon para os valores da espessura do trabeculado neoformado em 14 DCM, 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM **42**

LISTA DE ABREVIações

ALP	Fosfatase Alcalina
BMPS	Proteína Morfogenética Óssea
ePTFE	Politetrafluorotileno expandido
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
H/E	Hematoxilina-eosina
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
OLC	Osteocalcina
PB	Tampão Fosfato
PLA	Ácido Polilático
rhBMP-2	Proteína Morfogênica Óssea Recombinante Humana
ROG	Regeneração Óssea Guiada
ROI	Região de Interesse
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
14 DCM	Quatorze dias com membrana
14 DSM	Quatorze dias sem membrana
28 DCM	Vinte e oito dias com membrana
28 DSM	Vinte e oito dias sem membrana

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. REPARO ALVEOLAR	17
2.2. CRONOLOGIA DA REPARAÇÃO DO ALVÉOLO DENTAL APÓS EXODONTIA NO RATO	19
2.3. FATORES QUE INTERFEREM NA REPARAÇÃO DO ALVÉOLO DENTAL	20
2.3.1. FATORES INERENTES AO PROCEDIMENTO CIRURGICO DE EXODONTIA	20
2.3.2. SALIVA	21
2.3.3. <i>DIABETES MELLITUS</i>	21
2.3.4. ESTRESSE	21
3. REABILITAÇÃO	22
4. REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA	22
4.1. A TÉCNICA DA ROG	23
5. MARCADORES DE FORMAÇÃO ÓSSEA	24
6. SOBRE A UTILIZAÇÃO DE MEMBRANAS EM PESQUISAS	24
7. ESCANEAMENTO E ANÁLISE POR MICROTOMOGRÁFIA	27
7. OBJETIVOS	28
8. MATERIAIS E MÉTODOS	29
9. RESULTADOS	37
10. DISCUSSÃO	46
11. CONCLUSÃO	50
Referências	51
Anexos	60

1. INTRODUÇÃO

Apesar da formação dos profissionais na área da odontologia ter como base a prevenção, no Brasil ainda há inúmeros casos de perda dos elementos dentários e outras graves lesões (BARBATO, 2007).

A ausência total dos elementos dentários pode ser considerada como um dos agravantes da saúde bucal é considerado como uma marca de desigualdade social, ainda minimiza a eficiência da mastigação, dificulta a fala e afeta a estética, podendo causar danos psicológicos, acarretando na diminuição da qualidade de vida destes indivíduos (BARBATO, 2007). São inúmeros fatores que levam à perda dentária, sendo a doença cárie dental como a principal. Peterson (2000) afirmou que traumas, doença periodontal, razões ortodônticas, tratamentos inadequados realizados por profissionais da área de odontologia e também o total relapso de alguns pacientes, contribuem para elevar o número de elementos perdidos. Motivos econômicos ainda puderam ser associados como causa primária ou correlacionada a extrações dentárias (BARBATO, 2007).

O procedimento odontológico que visa à remoção dos dentes, quando há indicação, é a exodontia. Após a extração, o tecido ósseo deverá preencher o espaço que antes era ocupado pelo dente. Inicia-se então, em indivíduos saudáveis, uma cadeia de eventos que visa à cicatrização dessa loja cirúrgica, são elas: a inflamação, a epitelização, a fibroplasia e a remodelação. O alvéolo cicatriza por segunda intenção, ou seja, há um espaço entre as margens, pois, houve a perda tecidual que impossibilita a coaptação das margens. Deverão passar vários meses até que o osso cortical não seja mais visível nas radiografias.

Após a exodontia acontecem alterações dimensionais no osso alveolar tanto em altura quanto em espessura, pois ao término do processo de reparo há reabsorção óssea e as cristas são remodeladas. A ausência do estímulo mastigatório, causada pelo dente perdido é um dos determinantes locais que causam a reabsorção do osso alveolar. Existem uma combinação de fatores locais que determinam o grau e a velocidade da perda do osso alveolar, como fatores inerentes à dieta, gênero, idade e ação hormonal.

Muitas pesquisas foram realizadas tanto no homem como em animais com o intuito

de compreender melhor o processo de reabsorção do processo alveolar. Na maxila foi observada reabsorção mais pronunciada na tábua óssea vestibular do que na tábua óssea palatina, e que a reabsorção óssea em espessura é maior que a reabsorção em altura, nos períodos iniciais. Na mandíbula o padrão de reabsorção vestibular e lingual foram semelhantes (GUGLIELMOTTI; CABRINI, 1985; PIETROKOVSKI; MASSKER, 1967). Já para Araujo e Lindhe (2005), em mandíbulas, houve prevalência de reabsorção vestibular em relação com a lingual (MELO, 2007).

As maiores alterações do processo alveolar, do homem, ocorreram nos primeiros 12 meses após a extração dental, cerca de dois terços da reabsorção óssea aconteceram até o terceiro mês (SCHROPP et al., 2003; MELO, 2007).

Após a perda dental, é essencial para o sucesso do tratamento com implantes dentais a preservação do osso alveolar. Boa estabilidade inicial, volume ósseo suficiente e qualidade adequada do osso são os três fatores que influenciaram no resultado clínico das cirurgias de implante (WIDMARK et al., 1997; MELO, 2007).

Um possível método que permite ao organismo utilizar seu potencial de cicatrização natural para regenerar os tecidos perdidos, baseia-se na utilização de um biomaterial, uma membrana que pode ser absorvível ou não-absorvível, que possibilita a correta formação óssea e promove um ambiente adequado, isolando os tecidos moles do osso que será formado, sendo esta a terapia da Regeneração Óssea Guiada (ROG).

Um dos princípios da ROG é permitir que apenas as células desejadas invadam o coágulo. Assim as células indesejadas são impedidas de se aproximarem do local onde ocorre a formação do coágulo e do futuro processo de reparo. O tecido conjuntivo e o epitelial situados ao seu redor do defeito ósseo a ser reparado ficam isolados. Isso possibilita, de forma adequada, que a neoformação óssea ocorra. Para tanto a membrana deve possuir características como permeabilidade de nutrientes, biocompatibilidade, manuseabilidade clínica e capacidade de manutenção do espaço (DAHLIN et al., 1988).

Lekovie et al. (1997) e Lekovie (1998) usaram para ROG membranas de politetrafluorotileno (ePTFE) não-absorvível e de polímero de glicolídeo com lactídeo bioabsorvível, para diminuir a reabsorção óssea e preservar o osso alveolar. Concluíram que nos grupos com membrana, comparados ao grupo sem membrana, as membranas preservaram o osso alveolar.

A membrana de cortical óssea bovina desmineralizada, é uma membrana absorvível, composta por material biológico constituído por colágeno e proteínas não colágenas (CANOVA, 2003).

Para descrever o metabolismo do osso recém formado na presença ou não das membranas, utiliza-se a análise histológica imunoistoquímica. Tais estudos fazem uso dos marcadores da fosfatase alcalina e osteocalcina, uma vez que na formação do osso, a produção de matriz colágena precede a mineralização e a fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina, enquanto a mineralização coincide com uma maior produção de osteocalcina

Seria conveniente conhecer as características imunoistoquímicas e físicas do reparo ósseo após o uso da membrana de matriz óssea colágena (POLETI, 2009; VIEIRA, 1999).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. REPARO ALVEOLAR

Após a perda do elemento dental, são observadas quatro fases distintas no processo de reparo alveolar em humanos, são elas: a proliferação celular, o desenvolvimento do tecido conjuntivo, a maturação desse tecido conjuntivo e a diferenciação óssea ou mineralização (SIMPSON, 1960). Em ratos podem ser descritas apenas três fases: uma fase inicial (há formação do coágulo e alvéolo coberto parcialmente por epitélio (dura de 1 a 5 dias), uma fase de formação de tecido ósseo (dura de 5 à 20 dias) e uma fase de remodelação do tecido ósseo (a crista alveolar é remodelada e o osso matura) que dura de 20 a 60 dias (PIETROKOVSKI; MASSLER, 1967). Os eventos envolvidos no processo de reparo são parecidos em diferentes espécies e apesar de cada uma possuir períodos diferentes, podem ser resumidos da seguinte forma (MELO, 2007):

Após a exodontia o alvéolo é formado pelo osso cortical, pelo ligamento periodontal rompido, e coronalmente, por epitélio oral (gengiva). Tanto os vasos do ligamento periodontal quanto o feixe vascular, que nutria o dente, sangrarão e formarão o coágulo sanguíneo, isolando o alvéolo do meio bucal. Na primeira semana inicia-se um processo inflamatório onde leucócitos migram para o alvéolo e removem bactérias que poderiam contaminar a área. Farão também a remoção de qualquer tipo de detrito na região, como remanescentes ósseos. Também na primeira semana, o alvéolo será gradualmente povoado por fibroblastos que, originados por mitose, por diferenciação das células indiferenciadas presentes no ligamento periodontal e por células endoteliais, formarão novos vasos sanguíneos. Forma-se então um tecido conjuntivo rico em células e vasos (OKAMOTO, 1978).

O tecido neoformado, ou seja, o tecido conjuntivo, está povoado por grande quantidade de células, em maior quantidade por fibroblastos que aumentam a síntese de fibras e de substância fundamental amorfa, além de células endoteliais (OKAMOTO, 1978).

Em consequência a esses eventos há a diminuição do número de vasos sanguíneos e células, e aumento das fibras colágenas. O tecido conjuntivo começa a se

maturar (CARVALHO; OKAMOTO, 1978).

Após a exodontia a maturação das fibras colágenas e sua proliferação no interior do alvéolo dental, servem para a formação das trabéculas ósseas e de arcabouço para deposição mineral. O colágeno é o tipo de proteína mais encontrado no organismo humano e corresponde a 30% da massa corpórea seca. São encontrados na pele, ossos, cartilagens, músculos lisos e na lâmina basal. Há mais de 20 tipos de colágenos geneticamente diferentes, sendo que participam da formação estrutural do tecido ósseo os colágenos tipos I, III e V, sendo o mais abundante deles o colágeno tipo I (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Kurita et al. (1985) relataram que atuam de forma direta na reparação do alvéolo dental os colágenos tipo I, III e V. Devlin (1997) afirmou que o colágeno tipo II participa na fase inicial da reparação do alvéolo, sendo este uma proteína predominante da matriz de cartilagem hialina e que desempenha papel essencial da ossificação endocondral. Porém o alvéolo dental possui características da ossificação intramembranácea, e não há formação de cartilagem em fase anterior a calcificação do osso. Isto permite ao autor concluir que apesar dessa proteína estar presente no alvéolo, ela não participa do arcabouço de fibras colágenas no qual o osso imaturo se forma.

Na primeira semana é possível visualizar osteoclastos se acumulando na crista óssea.

Ao sétimo dia, após a exodontia, termina a fase de maturação do tecido conjuntivo e inicia-se a fase de mineralização. É depositado, da periferia para o centro, a matriz orgânica formada pelos osteoblastos e assim começa a se formar o tecido osteóide. Este será calcificado e assim se formarão as trabéculas ósseas. A deposição contínua de minerais sobre as trabéculas permite o preenchimento de toda extensão do alvéolo, há um constante espessamento das mesmas e diminuição do espaço intertrabecular. Em seguida finaliza com a organização do osso em lamelas, que é caracterizada como a maturação plena do osso. Quando o alvéolo está totalmente preenchido por tecido ósseo e a crista alveolar foi remodelada, considera-se então como uma fase completa. (BOYNE; KRUGER, 1967; BOYNE, 1966; TODO, 1968; ASTRAND; CARLSSON, 1969).

Em humanos foi observado o reparo alveolar após 64 dias, em ratos após 21 dias e em cães após 48 dias (HADDAD et al., 1965).

Enquanto o osso preenche o alvéolo, o epitélio vai se remodelando até atingir a altura da crista óssea adjacente para fechar o contato com o meio externo.

2.2. CRONOLOGIA DA REPARAÇÃO DO ALVÉOLO DENTAL APÓS EXODONTIA NO RATO

Cronologia da reparação alveolar após avulsão dental em ratos (MELO, 2007; HUEBSCH et al., 1952; GRANDINI et al., 1970; OKAMOTO; RUSSO, 1973, OKAMOTO et al., 1990).

- 24 horas de pós-operatório: presença do coágulo sanguíneo e feixes de fibras remanescentes do ligamento periodontal;

- Entre 3 e 5 dias de pós-operatório: proliferação de fibroblastos e capilares neoformados em direção ao coágulo sanguíneo com aumento da quantidade de células inflamatórias principalmente linfócitos e neutrófilos, formando o tecido de granulação. Sinais de reabsorção das paredes alveolares com presença de osteoclastos. Início da formação óssea no 5º dia de pós-operatório;

- Entre 6 e 7 dias de pós-operatório: continuação da substituição do coágulo sanguíneo por tecido de granulação, proliferação de osteoblastos na periferia do alvéolo e formação de trabéculas ósseas delgadas no terço apical e em parte do terço médio;

- Entre 9 e 10 dias de pós-operatório: presença de tecido conjuntivo mais organizado e bem vascularizado, rico em fibroblastos. Espessamento das trabéculas ósseas dos terços apical e médio, tornando-as mais evidentes. Terço cervical e porção central de todo o alvéolo sem diferenciação óssea;

- Entre 13 e 21 dias de pós-operatório: diminuição das áreas com remanescentes do coágulo sanguíneo e células inflamatórias, intensa atividade osteoblástica com formação de tecido osteóide, preenchimento gradual de todo alvéolo por trabéculas ósseas, sendo que as trabéculas próximas as corticais no terço apical do alvéolo são mais espessadas e bem definidas, enquanto que as do terço cervical são imaturas. Porção central do alvéolo ocupado por tecido de granulação, principalmente no terço cervical;

- Entre 24 e 28 dias de pós-operatório: redução constante do tecido de granulação, ocupação gradual de todos os terços e porção central do alvéolo por trabéculas ósseas

e espessamento das trabéculas com diminuição dos espaços inter-trabeculares, caracterizando o início da remodelação óssea;

- Acima de 28 dias de pós-operatório (4 semanas): remodelação óssea do alvéolo dental e processo alveolar.

Victor et al. (1977) estabeleceram radiograficamente como o 30º dia de pós-operatório o término do processo de reparo alveolar após exodontia.

2.3. FATORES QUE INTERFEREM NA REPARAÇÃO DO ALVÉOLO DENTAL

Inúmeros fatores podem interferir no reparo do alvéolo dental pós-exodontia. Como exemplos podemos citar: fatores inerentes ao procedimento cirúrgico de exodontia, saliva, distúrbios metabólicos (como diabetes mellitus), e estresse (MELO, 2007).

2.3.1. FATORES INERENTES AO PROCEDIMENTO CIRÚRGICO DE EXODONTIA

Microscopicamente foi observado por Simpson (1957) que a remoção com instrumento metálico do ligamento periodontal nas paredes do alvéolo de macacos após a extração, causa atraso na organização do coágulo e formação óssea no alvéolo.

A respeito da irrigação e curetagem Carvalho et al. (1983) observaram em ratos submetidos a exodontia do incisivo superior direito, que a irrigação com solução salina não interferia no processo de reparo alveolar entretanto a curetagem intra-alveolar, seguida de irrigação promoveu um retardo evidente na reparação. Foi concluído pelos autores que a remoção do remanescente do ligamento periodontal ocasionou o retardo no processo de reparação do alvéolo.

A fratura da crista óssea alveolar sobre o reparo de feridas de extração dental em ratos Wistar foi estudado por Magalhaes et al. (1982), onde concluíram que a fratura retarda o processo de reparo e foi sugerido a remoção do fragmento ósseo fraturado durante o ato cirúrgico, já que ele vem a atuar como corpo estranho na ferida promovendo reação inflamatória local.

Okamoto et al. (1994) relatou a interferência da presença do coágulo sanguíneo na formação do tecido de granulação pós-exodontia do incisivo superior direito em ratos Wistar. Histologicamente foi observado um grande atraso na reparação alveolar dos

animais onde foram removidos os coágulos sanguíneos após a extração dental, o que indica a importância do coágulo no mecanismo de formação do tecido de granulação.

2.3.2. SALIVA

A reparação do alvéolo dental após exodontia pode sofrer interferência pela condição do meio bucal. O processo de reparação alveolar do primeiro molar superior esquerdo após exodontia em ratos Sprague-Dawley foi pesquisado, onde esses animais foram submetidos a ligadura bilateral dos ductos parotídeos e remoção cirúrgica das glândulas sublingual e submandibular onde foi observado atraso na reparação alveolar, especificamente na substituição do coágulo sanguíneo pelo tecido de granulação, onde apresentou reação inflamatória mais longa e a formação óssea no alvéolo também aconteceu mais lentamente em comparação com o grupo sem membrana.

