

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

IRIS JASMIN SANTOS GERMAN BORGIO

Ação da matriz inorgânica de osso bovino (Bonefill®) na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental. Análise histológica e morfométrica

BAURU
2016

IRIS JASMIN SANTOS GERMAN BORGÓ

Ação da matriz inorgânica de osso bovino (Bonfill®) na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental. Análise histológica e morfométrica

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

BAURU
2016

B644a Borgo, Iris Jasmin Santos German
Ação da matriz inorgânica de osso bovino (Bonfill®) na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental. Análise histológica e morfométrica / Iris Jasmin Santos German Borgo. – Bauru, 2016.
143 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) - FOB-USP
Protocolo nº: 023/2012
Data: 24 de setembro de 2012

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Fabiana Del Rosario Altagracia German Alba** e **Juan Francisco Santos Lopez (Rafael)**, pelo apoio incondicional, por serem meu exemplo de luta, coragem, altruísmo e integridade. Vocês são a base da minha vida e sempre levarão o crédito das minhas conquistas. Amo vocês infinitamente.

À minha irmã, **Alba Iris Santos German**, por sempre estar disposta a me escutar e me dar forças quando precisei. Por ser minha amiga, minha fiel confidente e meu modelo a seguir.

Ao meu esposo **Ricardo Luiz Penteado Borgo**, por ter me acompanhado ativamente nesses anos de estudo, por confiar e me cuidar com tanto empenho e sutileza. Obrigada por amenizar meus momentos de dificuldade.

À minha avó **Ana América Alba** (*in memoriam*), pelo amor puro e por sempre torcer por mim. Sei que você estaria muito feliz e orgulhosa por ter concluído essa fase da minha vida. Você será o meu amor eterno e inesquecível.

Vocês são minha fonte principal de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me guiar em todos meus projetos pessoais e profissionais. Por ser minha esperança nas lutas e minha segurança e abrigo nas tempestades. Sou grata por ter viabilizado oportunidades na minha vida e por me cobrir de bênçãos e saúde.

À minha mãe, **Fabiana Del Rosario Altagracia German Alba**, por sempre estar presente, apesar da distância, e me apoiar incondicionalmente. Por ser a minha paz, o exemplo vivo do significado e função de uma mãe. Você sempre me direciona pelo caminho certo em pró da minha felicidade. Tua ternura, dignidade e amor são imensuráveis. Agradeço por tua luta em fazer de mim uma melhor pessoa.

Ao meu pai, **Juan Francisco Santos Lopez (Rafael)**, por ser o meu padrão de dedicação, responsabilidade, carinho e coragem. A energia positiva que você irradia é admirável, por esse motivo a tua companhia é tão prazerosa. Você é a minha inspiração de luta e a minha alegria. Te Admiro!

À minha irmã, **Alba Iris Santos German**, minha “manita”, pela proteção, carinho e apoio. Você é minha confidente, a âncora que me mantém firme. Agradeço a Deus por ter você como irmã.

Ao meu esposo **Ricardo Luiz Penteado Borgo**, obrigada pela cumplicidade, lealdade e por me dar tantos motivos para sorrir. Você é o pilar que me sustenta quando tento hesitar e com certeza em quem posso confiar.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, por ter me aceitado e confiado em mim, desde o início de 2012 na prática profissionalizante. Agradeço pela disposição, paciência e por ter me incentivado ao máximo a explorar meus conhecimentos e aptidões. Graças a você o mestrado foi uma revolução na minha vida.

Aos **membros da Banca** por ter aceitado o meu convite, e pela disposição em fornecer sugestões, importantes para enriquecer este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, por me transmitir tantos conhecimentos e pelo empenho por meu bem-estar pessoal. Considero o senhor como um pai. Agradeço pelo apreço e proteção.

Ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues**, pelas vivências, aprendizagem, pela atenção e dedicação que o caracteriza. Obrigada por ter me aberto as portas

no Departamento de Anatomia de forma tão amável e educada. Sinto muita admiração por você.

Ao **Prof. Dr. André Luis Shinohara**, por me receber de braços abertos desde o primeiro dia no Departamento de Anatomia, e pela preocupação para comigo em toda a jornada acadêmica e pessoal.

À **Prof.ª Dr.ª Daniela Vieira Buchaim**, pelo apoio acadêmico nas correções de artigos científicos e por estar sempre disponível durante a minha formação.

À **Dr.ª Tânia Mary Cestari**, pela paciência, amizade e por sempre ajudar com tanto carinho e disposição. Você é uma profissional admirável e um ser humano incrível.

À **Prof.ª Dr.ª Ana Lúcia Alvares Capellozza**, pela contribuição na realização de artigos acadêmicos, e pela excelente recepção, sempre dinâmica e atenciosa.

À ex-secretária do Departamento, **Vera Lúcia Rufino Rosa**, pelo tratamento afetuoso e pelo interesse em resolver cada dúvida no decorrer do mestrado.

À secretária do Departamento, **Dalva Ribeiro de Oliveira**, pela disposição e forte apoio nas questões acadêmicas.

Aos funcionários do Departamento de Histologia, **Patrícia de Sá Mortágua Germino e Daniele Santi Ceolin**, pela ajuda no processamento histológico das lâminas.

Aos funcionários do Departamento da Anatomia: **Daniela, Romário, Ovídio e Lorisvalda**, agradeço pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos técnicos do Biotério Central da FOB-USP pela ajuda com o cuidado dos ratos e por sempre serem tão atenciosos e amáveis.

Aos amigos e colegas de trabalho:

Karina Torres Pomini Puzipe, minha amiga-irmã, por sempre estar do meu lado, por me ajudar e zelar por minha felicidade. Uma pessoa carinhosa e com um instinto de proteção encantador. Nossos trabalhos de pesquisas foram mais divertidos na tua companhia. Nossas risadas, brincadeiras e cumplicidade são inesquecíveis. Sou grata por ter te conhecido.

Idvaldo Aparecido Favaretto Júnior, pela amizade, conselhos e momentos especiais que passamos juntos. Um grande amigo com quem pude compartilhar as minhas alegrias e tristezas. Sempre disposto em ajudar-me e com um enorme coração.

Farooque Jamaluddin Ahmed, por ser um grande colega e um bom amigo, pela confiança, companheirismo e amizade. Te considero um irmão de coração.

Mizael Pereira, pela confiança, companheirismo e conversas agradáveis que só me faziam rir. Obrigada pela ajuda nas diretrizes no laboratório e pelos nossos momentos nos *coffee breaks*.

Geraldo Marco Rosa Júnior, pela enorme ajuda, ensinamentos e boa disposição. Teu positivismo e caráter iluminaram o ambiente de trabalho, fazendo tudo fluir naturalmente, aumentando a produtividade.

Dayane Maria Braz Nogueira, pela confiança depositada em mim em momentos difíceis, pelo carinho e risadas que aliviavam o dia a dia acadêmico.

Marcelie Priscila de Oliveira Rosso, pela convivência no Departamento de Anatomia e nas disciplinas do mestrado.

Cleuber Rodrigo de Souza Bueno, pela assessoria em eventuais dúvidas laboratoriais.

À ex-aluna de mestrado **Jéssica Barbosa de Oliveira Gonçalves**, pela ajuda na cirurgia dos animais.

À Faculdade de Odontologia de Bauru FOB-USP e a todos os funcionários do campus que sempre estiveram disponíveis e atenciosos desde a prefeitura, refeitório, biblioteca e secretaria de pós-graduação.

À **CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, por ter concedido bolsa para a realização dessa pesquisa de Mestrado.

“A teoria sem a prática vira verbalismo, assim como a prática sem teoria, vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora.”

Paulo Freire

RESUMO

O desequilíbrio no *turnover* ósseo decorrente dos efeitos do alcoolismo crônico está relacionado à apoptose dos osteócitos, diminuição da espessura do osso medular e cortical e pelas alterações na atividade e diferenciação de osteoblastos. Devido à necessidade de tratamentos regenerativos e reconstrutivos associado ao alcoolismo, os xenoenxertos tem providenciado uma possibilidade terapêutica como material de preenchimento de defeitos ósseos. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo analisar o comportamento do biomaterial Bonefill® em defeitos críticos realizados em calvária de ratos, comparar a interferência do alcoolismo experimental na neoformação óssea, além de avaliar a influência do tipo de dieta líquida sobre a massa corporal dos animais. Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, separados aleatoriamente em Grupo Controle (GC) os animais receberam água como dieta líquida e Grupo Experimental (GE) os animais receberam etanol a 25%, cada grupo composto por 20 ratos. O GC foi sub-dividido em GAC (Grupo Água Coágulo) correspondente ao defeito direito na calota craniana do animal e GAB (Grupo Água Biomaterial), defeito do lado esquerdo do animal. O GE foi sub-dividido em GEC (Grupo Etanol Coágulo) correspondente ao defeito direito da calota craniana e GEB (Grupo Etanol Biomaterial) defeito do lado esquerdo do animal. Foi realizada uma osteotomia circular de 5 mm de diâmetro no osso parietal direito e esquerdo. Os defeitos GAC e GEC foram preenchidos com coágulo sanguíneo e os defeitos GAB e GEB com osso bovino cortical inorgânico. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias pós-cirúrgico. Os resultados da análise histológica mostraram que no período de 10 dias, no GAB e GEB as partículas do enxerto ósseo estavam circundadas por tecido de granulação e células inflamatórias, apresentou uma pequena formação de osso imaturo principalmente nas margens do defeito. No período de 20 dias foi observado presença de vasos sanguíneos e no GAB e GEB algumas partículas parcialmente circundadas por tecido ósseo neoformado. Os períodos de 40 e 60 dias exibiram áreas de formação óssea nas margens e ao redor de algumas partículas. O osso neoformado encontrava-se em um estágio mais avançado de remodelação, porém sem preenchimento completo do defeito e sem sinais de reabsorção da superfície do biomaterial. Na análise histomofométrica o percentual de formação óssea entre o GAC versus GEC e GAB

versus GEB, para cada período experimental, não apontou diferença estatisticamente significativa. Com relação à massa corporal o GC, nos períodos de 20, 40 e 60 dias pós-cirurgia a massa corporal aumentou, 7,9%, 6,6% e 14,1%, respectivamente. No GE ocorreu uma perda de 9,2% da massa corporal após 10 dias da cirurgia, e aos 40 e 60 dias ocorreu ganho de massa corporal de respectivamente 5,9% e 6,4% nos animais. Conclui-se que o biomaterial Bonefill® não promoveu uma maior neoformação óssea em defeitos críticos; a dieta alcoólica não atingiu os seus efeitos nocivos na formação óssea, e a dieta líquida de etanol, quando comparada à de água, interferiu negativamente na massa corporal dos animais.

Palavras-chave: Etanol. Regeneração óssea. Transplante ósseo. Transplante heterólogo.

ABSTRACT

Action of inorganic bovine bone Matrix (Bonefill®) on bone formation in rats submitted to experimental alcoholism. Histological and morphometric analysis

The imbalance in bone turnover resulting from the effects of chronic alcoholism is related to apoptosis of osteocytes, decrease of trabecular and cortical bone thickness and changes in activity and differentiation of osteoblasts. Due to the need for regenerative and reconstructive treatments associated with alcoholism, xenografts has provided a therapeutic possibility as a filling material of bone defects. Therefore, the aims of this study were to analyze the Bonefill® biomaterial behavior in critical defects created on the calvaria of rats; to compare the interference of experimental alcoholism in bone formation, as well as to evaluate the influence of 2 type of liquid diet on animal body weight. 40 male Wistar rats were used (*Rattus norvegicus*), with 60 days of age. The rats were randomly separated into Control Group (CG, $n^{\circ} = 20$), which received water as liquid diet and Experimental Group (EG, $n^{\circ} = 20$), these rats consumed ethanol 25%. CG was subdivided into WCG (Water Clot Group), corresponding to the right calvaria defect and WBG (Water Biomaterial Group), left side defect of the calvaria. EG was subdivided into ECG (Ethanol Clot Group), corresponding to the right calvaria defect and EBG (Ethanol Biomaterial Group), left side defect of the calvaria. A circle osteotomy of 5 mm in diameter was performed in the right and left parietal bone. The bone defects in WCG and ECG were filled with blood clot and the defects in WBG and EBG were filled with inorganic bovine bone. 5 animals from each group were euthanized at periods of 10, 20, 40 and 60 days after surgery. The histological analysis showed that at 10 days, WBG and EBG, the particles of bone graft were surrounded by granulation tissue and inflammatory cells, it also showed a small immature bone formation mainly at the margins of the defects. At 20 days it was observed blood vessels in WBG and EBG and some graft particles partially surrounded by new bone. At 40 and 60 days it was exhibited some areas of bone formation at the margins and around a few particles. The newly formed bone was in a more advanced stage of bone remodeling, however it did not showed neither complete filling nor signs of resorption of the biomaterial surface. Histomorphometric analysis on the percentage of bone formation between

WCG versus ECG and WBG versus EBG, for each trial period, showed no statistical significant difference. Regarding the body mass CG, at 20, 40 and 60 days the body mass increased 7.9%, 6.6% and 14.1%, respectively. The EG had a loss of body weight of 9.2% after 10 days of surgery and at 40 and 60 days it showed a body mass gain of 5.9% and 6.4%, respectively. It can be concluded that Bonefill® did not promote an increase bone formation in critical defects; the alcohol diet did not achieve its adverse effects on bone formation, and the liquid diet containing ethanol, compared to the liquid water diet had a negative effect on animal body weight.