2.3.3. DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus inclui um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação pelo pâncreas. Inúmeros experimentos com a indução do diabetes em animais foram realizados através da remoção cirúrgica do pâncreas ou por injeção de drogas, o que permitiu estudar detalhadamente as alterações provocadas pela doença no processo de reparo alveolar pós-exodontia. Grandini et al. (1970); Mcmillan (1970 e 1971); Grandini (1978); Grandini et al. (1990); Devlin et al. (1996); Baptista (2004) e Madid (2004) relataram haver um atraso significativo na reparação do alvéolo em ratos diabéticos.

2.3.4. ESTRESSE

Alves e Okamoto (1989) avaliaram a influência do estresse por contenção física pré e pós-cirúrgico sobre a reparação alveolar após exodontia em ratos Wistar. Tanto os animais que sofreram estresse pré-cirúrgico quanto os animais que sofreram estresse pós-cirúrgico tiveram atraso no reparo alveolar, sendo o estresse pós-cirúrgico com maiores alterações. Os autores sugerem que a interferência inicial pelo agente estressante no processo reparo aumenta o atraso onde há formação do coágulo sanguíneo.

3. REABILITAÇÃO

Para possível tratamento, há a necessidade de se manter o volume e a altura óssea, ou seja, preservar o processo alveolar adotando procedimentos que minimizam a perda óssea, que recuperam a dimensão do alvéolo ou que impeçam interferências durante o processo de reparo do alvéolo (PIRES, 2010).

4. REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA

O conceito de ROG foi descrito inicialmente por HURLEY et al. (1959).

No final dos anos 80 e começo dos anos 90 foi desenvolvida a utilização da ROG em procedimentos bucais (NYAN et al., 1982; DAHLIN et al., 1988; BUSER et al., 1995; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007).

Os termos “regeneração óssea guiada” e “regeneração tecidual guiada” têm sido usados muitas vezes como sinônimos, porém de forma inadequada. Para os autores, regeneração tecidual guiada (RTG) diz respeito à regeneração da região periodontal, composta pelo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar, enquanto que a ROG diz respeito a promoção de formação óssea sozinha.

Ambas possuem o mesmo princípio, o de usar membranas como barreira para manter o espaço sobre o defeito ósseo. O crescimento interno de células osteogênicas se torna possível com o uso dessa barreira prevenindo a migração de células indesejáveis, como células dos tecidos moles, para dentro da área de neoformação óssea (NYAN et al., 1982; DAHLIN et al., 1989; BUSER et al., 1993).

Essas membranas utilizadas para ROG devem possuir características como: biocompatibilidade, estabilidade (o período necessário para a função de barreira), mantenedora de espaço, permitir o crescimento celular seletivo e ser de fácil manipulação (LUNDGREN et al., 1997; ZITZMANN et al., 2001; VON ARX et al., 2001; VON ARX, 2001; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007).

Estas membranas são classificadas em: absorvíveis e não-absorvíveis (IRINAKIS, 2006; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007).

As membranas absorvíveis estão divididas em duas categorias: as membranas naturais e as membranas sintéticas, sendo as membranas naturais provenientes de vários tipos de colágeno de origem animal. As sintéticas são a base de polímeros como

poliéster alifático, o ácido polilático (PLA) (HUTMACHER et al., 1996; IRINAKIS, 2006; MCALLISTER; HAGHIGHAT, 2007; DARBY et al., 2009).

As membranas não-absorvíveis podem ser constituídas por politetrafluoretileno expandido (PTFEe), PTFEe reforçado com titânio, PTFEe de alta densidade ou malhas de titânio (MELLONIG; NEVINS, 1995; JOVANOVIĆ; NEVINS, 1995; VON ARX et al., 1996; BARTEE, 2001; IRINAKIS, 2006).

Quanto ao uso da membrana não-absorvível faz-se necessária uma segunda cirurgia para removê-la, o que após exposição pode levar a uma contaminação, a recessão gengival em casos de cirurgias periodontais, além do seu custo ser elevado. Na utilização da membrana absorvível, não há necessidade de um segundo tempo cirúrgico e seu tempo de absorção varia conforme o tipo de membrana utilizada.

A membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada é um material biológico constituído por colágeno tipo 1 (95%) e proteínas não colágenas (5%) como fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPS) (CANOVA, 2003).

Essas proteínas (BMPS) participam de diversas atividades biológicas, envolvendo diferenciação celular, regeneração, reparo e estímulo de secreção de matriz extracelular.

4.1. A TÉCNICA DA ROG

A técnica da regeneração óssea guiada tem como finalidade a preservação do rebordo alveolar, pode ser feita da seguinte maneira:

A) Utilização apenas da membrana. (LEKOVIC et al., 1997; LEKOVIC et al., 1998; BARTEE, 2001);

B) Utilização da membrana juntamente com preenchimento imediato do alvéolo dental com algum tipo de enxerto ósseo e/ou de seus substitutos. (BRUGNAMI et al., 1996), (BUSER et al., 1996; SMUKLER et al., 2009; FERNANDES et al., 2010);

C) Utilização da membrana associando ao implante osseointegrável imediato. (DAHLIN et al., 1988; MELLONIG; NEVINS, 1995; ZITZMANN et al., 2001);

D) Utilização das três técnicas – membrana, implante osseointegrável imediato e preenchimento alveolar. (LUNDGREN et al., 1997).

5. MARCADORES DE FORMAÇÃO ÓSSEA

Fosfatase Alcalina Óssea

No processo inicial de formação do tecido ósseo, os osteoblastos, após secretarem a primeira camada de matriz orgânica, assumem importante papel na mineralização (MUNDY, 1991). As vesículas da matriz óssea, originadas da membrana plasmática dos osteoblastos, permanecem na matriz extracelular e exibem forte marcação em sua membrana para a fosfatase alcalina (ALP). Tais vesículas se rompem e a mineralização se espalha pela matriz. Este processo é muito evidente nos locais onde está ocorrendo a formação e a mineralização do tecido ósseo (ANDIA et al., 2006). A interpretação dos valores da ALP pode assim ser usada como marcador molecular do metabolismo ósseo no processo de reparo alveolar (POLETI, 2009; VIEIRA, 1999).

Hassumi et al. (2014) confirmaram que, a expressão da fosfatase alcalina, durante o processo de reparo alveolar de ratos, aumenta próximo aos 14 dias e mantém valor semelhante até o 28º dia. Portanto é expressa de forma mais intensa, em períodos que coincidem com o aumento na formação de tecido mineralizado.

Osteocalcina

A osteocalcina é um peptídeo secretado por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos. É primariamente depositada na matriz óssea recém formada, tendo uma pequena fração que entra na circulação, que a caracteriza como uma proteína marcadora de atividade osteoblástica. É depositada significativamente na matriz óssea, tornando-a uma das proteínas não-colágenas mais abundantes. Quando há reabsorção óssea, é totalmente destruída na reabsorção promovida pelos osteoclastos. É constituída por 49 amino ácidos, sendo três (posições 17, 21 e 24) constituídos por ácido gama-carboxiglutâmico (Gla), que a permite se ligar cálcio. Sua estrutura indica interação com cálcio e com cristais de hidroxiapatita apontando que o aparecimento e aumento de produção da proteína são coincidentes com o início do processo de mineralização. Por suas características é utilizada como marcador de osteoblastos maduros (VIEIRA, 1999).

6. Sobre a utilização de membranas em pesquisas

Carvalho, (2011) avaliou sujeitos com fissura de lábio e palato completa unilateral

em época ideal para se realizar a cirurgia de enxerto ósseo alveolar (antes da irrupção do canino permanente). O total de participantes foi de 24 (16 do sexo masculino e 8 do sexo feminino), foram divididos em dois grupos de 12 indivíduos cada, o controle (onde foram realizados enxertos autógenos da crista ilíaca), e o teste (onde foram realizados enxertos com proteína morfogênica óssea recombinante humana (rhBMP-2) em esponja de colágeno absorvível (MCA)). Ambos os grupos realizaram exames clínicos, radiográficos e laboratoriais. Foi realizado também exames tomográficos de feixe cônico. Os indivíduos que participaram do estudo foram avaliados clinicamente, radiograficamente e tomograficamente nos intervalos de 6 meses e 1 ano. Na avaliação volumétrica, encontrou-se uma média de preenchimento de 45,34% aos 6 meses no grupo controle, e 40,63% no teste; 53,33% em um ano no grupo controle e 53,1% no grupo teste.

Silva, (2006), avaliou o processo de reparo ósseo em defeitos cirúrgicos realizados na parede alveolar do seio maxilar comunicando-se com a cavidade sinusal utilizando membranas de colágeno Gem-derm – Genius Baumer, Pro-tape – Proline e fáschia temporal autóloga. Foram empregados quatro macacos pregos (*Cebus apella*). Foram feitas análises histológicas com microscopia convencional e luz polarizada dos cortes corados com hematoxilina-eosina e com picro sirius red após 180 dias da comunicação experimental. Os resultados mostraram que no defeito experimental sem cobertura com métodos de barreira houve predomínio de proliferação óssea em dois animais e nos outros dois a comunicação foi preenchida com tecido conjuntivo fibroso. No grupo que foi utilizada a fáschia temporal houve predomínio de tecido conjuntivo fibroso em três animais e de proliferação óssea em um animal. Nos grupos que foram utilizadas membranas de colágeno Gen-derm e membrana de colágeno Pro-tape houve completa proliferação óssea e predomínio de tecido conjuntivo fibroso em um animal. Concluiu-se que o uso de membranas trouxe benefícios no processo de reparo ósseo comparados com o uso da fáschia temporal ou o não uso de membranas.

Deliberador et al. (2008) fizeram uma revisão de literatura sobre o uso da

regeneração tecidual guiada no tratamento dos defeitos de furca classe II. Nesses estudos foram comparados a técnica de RTG e o debridamento cirúrgico, apenas no tratamento de defeitos de furca classe II em molares mandibulares. Quando a membrana não-absorvível de politetrafluoroetileno expandido (PTFE-e) foi utilizada, foram encontrados resultados variados, e em algumas pesquisas os resultados não foram clinicamente significativos. Sobre a utilização da segunda geração de membranas (absorvíveis), também foram encontrados resultados variados, com alguns resultados clinicamente favoráveis para a técnica da RTG, principalmente quando a membrana à base de ácido polilático foi empregada. Na comparação clínica entre membranas absorvível e não-absorvível, os resultados mostraram-se similares e modestos, com diferenças não significantes. Puderam concluir que a RTG, no tratamento de molares mandibulares com defeitos de furca classe II, apresentou resultados com alta variabilidade e imprevisibilidade.

Borrasca (2007) avaliou o processo de reparo ósseo de cavidades cirúrgicas preenchidas ou não com osso autógeno e recobertas por membrana de matriz óssea homogênea em diabéticos. Foi avaliado qualitativamente 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 realizada em tíbias de ratos diabéticos. Foram utilizados 40 ratos Wistar que foram divididos em dois grupos, o controle e o diabético. Durante o procedimento cirúrgico, foi realizado uma incisão longitudinal na região anterolateral de cada tíbia, em seguida duas cavidades cirúrgicas de 2mm de diâmetro foram feitas, uma no membro posterior direito e outra no membro posterior esquerdo. A primeira foi preenchida com osso particulado autógeno, coletado durante a confecção da cavidade, a segunda preenchida com coágulo sanguíneo e ambas recobertas pela membrana. Aos 10 e 30 dias foram realizadas as análises histomorfométrica. Conclui-se que a reparação óssea

foi maior com o emprego dos enxertos ósseos no grupo controle, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significantes em nenhum período. Aos 30 dias o processo de reparo das tíbias preenchidas por enxerto no grupo controle foi qualitativamente mais favorável, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significantes, a membrana foi biocompatível em todos os grupos analisados.

7. Escaneamento e análise por microtomografia

O método radiológico que permite obter a reprodução de secções do corpo humano, com finalidade diagnóstica é a tomografia computadorizada, que utiliza de cortes tomográficos. Para melhor resolução da imagem os cortes tomográficos devem possuir entre si, espaços finos e próximos. Assim, esses cortes podem ser unidos artificialmente por programas de computador e permitir a reconstrução tridimensional do objeto radiografado, podendo-se escolher uma visualização em outro plano (RODRIGUES; VITRAL, 2007). Através de softwares também é possível analisar as imagens e coletar dados que podem ser utilizados em pesquisas (JIAO et al., 2010).

8. OBJETIVO

Avaliar, in vivo, o efeito sobre o volume do tecido ósseo, a espessura do trabeculado ósseo utilizando da microtomografia computadorizada e reconstrução tridimensional e o grau de maturidade do tecido ósseo neoformado através da análise histológica imunoistoquímica, durante o processo de reparo ósseo após a instalação de membrana reabsorvível em alvéolos de molares superiores de ratos.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo seguiu as normas estabelecidas pelo “Canadian Council on Animal Care – Guide to the Care and Use of Experimental Animals”. Os procedimentos experimentais propostos neste projeto foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo 00494-2013), (Anexo A).

Assim, foram utilizados 12 ratos (*Rattus norvegicus*, albinos, Wistar), machos, entre 200 e 300 gramas, adultos-jovens, de 5 semana de vida, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), sendo os animais transferidos para o Biotério de manutenção do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP), 5 dias antes do experimento. Estes foram acondicionados em gaiolas, alimentados com ração granulada e água *ad libitum* e mantidos em ciclo de claro/escuro de 12/12 horas a 22 +/- 2°C e 50 +/- 10% de umidade relativa.

Para avaliar a influência da presença ou não da membrana no processo de reparo do osso alveolar, os animais foram divididos em 2 grupos: com membranas e sem membranas. Os períodos estudados foram de 14 dias e 28 dias. Os grupos consistiam em:

Sem membrana – composto pelas hemi-maxilas esquerdas dos animais que não foram submetidos à condição experimental, nele não foi colocada a membrana no interior do alvéolo dental;

Com membrana (cirurgia) – composto pelas hemi-maxilas direitas dos animais que foram submetidos ao experimento, onde se colocou a membrana biológica de origem bovina (Gen-derm, 20x20mm, 150-200micra, Baumer S. A., Mogi Mirim, Brasil) no interior do alvéolo dental.

Antes da cirurgia experimental, os animais foram previamente anestesiados com solução de cloridrato de ketamina (25mg/kg, Vetanarcol, Laboratórios Konig, Argentina) e xilazina (10mg/kg, Coopazine, Coopers Brasil, Brasil).

Uma vez imobilizado o animal (Fig. 1), foi realizado a antisepsia da porção anterior e posterior das maxilas com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine –Ind. Farmac. Rioquímica Ltda). Foi realizado a sindesmotomia, luxação e avulsão do primeiro molar superior direito e esquerdo com auxílio de instrumental especialmente adaptado.

Do lado direito, após a exodontia e compressão com gaze estéril, foi instalada a membrana Gen-derm (Fig. 2) (membrana biológica de origem bovina, 20x20mm, 150-200micra, Baumer S. A., Brasil) sobre o alvéolo que na sequência será suturado com fio de seda 4.0. No lado esquerdo, após a exodontia e a compressão com a gaze, as bordas do alvéolo serão suturadas também com fio de seda 4.0.

Após a cirurgia todos os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular (benzatina benzilpenicilina – 12.000IU, provaina benzilpenilicina – 6.000 IU, benzilpenicilina potássica – 6.000 IU, sulfato de dihidroestreptomicina – 5mg, Fort Dodge, Animal Health Ltda., Campinas, SP, Brasil).

Eutanásia dos animais e processamento histológico

Em grupo de 6, os ratos foram sacrificados por inalação gás halotano aos 14 e 28 dias após o ato operatório. Após o sacrifício, a maxila direita foi separada da esquerda, realizando-se uma incisão ao nível do plano sagital mediano. Acompanhando a sutura inter-maxilar. Outro corte, com tesoura reta, foi feito anterior à face mesial dos molares, cerca de 5mm à frente desta, e possibilitou a obtenção da peça com alvéolos dentais posteriores.

As porções das maxilas, do lado direito, representavam os alvéolos que receberam a membrana, enquanto as do lado esquerdo eram seus respectivos controles, pois estes alvéolos não receberam a membrana após a exodontia do molar. Os espécimes assim obtidos foram imediatamente dissecados e fixados, por imersão, em solução fixadora de formol a 10% tamponada (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas a 4°C. Após esta etapa as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas.

As peças relativas aos lados direito e esquerdo de um animal sacrificado aos 14 dias e outras de um sacrificado aos 28 dias foram mantidas em solução fixadora. Estas foram encaminhadas para avaliação por microtomografia computadorizada (MicroCT) (Skyscan, Be).

Preparo das lâminas para análise HE/Imunoistoquímica

Neste momento, os espécimes fixados previamente em formol, foram lavados em

tampão fosfato de sódio (PB) (Sigma Chemical CO. St. Louis, MO, EUA) a 0,1M, pH 7,4 a 4°C em seguida foram submetidas a descalcificação em EDTA (Labsynth. Diadema, SP, Brasil) a 18% em PB, durante 20 dias e lavadas exaustivamente em PB. Em seguida passou por desidratação utilizando uma sequência de álcoois. Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de cortes com 5 µm de espessura e montados em lâminas silanizadas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras para as reações de imunoistoquímica.

Previamente a realização das análises histológicas e imunoistoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conhecesse a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

Realização da reação de imunoistoquímica e suas análises (Anexo C)

Para a análise histológica imunoistoquímica um grupo de lâminas foi submetido ao protocolo de Imunoistoquímica – Técnica da Imunoperoxidase conforme Anexo 3, foram utilizados marcadores para fosfatase alcalina e osteocalcina, sendo estas enzimas, sinalizadoras da formação óssea.

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (pH 6.0). Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteocalcina (SC18319 – anticorpo policlonal produzido em cabras, Santa Cruz Biotechnology), com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de precipitação de cálcio e mineralização do tecido ósseo.

Foram realizados experimentos de imunoistoquímica utilizando como método de detecção a Imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotinilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Avidina e Biotina (PK 6100, Vector Laboratories) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Ao término da reação de diaminobenzidina foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris. A avaliação da imunomarcção positiva foi realizada a partir de análise qualitativa ordinal, onde diferentes escores de acordo com área de células e tecido

mineralizado foram imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), por meio de escores que representaram: marcação leve (escore 1), marcação moderada (escore 2) e marcação intensa (escore 3) (Escore estabelecidos de acordo com PEDROSA JR et al., 2009; MANRIQUE et al., 2015). Foram consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos.

Forma de análise dos cortes histológicos corados em H/E

Um número de 3 cortes de cada amostra, com uma distância de 40 µm entre eles, foi selecionado para avaliar o processo de reparo osso alveolar e suas mudanças relacionadas durante o período de estudo.

Os cortes histológicos foram analisados em campo claro com o auxílio de um microscópio Aristoplan (Leica – Aristoplan, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). Os campos visuais da maxila de cada animal foram coletados com objetivas de 4x e 100x através do programa de software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha), alterando as variáveis de brilho e contraste de modo a realçar as células e tecidos.

Escaneamento e análise por microtomografia

As maxilas mantidas em solução fixadora foram escaneadas. Os cortes assim obtidos foram reconstruídos para posterior avaliação pelos programas CTan, CTvol, CTvox, Data Viewer e para a obtenção de parâmetros 3D, que permitiram a caracterização do tecido ósseo formado no interior do alvéolo na presença e na ausência da membrana para regeneração óssea guiada. As peças foram submetidas à microtomografia computadorizada em um microtomógrafo SkyScan modelo 1172 (SkyScan, Leuven, Bélgica) com pico de voltagem de 60 kV e amperagem de 165 uA. Foram realizados escaneamentos de cada peça em posição longitudinal e embebidas em Formol 10%. Nas imagens escaneadas, a dimensão dos pixels foi configurada em 5,88 µm em alta resolução (2000 x 2000 pixels).

Após o escaneamento, as sequências de imagens foram importadas no software

NRecon Reconstruction (SkyScan, Leuven, Bélgica) para reconstrução em escala de cinza, em cortes axiais e apresentando os coeficientes de atenuação de raios-x com valores relativos à estrutura óssea. Para obtenção dos valores corretos dos coeficientes de atenuação foi realizada calibração baseada nos valores referentes ao meio aquoso (solução de formol a 10% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) (JIAO et al., 2010).

Após a reconstrução tridimensional (Fig. 7) foi utilizado o software CT-Analyzer (SkyScan, Leuven, Bélgica) para obtenção de medidas da espessura do trabeculado ósseo neoformado e cálculo do volume ósseo neoformado (Anexo 2). Para padronização da região de interesse (ROI), foram quantificados os números totais de slices compondo totalmente o alvéolo em reparação de cada peça. A partir do slice central foram considerados, na ROI, 50 slices mesiais e distais, compondo uma região central com 100 slices (Fig. 3).

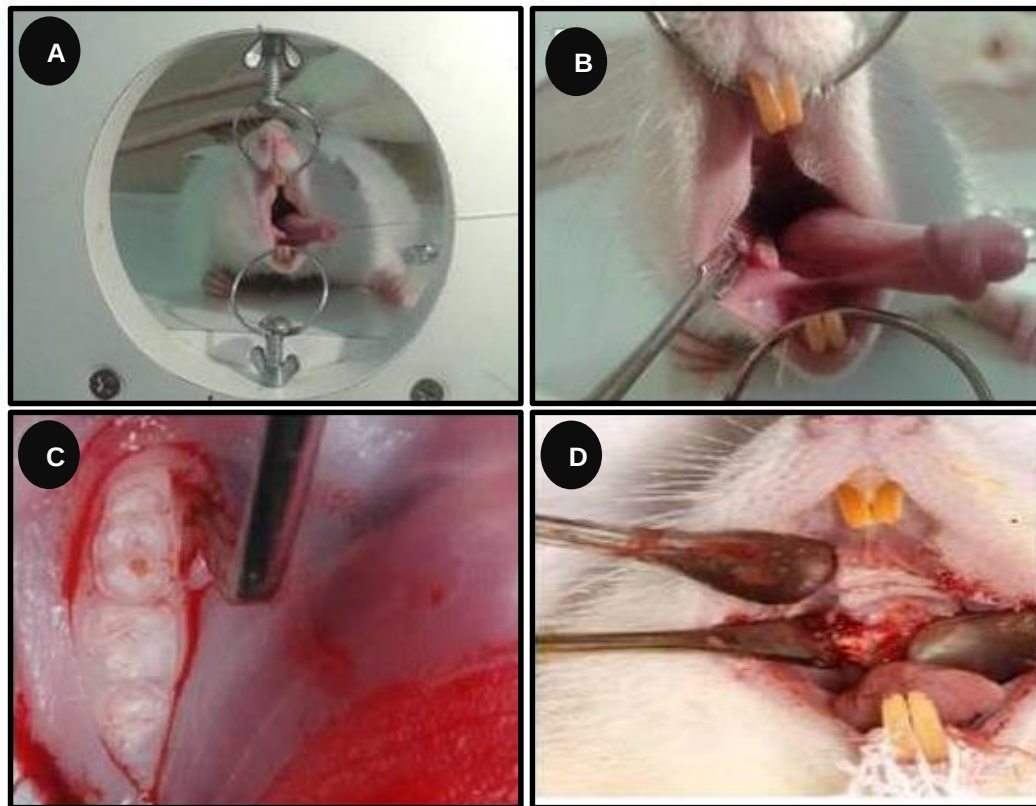
A ROI foi delimitada em um quadrado com 1mm de lado, localizado na parte central do alvéolo (Fig. 4). A partir da determinação da ROI, as imagens foram convertidas em escala de cinza para realização do cálculo tridimensional. Os dados obtidos foram exportados e organizados para análise estatística.

Conhecendo a densidade da solução fixadora, e utilizando o slice central, o software CT-Analyzer (SkyScan, Leuven, Bélgica) pode alterar sua coloração, inicialmente em escala de cinza para coloração com tons de cores quentes onde as cores mais escuras representariam tecidos mais densos (Fig. 6).

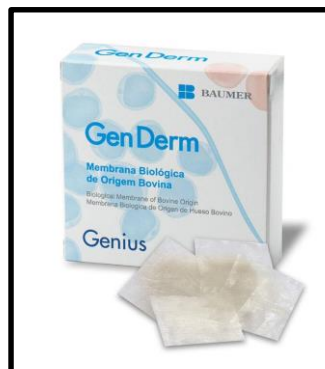
Análise estatística dos resultados da microtomografia computadorizada

A partir das amostras (14 DCM e 28 DCM, 14 DSM e 28 DSM) foi realizado processo estatístico bootstrap nos valores referentes ao volume ósseo e espessura das trabéculas do osso neoformado. Esse processo realiza uma reamostragem a partir dos dados que foram obtidos. Assim o n, nestas análises, passou de 1 para 5, para cada grupo, o que permite a análise estatística. Foram utilizados testes não-paramétricos em virtude do tamanho da amostra, pois não há normalidade. O teste Kruskal Wallis foi aplicado para diferenciar os grupos. Em seguida foi realizado o teste de Bonferroni para ver onde se encontram as diferenças entre as amostras.

Fig. 1. Procedimento cirúrgico em rato. (A, B) Início do procedimento cirúrgico com visualização dos molares (C), região de molares superiores do rato, extração utilizando de instrumental adaptado (D).

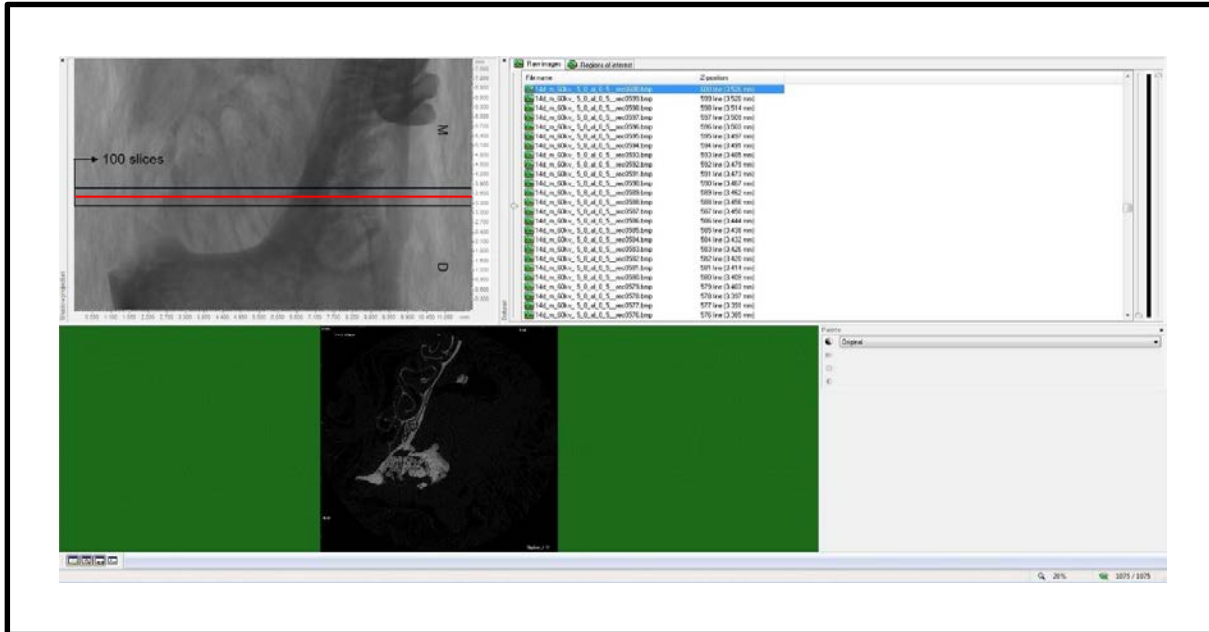


Fonte: Cedido por C.D. Gustavo Momesso e Profa. Ass. Dra. Mariza Akemi Matsumto.
Fig. 2. Membrana Biológica de origem bovina, Gen Derm.



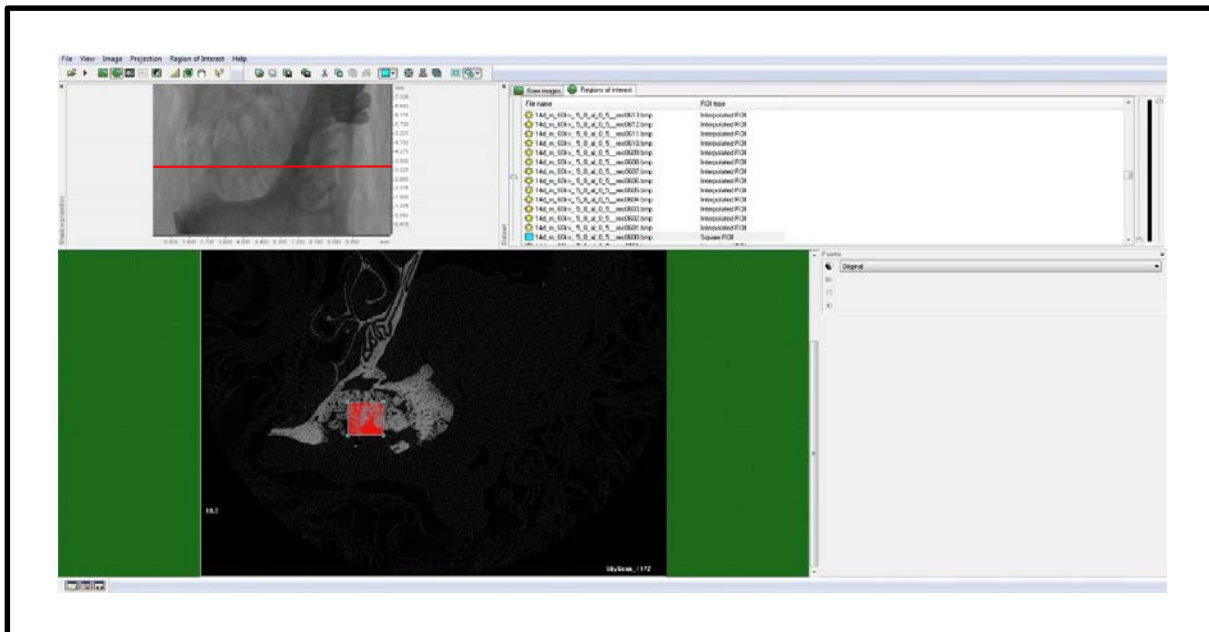
Fonte: Disponível em: <http://www.promodental.com.br/loja/002511/gen-derm-p-cortical-bovina-2x2.html>. Acesso em: 18.08.2015.

Fig. 3. Análise morfométrica utilizando o software CTAnalyzer. A linha vermelha indica o slice correspondente a metade do número de slices do alvéolo em reparação. As linhas pretas indicam os slices correspondentes à região de interesse que foi analisada.



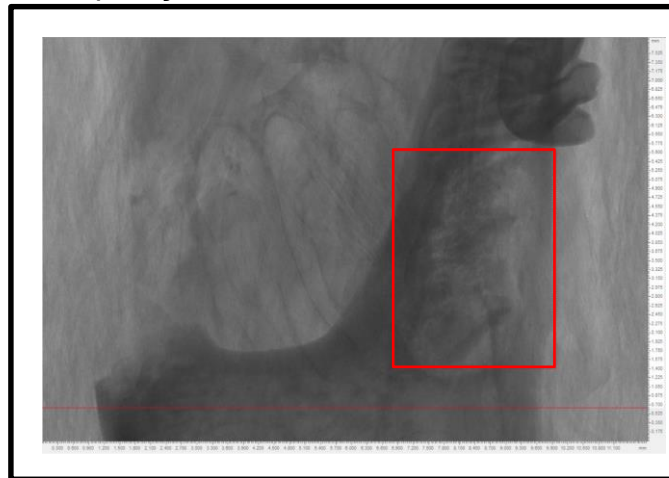
Fonte: Do autor com colaboração de Dr. Alexandre Rodrigues Freire.

Fig. 4. Análise morfométrica utilizando o software CTAnalyzer. O quadrado em vermelho indica a região de interesse, o qual foi posicionado na parte central do alvéolo em reparação.



Fonte: Do autor com colaboração de Dr. Alexandre Rodrigues Freire.

Fig. 5. Posicionamento da peça durante o escaneamento. O quadro vermelho indica o alvéolo em processo de reparação.



Fonte: Do autor com colaboração de Dr. Alexandre Rodrigues Freire.

10. RESULTADOS

Análise Microtomográfica

Os dados de volume e espessura do trabeculado ósseo neoformados foram extraídos da análise microtomográfica (Anexo 2) foram copiados no Quadro 1.

Os valores da reamostragem dos grupos 14 DCM, 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM estão apontados no Quadro 2.

Volume Ósseo.

Os resultados obtidos a partir da variável do volume ósseo, entre os grupos 14 DCM e 14 DSM, indicam que não existiram diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) entre os valores obtidos.

Entre os grupos 28 DCM e 28 DSM os valores obtidos também não resultaram em diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$).

Na comparação entre os grupos com 14 dias e os outros, com 28 dias, observam-se diferenças significantes ($p \leq 0,05$) apontadas pela análise estatística.

Espessura do Trabeculado Ósseo.

Os resultados obtidos a partir da variável da espessura do trabeculado ósseo neoformado, entre os grupos 14 DCM e 14 DSM, apresentaram valores que não tiveram diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Dentre os grupos 28 DCM e 28 DSM os valores tiveram diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

Análise Histológica H/E

Em ambos os grupos (Fig. 8), com e sem membrana, aos 14 dias após o ato operatório, foram observadas intensa atividade osteoblástica e formação de tecido osteóide. Preenchimento parcial do alvéolo por trabéculas ósseas bem definidas, porém não completamente maduras.

Na amostra (Fig. 8), o coágulo sanguíneo estava bem reduzido e o infiltrado inflamatório discreto. Já nos animais que receberam a membrana, apesar da diminuição do coágulo sanguíneo, observou-se um infiltrado inflamatório pouco mais intenso que nos sem membranas. Este aspecto era muito evidente apenas ao redor do restante da

membrana, que por sua vez era facilmente observada no interior do alvéolo.