Key words: Ethanol. Bone regeneration. Bone transplantation. Transplantation, heterologous

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Células da matriz óssea (Ossificação intramembranosa)	39
Figura 2 - Aspecto macroscópico do tecido ósseo	40
Figura 3 - Ossificação intramembranosa e endocondral	41
Figura 4 - Efeitos diretos e indiretos do etanol no tecido ósseo.....	44
Figura 5 - Desenho experimental da divisão dos grupos.....	60
Figura 6 - Biomaterial Bonafill® de granulação média (0,6-1,5 mm).....	60
Figura 7 - Procedimentos cirúrgicos: (A) Tricotomia da área da calota craniana; (B) Incisão crânio-caudal (20 mm); (C) Divulsão dos tecidos e visualização dos ossos parietais; (D) Osteotomia circular de 5 mm realizada nos parietais	62
Figura 8 - Procedimentos cirúrgicos: (A) Exposição do defeito ósseo; (B) Preenchimento do defeito com Biomaterial Bonafill®; (C) Sutura do plano profundo com fio Vicryl® 5-0; (D) Sutura do plano superficial com fio de seda 4-0.....	63
Figura 9 - Eutanásia: (A) Tricotomia da região da calota craniana; (B) Remoção da pele; (C) Incisão para separar o segmento de osso da calota; (D) Osteotomia com broca tronco-cônica de ponta diamantada; (E) Remoção da calota craniana; (F) Após remoção da calota.....	64
Figura 10 - Micrótomo Leica® RM 2245.....	65
Figura 11 - Microscópio Olympus BX50.....	66

Figura 12 - Representação da variação do tamanho corporal do GE e GC.....	69
Figura 13 - Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	73
Figura 14 - Objetiva de 10x. Fotomicrografia dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	75
Figura 15- Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 20 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	79
Figura 16- Objetiva de 10x. Fotomicrografia dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	81
Figura 17- Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	85
Figura 18 - Objetiva de 10x. Fotomicrografia do defeito dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	87

Figura 19 - Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 60 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	91
Figura 20 - Objetiva de 10x. Fotomicrografia dos defeitos dos diferentes grupos no período de 60 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), Margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela).....	93
Figura 21 - Objetiva de 40x. Aspectos microscópicos do defeito dos grupos GAB e GEB nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias corados pela Hematoxilina-Eosina. Tecido conjuntivo frouxo (TC); vasos sanguíneos (seta azul); células inflamatórias mononucleares (círculo preto); enxerto ósseo (Eo); neoformação óssea (asterisco); osteócitos (seta verde); células gigantes multinucleadas (seta vermelha).....	97
Figura 22 - Objetiva de 40x. Aspectos microscópicos do defeito dos grupos GAC e GEC nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias corados pela Hematoxilina-Eosina. Tecido conjuntivo frouxo (TC); vasos sanguíneos (seta azul); células inflamatórias mononucleares (círculo preto); margem do defeito (M); neoformação óssea (asterisco); osteócitos (seta verde).....	99
Figura 23 - Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAC, GEC, GAB e GEB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante.....	102

- Figura 24 - Representação gráfica do percentual de Biomaterial nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental tratados com biomaterial obtido para os grupos GAC e GEC nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa..... 103
- Figura 25 - Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAC e GEC nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa..... 104
- Figura 26 - Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAB e GEB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa..... 105
- Figura 27 - Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAC e GAB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa..... 106
- Figura 28 - Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GEC e GEB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa..... 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da massa corporal inicial do grupo controle (GC) e do grupo experimental (GE) por meio do Teste “t” para amostras independentes.....	69
Tabela 2 - Massa corporal inicial e final por períodos (10, 20, 40 e 60 dias) do Grupo Controle (GC).....	70
Tabela 3 - Massa corporal inicial e final por períodos (10, 20, 40 e 60 dias) do Grupo Experimental (GE).....	70
Tabela 4 - Comparação do percentual de formação óssea nos diferentes períodos de reparo para cada grupo: ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e post hoc teste de Tukey.....	101
Tabela 5 - Comparação do percentual de Biomaterial nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental tratados com biomaterial: ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e <i>post hoc</i> teste de Tukey.....	102
Tabela 6 - Comparação do percentual de formação óssea nos animais alcoolizados e não alcoolizados para cada tratamento (biomaterial ou coágulo) nos diferentes períodos experimentais para cada grupo experimental: Teste “t” para amostras independentes.....	104
Tabela 7 - Comparação do percentual de formação óssea conforme o grupo de tratamento (biomaterial versus coágulo) para cada situação clínica dos animais (alcoolizados e não alcoolizados): Teste “t” pareado.....	106

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µm	Micrômetro
ALDH	Enzima aldeído-desidrogenase
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas
CD4	Grupamento de diferenciação 4
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
cm	Centímetros
Coa	Coenzima a
CTL	Células T citotóxicas
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
g	Gramas
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular
Kg	Kilogramas
KVp	Quilovoltagem
L	Litros
mA	Miliamperagem
mg/kg	Miligramas/Kilogramas
mL/Kg	Mililitros/Kilogramas
mm	Milímetros
MMP-12	Metaloproteinases da matriz 12
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
p	Nível de significância estatística
Pc12	Linhagem de Células Feocromocitoma
Peth	Fosfatidiletanol
RANKL-RANK	Ligante/receptor ativador do fator nuclear kB
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos

SDA	Síndrome da Dependência Alcoólica
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
β -TCP	Beta fosfato tricálcico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
®	Marca Registrada
Nº	Número
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	ANTECEDENTES E PREVALÊNCIA DO ÁLCOOL	33
2.2	BIOQUÍMICA DO ÁLCOOL	34
2.3	ALCOOLISMO CRÔNICO	36
2.4	TECIDO ÓSSEO	38
2.4.1	População celular	38
2.4.2	Classificação do tecido ósseo	39
2.5	CALOTA CRANIANA	41
2.6	ÁLCOOL E TURNOVER ÓSSEO	43
2.7	SUBSTITUTOS ÓSSEOS	45
2.7.1	Resposta biológica aos substitutos ósseos	48
2.7.2	Biomaterial Bonfill®	49
3	PROPOSIÇÃO	53
3.1	OBJETIVO GERAL	55
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	59
4.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	61
4.3	EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	64
4.4	ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA	65
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5	RESULTADOS	67
5.1	MASSA CORPORAL	69
5.2	OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS	71
5.2.1	Período de 10 dias	71
5.2.2	Período de 20 dias	77
5.2.3	Período de 40 dias	83
5.2.4	Período de 60 dias	89
5.2.5	GAB e GEB nos períodos de 10 20, 40 e 60 dias (HE)	95

5.2.6	GAC e GEC nos períodos de 10 20, 40 e 60 dias (HE)	95
5.3	OBSERVAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS	101
6	DISCUSSÃO	109
7	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS	123
	ANEXOS	141

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O conceito de alcoolismo teve seu auge no século XVIII, logo após a crescente produção e comercialização do álcool destilado, conseqüente à revolução industrial (GIGLIOTTI; BESSA, 2004). A etiologia e as conseqüências da Síndrome da Dependência Alcoólica (SDA) vêm sendo muito estudadas há algumas décadas (MORAES et al., 2006).

O etanol é um solvente orgânico hidrossolúvel com a capacidade de penetrar todos os compartimentos do corpo humano. Uma ampla variedade de sistemas bioquímicos é influenciada pelos efeitos do etanol, incluindo a inibição da gliconeogênese e glicogenólise deprimindo o açúcar no sangue, caquexia, inibição da síntese de proteínas, oxidação de ácidos graxos e da cadeia respiratória (HOENSCH, 1987; HSU et al., 2006; WAHL et al., 2006).

O álcool apresenta ações multifatoriais no corpo humano na função celular e molecular pela interação direta com componentes celulares que participam na oxidação sistêmica e nos estágios da inflamação (RADEK et al., 2005; JUNG et al., 2011).

Os efeitos sistêmicos do álcool produzem alterações no sistema nervoso central, sistema muscular, doenças no fígado, pancreatite crônica, doenças cardiovasculares, pulmonares, entre outras (GONZÁLEZ-REIMERS et al., 2014).

As principais complicações e/ou comorbidades clínicas associadas ao consumo de álcool são: alterações do sistema nervoso central (convulsão, amnésia lacunar, diminuição da habilidade motora e cognitiva, degeneração cerebelar e transtornos neuropsicológicos relacionados ao álcool); complicações do sistema gastrointestinal (pancreatite crônica, esteatose hepática, hepatite alcoólica, hemorragia digestiva, cirrose hepática e gastrite); modificações do sistema ósteomuscular (miopatia generalizada, osteopenia e fraturas); anormalidades hematológicas (distúrbios de coagulação e anemias); doenças cardiovasculares (insuficiência cardíaca, arritmias, miocardiopatia alcoólica e hipertensão arterial); acometimentos do sistema endócrino (hipoparatiroidismo transitório, alteração do ritmo menstrual, impotência sexual, diabetes, hipoglicemia, infertilidade e diminuição da libido); alterações metabólicas (cetoacidose e hipoglicemia); alterações renais (insuficiência renal aguda); dermatológicas (afecções secundárias de pele, queda de

cabelo, prurido e rubor facial); alterações nutricionais (deficiências vitamínicas-minerais e proteicas) e complicações psiquiátricas (SHULMAN; WOLF, 1999; THERAPONDOS et al., 1999; WOLF; TÜZÜN; TÜZÜN, 1999).

O etanol produz vários efeitos na modulação da resposta imune humoral e celular envolvendo atividades de neutrófilos, monócitos, linfócitos e incrementa a TNF e IL-1 (PERRIEN et al., 2003; ALOMAN et al., 2007; WAHL et al., 2007) e altera a atividade de macrófagos, células killers e ceratinócitos (ZAHS et al., 2012). Por longos períodos ele suprime a proliferação das células CD4 em resposta a antígenos e células T citotóxicas (CTL), diminui a angiogênese pela redução da expressão do VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e incrementa a hipoxia nos tecidos (RADEK et al., 2008; HORVATH et al., 2011).

Os efeitos do álcool ao nível celular comprometem a função das células tronco mesenquimais, incrementa a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), exerce uma ação tóxica nas células PC12, importantes na diferenciação neuronal e produz a quebra do sistema de defesa antioxidante (LIU et al., 2010); interferindo, dessa forma, com os processos de adesão, migração, inflamação, e remodelação óssea (WALDSCHMIDT; COOK; KOVACS, 2006).

A adaptação funcional do álcool altera a atividade da transmembrana proteica de sódio, potássio e ATPase; importantes na manutenção dos gradientes iônicos celulares, no equilíbrio osmótico e no potencial elétrico da membrana (RABIN; ACARA, 1993).

Segundo Ronis, Mercer e Chen (2011), o álcool induz a estresse oxidativo e participa na regulação da diferenciação de osteoclastos, resultando em aumento da sinalização do RANKL-RANK (ligante/receptor ativador do fator nuclear kB) nas células ósseas e em incremento da osteoclastogênese.

O consumo de álcool está relacionado com riscos de fratura, osteoporose, deficiências nutricionais, produzindo um desequilíbrio no reparo ósseo (LIMA; ROCHA; LOPES, 2008; RONIS; MERCER; CHEN, 2011) e gerando efeitos nocivos na massa e densidade óssea (DIAMOND et al., 1989; CHAKKALAKAL, 2005a; ALVISA-NEGRÍN et al., 2009).

Estudos *in vitro* demonstram que o etanol dificulta a formação óssea e aumenta a reabsorção do osso inibindo a proliferação dos osteoblastos (FRIDAY; HOWARD, 1991; CHEUNG et al., 1995; GONZÁLEZ-PÉREZ et al., 2011). Essa alteração na remodelação óssea causada pelo etanol é expressa pela perda de

massa óssea e pelos níveis de osteocalcina sérica (um marcador de formação óssea), além disso, compromete a expressão genética do colágeno, também as proteínas da matriz não colagenosa e reduz significativamente os níveis do propeptídeo procolágeno I carboxi-terminal (HIDIROGLOU et al., 1994; WEZEMAN et al., 2000; ALVISA-NEGRÍN et al., 2009).

No osso compacto esse solvente reduz o número de ósteons e retarda o processo de mineralização devido aos efeitos deletérios do álcool no *turnover* ósseo (NYQUIST et al., 1996; SAMPSON, 1998; MAUREL et al., 2011a).

Atualmente a utilização dos biomateriais na área médica e odontológica vem assumindo uma importância cada vez maior em função da necessidade de restaurar áreas com perdas ou defeitos ósseos, devido ao consequente comprometimento da função, morfologia e reparação dos tecidos biológicos (CAMARINI et al., 2006; TREVISIOL et al., 2007, BUCHAIM, 2011).

Os biomateriais são definidos como materiais inertes, farmacologicamente capazes de interagir com um organismo vivo sem causar reações adversas no local transplantado ou em todo o organismo (JUNIOR; GARRAFA, 2007).

De acordo com sua origem, os biomateriais usados em técnicas de enxertia podem ser classificados em: autógenos ou autoenxertos (obtidos do mesmo indivíduo), aloenxertos ou enxertos homólogos (quando transplantados entre indivíduos da mesma espécie), xenoenxertos ou enxertos heterólogos (material obtido de outra espécie) e aloplásticos (materiais sintéticos ou naturais utilizados como substitutos ósseos) (CARRANZA; MCCLAIN; SCHALLHORN, 2004).

A avaliação dos materiais de enxertos ósseos é feita com relação ao seu potencial osteogênico, osteoindutivo e osteocondutivo. A osteogênese refere-se à formação ou ao desenvolvimento do novo osso por osteoblastos e células viáveis existentes capazes de sintetizar novo osso. A osteoindução consiste em um processo químico através do qual as moléculas existentes no enxerto (proteínas ósseas morfogenéticas ou BMPs) convertem células adjacentes em osteoblastos, levando a neoformação óssea. A osteocondução é um efeito físico através do qual a matriz do enxerto forma um arcabouço que favorece a penetração de células ósseas no interior do enxerto (WOLF; RATEITSCHAK, 2006).

Os enxertos autógenos apresentam características osteogênicas, sendo assim considerados como o tipo de enxerto de primeira escolha em procedimentos de enxertia. Dentre algumas das suas desvantagens, pode ser citada a necessidade

de um sítio doador aumentando a morbidade do paciente, maior tempo cirúrgico e em alguns casos o volume requerido no sítio receptor é limitado (POLLOCK et al., 2008; LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

As técnicas de enxertos ósseos são utilizadas em cirurgias regenerativas ou corretivas, em procedimentos destinados a restaurar o tecido ósseo perdido durante a doença periodontal ou lesões endodônticas, no preenchimento alveolar de dentes extraídos para evitar a redução do volume do rebordo alveolar, em levantamentos do assoalho do seio maxilar, assim como em outros procedimentos (CASTRO-SILVA; ZAMBIZZI; GRANJEIRO, 2009).

A implantação cirúrgica de biomateriais no local lesionado estimula e controla a repopulação celular. Esses biomateriais estão associados às moléculas sinalizadoras que estão envolvidas no controle do crescimento e diferenciação celular e fazem parte de um grupo distinto de fatores indutores que podem incluir células de sustentação e mecanismos de ação com propriedades de osteointegração, osteoindução, osteocondução e regeneração, implicando um equilíbrio entre formação (osteoblastos) e reabsorção óssea (osteoclastos) (NAGEM FILHO et al., 2009).

Os xenoenxertos têm sido empregados em tratamentos de osteotomias, artrodese¹ e fraturas, na restituição de perdas ósseas promovendo a indução de formação óssea e providenciando um mecanismo de suporte vascular (osteocondução) e de crescimento ósseo. As vantagens do uso de biomateriais heterógenos baseiam-se na necessidade de um único local cirúrgico e, portanto, causando menos morbidade pós-operatória e menor tempo cirúrgico, e igualmente evita o enfraquecimento da região doadora (CAMARINI et al., 2006; BIGHAM et al., 2008; CARBONARI et al., 2009). Os materiais osteosubstitutos resultam em biomateriais biocompatíveis e parcialmente absorvíveis, favorecendo a regeneração do defeito ósseo (CASTRO-SILVA; ZAMBIZZI; GRANJEIRO, 2009).

O processamento do osso bovino pode derivar em dois tipos distintos de materiais: o inorgânico e o orgânico. O inorgânico é livre de proteínas e células e se caracteriza pelo elevado conteúdo de hidroxiapatita. A desproteínização é obtida através do tratamento térmico a temperaturas superiores a 300°C, porém quanto mais alta a temperatura, menor a possibilidade de bioabsorção do material. Por

¹ A artrodese é uma intervenção cirúrgica realizada com a finalidade de suprimir totalmente a mobilidade de uma articulação. Fonte: http://www.hcnet.usp.br/dicionario/depto_ortopedia_trau.htm

outro lado, o tratamento do osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácidos com concentração e temperatura controlada, levam à remoção de células, detritos celulares e várias proteínas não colagenosas, bem como a porção mineral, deixando um arcabouço proteico constituído basicamente de colágeno tipo I e pequena quantidade de fatores de crescimento, como a proteína morfogenética óssea (NAGEM FILHO et al., 2009).

A matriz óssea inorgânica Bonefill® (Bionnovation, São Paulo, Brasil) é extraída do fêmur bovino totalmente desnaturado, isto é, não apresenta porção orgânica que possa induzir processos imunogênicos do organismo (NAGEM FILHO et al., 2009). Esse material permite uma fácil manipulação para a instalação no leito cirúrgico, neoformação óssea consistente. Histologicamente é capaz de propiciar neoformação e crescimento ósseo, resultando em um tecido neoformado de consistência clínica firme e com grande atividade celular (CARBONARI et al., 2009).

Com a crescente utilização do etanol em bebidas consideradas de consumo social, tem-se aumentado o número de pacientes que ingerem álcool e necessitam de tratamento médico-odontológico. Esses pacientes constantemente surgem com perdas ósseas, principalmente se o consumo do álcool for associado ao tabagismo. Surge então a necessidade de desenvolvimento de pesquisas sobre a atividade dos biomateriais para reconstrução de tecido ósseo, como por exemplo, o Bonefill®. Com isso, a realização desta pesquisa reuniria subsídios para conhecer o comportamento desse biomaterial como alternativa clínica de tratamento em pacientes com comprometimento da formação e reparo ósseo, decorrentes da dependência do álcool.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES E PREVALÊNCIA DO ÁLCOOL

Entre 8000 a 3500 anos a.C, conhecido como Período Neolítico, a atividade agrícola começou a ser explorada. O aumento da produção da agricultura levou à plantação de milho, uvas, arroz e maçã para a elaboração de bebidas fermentadas. Posteriormente a esse período a descoberta do álcool influenciou civilizações antigas como Egito, Mesopotâmia, Índia e o continente americano. O seu consumo estava relacionado principalmente à hierarquia social e rituais religiosos (HAMES, 2012).

Com a comercialização do álcool no século XVIII, na Revolução Industrial, o seu consumo teve um aumento e distribuição em vários países (GIGLIOTTI; BESSA, 2004). O álcool é uma substância de amplo uso à nível mundial adotado em diferentes culturas e populações e modelada por fatores sociais e econômicos (VONGHIA et al., 2008; MAUREL et al., 2012a). Seu consumo crônico representa um problema de saúde multifatorial acometendo o aspecto psicossocial do indivíduo e produzindo efeitos deletérios no organismo (MAUREL et al., 2012a). Essas consequências negativas aumentam a morbidade, mortalidade e comprometem a qualidade de vida dos indivíduos (MIKOSCH, 2014).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que 3,3 milhões de pessoas morrem a cada ano pelo uso excessivo do álcool. No Brasil, em 2010, o consumo de álcool puro foi de 8,7 litros *per capita*, superior a países como China, México, Costa Rica, Panamá, Equador, Bolívia, Egito, Turquia, Iraque e Malásia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015a).

O consumo do álcool puro em litros no Brasil, segundo o gênero, em 2010 foi mais frequente em homens (19,6 L) em relação às mulheres (8,9 L) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015b).

Uma série de fatores influenciam o aparecimento e a evolução da Síndrome da Dependência Alcoólica (SDA), entre eles: o gênero, padrão de consumo de álcool, as características individuais biológicas e psicológicas e os fatores socioculturais (LARANJEIRA et al., 2000).

O alcoolismo é um transtorno complexo também influenciado por aspectos genéticos (GOODWIN et al., 1973; CADORET; GATH, 1978; BOHMAN,

1978; SCHUCKIT, 2005). Segundo Köhnke (2008) pesquisas entre familiares revelam uma hereditariedade do alcoolismo de 50%. Baseado nessa ligação, muitos estudos na literatura conduzem pesquisas com o objetivo de avaliar a correlação do álcool com o fator genético.

A dependência do álcool é um transtorno com múltiplas repercussões na saúde do indivíduo e pode apresentar diversos graus e formas de comportamento. A *CID* (Classificação Internacional de Doenças) inclui os efeitos do álcool na classificação F10 – Transtornos mentais e de comportamento decorrentes do uso de álcool (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

2.2 BIOQUÍMICA DO ÁLCOOL

O álcool etílico (fórmula química: C_2H_6O) tem efeitos multifatoriais no corpo, afetando cada tecido e órgão do nosso organismo. Seus efeitos diretos no sistema oxidativo produzem efeitos patofisiológicos (DOLGANIUC et al., 2006; SZABO et al., 2007).

O metabolismo do álcool gera a produção de acetaldeído, espécies reativas de oxigênio, aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, entre outros efeitos bioquímicos, resultando em danos no sistema imunológico e estágios inflamatórios. A duração desse estresse oxidativo depende da capacidade das células na metabolização do álcool (JUNG et al., 2011).

O etanol é metabolizado pela enzima álcool desidrogenase, citocromo p450 e a enzima aldeído-desidrogenase (ALDH) no fígado (DEY; CEDERBAUM, 2006). Este processo produz metabólitos oxidativos, como são o acetilaldeído, acetato, espécies reativas de oxigênio (ROS), coenzima a (coa), além de produtos não-oxidativos como os ésteres etílicos de ácidos graxos e fosfatidiletanol (PEth) (BEST; LAPOSATA, 2003; SHUKLA; AROOR 2006). Esses metabólitos produzem mudanças epigenéticas (modificação da expressão genética sem alteração do DNA) nos tecidos, resultantes do metabolismo oxidativo e não-oxidativo (SHUKLA; AROOR 2006; CURTIS; ZAHS; KOVACS, 2013).

O consumo crônico do álcool altera a via da ubiquitina-proteassoma, uma via de marcação de proteínas danificadas ou com erros de sínteses que são sinalizadas para sua degradação (OLIVA et al., 2009; BARDAG-GORCE, 2010).

Esta via proteolítica interage por meio de moléculas com as células ósseas, assim participando no *turnover* ósseo (SÉVÈRE; DIEUDONNÉ; MARIE, 2013).

Tem sido descrito na literatura os diversos locais de interação do álcool com a membrana dos tecidos, modificando a transdução da sinalização (DOLGANIUC et al., 2006; SZABO et al., 2007) e alterando os canais iônicos (DOPICO, 2003). Essas mudanças na membrana produzem efeitos prejudiciais no organismo mediado pelo aumento do estresse oxidativo produto do álcool (JUNG, et al., 2011).

De acordo com Kim et al. (2013) a sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB) está envolvida nos efeitos do álcool nos tecidos. Além disso, ocorre um aumento da enzima MMP-12 expressada em macrófagos.

Outros efeitos bioquímicos do álcool incluem a expressão e sinalização de várias moléculas (SETH et al., 2010). Dentre estas, estão às proteínas Wnt, as quais desempenham um papel importante na formação óssea pelo seu envolvimento na proliferação e diferenciação dos osteoblastos (GONG et al., 2001), na supressão da síntese da matriz óssea pela inibição da proliferação e diferenciação das células-tronco mesenquimais (HILL et al., 2005; CHAKKALAKAL, 2005a), além de desempenhar um efeito inibitório no reparo de fraturas ósseas (JUNG et al., 2011).

O consumo crônico do álcool aumenta os níveis do fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 6 (IL-6), citocinas que estão presentes na reabsorção óssea (DÍEZ-RUI et al., 2010). Conseqüentemente o aumento dessas citocinas produz uma elevação dos níveis da osteoprotegerina (OPG) como efeito protetor (FÁBREGA et al., 2005; GARCÍA-VALDECASAS-CAMPELO, 2006) e ocorre uma diminuição do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (GARCÍA-VALDECASAS-CAMPELO, 2006).

A absorção do álcool ocorre no estômago (5-20% no estômago) e no duodeno (80-90%) e o restante é excretado pela respiração e urina. A sua distribuição penetra em todos os tecidos corporais, através da corrente sanguínea. A concentração plasmática máxima acontece em 30 minutos após a ingestão; este período vai depender da temperatura e dos alimentos ingeridos. O metabolismo do álcool ocorre no fígado, convertendo, na sua primeira fase, a enzima álcool desidrogenase em acetaldeído e na segunda fase a enzima Acetaldeído Desidrogenase (ALDH) converte o aldeído em ácido acético, que posteriormente é

transformado em dióxido de carbono e água, liberando neste processo energia (HARDMAN, LIMBIRD, 2012).

2.3 ALCOOLISMO CRÔNICO

O conceito de alcoolismo crônico foi introduzido pelo sueco Magnus Huss em 1849, sendo definido como um estado de intoxicação decorrente do uso de álcool relacionado com sintomas físicos, psiquiátricos ou mistos (GIGLIOTTI; BESSA, 2004).