Aos 28 dias (Fig. 8), pós operatórios, não foi possível encontrar fragmentos da membrana nos alvéolos tratados. Em todos os animais, com ou sem membrana, o aspecto histológico observado era semelhante. Apresentavam uma redução drástica do tecido de granulação, preenchimento dos espaços por trabéculas ósseas. Estas já preenchiam quase que totalmente o alvéolo, o que tornava os espaços medulares reduzidos.

Análise Histológica Imunoistoquímica

Em todos os grupos, após a exodontia caracterizaram-se pela presença das proteínas fosfatase alcalina e osteocalcina nos osteoblastos ao redor do trabeculado ósseo em formação, na matriz extra-celular não mineralizada e mineralizada.

A fosfatase alcalina caracteriza-se por ser uma enzima presente nos osteoblastos, sendo um dos marcadores do fenótipo osteoblástico, que regula a precipitação de fosfato sobre a matriz colágena.

Já a osteocalcina, também marcadora do fenótipo osteoblástico, sinalizará a precipitação de cálcio sobre a matriz colágena, sendo também um marcador do processo de mineralização óssea.

Análise histológica imunoistoquímica para o marcador de ALP

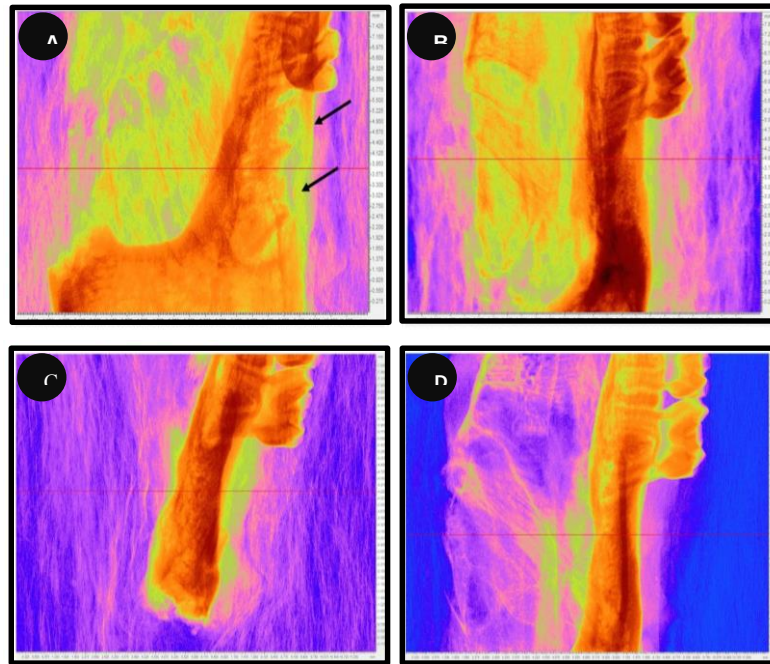
A expressão do marcador de ALP, de acordo com os escores, no grupo 14 DSM se mostrou moderado e no grupo 14 DCM, se mostrou intenso.

A expressão do marcador de ALP, de acordo com os escores, no grupo 28 DSM, se mostrou moderado e no grupo 28 DCM, se mostrou moderado.

Análise histológica imunoistoquímica para o marcador de OC.

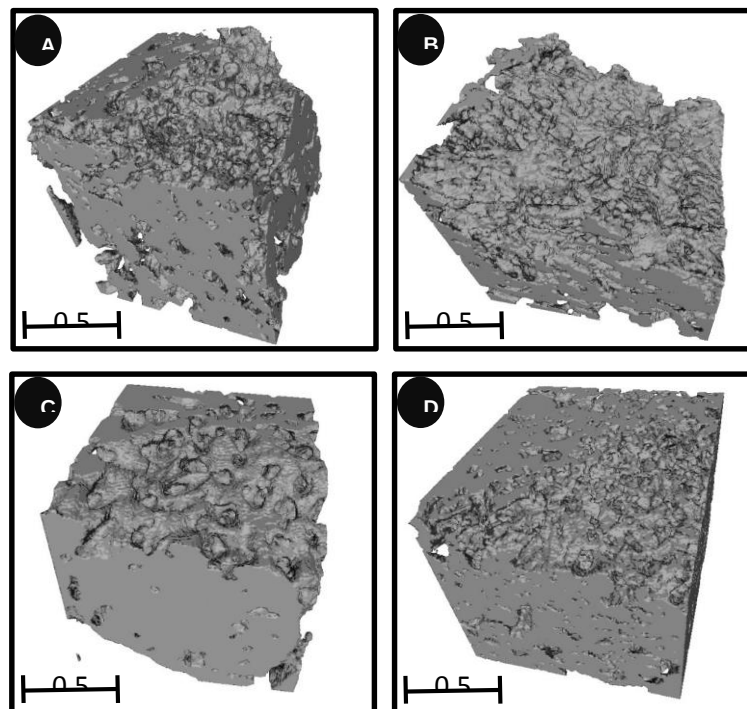
A expressão do marcador de OC, de acordo com os escores, no grupo 14 DSM, o resultado se mostrou de moderado a intenso e no grupo 14 DCM, o resultado se mostrou moderado. A expressão do marcador de OC, de acordo com os escores, no grupo 28 DSM, o resultado se mostrou entre leve a moderado e no grupo 28 DCM, o resultado se mostrou moderado.

Fig. 6. 14 DCM (A), 14 DSM (B), 28 DCM (C) e 28 DSM (D). Mudança da escala de cores para melhor visualização da densidade óssea.



Fonte: Do autor com colaboração de Dr. Alexandre Rodrigues Freire.

Fig. 7. Reconstrução tridimensional do alvéolo com 14 DCM (A) e 14 DSM (B), reconstrução tridimensional 28 DCM (C) e 28 DSM (D).



Fonte: Do autor com colaboração de Dr. Alexandre Rodrigues Freire.

Quadro 1. Valores obtidos através da MicroCT para Volume ósseo neoformado dos grupos: 14 DCM e 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM e Espessura do trabeculado ósseo neoformado dos grupos: 14 DCM e 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM.

	Volume ósseo		Espessura do trabeculado ósseo	
	SM	CM	SM	CM
14 D	0.30015 mm ³	0.26467 mm ³	0.08617mm	0.08418mm
28 D	0.46718 mm ³	0.43839 mm ³	0.21753mm	0.14275mm

Fonte: Do autor.

Quadro 2. Valores obtidos após reamostragem dos grupos de 14 DCM e 14 DSM, e 28 DCM e 28 DSM.

Obs	Grupo	EspTrabOsseo	VolOsso	Obs	Grupo	EspTrabOsseo	VolOsso
1	14CM	0.0842	0.2646	11	28CM	0.1427	0.4383
2	14CM	0.0673	0.2058	12	28CM	0.1142	0.3896
3	14CM	0.0786	0.2499	13	28CM	0.1332	0.3409
4	14CM	0.0617	0.2352	14	28CM	0.1237	0.4140
5	14CM	0.0730	0.2205	15	28CM	0.1046	0.3653
6	14SM	0.0861	0.3001	16	28SM	0.2175	0.4671
7	14SM	0.0746	0.2401	17	28SM	0.1575	0.4152
8	14SM	0.0804	0.2601	18	28SM	0.1885	0.3633
9	14SM	0.0631	0.2201	19	28SM	0.1740	0.3893
10	14SM	0.0689	0.2334	20	28SM	0.2030	0.3374

Fonte: Do autor.

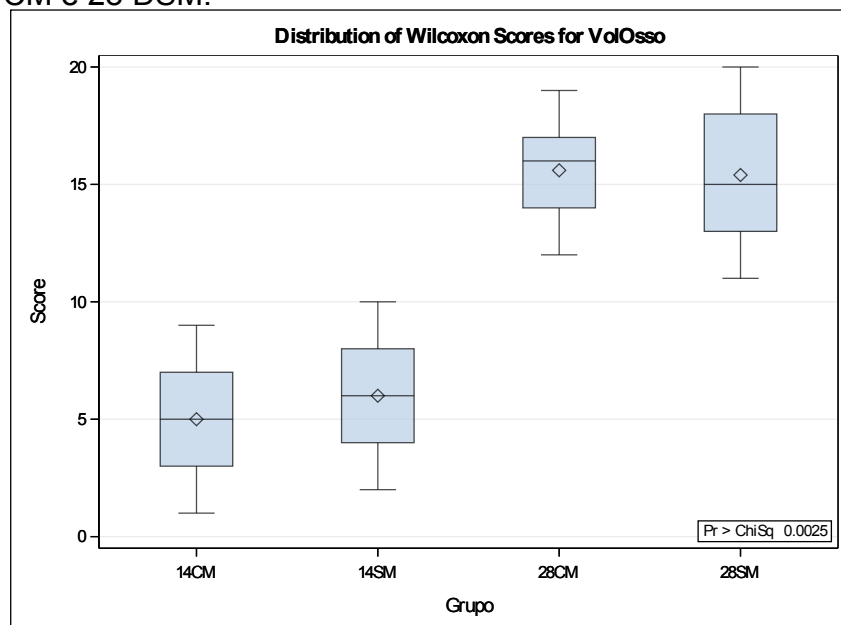
Variável: Volume Ósseo.

Quadro 3. Teste de Kruskal-Wallis para o volume ósseo neoformado.

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	14.3600
DF	3
Pr > Chi-Square	0.0025

Fonte: Do autor.

Gráfico 1: Distribuição de Wilcoxon para os valores de volume ósseo em 14 DCM, 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM.



Fonte: Do autor.

Quadro 4. Resultados do teste de Bonferroni relativo a comparação entre os valores médios, dos diferentes grupos, nos diferentes tempos de análise, para o volume ósseo neoformado.

Dependent Variable: VolOsso				
i/j	14CM	14SM	28CM	28SM
14CM		1.0000	0.0005	0.0006
14SM	1.0000		0.0013	0.0016
28CM	0.0005	0.0013		1.0000
28SM	0.0006	0.0016	1.0000	

Fonte: Do autor.

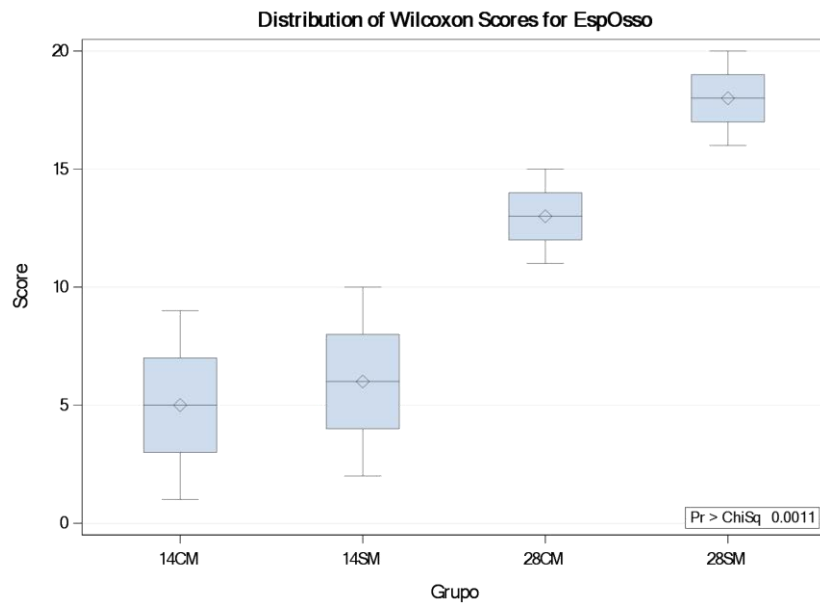
Variável: Espessura do Trabeculado Ósseo.

Quadro 5. Teste de Kruskal-Wallis para espessura do trabeculado ósseo neoformado.

Kruskal-Wallis Test	
Chi-Square	16.1429
DF	3
Pr > Chi-Square	0.0011

Fonte: Do autor.

Gráfico 2: Distribuição de Wilcoxon para os valores da espessura do trabeculado neoformado em 14 DCM, 14 DSM, 28 DCM e 28 DSM.



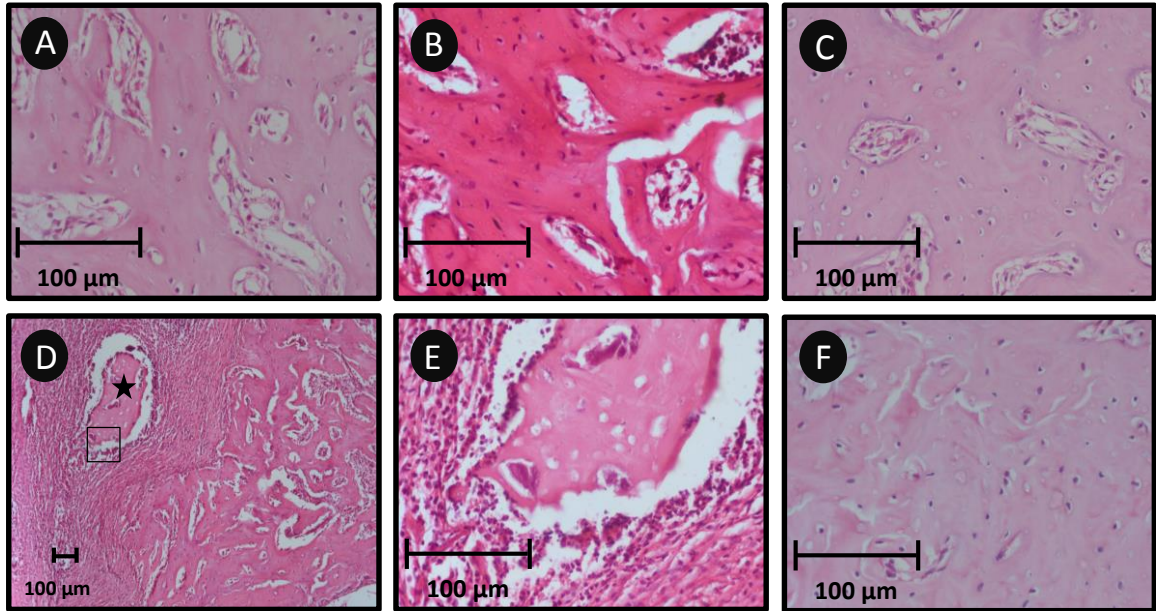
Fonte: Do autor.

Quadro 6. Resultados do Teste de Bonferroni, relativo à comparação entre os valores médios, dos diferentes grupos, nos diferentes tempos de análise, para a espessura do trabeculado neoformado.

Dependent Variable: EspTrabOsseo				
i/j	14CM	14SM	28CM	28SM
14CM		1.0000	0.0007	<.0001
14SM	1.0000		0.0025	<.0001
28CM	0.0007	0.0025		0.0362
28SM	<.0001	<.0001	0.0362	

Fonte: Do autor.

Fig. 8. Alvéolo do grupo 14 DSM (A, B; 400x) com tecido osteóide e 14 DCM (D; 100x, porção da membrana (★) com infiltrado inflamatório intenso), (E; 400x, região em maior aumento do quadro existente na figura D, com presença do infiltrado inflamatório intenso e presença de osteoclastos). Região do alvéolo de 28 DSM (C; 400x) e 28 DCM (F; 400x) tecido ósseo preenchendo todo o alvéolo com trabéculas bem estruturadas. (Coloração H/E).



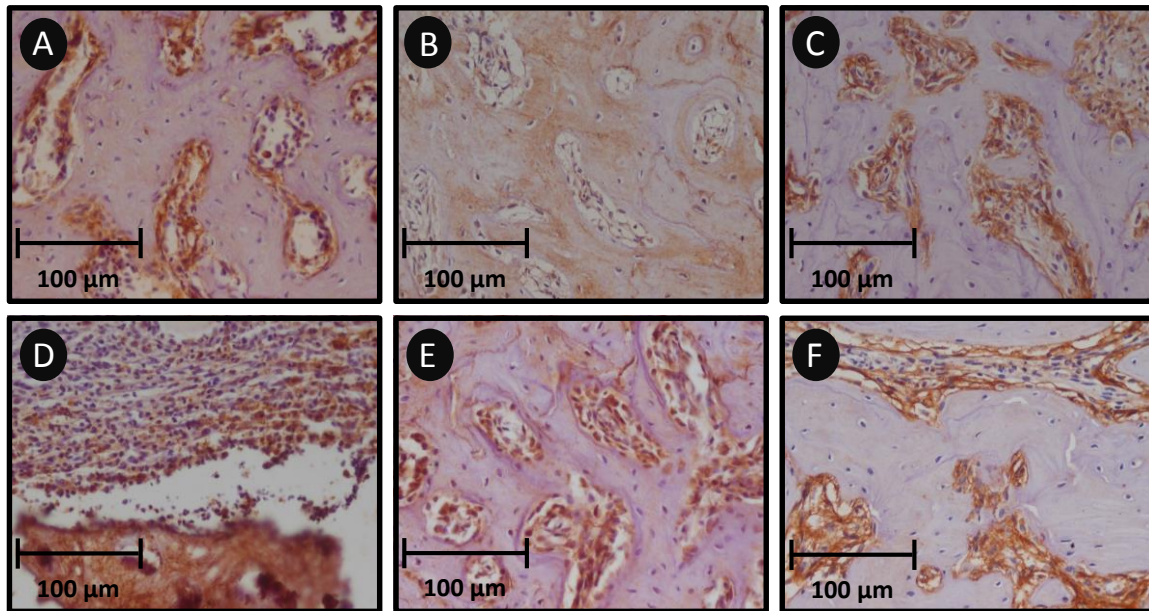
Fonte: Do autor com colaboração de Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino.