O consumo leve, moderado e crônico do álcool é divergente na literatura, devido à dificuldade de estabelecer o padrão de consumo, tanto em humanos como em animais submetidos ao alcoolismo experimental (MAUREL et al., 2012a).

A comparação dos efeitos do álcool em animais é difícil de extrapolar em humanos (LIEBER; DECARLI; SORRELL, 1989) devido às espécies serem diferentes, as percentagens das doses e as calorias da dieta diária serem distintas. Contudo, os modelos realizados em animais tem permitido avaliar a microarquitetura tanto da anatomia como da fisiologia de uma forma mais específica do que no ser humano (MAUREL, 2012a).

Além disso, as pesquisas em animais permitem um acesso a certos parâmetros, tais com: a microscopia de células ósseas e histomorfometria; análises difíceis de serem obtidas em humanos (LELOVAS et al., 2008). Outros aspectos limitantes em humanos são: a dificuldade de controlar a quantidade de álcool ingerida e os fatores concomitantes do abuso do álcool, incluindo uso de cigarro, má nutrição, deficiência de vitamina D e falta de exercício (MALIK, 2008); fatores relacionados com a baixa densidade mineral óssea (MALIK et al., 2009).

Existem autores que consideram a ingestão de altas doses de álcool em animais equivalentes a 36% do total de calorias, durante 90 dias (MAIER, et al, 1990; FAUSTINO; STIPP, 2003; MARCHINI, 2010). Enquanto outros autores consideram a ingestão de altas doses de álcool correspondente a 18-33% do total de calorias consumidas pelo animal (SINGER; BRENNER, 2005; SEITZ, POSCHL, SALASPURO, 2006).

Em humanos, Ganry, Baudoin, Fardellone (2000) define o consumo leve sendo de 1-10 g de etanol/dia; o consumo moderado como 11-29 g por dia e o consumo crônico sendo maior de 30 g de etanol/dia. Entretanto, González-Calvín et

al. (1993), classificou o consumo do álcool sendo o crônico maior de 100 g etanol/dia; moderado de 60-100 g etanol/dia e o consumo leve sendo inferior a 60 g etanol/dia. Com relação à percentagem de calorias do álcool existem autores que relatam um valor entre 40% e 65% da dieta (BRUNOUT et al., 1983; ADDOLORATO et al., 1997).

No estudo realizado por Maurel et al. (2011a), a indução ao alcoolismo crônico em ratos consistiu no aumento progressivo da percentagem de etanol. A dose menor foi de 10% equivalente a 3-4 copos de álcool por dia no humano, sendo incrementando para 12%, 15%, 17% e 20% gradativamente (correspondente a 7 copos de álcool por dia no humano).

Dentre as consequências deletérias causadas pelo alcoolismo crônico estão: as desordens psíquicas (depressão, ansiedade severa, insônia), doenças cardíacas, câncer, cirrose hepática, alterações do sistema imunológico, déficits cognitivos temporários, neuropatias periféricas, problemas gastrointestinais, redução das células sanguíneas e diminuição da densidade óssea (LARANJEIRA et al., 2000; SCHUCKIT, 2009).

Com relação a atividade cerebral, o consumo crônico de etanol inibe algumas áreas do cérebro incluindo a redução de neurônios no hipocampo (WEST; HAMRE; CASSELL, 1986) e da estrutura associada com a aprendizagem, memória e alterações de humor (LERACI; HERRERA, 2007) além de deprimir no neurocortex a proliferação de células da zona ventricular e ter impacto na diminuição de neurônios no girus dentado (MILLER, 1995).

Segundo Kendell (1980), o consumo de etanol torna-se crônico quando ocorre a ingestão por períodos prolongados e desenvolve mecanismos adaptativos de tolerância. Tem sido descrito na literatura o alcoolismo experimental crônico em ratos com relação ao tempo de exposição ao álcool. Shih e Taberner (1997) submeteram ratos ao alcoolismo crônico por 28 dias, Shih e Taberner (2001) relataram 4 semanas de consumo de álcool, Udoh et al. (2015) descreveram o tempo de exposição correspondente a 5 semanas, Passaglia (2015) conduziram o alcoolismo experimental por 2 semanas, Zhang et al. (2015) caracterizaram a alcoolização crônica de 3-6 meses, enquanto Zimatkin e Phedina (2015) o reproduziram por um período de 6 meses.

2.4 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado e mineralizado, composto por células, fibras e substância fundamental amorfa. A sua proporção da constituição celular está composta por 35% de matriz orgânica (colágeno e proteínas de adesão) e 65% de elementos inorgânicos (cálcio, fósforo, cristais de hidroxiapatita) responsáveis pela resistência do osso (MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012).

O osso caracteriza-se por apresentar rigidez, resistência e elasticidade, sendo essa última propriedade devida aos seus componentes orgânicos e ao tecido conectivo fibroso da sua matriz (GARDNER, 1998).

Dentre as suas várias funções, destacam-se a proteção de órgãos vitais, homeostase mineral, reservatório de cálcio do organismo, formação das células sanguíneas, apoio aos músculos esqueléticos além de alojar a medula óssea (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS 2006).

As superfícies internas e externas do osso são recobertas por células osteogênicas que constituem o endóstio e o perióstio. O endóstio é formado por células osteogênicas que revestem as cavidades do osso esponjoso, o canal medular e os canais de Havers e de Volkmann. O perióstio apresenta células osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos. As funções destas membranas são a nutrição do tecido ósseo e o fornecimento de osteoblastos, essenciais no crescimento e reparação do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

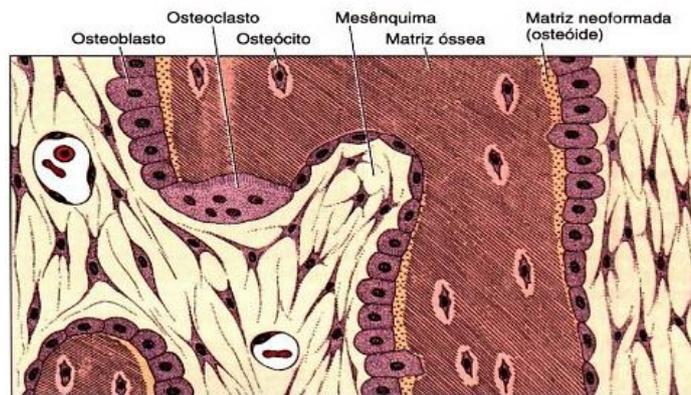
2.4.1 População celular

Os tipos celulares que participam na regeneração do tecido ósseo são: as células osteoprogenitoras, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. As células osteoprogenitoras são derivadas do mesênquima e são células precursoras de osteoblastos. Estas células estão localizadas no perióstio, endóstio, no osso cortical e medular (DYM; HUANG; STERN, 2012).

Os osteócitos são células achatadas e estão localizados em lacunas dentro da matriz óssea. Nessas lacunas existem canálculos que permitem a nutrição e possibilitam as trocas de íons e moléculas entre os osteócitos e os

capilares sanguíneos. A função dos osteócitos é a manutenção da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) (Figura 1).

Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea e são compostos por fosfato de cálcio, glicoproteínas, proteoglicanas, colágeno tipo I e possuem também um sistema de comunicação intercelular similar aos osteócitos. Quando estão em atividade intensa de síntese são cuboide e quando pouco ativos exibem um formato achatado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999) (Figura 1).



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999

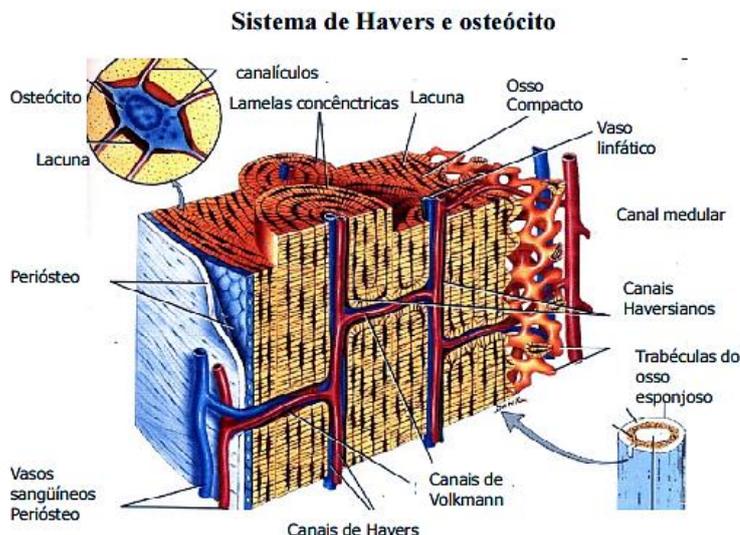
Figura 1 – Células da matriz óssea (Ossificação intramembranosa)

Por sua vez, os osteoclastos são células gigantes móveis, multinucleadas e extensamente ramificadas, derivados de monócitos do sangue. A sua função é a absorção do tecido ósseo, participando na remodelação óssea (Figura 1). Os osteoclastos formam depressões pela ação enzimática (fosfatase ácida e colagenase) na matriz óssea conhecidas como lacunas de Howship (MAZZONETTO, DUQUE NETTO, NASCIMENTO, 2012).

2.4.2 Classificação do tecido ósseo

No aspecto macroscópico o tecido ósseo é dividido de acordo com a sua densidade em: tecido ósseo cortical (denso ou compacto) e tecido ósseo medular (trabecular ou esponjoso). Ambos apresentam as mesmas células, mas diferem na quantidade de espaços medulares e na sua resistência. O osso medular está constituído por espaços medulares e trabéculas, o que lhe confere o aspecto poroso. Por sua vez, o osso compacto está composto por canais pelos quais passam nervos e vasos sanguíneos, denominados Canais de Volkmann (alinhados

perpendicularmente ao longo eixo do osso) e canais de Havers (paralelamente ao longo eixo do osso) (LINDHE; KARRING, 1999; MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012) (Figura 2).



Fonte: ROSS; ROWRELL, 1993.

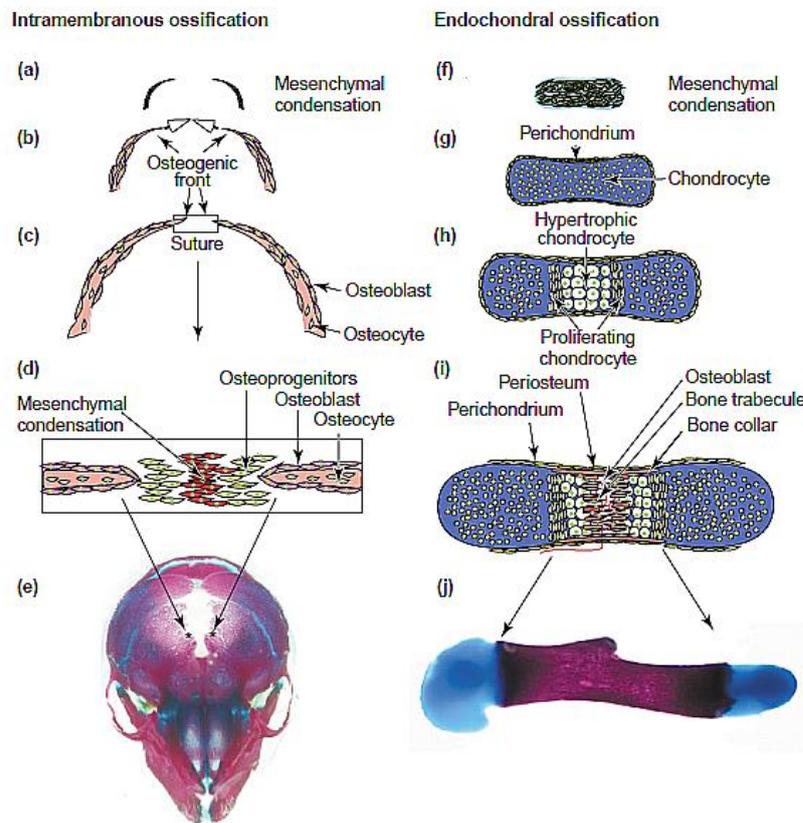
Figura 2 – Aspecto macroscópico do tecido ósseo

De acordo com a maturação o tecido ósseo pode ser classificado em osso primário (imaturo ou não lamelar) e osso secundário (maduro ou lamelar) (TEN CATE, 2008).

O tecido ósseo primário apresenta fibras colágenas dispostas em várias direções sem organização definida, possui menor quantidade de minerais e maior proporção de osteócitos comparado ao tecido ósseo secundário, caracterizado por apresentar fibras colágenas organizadas, lamelas concêntricas dispostas ao redor dos feixes neurovasculares e contém a unidade estrutural e metabólica do osso denominada ósteon (LINDHE; KARRING, 1999), sendo que o seu tamanho varia de 100 a 400 μm de diâmetro e 1 a 2 mm de comprimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

De acordo com a sua origem embriológica o tecido ósseo é classificado em: ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana de tecido conjuntivo. Este processo forma o osso frontal, parietal e partes do osso occipital, temporal, osso maxilar e a mandíbula (Figura 3 a-e). O segundo tipo embriológico é a ossificação endocondral, o qual tem início sobre uma cartilagem hialina que sofre modificações incluindo a hipertrofia dos condrócitos e redução da matriz cartilaginosa, mineralização e morte dos condrócitos (Figura 3 f-j). Este tipo

de ossificação é responsável pela formação de ossos curtos e longos (JUNQUEIRA; CARNEIRO 1999).



Fonte: NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003

Figura 3 – Ossificação intramembranosa e endocondral

Ossificação intramembranosa: (a) Condensação mesenquimal nas laterais do crânio, (b) A atividade osteogênica se propaga para a linha sagital do crânio, (c) As duas massas celulares de cada lado encontram-se na sutura sagital média, (d) As células mesenquimais se diferenciam em células osteoprogenitoras e posteriormente em osteoblastos na região da sutura, (e) Vista frontal do crânio de rato. **Ossificação endocondral:** (f) Formação da condensação mesenquimal, (g) As células mesenquimais dão origem aos condrócitos e na periferia formam o pericôndrio, (h) Proliferação ativa dos condrócitos no centro do osso e diferenciação em condrócitos hipertrofiados. A diferenciação dos condrócitos constitui a placa epifisiária. Ocorre invasão de vasos sanguíneos e osteoclastos que degradam a matriz dos condrócitos hipertrofiados, enquanto os osteoblastos depositam matriz óssea específica; (i) A matriz cartilaginosa mineralizada formam uma superfície para deposição de matriz óssea pelos osteoblastos; (j) Osso úmero de rato corado com Vermelho de Alizarina e Azul de alcian

2.5 CALOTA CRANIANA

A calota craniana ou calvária esta caracterizada pelo tipo de osso plano com duas camadas de osso cortical e em seu interior uma porção de osso trabecular ou esponjoso denominada díploe (GARDNER, 1998).

A calvária é utilizada em vários experimentos em animais com o objetivo de avaliar a regeneração óssea utilizando a bioengenharia tecidual. Uma das

vantagens de usar esta área anatômica é a falta de compressão, sendo assim considerada como uma região com estresse mecânico limitado. Além disso, as estruturas musculares vizinhas fornecem um ambiente de proteção (MANKANI et al., 2006).

Os defeitos realizados em calvária criam um nicho composto por um microambiente de células vindas tanto do periósteo como da dura-máter (LEVI et al., 2011). Sua regeneração requer da dinâmica entre estas células capazes de se diferenciar em linhagem osteogênica (BRADLEY et al., 1997; GREENWALD et al., 2000).

Tem sido bem esclarecido na literatura a importância e função da dura-máter na cicatrização e revascularização de defeitos em calvária. A sua ausência resulta no atraso na fase de remodelação do enxerto ósseo (HANSON et al., 1977; MABBUTT; KOKICH, 1979; HOPPER et al., 2001).

Por outra parte, o periósteo funciona como uma barreira para que os fibroblastos não invadam precocemente a área onde será formado tecido ósseo, em vista que a maturação dos osteoblastos demora mais tempo que os fibroblastos; apesar de ambos os tecidos serem conjuntivos. Assim, a diferenciação e migração dos osteoblastos, na reparação óssea, é mais lenta comparado com os fibroblastos. Se o periósteo for lesado o tecido conjuntivo fibroso cicatricial pode invadir o espaço anteriormente ocupado pelo osso, prejudicando o reparo ósseo (CONSOLARO, 2009).

Durante a reossificação ocorre uma deposição de osso nas margens do defeito. No caso da regeneração do crânio, o tecido do endocrânio é capaz de produzir osteoindução (MABBUTT; KOKICH, 1979) devido à grande quantidade de fatores de crescimento com propriedades osteogênicas e osteoindutivas, participando no desenvolvimento e regeneração da calota craniana (MEHRARA et al., 1999).

Os defeitos ósseos de diâmetro reduzido tem a capacidade de se auto-regenerar por um mecanismo similar à osteogênese embriológica (DE CARVALHO, 2010). Em defeitos com dimensões maiores, este mecanismo de regeneração não ocorre (PINHEIRO; GERBI, 2006). Assim, a completa regeneração dos defeitos ósseos depende, além de outros fatores, do tamanho do defeito (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; SCHMITZ et al., 1990).

Segundo Hollinger e Kleinschmidt (1990), um defeito ósseo crítico é definido como, “a menor ferida intra-óssea que não vai se regenerar espontaneamente durante toda a vida de um animal.”

Lindsey et al. (2006), estabeleceram que para considerar um defeito como crítico, este deve exceder 1,5-3,0 vezes o diâmetro do osso. O conceito de defeito crítico depende da espécie animal, da localização do defeito (MARQUES et al., 2010), da associação de tecidos moles protegendo a área cirúrgica, a carga mecânica que a região é submetida, idade do animal e as condições metabólicas e sistêmicas. Esses fatores influenciam na cicatrização e neoformação óssea (LINDSEY et al., 2006).

2.6 ÁLCOOL E *TURNOVER* ÓSSEO

De acordo com a literatura disponível atualmente, De Vernejoul, Bielakoff e Herve (1983); Schnitzler e Solomon (1984), foram os primeiros pesquisadores em relatar a associação do álcool com a redução do volume e espessura do osso trabecular em humanos. Esses dados foram confirmados em estudos posteriores relacionando o álcool à osteopenia (FEITELBERG et al., 1987), reabsorção óssea (FARLEY et al., 1985), diminuição da mineralização (TURNER; GREENE, BELL 1987), mudanças na estrutura e massa óssea e menor atividade osteoblástica (DIAMOND et al., 1989).

Alvisa-Negrín et al. (2009), observaram que o consumo crônico do álcool aumenta a reabsorção óssea e diminui a massa óssea de diferentes locais do corpo humano, tais como: a crista ílfaca, o trocânter, região lombar e torácica da coluna vertebral e cabeça do fêmur. Esses efeitos deletérios produzem osteopenia e diminuição da proteína osteocalcina sérica.

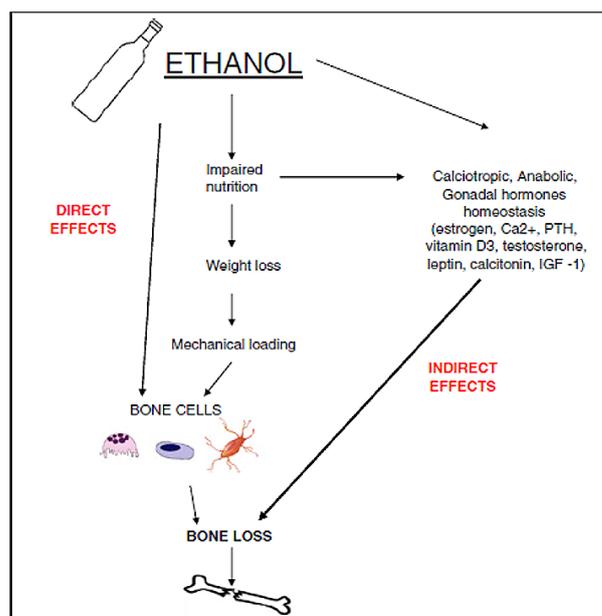
Outros efeitos prejudiciais que comprometem a formação óssea produto do consumo crônico de álcool são: a apoptose dos osteócitos (WANG et al., 2003; MAUREL et al., 2011b), diminuição da espessura do osso medular e cortical (MADDALOZZO, et al., 2009) e alterações na atividade e diferenciação de osteoblastos (CHAVASSIEUX et al., 1993).

Lorenz e Jänicke-Lorenz (1983), demonstraram que ratos submetidos ao alcoolismo experimental durante 10 meses (5%-20% de álcool) exibiram mudanças

morfológicas dos osteócitos, fragmentação das células, aumento do número de vesículas, citólise e modificação das organelas.

O efeito do álcool no osso produz um decréscimo da densidade mineral óssea. O alcoolismo é considerado como uma causa secundária de osteoporose no homem, assim incrementando os riscos à fratura (MAUREL et al., 2012b).

As modificações no osso decorrentes do álcool afetam a microarquitetura dos tecidos e o metabolismo ósseo, produzindo efeitos negativos, diretos e indiretos, no *turnover* ósseo (renovação óssea) (MAUREL et al., 2014). Tanto os efeitos diretos e indiretos estão relacionados com a perda óssea. Os efeitos indiretos estão associados à má nutrição, o que induz à perda óssea e alterações hormonais, que consequentemente podem interferir na atividade das células ósseas (MAUREL et al., 2012a) (Figura 4). Estas mudanças estão relacionadas com a duração e exposição ao álcool (MIKOSCH 2014).



Fonte: MAUREL, 2012a

Figura 4 - Efeitos diretos e indiretos do etanol no tecido ósseo

As consequências negativas no tecido ósseo derivadas do etanol são dose-dependentes. Chakkalakal et al. (2005b), determinaram as mudanças no metabolismo ósseo de acordo com a percentagem do total de calorias diárias. A dose mais baixa utilizada foi de 26%. Os resultados mostraram que houve mudanças mínimas no metabolismo ósseo dos ratos na dose de 26% em comparação com a dose de 36%, que acarretou em uma deficiência do reparo

ósseo. Os ratos que não receberam dieta líquida com etanol apresentaram menor acometimento de perda da rigidez e densidade óssea. Este efeito foi reafirmado no estudo de Buchaim et al. (2009), cujos resultados demonstraram que a neoformação óssea decresce de acordo com o aumento da concentração alcoólica, retardando o processo de reparo ósseo.

2. 7 SUBSTITUTOS ÓSSEOS

A primeira referência na literatura sobre o uso de substitutos ósseos foi ao redor de 1600, quando Job Van Meek'ren transplantou um osso craniano de um cão para um defeito craniano em humano, obtendo sucesso (MEEK'REN, 1632 apud YASZEMSKI et al., 1996).

Na odontologia e cirurgia maxilofacial existem condições que levam a perda óssea prejudicando a função dental e até a reabilitação bucal devido à ausência da quantidade e qualidade óssea (POLO et al., 2011). O objetivo primordial do tratamento cirúrgico regenerativo é o preenchimento de defeitos ósseos com um biomaterial que promova a osteogênese reparativa (TSONIS, 2002).

Os biomateriais são substâncias farmacologicamente ativas ou inertes utilizadas na reparação tecidual, com o objetivo de substituir parcial ou totalmente tecidos e órgãos (DA SILVA, JOLY, DE CARVALHO, 2010).

Os substitutos ósseos são utilizados em procedimentos cirúrgicos, tais como: levantamento de assoalho do seio maxilar, preenchimento de defeitos periodontais, aumento horizontal e vertical de rebordo alveolar, reconstruções maxilares e faciais, conservação do rebordo alveolar após exodontias, entre outras aplicações (DO DESTERRO, 2012).

Para serem considerados ideais os biomateriais devem induzir à neoformação óssea, ter capacidade de reabsorção com o tempo, apresentar biocompatibilidade e biofuncionalidade, radiolucência, disponibilidade, não gerar resposta imunológica e a acessibilidade econômica. Esse é o objetivo primordial da bioengenharia tecidual (DA SILVA, JOLY, DE CARVALHO, 2010).

A biocompatibilidade dos substitutos ósseos pode ser definida como:

A habilidade de um biomaterial desempenhar sua função desejada em relação a uma terapia médica, sem induzir qualquer efeito local ou sistêmico indesejável ao beneficiário da terapia; porém, gerando as respostas

celulares e teciduais mais benéficas naquela situação específica e otimizando as respostas clinicamente relevantes daquela terapia (WILLIAMS, 2008, p. 2951).

A biofuncionalidade refere-se às propriedades mecânicas que habilitam um implante (biomaterial) a desempenhar a função esperada (BOSS et al., 1995).