Quadro 7. Escores para lâminas 14 DSM e 28 DSM e 14 DCM e 28 DCM para (ALP).

Grupo(ALP) 4DSM		Grupo(ALP)28DSM		Grupo(ALP)14DCM		Grupo(ALP)28DCM	
Lâmina	Escore	Lâmina	Escore	Lâmina	Escore	Lâmina	Escore
1	2	1	½	1	2	1	2
2	½	2	2	2	3	2	2
3	2	3	2/3	3	3	3	2
4	3	4	2	4	3	4	2
5	2	5	1/2	5	3	5	2

Fonte: Do autor.

Fig. 9. Região do alvéolo 14 DSM (A, B; expressão da fosfatase alcalina), 14 DCM (D; presença da membrana), (E; maior expressão da fosfatase alcalina). Região do alvéolo de 28 DSM (C), 28 DCM (F) presença de fosfatase alcalina. (Imunoistoquímica).400x.



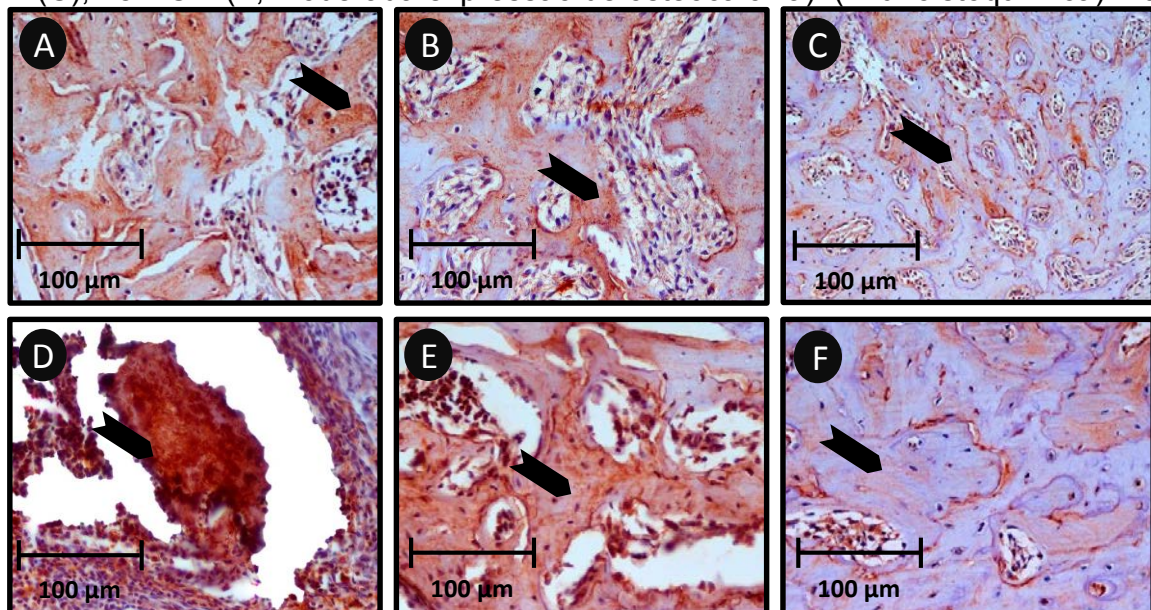
Fonte: Do autor com colaboração de Prof. Ass. Dr. Edison Ervolino.

Quadro 8. Escores para lâminas 14 DSM e 28 DSM e 14 DCM e 28 DCM para (OC).

Grupo(OC) 14DSM		Grupo(OC) 28DSM		Grupo(OC) 14DCM		Grupo(OC) 28DCM	
Lâmina	Escore	Lâmina	Escore	Lâmina	Escore	Lâmina	Escore
1	2/3	1	2	1	2	1	2/3
2	3	2	2	2	2	2	2/3
3	2/3	3	2	3	2	3	1
4	2	4	2	4	2	4	1/2
5	2/3	5	1	5	2	5	2/3

Fonte: do autor.

Fig. 10. Região do alvéolo 14 DSM (A, B; moderada expressão de osteocalcina), 14 DCM (D; presença da membrana), (E; expressão de osteocalcina). Região do alvéolo de 28 DSM (C), 28 DCM (F; moderada expressão de osteocalcina). (Imunoistoquímica). 400x.



Fonte: Do autor com colaboração de Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino.

10. DISCUSSÃO

Na presente pesquisa optou-se pela utilização de uma membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada. Esta é composta por material biológico constituído principalmente por colágeno tipo 1 e também por proteínas não colágenas como fatores de crescimento e BMPs. O fato de ter utilizado membrana absorvível representa vantagens em comparação com as membranas não absorvíveis, não havendo a necessidade de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção, o que acarretaria custos adicionais, possíveis complicações pós-cirúrgicas e desconforto por impor um segundo tempo cirúrgico (YAMATOGLI et al., 2005). Outras vantagens foram o custo reduzido e a boa distribuição no mercado nacional quando comparada com outras marcas importadas.

A membrana deve permanecer funcional, estrutural e íntegra durante o período necessário, para manter-se como barreira protetora e seletiva, e assim não permitir a interferência dos tecidos moles sobre o alvéolo. Na técnica de ROG as membranas são usadas para preservarem o osso alveolar após exodontia e para isto devem manter sua posição. Caso a membrana se invagine para o interior do alvéolo ela atuaria como um corpo estranho (LEKOVIC et al., 1997 e LEKOVIC et al., 1998). Pudemos observar, em lâminas coradas com H/E ou que foram submetidas às reações de imunoistoquímica, que aos 14 dias a membrana se encontrava posicionada no local esperado (Figs. 8, 9, 10). Já no período de 28 dias ela não foi observada, sugerindo sua reabsorção.

A análise das lâminas coradas pela H/E, do grupo 14 DCM (Fig. 8), permitiu detectar entre os achados histológicos a membrana, cercada por um infiltrado inflamatório pouco mais intenso e focado que o esperado para o período (HUEBSH et al., 1952; GRANDINI et al., 1970; OKAMOTO; RUSSO, 1973; OKAMOTO; FIALHO, 1990). Dessa forma este grupo apresentava um pequeno atraso no processo de reparo alveolar, quando comparado com o grupo sem membrana, sugerindo que isto ocorreu motivado pela presença da membrana.

Aos 28 dias (Figs. 8, 9, 10) não foi possível detectar a membrana nos achados histológicos, talvez pelo fato de que os ratos possuem o processo de reparo mais rápido do que o humano, tendo o término do reparo ao 30º dia (VICTOR, et al., 1997).

Em nossos experimentos os demais aspectos histológicos, para este período de 28 dias, tanto nos animais com ou sem membrana, apresentavam características semelhantes as descritas na literatura (HUEBSCH et al., 1952; GRANDINI et al., 1970; OKAMOTO; RUSSO, 1973; OKAMOTO et al., 1990).

Tais resultados sugerem que, independente do que tenha ocorrido durante a reparação alveolar, aos 28 dias de pós operatório em ambos os grupos, com e sem membrana, o reparo alveolar apresenta-se concluído.

Os escores obtidos para a expressão da fosfatase alcalina nos períodos estudados foram coincidentes com os descritos na literatura (VIEIRA, 1999; POLETI, 2009; HASSUMI et al., 2014). Assim, a expressão desta enzima estava presente aos 14 dias e continuava aos 28 dias, para ambos os grupos. Porém, há de se destacar a maior presença da ALP, no grupo com membrana do que no sem membrana após 14 dias do ato cirúrgico. Esta alteração pode ser atribuída à presença da membrana no interior do alvéolo e indica que está favoreceu a formação e mineralização do tecido ósseo.

De acordo com Vieira (1999) o peptídeo Osteocalcina é caracterizado como uma proteína marcadora da atividade osteoblástica e o seu aumento é coincidente com o início do processo de mineralização. De fato esse marcador foi observado nas lâminas de imunoistoquímica (Fig. 10), sendo mais acentuada nas lâminas com maior escore (Quadro 8). Dentre os grupos de 14 dias as lâminas que apresentaram maior marcação foram do grupo sem membrana, enquanto que no grupo das lâminas de 28 dias foi constatado predominância no grupo com membrana.

A combinação dos resultados da análise histológica do H/E e da imunoistoquímica da OC, sugerem que no início do processo de reparo, a membrana, apesar de ser biomaterial, é mais um elemento que passa a existir no caminho da reparação tecidual. Este parece alterar, de forma discreta, uma etapa da reparação, o mais importante porém, é que não deixa de cumprir uma de suas funções, que é a de manter o alvéolo sem interferências do tecido mole. Além disso, possui BMPS e fatores de crescimento que favorecem a maior deposição de minerais, o que resultará em um osso com amadurecimento precoce (CANOVA, 2003). Resultado semelhante ao obtido neste experimento quando comparamos o grupo com membrana ao sem membrana, aos 28 dias, pela análise da expressão de OC.

Os achados volumétricos realizados pela MicroCT (Anexo 2, Quadro 1) após processamento estatístico para análise do volume ósseo aos 14 DCM e 14 DSM concluíram ser estatisticamente não significantes ($p \leq 0,05$) (Quadro 3). Apesar disto, podemos supor que o menor volume ósseo nos alvéolos com membrana aos 14 dias, seja consequência da existência, em seu interior, de um elemento extra, a membrana.

Em relação aos 28 DCM e 28 DSM, sob análise do volume ósseo também concluíram-se estatisticamente não significantes ($p \leq 0,05$) (Quadro 3) tendo os alvéolos, que receberam a membrana, também se comportado de forma parecida com os alvéolos sem membranas, tendo o grupo sem membrana valores pouco mais altos (Gráfico 1). Podemos sugerir que em ambos os grupos, com o decorrer do tempo, houve um aumento volumétrico do tecido ósseo que passa a preencher o interior do alvéolo. Portanto a membrana não impediu a formação óssea. Não se pode afirmar, com estes dados, como ela auxiliou este processo de formação.

Os resultados, das análises estatísticas, das medidas da espessura do trabeculado ósseo (Quadro 5), obtidas após a reconstrução 3D, indicam existir diferenças significantes ($p \leq 0,05$) na comparação dos grupos 28 DCM e 28 DSM.

A comparação entre os períodos de 14 dias não apresentou diferenças. Isto indica que ao término do processo a espessura da trabécula foi influenciada pela presença da membrana e apresentava-se menos espessa que no grupo sem membrana.

Os valores encontrados aos 14 dias em ambos os grupos (com e sem membrana) e em ambas análises: espessura do trabeculado ósseo e volume ósseo, se mostraram estatisticamente não significantes ($p \leq 0,05$), fica a dúvida se, existiria alguma diferença em períodos pós cirúrgicos menores que este.

A imagem tomográfica em escala de cinza com conseguinte modificação para escala de cores quentes (Fig. 6), possibilita a visualização das regiões com maior densidade e reforçam os resultados quantitativos obtidos através da análise da MicroCT.

É importante ressaltar que não foram encontrados na literatura resultados que pudessem ser comparados aos obtidos nesta pesquisa. Em especial aqueles relacionados com a reconstrução tridimensional. Faz-se necessário futuros estudos que utilizem deste método para outras comparações.

Nesse sentido cabe ainda outros estudos com diferentes tipos de membranas, sendo estas um grupo vasto e extenso, desde as absorvíveis às membranas sintéticas, que podem resultar em diferentes metodologias e resultados.

A membrana biológica utilizada neste estudo, foi de fácil manipulação, flexível e de fácil ajuste. Trata-se ainda de um material disponível no mercado e de preço razoável.

11. CONCLUSÃO

Itens para reflexão:

1) A respeito da utilização da reconstrução 3D, o volume ósseo do grupo com membrana e do grupo sem membrana foi igual

2) A respeito da análise histológica com coloração H/E, o grupo 14 DCM possui infiltrado inflamatório ligeiramente mais intenso do que o restante dos grupos, 14DSM, 28 DCM, 28 DSM, que possuíam achados histológicos esperados para os períodos analisados.

3) A respeito da análise da ALP, foi encontrado maior expressão no grupo com membrana, 14 DCM, do que no grupo sem membrana. E para análise da OC houve uma maior expressão no grupo com membrana, 28 DCM, indicando uma maturidade óssea maior que no grupo sem membrana.

Conclusão:

Assim, sob as condições propostas pela metodologia, pode-se concluir que: a membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada, causou leve atraso no processo inicial de reparação alveolar, porém ao final desse processo o alvéolo estava reparado e continha o mesmo volume de osso que os alvéolos que não receberam a membrana, além disto o conjunto de trabéculas eram mais delgadas com tecido ósseo mais maduro. Não houve diferença na quantidade do tecido ósseo neoformado ao final do processo de reparo alveolar entre os grupos sem membrana e com membrana.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. C. R.; OKAMOTO, T. Influência do “stress” no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev Odont UNESP*, v. 18, n. ½, p. 119-30, 1989.
- AMLER, M. H.; JOHNSON, P. L.; SALMAN, I. Histological and histochemical investigation investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wound. *J Am Dent Assoc*, v. 61, p. 32-4, July 1960.
- AMLER, M. H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *O. S., O. M & O. P.* v 27, n. 3, p. 309-18, 1969.
- ANDIA, D.C.; CERRI, P.S.; SPOLIDORIO, L.C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Rev Odontol UNESP*. v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.
- ARAÚJO, M. G.; LINDHE, J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J Clin Periodontol*, v. 32, p. 212-18, 2005.
- ASTRAND, P.; CARLSSON, G. E. Changes in the alveolar process after extractions in the White rat a histologic and fluorescence microscopic study. *Acta Odont Scand*, v. 27, n. 1, p. 113-27, 1969.
- AVILA-ORTZ, G.; ELANGO VAN, S.; KRAMER, K. W. O.; BLANCHETTE, D.; DAWSON, D. V. Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis. *J Dents Res*. v. 10, n. 93, p. 950-58, 2014.
- BAPTISTA, L. C. P. Ação da hidroxiapatita reabsorvível na reparação do alvéolo, após extração dental, em ratos diabéticos. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2004.
- BARBATO, P. R. Perdas dentárias e fatores sociais, demográficos e de serviços associados em adultos brasileiros: uma análise dos dados do Estudo Epidemiológico Nacional (Projeto SB Brasil 2002-2003). 2007. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 8, n. 23, p. 1803-14, ago, 2007.
- BARTEE, B. K. Extraction site reconstruction for alveolar ridge preservation, Part 2: membrane-assisted surgical technique. *J Oral Implantol*, v. 27, n. 4, p. 194-7, 2001.
- BENETI, I. M. O efeito da oclusão traumática no processo de reparo do ligamento periodontal após reimplante imediato em molar de ratos: uma avaliação histológica e imunoistoquímica. 2013. 16 f. Tese (Dissertação de Doutorado em Cirurgia e

Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, 2013.

BIGUETTI, C. C. Papel das células CCR2+ no processo de reparo ósseo alveolar em camundongos: caracterização histomorfométrica e molecular. 2014. 150 f. Tese (Dissertação de mestrado em Estomatologia e Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru, 2014.

BOYNE, P. J.; KRUEGER, G. O. Fluorescence microscopy of alveolar bone repair. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 15, n. 3, p. 265-81, Mar. 1962

BOYNE, P. J. Osseous repair of the postextraction alveolus in man. *O. S., O. M & O. P.* v 21, n. 6, p. 805-13, 1966.

BRUGNAMI, F. THEN, P. R.; MOROI, H.; LEONE, C. W. Histologic evaluation of human extraction sockets treated with demineralized freeze-dried bone allograft (DFDBA) and cell occlusive membrane. *J Periodontol*, v 67, n. 8, p. 821-5, 1996.

BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R. Regeneração óssea guiada na implantodontia. 1. ed. Livraria Santos Editora Com. Imp. Ltda. 1996. 265 p.

BUSER, D.; DULA, K.; BELSER, U.; HIRT, H. P.; BERTHOLD, H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v. 13, n. 1, p. 29-45, 1993.

BUSER, D.; DULA, K.; BELSER, U.; HIRT, H. P.; BERTHOLD, H. LOCALIZED ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v. 5, n. 1, p. 10-29, 1995.

BUSER, D.; DULA, K.; HIRT, H. P.; SCHENK, R. K. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 54, n. 4, p. 420-32, 1996.