Com relação a origem, os biomateriais de preenchimento ósseo podem ser classificados em:

- a) Autógeno: O enxerto tem origem do próprio indivíduo. Esse enxerto é o único osteogênico, osteocondutor e osteoindutor, e não induz riscos de transmissão de doenças, assim sendo considerado o “padrão ouro” dos biomateriais de enxertia. No entanto, precisa de dois leitos cirúrgicos, aumentando a morbidade do paciente e o tempo trans-operatório. As suas fontes podem ser intraorais (mento, tuberosidade da maxila e ramo da mandíbula) e extraorais (crista ilíaca, tíbia e calota craniana);
- b) Homógeno/Alógeno: Quando o doador e o receptor são indivíduos diferentes, mas da mesma espécie. Esse enxerto tem propriedades osteoindutivas associadas à porção orgânica que contém BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas). Entretanto, existe uma preocupação e desconfiança relacionada aos bancos de osso, métodos de esterilização e armazenamento; além dos fatores referentes com o doador. Algumas das suas vantagens são a ausência de um segundo sítio cirúrgico, disponibilidade da quantidade do enxerto, diminuição do tempo cirúrgico e baixo custo;
- c) Heterógeno/xenógeno: Quando o doador e o receptor são de espécies diferentes. Os enxertos de origem bovina são os mais utilizados em procedimentos de enxertia. Podem ser de origem vegetal (hidroxiapatita de coral) ou animal. Esse biomaterial apresenta íntimo contato com o osso neoformado pela sua porosidade, área de contato das partículas e índice cálcio/fosfato semelhantes ao osso autógeno. O enxerto xenógeno tem propriedade osteocondutora, visto que durante o processamento, as moléculas bioativas são removidas mantendo apenas o arcabouço mineral que servirá de guia na formação de novo osso. A reabsorção ocorre de forma lenta, sendo gradualmente substituído. Esta característica resulta da exposição a altas

temperaturas (sinterização) para eliminar a porção orgânica do osso (JOLY; MESQUITA; SILVA, 2010). Dentre suas vantagens estão: a disponibilidade de grandes volumes de osso, sem a necessidade de área doadora, a biocompatibilidade e custo acessível (MAZZONETTO, DUQUE NETTO, NASCIMENTO, 2012);

- d) Sintéticos/Aloplásticos: Podem ser metálicos, cerâmicos ou plásticos (DE CARVALHO et al., 2010). São materiais produzidos sinteticamente e são considerados seguros, não alergênicos e funcionam como arcabouço na formação óssea. Um exemplo desse biomaterial é o β -TCP, utilizado na regeneração óssea por apresentar a mesma porosidade da hidroxiapatita (HA) e as suas partículas são reabsorvidas (50%) e substituída por osso. (JOLY; MESQUITA; SILVA, 2010).

Quanto a propriedade biológica, os mecanismos que fundamentam a utilização dos enxertos ósseos são:

- a) Osteogênese: Processo pelo qual células viáveis formam centros de ossificação com o enxerto e contribuem com a formação de novo osso (KLOKKEVOLD, JOVANOVIC, 2004);
- b) Osteocondução: É a capacidade do biomaterial de conduzir por meio de uma matriz de suporte (arcabouço) as células ósseas para a sua substituição (reabsorção) e formação de novo osso. A osteocondução é mantida pela matriz inorgânica do biomaterial (DE CARVALHO et al., 2010; LINDHE; LANG; KARRING, 2010);
- c) Osteoindução: É um processo que envolve a estimulação de células osteoprogenitoras imaturas a formar novo osso. Os enxertos de origem homogêneos e autógenos apresentam estas propriedades. A atividade osteoindutora reside na liberação de BMPs, as quais são liberadas entre 2 semanas a 2 meses e seu pico de descarga ocorre em 6 meses (DE CARVALHO et al., 2010);
- d) Osteopromoção: É um princípio utilizado pelas técnicas de regeneração óssea guiada. Envolve o uso de membranas ou barreiras que promovem o isolamento e impedem que células que teriam uma ação inibidora entrem em contato com o enxerto (MAZZONETTO, DUQUE NETTO, NASCIMENTO, 2012).

Observando as características físicas, os materiais de enxertia são submetidos a processamentos químicos, classificados em:

- a) Anorgânicos, inorgânicos ou mineralizados: neste processo são removidos os componentes orgânicos e a matriz inorgânica apresenta formatos e tamanhos variados;
- b) Desmineralizados: os componentes celulares e inorgânicos são removidos, permanecendo apenas a matriz extracelular e pode ou não incluir as BMPs;
- c) Fresco: é obtido e utilizado sem nenhum tipo de processamento (MAZZONETTO, DUQUE NETTO, NASCIMENTO, 2012).

Quanto à reação biológica os biomateriais podem ser divididos em:

- a) Biotolerados: apresenta tecido conjuntivo fibroso entre o implante e o tecido ósseo;
- b) Bioinertes: quando ocorre uma neoformação óssea de contato (sem reação entre o leito e o implante);
- c) Bioativos: material caracterizado por induzir uma reação físico-química entre o implante e o osso, produto de uma adaptação microestrutural e química com o tecido ósseo (DE CARVALHO et al., 2010; MAZZONETTO, DUQUE NETTO, NASCIMENTO, 2012).

2.7.1 Resposta biológica aos substitutos ósseos

O processo de incorporação dos enxertos ósseos inicia com a homeostase do osso remanescente e posterior substituição do biomaterial por novo osso, caracterizando a fase reparativa (FRIEDLAENDER, 1987).

A incorporação dos substitutos ósseos consiste em 5 estágios: a) fase de organização do coágulo, b) fase inflamatória: proliferação vascular (angiogênese) e resposta celular local e sistêmica, c) osteocondução: o enxerto funciona como um andaime ou suporte mecânico para permitir a angiogênese, e) osteoindução: nesta fase células mesenquimais do hospedeiro conduzem à diferenciação de células osteoblásticas, e) remodelação tecidual: fase de neoformação óssea (aposição/reabsorção óssea). Esta fase final demora aproximadamente de 3-6 meses (FRY; MILHOLEN; HARBRECHT, 1983; MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012).

A regeneração óssea ocorre por dois mecanismos, o primário e o secundário. O mecanismo primário está associado a uma fixação rígida, onde existe uma proximidade entre os fragmentos ósseos. Na interfase das margens, os osteoclastos produzem colagenase, reabsorvendo o osso existente (primeiro evento). Assim, o tecido fibrovascular e os osteoblastos começam a secretar matriz osteóide. Posteriormente, na fase de maturação essas células são convertidas em canais haversianos. Por outro lado, o mecanismo secundário envolve a formação de um calo, e dentro do mesmo os osteóides são secretados e mineralizados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; DYM, HUANG, STERN 2012).

O mecanismo secundário da regeneração óssea se dá em 3 fases: inflamação, reparo e remodelação (CONSOLARO, 2009). A etapa de inflamação se caracteriza pela formação de um hematoma com a presença de macrófagos, fibroblastos e outras células inflamatórias que migram para o local. A etapa de reparo tem a formação de tecido de granulação, aumento do tecido vascular e migração de células mesenquimais, e o osteóide é posteriormente mineralizado, formando o calo ósseo mole. Esse calo é subsequentemente mineralizado e ossificado, constituindo uma ponte de tecido ósseo. A fase de remodelação ou de maturação pode demorar meses a anos e a resistência funcional completa é atingida de 4-6 meses (DYM, HUANG, STERN 2012).

O período mais crítico dessas fases evolutivas da reparação óssea acontece na 1.^a e 2.^a semana, onde ocorre a inflamação e revascularização. Nessa fase qualquer fator sistêmico (má-nutrição, diabetes, artrite reumatóide, medicamentos e agentes citotóxicos) pode inibir a proliferação de células ósseas (KALFAS, 2001).

Assim, a regeneração óssea é um processo complexo que envolve a interação de vários elementos, incluindo as células ósseas, fatores de crescimento, hormônios e citocinas que resultam na manutenção da arquitetura óssea e a homeostase do cálcio (ERIKSEN, 2010).

2.7.2 Biomaterial Bonfill®

Os materiais de origem bovina desmineralizados tem sido descritos como uma matriz de suporte da proliferação e ancoragem de osteoblastos na regeneração óssea (STEPHAN et al., 1999).

Os xenoenxertos são amplamente utilizados em clínicas odontológicas e procedimentos médicos. Possuem a vantagem de fornecer uma quantidade abundante de osso, o custo é relativamente acessível e não gera resposta imunológica do tipo “corpo estranho”, devido a sua biocompatibilidade. A controvérsia que geram o uso dos xenoenxertos é causada pela possível presença de príons que colocaria em risco à saúde do paciente pela transmissão de doenças em humanos. No entanto, análises experimentais tem demonstrado que os enxertos xenógenos não tem risco de transmissão de doenças (LI; WANG 2008; WENZ, OESCH, HORST, 2001), uma vez que sua matriz orgânica é removida por procedimentos químicos (JOLY; MESQUITA; SILVA, 2010; MAZZONETTO, DUQUE NETTO, NASCIMENTO, 2012).

Os príons são patógenos infecciosos que causam doenças neurodegenerativas fatais (STANLEY; PRUSINER, 1998). Na sua composição apresentam proteínas normais alteradas denominadas proteínas príons. A desnaturação e modificação dessas proteínas produz uma inativação dos príons e consequentemente elimina o risco de atividade imunológica dos enxertos xenógenos (WENZ, OESCH, HORST, 2001).

Uma das características que devem apresentar os biomateriais é a presença de poros com tamanhos específicos. No interior do poro do biomaterial, o crescimento ósseo ocorre de fora para dentro, de forma centrípeta (IKEDA; KAWANABE; NAKAMURA, 1999). Engin e Tas (1999) relatam que os poros devem apresentar tamanho entre 50-100 μm ou entre 250 e 300 μm . Os biomateriais com poros menores de 50 μm não permitem a formação de novo osso (IKEDA; KAWANABE; NAKAMURA, 1999).

Vários materiais xenógenos tem sido desenvolvidos no Brasil, dentre deles está a marca comercial Bonefill®. O biomaterial Bonefill® consiste em uma estrutura mineral extraída do fêmur bovino. Sua porção inorgânica apresenta uma estrutura similar à do osso humano, totalmente desproteínizado, por tanto, está isento de contaminações imunológicas. Apresenta a propriedade de osteocondução que permite a sua utilização em reconstruções de defeitos ósseos promovendo a remodelação e neoformação óssea. No seu processamento o osso fresco é triturado e recebe uma sequência de banhos com o objetivo de solubilizar as porções orgânicas (fibras e proteínas) conservando a porção mineral. O Bonefill® é utilizado em defeitos periodontais, enxerto ósseo ao redor de implantes, material de

preenchimento em exodontias, substituto ósseo em levantamento de seio maxilar, em procedimentos regenerativos, na neoformação óssea, defeitos ósseos em regiões orais, maxilares e faciais, base do crânio, fusão espinhal e em procedimentos ortopédicos (BIONNOVATION, 2015).

Polo et al. (2011) utilizaram o Bonefill® como material de preenchimento em tíbias de ratos obtendo resultados satisfatórios relacionados com a biocompatibilidade, osteocondução e regeneração óssea, após 10 e 30 dias pós-operatórios.

Em um estudo comparativo realizado por Manfro et al. (2014) foi avaliado a propriedade osteocondutiva de três substitutos ósseos inorgânicos bovinos: Bio-Oss®, Bonefill® and Gen-Ox® inorgânico. Os resultados da análise histométrica e histológica mostraram que o Bonefill® e o Bio-oss® obtiveram valores similares e superiores ao Gen-Ox® inorgânico.

Carbonari et al. (2009) analisaram em cobaias albinas jovens (*Cavia porcellus*) o potencial de citotoxicidade, toxicidade aguda sistêmica, teste de irritação cutânea e avaliação histológica de defeitos ósseos. Os resultados demonstraram a biocompatibilidade e biossegurança do Bonefill® como material de preenchimento em defeitos ósseos.

Apesar dos resultados positivos obtidos em várias pesquisas experimentais sobre o biomaterial Bonefill® existe a necessidade desse substituto ósseo ser testado na regeneração óssea em defeitos críticos associados ao alcoolismo crônico, descrito na literatura como um fator que interfere negativamente na formação óssea e cuja prevalência aumenta nos pacientes atendidos na clínica médico/odontológica.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a ação da matriz óssea bovina inorgânica desmineralizada (Bonfill®) na neoformação óssea em ratos submetidos ou não ao alcoolismo experimental, por meio de análise histológica e histométrica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a-) Analisar o comportamento do biomaterial Bonfill® no preenchimento de defeitos críticos em calota craniana de ratos;
- b-) Avaliar e comparar a interferência do alcoolismo experimental na neoformação óssea;
- c-) Avaliar a interferência do tipo de dieta líquida sobre a massa corporal dos animais dos Grupos Controle (GC – água) e Experimental (GE – etanol).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O projeto de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (CEEPA – Proc. N° 023/2012), sendo aprovado em 24 de setembro de 2012 (Anexo A).

Os procedimentos realizados nos animais foram desenvolvidos no Laboratório de Mesoscopia da Disciplina de Anatomia, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos (60 dias de idade), fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB/USP) – Campus de Bauru, São Paulo.

No Biotério, os animais foram mantidos em gaiolas contendo 4 animais cada. O macroambiente apresentou uma iluminação artificial administrada por “timer”, que controlava o ciclo claro/escuro de 12/12 horas com luminosidade de 220 lux, umidade de 55%, exaustor e ar condicionado, que manteve a temperatura média de 22°C, confirmada por um termômetro de temperatura ambiente.

Os animais foram separados aleatoriamente em Grupo Controle (GC) com 20 ratos, sendo dividido em Grupo Água Coágulo (GAC) correspondente ao defeito direito na calota craniana do animal e Grupo Água Biomaterial (GAB), defeito do lado esquerdo do animal. O Grupo Experimental (GE), composto por 20 ratos foi dividido em Grupo Etanol Coágulo (GEC) correspondente ao defeito direito na calota craniana do animal e Grupo Etanol Biomaterial (GEB) defeito do lado esquerdo do animal.

1. Grupo Controle (GC): Os animais receberam água como dieta líquida. Foi realizada uma osteotomia circular de 5 mm de diâmetro no osso parietal direito e esquerdo. O lado direito (GAC) foi preenchido com coágulo sanguíneo e o lado esquerdo (GAB) com osso bovino cortical inorgânico (Bonefill® Bionnovation, São Paulo, Brasil) de granulação média de 0,6 a 1,5 mm - 0,5 g (Figuras 5 e 6).

2. Grupo experimental (GE): Os animais receberam como dieta líquida álcool (álcool etílico absoluto, Laboratório Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) a

25%, diluído em água. Foi realizada uma osteotomia circular (5 mm de diâmetro) no osso parietal direito e esquerdo. O lado direito (GEC) foi preenchido com coágulo sanguíneo e o lado esquerdo (GEB) com osso bovino cortical inorgânico (Bonfill® Bionnovation, São Paulo, Brasil) de granulação média de 0,6 a 1,5 mm - 0,5 g (Figuras 5 e 6).

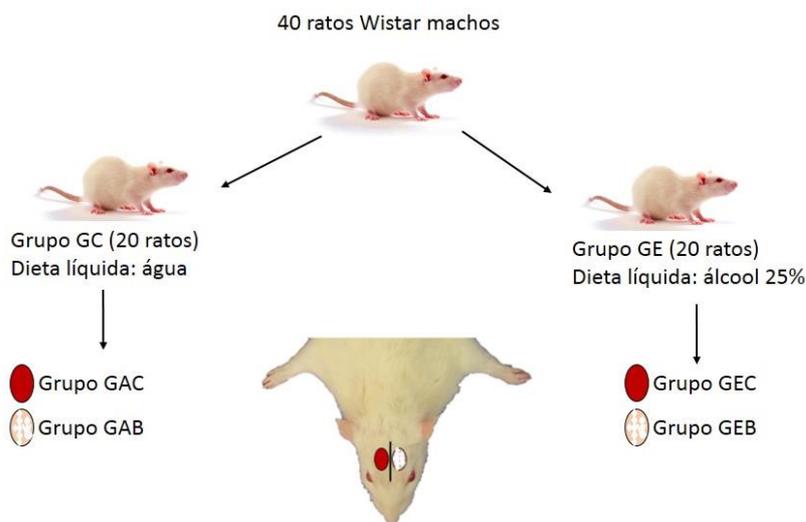


Figura 5 - Desenho experimental da divisão dos grupos

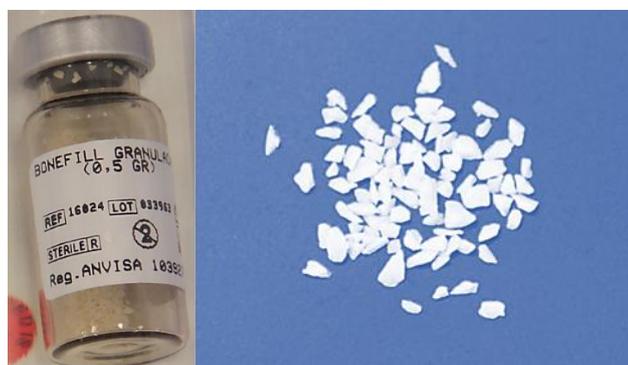


Figura 6 – Biomaterial Bonfill® de granulação média (0,6-1,5 mm)

Os animais receberam a mesma dieta sólida *“ad libitum”* (Ração Nuvilab CR1; Nuvital, Colombo, PR, Brasil) durante todo o experimento.

Os ratos do Grupo Experimental (GE) foram submetidos ao alcoolismo crônico “semi-voluntário” por adaptação gradativa ao álcool (TIRAPELLI; TAMEGA; PETRONI, 2000; TIRAPELLI et al., 2007a-b; TIRAPELLI et al., 2008a-b). A administração gradual permite produzir a alcoolização experimental e evita o óbito dos animais. A adaptação progressiva correspondeu ao fornecimento de álcool etílico diluído em água na dieta líquida. Na primeira semana 8%, na segunda

semana 16% e na terceira semana 25%. Os animais continuaram a receber dieta alcoólica por um período de 90 dias, na concentração final de álcool (25%) conforme o protocolo de Buchaim (2011).

Decorridos 90 dias os animais foram submetidos à cirurgia experimental e a dieta alcoólica continuou após realização da cirurgia até a eutanásia dos animais.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os ratos foram previamente pesados em balança analítica (MicroNal® Equipamentos de Precisão, SP, Brasil) e submetidos à anestesia geral intramuscular por meio da associação do sedativo cloridrato de quetamina 50 mg/kg (Dopalen® Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands Saúde Animal, Jacareí, São Paulo, Brasil) e o relaxante muscular cloridrato de xilazina 10 mg/kg (Anasedan® Sespo Indústria e Comércio Ltda – Divisão Vetbrands Saúde Animal, Paulínia, São Paulo, Brasil) em uma proporção de 0,3 mg/100 Kg IM. A região superior da cabeça foi tricotomizada com aparelho de barbear (Philips® Multigroom QG3250, São Paulo, Brasil).

Para a identificação de cada animal os pavilhões auriculares foram perfurados com um Alicate Perfurador (Ainsworth Golgran®, São Paulo, Brasil). Antissepsias do campo operatório foram realizadas com clorexidina 2% (RIOHEX® Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA – Brasil) na região frontoparietal. Os animais foram posicionados em decúbito ventral sobre uma tábua de cortiça. A seguir, foi infiltrado anestésico local Mepivacaína 2% com Vasoconstritor com epinefrina 1:1000.000 (Mepivalem SD®, Dentsply, São Paulo, Brasil) na região cirúrgica para controlar o sangramento e permitir melhor visualização dos tecidos. Foi realizada uma incisão longitudinal média crânio-caudal no couro cabeludo com lâmina de bisturi nº15 (Embramax®, São Paulo, Brasil), sobre a sutura sagital da calvária, com aproximadamente 20 mm de comprimento para exposição e divulsão dos tecidos, permitindo o seu deslocamento e afastamento, obtendo-se assim visualização dos ossos parietais (Figura 7 A-C).

Em âmbos os grupos (GC e GE) foi realizado uma osteotomia circular no osso parietal direito e esquerdo com broca trefina (SIN®, Sistema de Implante, São Paulo, Brasil) de 5 mm de diâmetro, em baixa velocidade (1500 rpm), sob irrigação

de solução salina constante para evitar necrose óssea por ação térmica, obtendo assim, um fragmento de osso arredondado, preservando a integridade da dura-máter e o cérebro (Figura 7D).

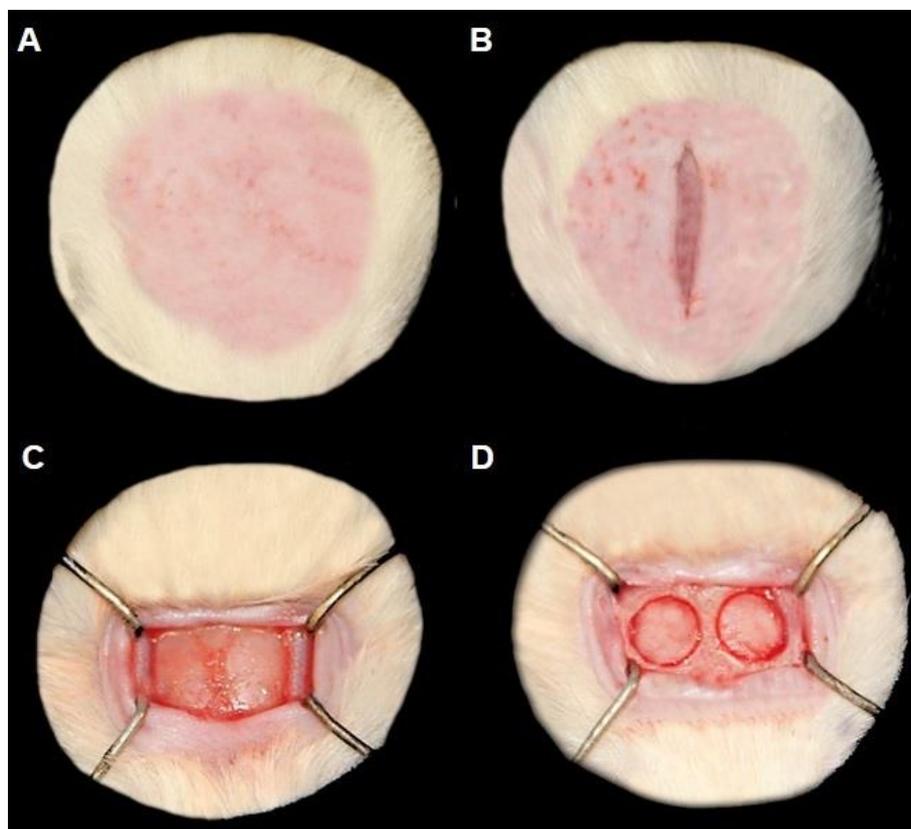


Figura 7 – Procedimentos cirúrgicos: (A) Tricotomia da área da calota craniana; (B) Incisão crânio-caudal (20 mm); (C) Divulsão dos tecidos e visualização dos ossos parietais; (D) Osteotomia circular de 5 mm realizada nos parietais

Como a calota craniana tem aproximadamente 1 mm de espessura a marcação da broca trefina ajuda a monitorar a perfuração da calvária. A pressão da broca sobre o osso foi menor do que o peso do micromotor utilizado (micromotor com contra-ângulo adaptado modelo 500, Kavo[®], Santa Catarina, Brasil) seguindo os cuidados e procedimentos cirúrgicos relatados na literatura (SPICER et al., 2012). A translucência do fragmento ósseo indicou a total osteotomia e o mesmo foi removido com o uso do descolador de molt 2/4 (Quinelato[®], Rio Claro, SP, Brasil) pelas margens do defeito (Figura 8A). A colocação do biomaterial foi feita sem exercer pressão sobre o cérebro. O lado direito foi preenchido com coágulo sanguíneo do próprio local e o lado esquerdo com osso bovino cortical inorgânico (Bonefill[®]) com aproximadamente 0,015 g de biomaterial (Figura 8B).

Os tecidos da área cirúrgica foram reposicionados e suturados. Internamente o periósteo (pontos simples) com fio de poliglactina Vicryl® (Ethicon-Johnson & Johnson São Paulo, Brasil) 5-0 e externamente a pele (pontos simples), utilizando-se fio de seda 4-0 (Ethicon®- Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) (Figura 8 C-D).

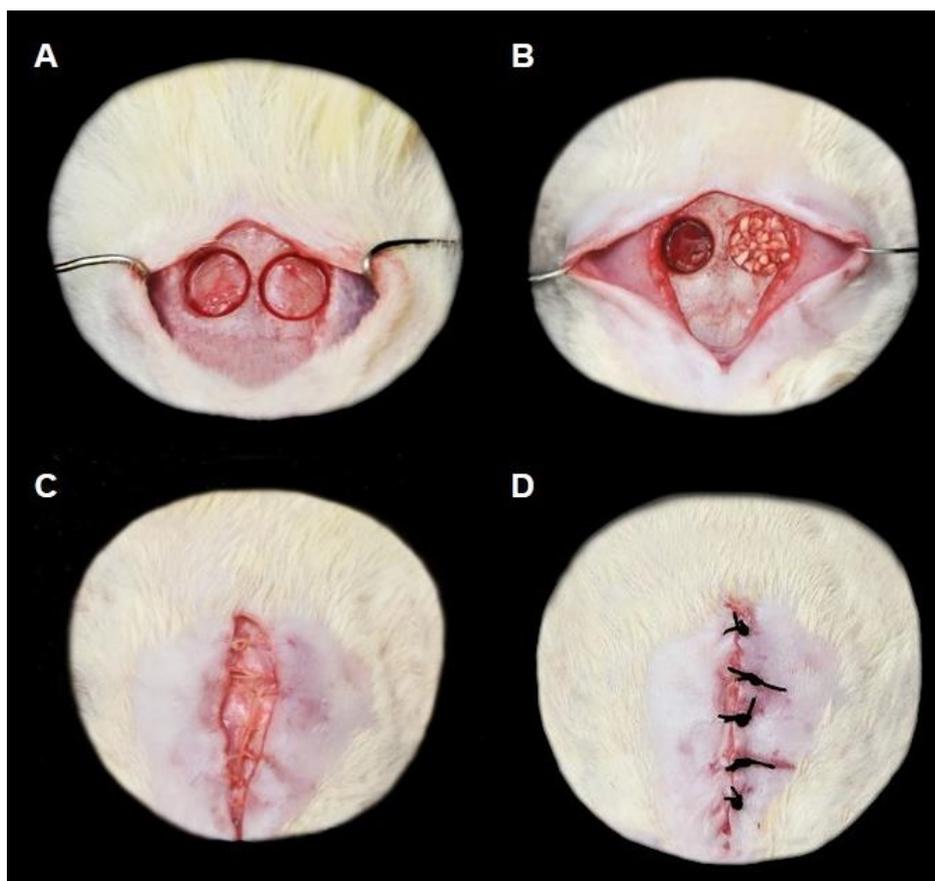


Figura 8 – Procedimentos cirúrgicos: (A) Exposição do defeito ósseo; (B) Preenchimento do defeito com Biomaterial Bonefill®; (C) Sutura do plano profundo com fio Vicryl® 5-0; (D) Sutura do plano superficial com fio de seda 4-0

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam antibiótico em dose única (Flotril 2,5%, Schering-Plough S. A., Rio de Janeiro, Brasil) na dose de 0,2 mL/Kg e analgésico dipirona (Analgex V, Agener União, Brasil), na dose de 0,06 mL/Kg, em aplicações intramusculares. A aplicação do analgésico foi mantida a cada 12 horas, durante 3 dias.