CABRINI, R. L.; GUGLIELMOTTI, M. B. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* v. 43, p. 359-64, 1985.

CALIXTO, R. F. E. Grafting of Tooth Extraction Socket With Inorganic Bovine Bone or Bioactive Glass Particles: Comparative Histometric Study in Rats, *Implant Dentistry*. V. 16, n. 3, p. 260-69, 2007.

CALIXTO, R. F. E. Alveolar healing after implantation with a pool of commercially available

bovine bone morphogenetic proteins (BMPs) – a histometric study in rats, *Braz DentJ.* v. 18, n. 1, p. 29-33, 2007.

CANEVA, M.; BOTTICELLI, D.; SALATA, L. A.; SCOMBATTI SOUZA, S. L.; CARVALHO CARDOSO, L.; LANG, N. P. Collagen membranes at immediate implants: a histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res*, v. 21, n. 9, p. 891-7, 2010.

CANOVA, G. C. Influência da membrana absorvível de cortical óssea bovina desmineralizada no processo de reparo após pulpotomia em dentes de cães: análise microscópica e radiográfica. 2003. 99 f. Tese (Mestrado em Endodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2003.

CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO T. Cuidados pós-exodontos: considerações clínicas e experimentais. *Ars Cvrandi em Odontologia*, v. 5, p. 19-27, Abr. 1978.

CARVALHO T. L. L.; BOMBONATO K. F.; BRENTGANI L. G. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J.* 1997. v. 8, n. 1, p. 9-12, 1997.

COUTINHO, C. C. C. Análise da dinâmica do processo de reapro de alvéolos preenchidos com coágulo sanguíneo e vidro bioativo (Perioglass) em ratos não diabéticos, diabéticos controlados e não controlados. Estudo histológico, histométrico e imunoistoquímico. 2009. 198 f. Tese (Dissertação de Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp, Araçatuba, 2009.

CURSINO, N. M. Avaliação do efeito do atenolol no processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). 2010. 141 f. Tese (Dissertação de Mestrado em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, 2010.

DAHLIN, C.; LINDHE, A.; GOTTLOW, J.; NYMAN, S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconst Surg*, v. 81, n. 5, p. 672-6, 1988.

DAHLIN, C.; SENNERBY, L.; LEKSOLM, U.; LINDHE, A.; NYMAN, S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 4, n. 1, p. 19-25, 1985.

DALITZ, G. D. A radiographic study of the rate at which human extraction wounds heal. *Austr Dent J*, v. 9, n. 5, p. 466-73, Dec. 1964.

DARBY, I.; CHEN, S. T. BUSER, D. Ridge preservation techniques for implant therapy. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 24, p. 260-71, 2009.

DEVLIN, H.; GARLAND, H. SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental

- diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 54, n. 9, p. 1087-91, Sept. 1996.
- DEVLIN, H.; HOYLAND, J.; NEWALL, J. F.; AYAD, S. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *J Bone Miner Res*, v. 12, n. 12, p. 2061-67, Dec. 1997.
- DEVLIN, H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. *Cells Tissues Organs*. n. 167, p. 33-37, 2000.
- DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*, 2002, n. 31, p. 641-45, 2002.
- EVIAN, C. I.; ROSENBERG, E. S.; COSLET, J. G.; CORN, H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in human. *J Periodontal*, v. 53, n. 2, p. 81-85, Feb. 1982.
- FERNANDES, M. S. Avaliação da influência do fluoreto no reparo ósseo em alvéolos de ratos. Estudo nos processos de reabsorção e neoformação óssea. 2010. 235 f. Tese (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru, 2010.
- FERNANDES, P. G.; NOVAES, A. B.; DE QUEIROZ, A. C.; DE SOUZA, S. L. TABA, M.; PALIOTO, D. B.; DE MORAES GRISI, M. F. Ridge preservation with acellular dermal matrix and anorganic bone matrix cell-binding peptide P-15 following tooth extraction in humans. *J Periodontol*, 2010.
- GRANDINI, S. A.; MIGLIORINI, R. H.; OKAMOTO, T. Processo de reparo em feridas de extração dental em ratos com diabetes aloxânico. *Bol Fac Farm Odontol Ribeirão Preto*, v. 7, n. 1, p. 47-71, 1970
- GRANDINI, S. A. The effects of partial-pancreatectomy-induced diabetes on wound healing subsequent tooth extraction. *Oral surg Oral Med Oral Pathol*, v. 45, n. 2, p. 1990-9, 1978.
- GRANDINI, S. A.; BRENTAGANI, L. G.; NOVAES, A. B.; MIGLIORINI, R. H. Protein synthesis in wound after tooth extraction in pancreatectomized diabetic rats. *Braz Dent J*, v. 1, n. 1, p. 25-30, 1990.
- GUGLIELMOTTI, M. B.; CABRINI, R. L. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg*. v. 43, p. 359-64, 1985.
- HADDAD, A.; HETEM, S.; BRANDÃO, H. J. J.; PINTO, R. S. A tetraciclina no processo

de reparo em feridas de extração dental em ratos. Rev. FOA. 1965; v. 1, n. 2, p. 33-42. 1965.

HASSUMI, J.S.; FABRIS, A.L.S.; FAVERANI, L.P.; GONÇALVES, A.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R. Expressão da fosfatase alcalina durante processo de reparo alveolar em ratos. Rev. odontol. UNESP, v. 43, n. Especial, 2014

HUEBSCH, R. F.; COLEMAN, R. D.; FRANDSEN, A. M.; BECKS, H. The healing process following molar extractions: normal male rats (long-evans strain). Oral Surg Oral Med Oral Pathol, v. 5, p. 864-76, Aug. 1952.

HURLEY, L. A.; STINCHFIELD, F. E.; BASSETT, A. L.; LYON, W. H. The role of soft tissues in osteogenesis. J Bone Joint Surg Am, v. 41, n. 7, p. 1243-66, Oct. 1959

HUTNACHER, D.; HURZELER, M. B.; SCHLIEPHAKE, H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. Int J Oral Maxillofac Implants, v. 11, n. 5, p. 667-78, 1996.

IRINAKIS, T. Rationable for socket preservation after extraction of a single-rooted tooth when planning for future implant placement, J Can Dent Assoc, v. 72, n. 10, p. 917-22, 2006.

JIAO, K.; DAÍ, J.; WANGA, M. Q.; NIU, L. N.; YU, S. B.; LIU X. D. Age- and sex- related changes of maxilar condylar cartilage and subchondral bone: A histomorphometric and micro-CT study in rats. Archives of Oral biology. v. 55, p. 155-63, 2010.

JOVANOVIC, S. A.; NEVINS, M. BONE formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes. Int J Periodontics Restorative Dent, v. 15, n. 1, p. 56-69, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 10. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KURITA, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKEI, T.; KAWAI, T.; HAYAKAWA, T. Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds. J Dent Res, v. 64, n. 1, p. 28-32, Jan. 1985.

LACERDA, S. A. Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study. Braz Dent J. v. 21, n. 3, p. 199-204, 2010.

LACERDA, S. A. Osteogenic potencial of autogenous bone associated with bone marrow osteoblastic cells in bony defects: a histomorphometric study. Implant Dentsitry. v. 18, n. 6, p. 521-29. 2009.

LEKOVIC, V.; KENNEY, E. B.; WEINLAENDER, M.; HANT, T.; KLOKKEVOLD, P.; NEDIC, M.; ORSINI, M. A bone regenerative approach to alveolar ridge maintenance following tooth extraction: report of 10 cases. *J Periodontol*, v. 68, n. 6, p. 563-70, June 1997.

LEKOVIC, V.; CAMARGO, P. M.; KLOKKEVOLD, P. R.; WEINLAENDER, M.; NEKKEY, E. B.; DIMITRIJEVIC, B.; NEDIC, M. Preservation of alveolar bone in extraction sockets using bioabsorbable membranes. *J Periodontol*, v. 69, n. 9, p. 1044-49, Sep. 1998.

LUNDGREN, A. K.; SENNERBY, L.; LUNDGREN D.; TAYLOR, A.; GOTTLAW, 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*, v. 8, n. 2, p. 82-9, 1997.

LUVIZUTO, E. R. Co-localização de OPG e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou com raloxifeno. 2007. 58 f. Tese (Dissertação de Mestrado em Clínica Integrada) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, 2007.

MADID, P. Influência do osso inorgânico na reparação da ferida após extração dental em ratos Wistar diabéticos. 2004. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

MAGALHÃES, A. E. O.; OKAMOTO, T.; BARROSO, J. S. Influência da fratura da crista óssea alveolar no processo de reparo, em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. *Rev Ass Paul Cirurg Dent*, v. 36, n. 2, mar/abr., 1982.

MCALLISTER, B. S.; HAGHIGHAT, K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol*. V. 78, n. 3, p. 377-96, 2007.

MCMILLAN, M. D. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats, Part I, macroscopic observations. *N Z Dent J*, v. 66, n. 305, p. 239-47, July 1970.

MCMILLAN, M. D. Oral changes following tooth extraction in normal and alloxan diabetic rats, Part II, macroscopic observations. *N Z Dent J*, v. 67, n. 307, p. 25-31, Jan. 1971.

MELLONIG, J. T.; NEVINS, M. Guided bone regeneration of bone defects associated with implants: an evidence-based outcome assessment. *Int J Periodontic Restorative Dent*, v. 15, n 2, p. 168-85, 1995.

MELO, A. Estudo da reparação do alvéolo dental de ratos wistar preenchido com osso

autógeno particulado após exodontia. 2007. 118 f. Tese (Dissertação de Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, 2007.

MUNDY, G.R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res.*, v. 26, p. 213-17, 1991.

MANRIQUE, N.; PEREIRA, C. C.; LUVIZUTO E. R.; SÁNCHEZ, M. D. P. R.; OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R.; SUMIDA, D. H.; ANTONIALI, C. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression. During the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Invest*, v. 19, p. 1319-27, 2015.

NYMAN, S.; LINDHE, J.; KARRING, T.; RYLANDER, H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 9, p. 290-4, 1982.

OKAMOTO, K.; AOKI K. Development of strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 1963 v. 27, n. 48, p. 282-93.

OKAMOTO, K.; RUSSO, M. C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. *Rev Fac Odont Araçatuba*, v. 2, n. 2, 1973.

OKAMOTO, K.; RUSSO, M. C.; FIALHO, A. C. V. Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. *Rev Fac Odont Araçatuba*, v. 19, n. 1, p. 63-74, 1990.

OKAMOTO, T.; OKAMOTO, R.; ALVES REZENDE, M. C. R.; GABRIELLI, M. F. R. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. *Braz Dent J*, v. 5, n. 2, p. 85-92, 1994.

PEDROSA JR, W.F.; FARIA, P. E. P.; ARNEZ M. F. M.; XAVIER S. P.; SALATA, L. A. Immunohistochemical, Tomographic and histological study on onlay bone grafts remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Impl*, v. 20, p. 1254-64, 2009.

PETERSON, L. J. Princípios da exodontia não complicada. In: PETERSON LJ, editor. *Cirurgia oral e maxillofacial contemporânea*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000, p. 118-66.

PIETROKOVSKI, J.; MASSLER, M. Residual ridge remodeling after tooth extraction in monkeys. *J Prosthet Dent*. 1971. v. 26, n. 2, p. 119-29, 1971.

PIETROKOVSKI, J.; MASSLER, M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dent*. v. 17, n. 1, p. 21-7, Jan. 1967a.

PIETROKOVSKI, J.; MASSLER, M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent*

Res. v. 48, n. 1, p. 222-31, Jan-Feb. 1967b.

PIRES, A. C. Avaliação de uma nova matriz tridimensional no processo de reparo de alvéolos dentários em humanos para preservação do rebordo alveolar. 2007. 186 f. Tese (Dissertação de Doutorado em Estomatologia e Biologia Oral) – Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, Bauru, 2010.

POLETI, M.L. Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após a terapia fotodinâmica antimicrobiana em ratos Wistar. 2009. Dissertação (Mestrado em Estomatologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25132/tde-03072009-105031/>. Acesso em: 15.08.2015.

RODRIGUES, T. S. Avaliação da dinâmica do processo de reparo alveolar utilizando fluorocromos. 2005. 101 f. Tese (Dissertação de Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, 2005.

SCHROPP, L.; WENZEL, A.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Bone Healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent*, v. 23, n. 4, p. 313-23, Aug. 2003.

SILVA, A. N. Bone defect repair on the alveolar wall of the maxillary sinus using collagen membranes and temporal fascia. An experimental study in monkeys 2011. 8f.

SIMPSON, H. E. Trauma as a fator causing delayed repair of dental extractons sites. *J Oral Surg*, v. 15, n. 1, p. 3-11, Jan. 1957

SIMPSON, H. E. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in macacus rhesus monkeys. *J Oral Surg, Anesth & Hosp D Serv*, v. 18, n. 5, p. 391-99, Sept. 1960a.

SIMPSON, H. E. Effects of suturing extraction wounds in macacus rhesus monkeys. *J Oral Surg, Anesth & Hosp D Serv*, v. 18, n. 6, p. 461-64, Nov. 1960b.

SMUKLER, H.; LANDI, L.; SETAYESH, R. Histomorphometric evaluation of extraction sockets and deficiente alveolar ridges treated with allograft and barrier membrane: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 14, n. 3, p. 407-16, 1999.

TEÓFILO, J. M.; BRENTGAMI, L. G.; LAMANO-CARVALHO, T. L. Bone healing in

osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. 2004. Archives of Oral Biology. n. 49. p. 755-62.

TIMOTEO, C. A. Analise histologica e histomorfometrica do processo de reparo de defeitos osseos em ratos diabeticos preenchidos com osso autogeno e recobertos por membrana de matriz ossea homogenea ou por membrana de poletetrafluoretileno 2014.

TODO, H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats: I initial cellular response to tooth extraction in rats studied with H-Thymidine. Arch Oral Biol, v. 13, n. 12, p. 1421-27, 1968a.

TODO, H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats: II histochemical observations on hydrolytic and oxidative enzymes in tooth extraction wounds in the rat. Arch Oral Biol, v. 13, n. 12, p. 1429-43, 1968b.

VIEIRA, J. G. H. Considerações sobre marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. Arq Bras Endocrinol Metab. v. 43, n. 6, p. 415-22, 1999.

VON ARX, T.; HARDT, N.; WALLKAMM B. The TIME technique: a new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants. Int J Oral Maxillofac Implants. v. 11, n. 3, p. 387-94, 1996.

VON ARX, T.; COCHRAN, D. L.; HERMANN, J. S.; SCHENK, R. K.; HIGGINBOTTOM, F. L.; BUSER, D. Lateral ridge augmentation and implant placement: and experimental study evaluating implant osseointegration in diferente augmentation materials in the canine mandible, Int J Oral Maxillofac Implants, v. 16, n. 3, p. 343-54, 2001.

WIDMARK, G.; ANDERSSON, B.; IVANOFF, C. J. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single tooth implants. Int J Oral Maxillofac Surg, v. 26, n. 2, p. 106-9, Apr. 1997.

YAMATOGLI, R. S.; RAHAL S. C.; GRANJEIRO, J. M.; TAGA, R.; CESTARI, T. M.; LIMA, A. F. M. Histologia da associação de membranas biológicas de origem bovina implantadas no tecido subcutâneo de ratos. Ciência Rural, v. 35, n. 4, p. 837-42, Jul-Ago. 2005.

ZITZMANN, N. U.; SCHARER, P.; MARINELLO, C. P. Long-term results of implants treated with guided bone regeneration: a 5-year prospective study. Int J Oral Maxillofac Implants. v. 16, n. 3, p. 355-66, 2001.

ANEXOS

Anexo A



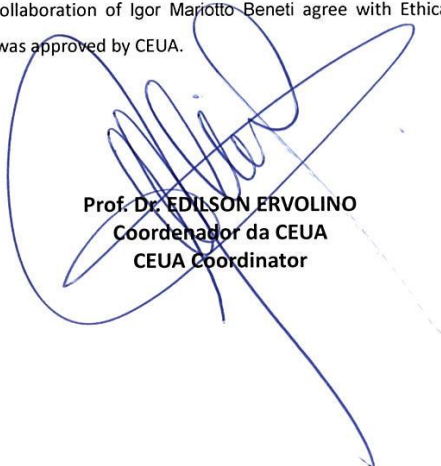
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Avaliação da dinâmica do reparo ósseo após a exodontia de molares de ratos"** sob responsabilidade da Pesquisadora **ROBERTA OKAMOTO** e colaboração de Igor Mariotto Beneti está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-00494-2013**.

CERTIFICATE

We certify that the research **"Evaluation the dynamics of bone healing after extraction or rat molars"**, process number **FOA-00494-2013**, under responsibility of **ROBERTA OKAMOTO** and with collaboration of Igor Mariotto Beneti agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. **EDILSON ERVOLINO**
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Anexo B

Analise 28 DSM

CTAn 1
 Date and time: 20.08.2015 11:58
 Operator identity: morfologia02
 Computer name: MORFOLOGIA02
 Computation time: 00:08:40
 Dataset: 28d_sm_60kv_5_8_al_0_5_rec
 Location: C:\FEA\Geometrias\Alexandre Freire\FOA\28D_SM\
 Description Abbreviation Value Unit
 Number of layers 101
 Lower vertical position 2.54471 mm
 Upper vertical position 3.13240 mm
 Pixel size 5.87693 um
 Lower grey threshold 70
 Upper grey threshold 255
 Tissue volume TV 0.53798 mm³
 Bone volume BV 0.46718 mm³
 Percent bone volume BV/TV 86.83922 %
 Tissue surface TS 4.05608 mm²
 Bone surface BS 6.07222 mm²
 Intersection surface i.S 2.96392 mm²
 Bone surface / volume ratio BS/BV 12.99763 1/mm
 Bone surface density BS/TV 11.28704 1/mm
 Trabecular pattern factor Tb.Pf -17.24224 1/mm
 Centroid (x) Crd.X 6.51687 mm
 Centroid (y) Crd.Y 4.88604 mm
 Centroid (z) Crd.Z 2.83277 mm
 Structure model index SMI -3.57072
 Trabecular thickness Tb.Th 0.21753 mm
 Trabecular number Tb.N 3.99214 1/mm
 Trabecular separation Tb.Sp 0.08086 mm
 Degree of anisotropy DA 1.69116 (0.40869)
 Eigenvalue 1 1.21157
 Eigenvalue 2 1.85905
 Eigenvalue 3 2.04896
 Fractal dimension FD 2.86886
 Number of objects Obj.N 26
 Number of closed pores Po.N(cl) 48
 Volume of closed pores Po.V(cl) 0.00108 mm³
 Surface of closed pores Po.S(cl) 0.20641 mm²
 Closed porosity (percent) Po(cl) 0.22963 %
 Volume of open pore space Po.V(op) 0.06973 mm³
 Open porosity (percent) Po(op) 12.96092 %
 Total volume of pore space Po.V(tot) 0.07080 mm³
 Total porosity (percent) Po(tot) 13.16078 %
 Euler number Eu.N 26
 Connectivity Conn 48
 Connectivity density Conn.Dn 89.22242 1/mm³
 Trabecular thickness distribution Tb.Th
 Range Mid-range Volume Percent volume in range
 mm mm mm³ %
 0.006 - <0.018 0.012 0.00012 0.0257
 0.018 - <0.029 0.024 0.00065 0.1411
 0.029 - <0.041 0.035 0.00257 0.5550
 0.041 - <0.053 0.047 0.00408 0.8806

0.053 - <0.065 0.059 0.00626 1.3488
 0.065 - <0.076 0.071 0.00759 1.6355
 0.076 - <0.088 0.082 0.00997 2.1498
 0.088 - <0.100 0.094 0.01182 2.5491
 0.100 - <0.112 0.106 0.01338 2.8838
 0.112 - <0.123 0.118 0.01596 3.4412
 0.123 - <0.135 0.129 0.01485 3.2012
 0.135 - <0.147 0.141 0.01619 3.4905
 0.147 - <0.159 0.153 0.01788 3.8544
 0.159 - <0.170 0.165 0.01568 3.3808
 0.170 - <0.182 0.176 0.01885 4.0637
 0.182 - <0.194 0.188 0.01596 3.4413
 0.194 - <0.206 0.200 0.01488 3.2072
 0.206 - <0.217 0.212 0.01984 4.2779
 0.217 - <0.229 0.223 0.01899 4.0952
 0.229 - <0.241 0.235 0.02219 4.7836

CTAn 2

0.241 - <0.253 0.247 0.02879 6.2071
 0.253 - <0.264 0.259 0.02930 6.3164
 0.264 - <0.276 0.270 0.02869 6.1861
 0.276 - <0.288 0.282 0.03907 8.4229
 0.288 - <0.300 0.294 0.04031 8.6916
 0.300 - <0.311 0.306 0.00320 0.6899
 0.311 - <0.323 0.317 0.01922 4.1442
 0.323 - <0.335 0.329 0.00219 0.4718
 0.335 - <0.347 0.341 0.00338 0.7278
 0.347 - <0.358 0.353 0.02196 4.7358

Standard deviation SD 0.07880 mm

Trabecular separation distribution Tb.Sp

Range Mid-range Volume Percent volume in range
 mm mm mm³ %

0.006 - <0.018 0.012 0.00035 0.5165
 0.018 - <0.029 0.024 0.00333 4.9269
 0.029 - <0.041 0.035 0.00748 11.0673
 0.041 - <0.053 0.047 0.00800 11.8370
 0.053 - <0.065 0.059 0.00796 11.7820
 0.065 - <0.076 0.071 0.00689 10.1892
 0.076 - <0.088 0.082 0.00475 7.0329
 0.088 - <0.100 0.094 0.00736 10.8907
 0.100 - <0.112 0.106 0.00466 6.8906
 0.112 - <0.123 0.118 0.00452 6.6813
 0.123 - <0.135 0.129 0.00640 9.4750
 0.135 - <0.147 0.141 0.00384 5.6779
 0.147 - <0.159 0.153 0.00205 3.0328

Standard deviation SD 0.03684 mm

STEREOLOGY RESULTS

=====

ANALYSIS SPECIFICATIONS

Total grid size: 161 x 161 x 101 pixels

Sphere centered at: 80, 80, 50 pixels

Sphere radius: 124 pixels

Pixel size: 0.00588 x 0.00588 x 0.00588 mm³/voxel

VOLUME FRACTION

BV/TV: 0.86842

Sphere volume: 1.62108 mm³

Solid volume: 0.46148 mm³

VOI volume: 0.53140 mm³

INTERSECTIONS

```

-----
Test line spacing: 0.19982 mm
Number of test orientations: 128
Number of test lines per orientation: 25
Avg tline length per orientation: 29.63613 mm
Total # intrsctns: 8599
# of intrsctns/tline length: 2.26682 1/mm
MORPHOLOGY PARAMETERS
-----
BS/BV: 5.22058 1/mm
Tb.Th: 0.38310 mm
Tb.N: 2.26682 1/mm
Tb.Sp: 0.05805 mm
ANISOTROPY PARAMETERS
-----
Principal MILs: 0.90850, 0.73342, 0.69861 mm
Mean MIL: 0.77946 mm
Stdev of MILs: 0.10249 mm
Minimum of MILs: 0.51993 mm
Kurtosis: -0.17216
Skew of MILs: 0.30031
Orientation 1 (theta, phi): 96.20766, 84.89305 °
CTAn 3
Orientation 2 (theta, phi): 29.74440, 5.86634 °
Orientation 3 (theta, phi): 118.96037, 351.44211 °
Degree of anisotropy MIL 1: 0.16448
Degree of anisotropy MIL 2: -0.05993
Degree of anisotropy MIL 3: -0.10455
95% Confidence intervals for principals:
0.83099 < MIL 1 < 1.01273
0.69662 < MIL 2 < 0.77675
0.66040 < MIL 3 < 0.74431
ELLIPSOID FIT PARAMETERS
-----
Ellipsoid coefficients:
ae 1.99615
be 1.22743
ce 1.89600
de -0.15626
ee 0.16260
fe -0.14674
Sum of squares: 21.55530
Correlation coeff.: 0.47672
EIGENVALUE/VECTOR PARAMETERS
-----
Eigenvectors:
E-vector 1: 0.08849, 0.99019, -0.10813
E-vector 2: 0.49353, 0.05071, 0.86825
E-vector 3: 0.86521, -0.13020, -0.48420
Eigenvalue Independence:
tvalue 2.42900
teststat1 4.54599
teststat2 1.25600
teststat3 5.54627

```

Analise 14 DSM

CTAn 1
 Date and time: 20.08.2015 10:54
 Operator identity: morfologia02
 Computer name: MORFOLOGIA02
 Computation time: 00:06:54
 Dataset: 14d_sm_60kv_5_8_al_0_5__rec
 Location: C:\FEA\Geometrias\Alexandre Freire\FOA\14D_SM\14_SM_Rec novo\
 Description Abbreviation Value Unit
 Number of layers 101
 Lower vertical position 3.11477 mm
 Upper vertical position 3.70246 mm
 Pixel size 5.87693 um
 Lower grey threshold 100
 Upper grey threshold 255
 Tissue volume TV 0.52540 mm³
 Bone volume BV 0.30015 mm³
 Percent bone volume BV/TV 57.12827 %
 Tissue surface TS 4.16941 mm²
 Bone surface BS 11.13989 mm²
 Intersection surface i.S 1.99894 mm²
 Bone surface / volume ratio BS/BV 37.11440 1/mm
 Bone surface density BS/TV 21.20281 1/mm
 Trabecular pattern factor Tb.Pf -20.45299 1/mm
 Centroid (x) Crd.X 4.58674 mm
 Centroid (y) Crd.Y 4.50008 mm
 Centroid (z) Crd.Z 3.41458 mm
 Structure model index SMI -1.31872
 Trabecular thickness Tb.Th 0.08617 mm
 Trabecular number Tb.N 6.62968 1/mm
 Trabecular separation Tb.Sp 0.10445 mm
 Degree of anisotropy DA 1.23113 (0.18774)
 Eigenvalue 1 8.00688
 Eigenvalue 2 8.62833
 Eigenvalue 3 9.85753
 Fractal dimension FD 2.72993
 Number of objects Obj.N 25
 Number of closed pores Po.N(cl) 134
 Volume of closed pores Po.V(cl) 0.00025 mm³
 Surface of closed pores Po.S(cl) 0.08807 mm²
 Closed porosity (percent) Po(cl) 0.08268 %
 Volume of open pore space Po.V(op) 0.22500 mm³
 Open porosity (percent) Po(op) 42.82446 %
 Total volume of pore space Po.V(tot) 0.22525 mm³
 Total porosity (percent) Po(tot) 42.87173 %
 Euler number Eu.N -174
 Connectivity Conn 333
 Connectivity density Conn.Dn 633.80633 1/mm³
 Trabecular thickness distribution Tb.Th
 Range Mid-range Volume Percent volume in range
 mm mm mm³ %
 0.006 - <0.018 0.012 0.00057 0.1952
 0.018 - <0.029 0.024 0.00455 1.5601
 0.029 - <0.041 0.035 0.01372 4.7039
 0.041 - <0.053 0.047 0.02250 7.7172
 0.053 - <0.065 0.059 0.03294 11.2956
 0.065 - <0.076 0.071 0.04156 14.2544
 0.076 - <0.088 0.082 0.04348 14.9108
 0.088 - <0.100 0.094 0.05164 17.7111


```

0.100 - <0.112 0.106 0.02755 9.4495
0.112 - <0.123 0.118 0.02167 7.4309
0.123 - <0.135 0.129 0.00703 2.4111
0.135 - <0.147 0.141 0.01062 3.6424
0.147 - <0.159 0.153 0.00522 1.7892
0.159 - <0.170 0.165 0.00409 1.4018
0.170 - <0.182 0.176 0.00040 0.1388
0.182 - <0.194 0.188 0.00405 1.3881
Standard deviation SD 0.03210 mm
Trabecular separation distribution Tb.Sp
Range Mid-range Volume Percent volume in range
CTAn 2
mm mm mm^3 %
0.006 - <0.018 0.012 0.00085 0.3953
0.018 - <0.029 0.024 0.00763 3.5435
0.029 - <0.041 0.035 0.01844 8.5642
0.041 - <0.053 0.047 0.02153 9.9972
0.053 - <0.065 0.059 0.02225 10.3334
0.065 - <0.076 0.071 0.01798 8.3491
0.076 - <0.088 0.082 0.01793 8.3262
0.088 - <0.100 0.094 0.01468 6.8170
0.100 - <0.112 0.106 0.01029 4.7800
0.112 - <0.123 0.118 0.00586 2.7204
0.123 - <0.135 0.129 0.00698 3.2406
0.135 - <0.147 0.141 0.00483 2.2433
0.147 - <0.159 0.153 0.01245 5.7822
0.159 - <0.170 0.165 0.00683 3.1714
0.170 - <0.182 0.176 0.01069 4.9635
0.182 - <0.194 0.188 0.02387 11.0833
0.194 - <0.206 0.200 0.01225 5.6892
Standard deviation SD 0.05674 mm
STEREOLOGY RESULTS
=====
ANALYSIS SPECIFICATIONS
-----
Total grid size: 210 x 211 x 101 pixels
Sphere centered at: 104, 105, 50 pixels
Sphere radius: 124 pixels
Pixel size: 0.00588 x 0.00588 x 0.00588 mm^3/voxel
VOLUME FRACTION
-----
BV/TV: 0.57069
Sphere volume: 1.62108 mm^3
Solid volume: 0.29979 mm^3
VOI volume: 0.52531 mm^3
INTERSECTIONS
-----
Test line spacing: 0.19982 mm
Number of test orientations: 128
Number of test lines per orientation: 42
Avg tline length per orientation: 40.81424 mm
Total # intrsctns: 17553
# of intrsctns/tline length: 3.35993 1/mm
MORPHOLOGY PARAMETERS
-----
BS/BV: 11.77488 1/mm
Tb.Th: 0.16985 mm
Tb.N: 3.35993 1/mm
Tb.Sp: 0.12777 mm
ANISOTROPY PARAMETERS

```

```

-----
Principal MILs: 0.35340, 0.34044, 0.31850 mm
Mean MIL: 0.34219 mm
Stdev of MILs: 0.02958 mm
Minimum of MILs: 0.28063 mm
Kurtosis: -0.28654
Skew of MILs: 0.37677
Orientation 1 (theta, phi): 36.81141, 247.47871 °
Orientation 2 (theta, phi): 59.79725, 106.42306 °
Orientation 3 (theta, phi): 71.00419, 4.86400 °
Degree of anisotropy MIL 1: 0.04728
Degree of anisotropy MIL 2: 0.00886
Degree of anisotropy MIL 3: -0.05614
95% Confidence intervals for principals:
0.33889 < MIL 1 < 0.36995
0.32132 < MIL 2 < 0.36343
0.30624 < MIL 3 < 0.33238
CTAn 3
ELLIPSOID FIT PARAMETERS
-----
Ellipsoid coefficients:
ae 9.68667
be 8.44585
ce 8.36023
de 0.02781
ee 0.61492
fe 0.98228
Sum of squares: 247.49172
Correlation coeff.: 0.33415
EIGENVALUE/VECTOR PARAMETERS
-----
Eigenvectors:
E-vector 1: -0.22950, -0.55349, 0.80061
E-vector 2: -0.24435, 0.82899, 0.50306
E-vector 3: 0.94214, 0.08017, 0.32550
Eigenvalue Independence:
tvalue 2.42900
teststat1 1.00521
teststat2 2.03180
teststat3 3.84426

```

Analise 28 DCM

```

CTAn 1
Date and time: 20.08.2015 11:16
Operator identity: morfologia02
Computer name: MORFOLOGIA02
Computation time: 00:07:48
Dataset: 28d_m_60kv_5_8_al_0_5_rec
Location: C:\FEA\Geometrias\Alexandre Freire\FOA\28D_M\28D_M_Rec_novo\
Description Abbreviation Value Unit
Number of layers 101
Lower vertical position 3.83176 mm
Upper vertical position 4.41945 mm
Pixel size 5.87693 um
Lower grey threshold 60
Upper grey threshold 255

```

Tissue volume TV 0.59547 mm³
 Bone volume BV 0.43839 mm³
 Percent bone volume BV/TV 73.62070 %
 Tissue surface TS 4.56107 mm²
 Bone surface BS 8.40822 mm²
 Intersection surface i.S 2.74376 mm²
 Bone surface / volume ratio BS/BV 19.17993 1/mm
 Bone surface density BS/TV 14.12040 1/mm
 Trabecular pattern factor Tb.Pf -26.52259 1/mm
 Centroid (x) Crd.X 6.32328 mm
 Centroid (y) Crd.Y 4.96485 mm
 Centroid (z) Crd.Z 4.11905 mm
 Structure model index SMI -4.11250
 Trabecular thickness Tb.Th 0.14275 mm
 Trabecular number Tb.N 5.15717 1/mm
 Trabecular separation Tb.Sp 0.11643 mm
 Degree of anisotropy DA 1.61824 (0.38204)
 Eigenvalue 1 1.81941
 Eigenvalue 2 2.56074
 Eigenvalue 3 2.94423
 Fractal dimension FD 2.81604
 Number of objects Obj.N 138
 Number of closed pores Po.N(cl) 183
 Volume of closed pores Po.V(cl) 0.00091 mm³
 Surface of closed pores Po.S(cl) 0.27098 mm²
 Closed porosity (percent) Po(cl) 0.20668 %
 Volume of open pore space Po.V(op) 0.15617 mm³
 Open porosity (percent) Po(op) 26.22682 %
 Total volume of pore space Po.V(tot) 0.15708 mm³
 Total porosity (percent) Po(tot) 26.37930 %
 Euler number Eu.N 173
 Connectivity Conn 148
 Connectivity density Conn.Dn 248.54473 1/mm³
 Trabecular thickness distribution Tb.Th
 Range Mid-range Volume Percent volume in range
 mm mm mm³ %
 0.006 - <0.018 0.012 0.00039 0.0892
 0.018 - <0.029 0.024 0.00204 0.4723
 0.029 - <0.041 0.035 0.00583 1.3505
 0.041 - <0.053 0.047 0.00985 2.2803
 0.053 - <0.065 0.059 0.01321 3.0586
 0.065 - <0.076 0.071 0.01487 3.4414
 0.076 - <0.088 0.082 0.01758 4.0707
 0.088 - <0.100 0.094 0.02488 5.7589
 0.100 - <0.112 0.106 0.02558 5.9224
 0.112 - <0.123 0.118 0.03256 7.5386
 0.123 - <0.135 0.129 0.03652 8.4556
 0.135 - <0.147 0.141 0.04519 10.4617
 0.147 - <0.159 0.153 0.04195 9.7118
 0.159 - <0.170 0.165 0.02899 6.7111
 0.170 - <0.182 0.176 0.03293 7.6239
 0.182 - <0.194 0.188 0.02343 5.4234
 0.194 - <0.206 0.200 0.02326 5.3850
 0.206 - <0.217 0.212 0.02512 5.8157
 0.217 - <0.229 0.223 0.01543 3.5713
 0.229 - <0.241 0.235 0.01234 2.8578
 CTAn 2
 Standard deviation SD 0.04938 mm
 Trabecular separation distribution Tb.Sp
 Range Mid-range Volume Percent volume in range

```

mm mm mm^3 %
0.006 - <0.018 0.012 0.00075 0.5021
0.018 - <0.029 0.024 0.00644 4.2861
0.029 - <0.041 0.035 0.01201 7.9917
0.041 - <0.053 0.047 0.01358 9.0372
0.053 - <0.065 0.059 0.01094 7.2773
0.065 - <0.076 0.071 0.00967 6.4367
0.076 - <0.088 0.082 0.00709 4.7171
0.088 - <0.100 0.094 0.00590 3.9242
0.100 - <0.112 0.106 0.00800 5.3224
0.112 - <0.123 0.118 0.00543 3.6110
0.123 - <0.135 0.129 0.00865 5.7593
0.135 - <0.147 0.141 0.00788 5.2438
0.147 - <0.159 0.153 0.00504 3.3571
0.159 - <0.170 0.165 0.00708 4.7124
0.170 - <0.182 0.176 0.00934 6.2173
0.182 - <0.194 0.188 0.00625 4.1618
0.194 - <0.206 0.200 0.01773 11.7965
0.206 - <0.217 0.212 0.00848 5.6459
Standard deviation SD 0.06171 mm
STEREOLOGY RESULTS
=====
ANALYSIS SPECIFICATIONS
-----
Total grid size: 218 x 219 x 101 pixels
Sphere centered at: 108, 109, 50 pixels
Sphere radius: 130 pixels
Pixel size: 0.00588 x 0.00588 x 0.00588 mm^3/voxel
VOLUME FRACTION
-----
BV/TV: 0.73564
Sphere volume: 1.86797 mm^3
Solid volume: 0.43798 mm^3
VOI volume: 0.59538 mm^3
INTERSECTIONS
-----
Test line spacing: 0.19982 mm
Number of test orientations: 128
Number of test lines per orientation: 43
Avg tline length per orientation: 46.15182 mm
Total # intrsctns: 13376
# of intrsctns/tline length: 2.26427 1/mm
MORPHOLOGY PARAMETERS
-----
BS/BV: 6.15595 1/mm
Tb.Th: 0.32489 mm
Tb.N: 2.26427 1/mm
Tb.Sp: 0.11676 mm
ANISOTROPY PARAMETERS
-----
Principal MILs: 0.74137, 0.62491, 0.58279 mm
Mean MIL: 0.65948 mm
Stdev of MILs: 0.08263 mm
Minimum of MILs: 0.50673 mm
Kurtosis: 0.55718
Skew of MILs: 0.70230
Orientation 1 (theta, phi): 109.94538, 53.06088 °
Orientation 2 (theta, phi): 28.83872, 4.28765 °
Orientation 3 (theta, phi): 109.93877, 315.49636 °
Degree of anisotropy MIL 1: 0.14111

```

```

Degree of anisotropy MIL 2: -0.03814
Degree of anisotropy MIL 3: -0.10297
CTAn 3
95% Confidence intervals for principals:
0.69156 < MIL 1 < 0.80377
0.59706 < MIL 2 < 0.65706
0.54919 < MIL 3 < 0.62342
ELLIPSOID FIT PARAMETERS
-----
Ellipsoid coefficients:
ae 2.49654
be 2.30877
ce 2.51907
de -0.96815
ee 0.55235
fe 0.11036
Sum of squares: 32.04707
Correlation coeff.: 0.47049
EIGENVALUE/VECTOR PARAMETERS
-----
Eigenvectors:
E-vector 1: 0.56492, 0.75133, -0.34112
E-vector 2: 0.48100, 0.03606, 0.87598
E-vector 3: 0.67045, -0.65894, -0.34102
Eigenvalue Independence:
tvalue 2.42900
teststat1 4.44026
teststat2 1.83451
teststat3 5.31505

```

Analise 14 DCM

```

CTAn 1
Date and time: 20.08.2015 10:08
Operator identity: morfologia02
Computer name: MORFOLOGIA02
Computation time: 00:07:04
Dataset: 14d_m_60kv_5_8_al_0_5__rec
Location: C:\FEA\Geometrias\Alexandre Freire\FOA\14D_M\14D_Rec_novo\
Description Abbreviation Value Unit
Number of layers 101
Lower vertical position 3.32046 mm
Upper vertical position 3.90816 mm
Pixel size 5.87693 um
Lower grey threshold 60
Upper grey threshold 255
Tissue volume TV 0.49887 mm^3
Bone volume BV 0.26467 mm^3
Percent bone volume BV/TV 53.05493 %
Tissue surface TS 3.84105 mm^2
Bone surface BS 10.79040 mm^2
Intersection surface i.S 1.50772 mm^2
Bone surface / volume ratio BS/BV 40.76873 1/mm
Bone surface density BS/TV 21.62982 1/mm
Trabecular pattern factor Tb.Pf -18.21815 1/mm
Centroid (x) Crd.X 4.21308 mm
Centroid (y) Crd.Y 4.23584 mm
Centroid (z) Crd.Z 3.64265 mm
Structure model index SMI -0.79150

```

Trabecular thickness Tb.Th 0.08418 mm
 Trabecular number Tb.N 6.30255 1/mm
 Trabecular separation Tb.Sp 0.09736 mm
 Degree of anisotropy DA 1.44131 (0.30619)
 Eigenvalue 1 15.15563
 Eigenvalue 2 18.79148
 Eigenvalue 3 21.84397
 Fractal dimension FD 2.69356
 Number of objects Obj.N 103
 Number of closed pores Po.N(cl) 126
 Volume of closed pores Po.V(cl) 0.00032 mm³
 Surface of closed pores Po.S(cl) 0.11534 mm²
 Closed porosity (percent) Po(cl) 0.12154 %
 Volume of open pore space Po.V(op) 0.23387 mm³
 Open porosity (percent) Po(op) 46.88051 %
 Total volume of pore space Po.V(tot) 0.23419 mm³
 Total porosity (percent) Po(tot) 46.94507 %
 Euler number Eu.N -156
 Connectivity Conn 385
 Connectivity density Conn.Dn 771.74885 1/mm³
 Trabecular thickness distribution Tb.Th
 Range Mid-range Volume Percent volume in range
 mm mm mm³ %
 0.006 - <0.018 0.012 0.00063 0.2469
 0.018 - <0.029 0.024 0.00527 2.0611
 0.029 - <0.041 0.035 0.01832 7.1657
 0.041 - <0.053 0.047 0.03245 12.6899
 0.053 - <0.065 0.059 0.03806 14.8857
 0.065 - <0.076 0.071 0.03532 13.8141
 0.076 - <0.088 0.082 0.02726 10.6595
 0.088 - <0.100 0.094 0.01990 7.7812
 0.100 - <0.112 0.106 0.01546 6.0468
 0.112 - <0.123 0.118 0.01268 4.9594
 0.123 - <0.135 0.129 0.01776 6.9441
 0.135 - <0.147 0.141 0.01455 5.6909
 0.147 - <0.159 0.153 0.01105 4.3219
 0.159 - <0.170 0.165 0.00123 0.4818
 0.170 - <0.182 0.176 0.00576 2.2510
 Standard deviation SD 0.03741 mm
 Trabecular separation distribution Tb.Sp
 Range Mid-range Volume Percent volume in range
 mm mm mm³ %
 CTAn 2
 0.006 - <0.018 0.012 0.00102 0.4565
 0.018 - <0.029 0.024 0.00816 3.6570
 0.029 - <0.041 0.035 0.01847 8.2718
 0.041 - <0.053 0.047 0.02257 10.1102
 0.053 - <0.065 0.059 0.02191 9.8161
 0.065 - <0.076 0.071 0.02080 9.3153
 0.076 - <0.088 0.082 0.02050 9.1826
 0.088 - <0.100 0.094 0.01820 8.1538
 0.100 - <0.112 0.106 0.01703 7.6272
 0.112 - <0.123 0.118 0.01189 5.3282
 0.123 - <0.135 0.129 0.01328 5.9475
 0.135 - <0.147 0.141 0.01224 5.4834
 0.147 - <0.159 0.153 0.00455 2.0371
 0.159 - <0.170 0.165 0.00408 1.8257
 0.170 - <0.182 0.176 0.00494 2.2148
 0.182 - <0.194 0.188 0.00713 3.1918
 0.194 - <0.206 0.200 0.00894 4.0061

```

0.206 - <0.217 0.212 0.00193 0.8665
0.217 - <0.229 0.223 0.00560 2.5083
Standard deviation SD 0.05208 mm
STEREOLOGY RESULTS
=====
ANALYSIS SPECIFICATIONS
-----
Total grid size: 155 x 155 x 101 pixels
Sphere centered at: 77, 77, 50 pixels
Sphere radius: 120 pixels
Pixel size: 0.00588 x 0.00588 x 0.00588 mm^3/voxel
VOLUME FRACTION
-----
BV/TV: 0.52937
Sphere volume: 1.46921 mm^3
Solid volume: 0.26073 mm^3
VOI volume: 0.49253 mm^3
INTERSECTIONS
-----
Test line spacing: 0.19982 mm
Number of test orientations: 128
Number of test lines per orientation: 25
Avg tline length per orientation: 28.39597 mm
Total # intrsctns: 16439
# of intrsctns/tline length: 4.52281 1/mm
MORPHOLOGY PARAMETERS
-----
BS/BV: 17.08742 1/mm
Tb.Th: 0.11705 mm
Tb.N: 4.52281 1/mm
Tb.Sp: 0.10406 mm
ANISOTROPY PARAMETERS
-----
Principal MILs: 0.25687, 0.23069, 0.21396 mm
Mean MIL: 0.23694 mm
Stdev of MILs: 0.02669 mm
Minimum of MILs: 0.17278 mm
Kurtosis: 1.48824
Skew of MILs: 0.74208
Orientation 1 (theta, phi): 127.87622, 49.13629 °
Orientation 2 (theta, phi): 94.20042, 142.41108 °
Orientation 3 (theta, phi): 38.19292, 57.76760 °
Degree of anisotropy MIL 1: 0.09849
Degree of anisotropy MIL 2: -0.01349
Degree of anisotropy MIL 3: -0.08501
95% Confidence intervals for principals:
0.24113 < MIL 1 < 0.27616
0.21691 < MIL 2 < 0.24747
CTAn 3
0.20500 < MIL 3 < 0.22422
ELLIPSOID FIT PARAMETERS
-----
Ellipsoid coefficients:
ae 18.15375
be 18.33086
ce 19.30646
de -1.18876
ee 5.17463
fe 3.88795
Sum of squares: 1735.04415

```

```
Correlation coeff.: 0.40852
EIGENVALUE/VECTOR PARAMETERS
-----
Eigenvectors:
E-vector 1: 0.51643, 0.59695, -0.61396
E-vector 2: -0.79028, 0.60835, -0.07325
E-vector 3: 0.32978, 0.52302, 0.78593
Eigenvalue Independence:
tvalue 2.42900
teststat1 2.38456
teststat2 2.25143
      teststat3 4.90154
```


Anexo C

Protocolo – Imunoistoquímica – Técnica da Immunoperoxidase

1º Dia

A – Colocar as lâminas na estufa por 20 minutos para amolecer a parafina

B – Passar as lâminas nos Xilóis (4 minutos cada banho) e Alcoois (2 minutos cada banho) para reidratação dos cortes.

Xilol 1 100% - 4 min.

Xilol 2 100% - 4 min.

Xilol 3 100% - 4 min.

Xilol 100% + Alcool 100% - 4 min.

Alcool 100% - 2 min.

Alcool 100% - 2 min.

Alcool 95% - 2 min.

Alcool 80% - 2 min.

Alcool 70% - 2 min.

Alcool 50% - 2 min.

C – Lavar as lâminas com PBS normal: 3 banhos de 1,5 minutos cada

D – Bloqueio da enzima endógena peroxidase – Preparar a H₂O₂ a 30%. Deixar as lâminas reagindo por 45 minutos no escuro para não diminuir a atividade da peroxidase. Envolver com papel alumínio e apagar as luzes. Normalmente ocorre a atividade da peroxidase nas hemácias e granulócitos e estas se não bloqueadas, sofrerão reação com a DAB (cromógeno) posteriormente.

E – Lavar as lâminas com PBS com Triton: 3 banhos de 1,5 minutos cada.

F – Recuperação antigênica – Preparar o tampão citrato. Aquece-lo no micro-ondas por 2 minutos e coloca-lo na vaporeira.

Deixar as lâminas 10 minutos na vaporeira tampada, 10 minutos na vaporeira destampada e 20 minutos na bancada esfriando.

As técnicas histológicas utilizadas (ex. fixação) podem desmascarar algum epítomos antigênicos, fazer ligação cruzada e até mesmo destuí-los. O calor e o tampão citrato fazem o desmascaramento dos epítomos, facilitando o acesso do anticorpo aos epítomos alvo.

G – Bloqueio da enzima endógena Biotina – preparar o leite e deixar as lâminas por 20 minutos.

A biotina endógena é uma vitamina/coenzima presente em diversos tecidos. O leite tem muita adivinha que consome a biotina endógena.

H – Secar as lâminas com lenço de papel, delimitar os cortes com caneta hidrofóbica e colocar as lâminas no porta lâminas.

I – Pipetar o Anticorpo primário. Preparar 1 eppendorf para cada 5 lâminas (paracortes grandes). Pipetar aproximadamente 120µl por corte.

J – Repousar as lâminas na geladeira por 18 horas dentro de um suporte fechado com tampa (porta-lâminas). Neste tempo o Anticorpo Primário se ligará ao epítipo alvo.

2º Dia

A – Lavar as lâminas com PBS com triton: 2 banhos de 2,5 minutos cada.

B – Secar as lâminas com lenço de papel e colocar as lâminas no porta-lâminas.

C – Pipetar o anticorpo secundário. Preparar 1 eppendorf para cada 5 lâminas (para cortes grandes). Pipetar aproximadamente 120µl por corte. Deixar repousar por 1 hora em temperatura ambiente.

Nesta etapa o anticorpo secundário irá se ligar no anticorpo primário.

D – Lavar as lâminas com PBS triton: 3 banhos de 1,5 minutos .

E – Preparar o complexo AB com antecedência (faltando 45 minutos para completar 1 hora).

Pipetar o complexo AB sobre os cortes e deixar por 45 minutos. O complexo AB irá se ligar ao anticorpo secundário e amplificará o sinal que logo será marcado com a DAB

F – Lavar as lâminas com PBS com triton 1 banho de 5 minutos

G – Preparar a DAB na hora. 1 ml de substrato + 1 gota da DAB. Esta deve ser preparada e pipetada na capela e de preferência com a luz apagada. Deixar reagindo por 10 minutos. OBS: prepara-se 3ml de substrato + 3 gotas da DAB para 25 lâminas.

A DAB é um cromógeno líquido que dará uma coloração marrom ao tecido, devido

a reação com o antígeno alvo.

H – Lavar as lâminas com água destilada para paralisar a reação.

I – Pipetar a hematoxilina sobre os cortes. Deixar por 2 minutos. A hematoxilina fará a contra coloração do tecido.

J – Lavar as lâminas com água corrente para tirar o excesso de hematoxilina.

K – Passar as lâminas nos álcoois e xilóis

Alcool 95% - 1 min.

Alcool 100% - 1 min.

Alcool 100% - 2 min.

Xilol I – 5 min.

Xilol II – 5 min.

L – Montar as lâminas com as lamínulas limpas e colar.