4.3 EUTANÁSIA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Decorridos os períodos de 10, 20, 40 e 60 dias pós-cirúrgico. Após de ter sido conferido o peso corporal de cada animal e aplicação da anestesia, as calotas cranianas foram cuidadosamente removidas com o auxílio de uma broca tronco-cônica de ponta diamantada FG 4138 (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil), preservando os tecidos moles supraparietais (Figura 9 A-F).

Posteriormente à remoção da calota, cinco animais de cada grupo, por período, foram eutanasiados por injeção de dose excessiva do anestésico citado anteriormente.



Figura 9 – Eutanásia: (A) Tricotomia da região da calota craniana; (B) Remoção da pele; (C) Incisão para separar o segmento de osso da calota; (D) Osteotomia com broca tronco-cônica de ponta diamantada; (E) Remoção da calota craniana; (F) Após remoção da calota

As peças foram fixadas em formol a 10% tamponado, por um período de 48 horas. Após esse período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e colocadas em EDTA a 10% (solução contendo 4,13% de Titriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio), fazendo trocas a cada 48 horas, para o processo de desmineralização, período aproximadamente de 40 dias. As amostras foram radiografadas no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Radiologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo usando filmes oclusais (Radiografia dental Kodak Insight® IO-41, Eastman Kodak Company - EUA) e o aparelho de Raio-X, modelo x-707 (Yoshida Dental® MFC Co. Tóquio, Japão) regulado em 70 KVp e 7 mA, com uma distância foco-filmede 40 cm e tempo de

exposição de 0,17 s. Em seguida, a amostra passou pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina.

As secções histológicas foram realizadas com 5 µm de espessura no micrótomo semi-automático Leica® (Modelo RM 2245, Leica Microsystems®, Alemanha) (Figura 10), levando em consideração a região central do defeito (maior diâmetro). Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômico de Masson, para estudo histomorfológico e histométrico.



Figura 10 - Micrótomo Leica® RM 2245

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Para a realização das análises histológica e histomorfométrica foram utilizadas duas lâminas de cada espécime contendo três cortes semi-seriados da área cirúrgica.

Na descrição histológica das áreas do defeito ósseo, em todos os espécimes foram consideradas as regiões de margem e central, para análise de formação de tecido de granulação, infiltrado inflamatório, formação de tecido ósseo primário e maturação óssea.

Para a análise histomorfométrica, as fotografias foram capturadas no microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Tóquio, Japan) com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71, Tokyo, Japan) (Figura 11). A análise quantitativa foi realizada no computador (Processador Intel (R) Celeron Windows 8; Manaus, Brasil) usando o programa AxioVision version 4.9 Zeiss, Alemanha, assim foi medida a área do biomaterial e da neoformação óssea.



Figura 11 – Microscópio Olympus BX50

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na comparação da massa corporal inicial (dia da cirurgia experimental) nos diferentes grupos (grupo controle e grupo experimental), foi utilizado o teste “*t*” independente, e na confrontação da massa corporal inicial e final (dia da eutanásia) dentro do mesmo grupo (grupo controle e grupo experimental) foi aplicado o teste “*t*” pareado.

A análise estatística para mensurar o percentual de formação óssea e de biomaterial, dentre os animais dos Grupos GAC, GAB, GEC e GEB, nos diferentes períodos (10 x 20 x 40 x 60 dias), foi utilizado o teste de variância ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes, com *post hoc* teste de Tukey. O nível de significância determinado foi de $p < 0.05$.

Para comparar o percentual de formação óssea nos animais de grupos diferentes para cada tratamento (GAC x GEC e GAB x GEB), nos diferentes períodos, foi aplicado o teste “*t*” para amostras independentes, com nível de significância $p < 0,05$.

Para comparar o percentual de formação óssea nos animais do mesmo grupo para tratamentos diferentes (GAC x GAB e GEC x GEB), nos diferentes períodos, foi aplicado o teste “*t*” pareado, com nível de significância $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 MASSA CORPORAL

A massa corporal inicial (dia da cirurgia experimental) dos animais que receberam água (GC) foram superiores em comparação com os animais que receberam álcool (GE) por um período de 110 dias (período total da alcoolização experimental), mostrando diferenças estatisticamente significantes (Tabela 1; Figura 12).

Tabela 1: Comparação da massa corporal inicial do grupo controle (GC) e do grupo experimental (GE) por meio do Teste "t" para amostras independentes.

Massa corporal inicial (g)				
GC		GE		Test "t" (p)
n°	Media DMP	n°	Média DMP	
20	444,59±45,20 ^{*a}	20	343,82±41,93 ^b	0,00000

* Média ± Desvio Padrão de 40 animais.

Letras diferentes p<0,05 (teste "t" independente)



Figura 12 – Representação da variação do tamanho corporal do GE e GC

Durante os períodos pós-cirúrgicos a massa corporal final (dia da eutanásia) dos animais do GC não apresentou diferença significativa no período de 10 dias. Nos períodos 20, 40 e 60 dias pós-cirurgia a massa corporal aumentou,

7,9%, 6,6% e 14,1%, respectivamente, mostrando diferenças estatisticamente significantes nesses períodos (Tabela 2).

Tabela 2: Massa corporal inicial e final por períodos (10, 20, 40 e 60 dias) do Grupo Controle (GC)

Massa corporal do GC (g)					
Período	n	Inicial	Final	MCF -MCI	Teste "t" pareado (p)
10 dias	5	456,32±55,94* ^a	454,30±39,24 ^a	-2,020000	0,888698
20 dias	5	413,78±26,30 ^a	446,46±18,80 ^b	32,682000	0,007984
40 dias	5	475,18±35,70 ^a	506,70±52,91 ^b	31,524000	0,021220
60 dias	5	433,09±43,76 ^a	494,34±60,24 ^b	61,246000	0,004928

* Média ± Desvio Padrão de 20 animais.

Letras diferentes p<0,05 (teste "t" pareado)

Na massa corporal final dos animais do GE ocorreu uma perda de 9,2% da massa corporal após 10 dias da cirurgia. No período de 20 dias depois da cirurgia a massa corporal mostrou-se similar ao da massa inicial. Aos 40 e 60 dias ocorreu ganho de massa corporal de respectivamente 5,9 e 6,4% nos animais. Constataram-se diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 10, 40 e 60 dias (Tabela 3).

Tabela 3: Massa corporal inicial e final por períodos (10, 20, 40 e 60 dias) do Grupo Experimental (GE)

Massa corporal do GE (g)					
Período	n	Inicial	Final	MCF -MCI	Teste "t" pareado (p)
10 dias	5	284,81±17,36* ^a	258,61±14,43 ^b	-26,20400	0,000178
20 dias	5	376,79±10,81 ^a	389,29±23,43 ^a	12,50200	0,343744
40 dias	5	349,69±28,45 ^a	369,88±26,09 ^b	20,18400	0,006915
60 dias	5	363,98±23,46 ^a	386,23±27,82 ^b	22,24600	0,045035

* Média ± Desvio Padrão de 20 animais.

Letras diferentes p<0,05 (teste "t" pareado)

5.2 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS

A descrição histomorfológica a seguir será realizada de duas maneiras: inicialmente, com objetivas de 4 e 10 vezes, com coloração de Tricrômico de Masson, a descrição será nos períodos estipulados previamente (10, 20, 40 e 60 dias), com ênfase na observação da cavidade cirúrgica em relação às margens do defeito, o biomaterial enxertado, tecido ósseo e conjuntivo no seu interior. Depois, com objetiva de 40 vezes, coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), a análise dos Grupos GAB e GEB, GAC e GEC, nos períodos estipulados previamente (10, 20, 40 e 60 dias), com ênfase na observação dos elementos celulares presentes na cavidade cirúrgica.

5.2.1 Período de 10 dias

A análise histomorfológica dos defeitos nos diferentes grupos demonstraram em GAB e GEB partículas do enxerto ósseo circundado por tecido conjuntivo e pequenas áreas de formação óssea na margem do defeito. Os grupos GAC e GEC apresentaram uma pequena formação óssea na margem do defeito, sendo que o GEC também mostrou formação óssea no centro do defeito. Em ambos os grupos observou-se grande quantidade de tecido conjuntivo (Figura 13).

Os grupos GAB e GEB apresentaram as partículas do enxerto ósseo circundados por tecido de granulação, sem sinais de reabsorção da sua superfície e pequenas áreas de formação óssea na margem do defeito. Nos grupos GAC e GEC observaram-se formação de novo osso e tecido de granulação nas margens do defeito (Figura 14).

10 DIAS

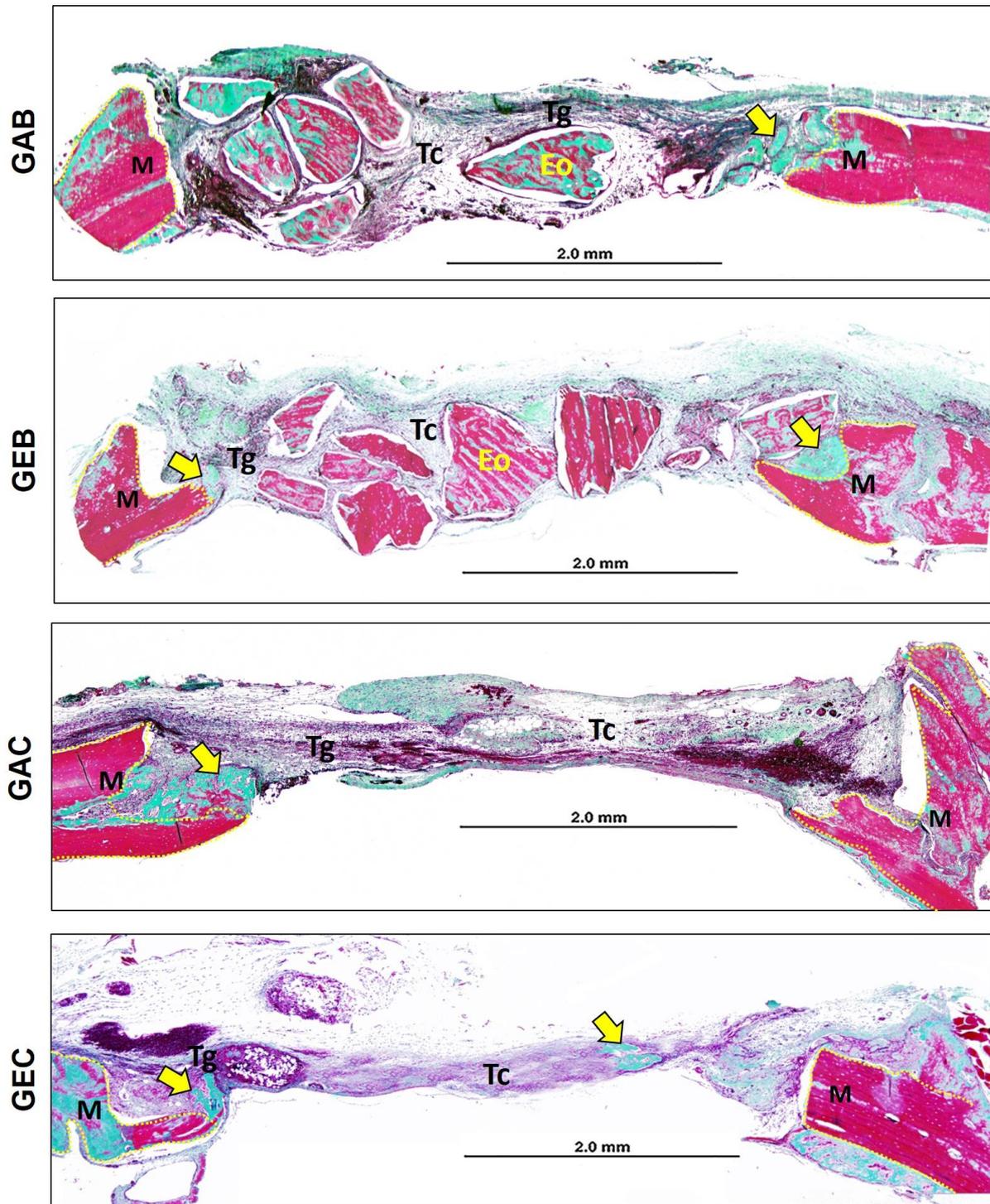


Figura 13: Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

10 DIAS

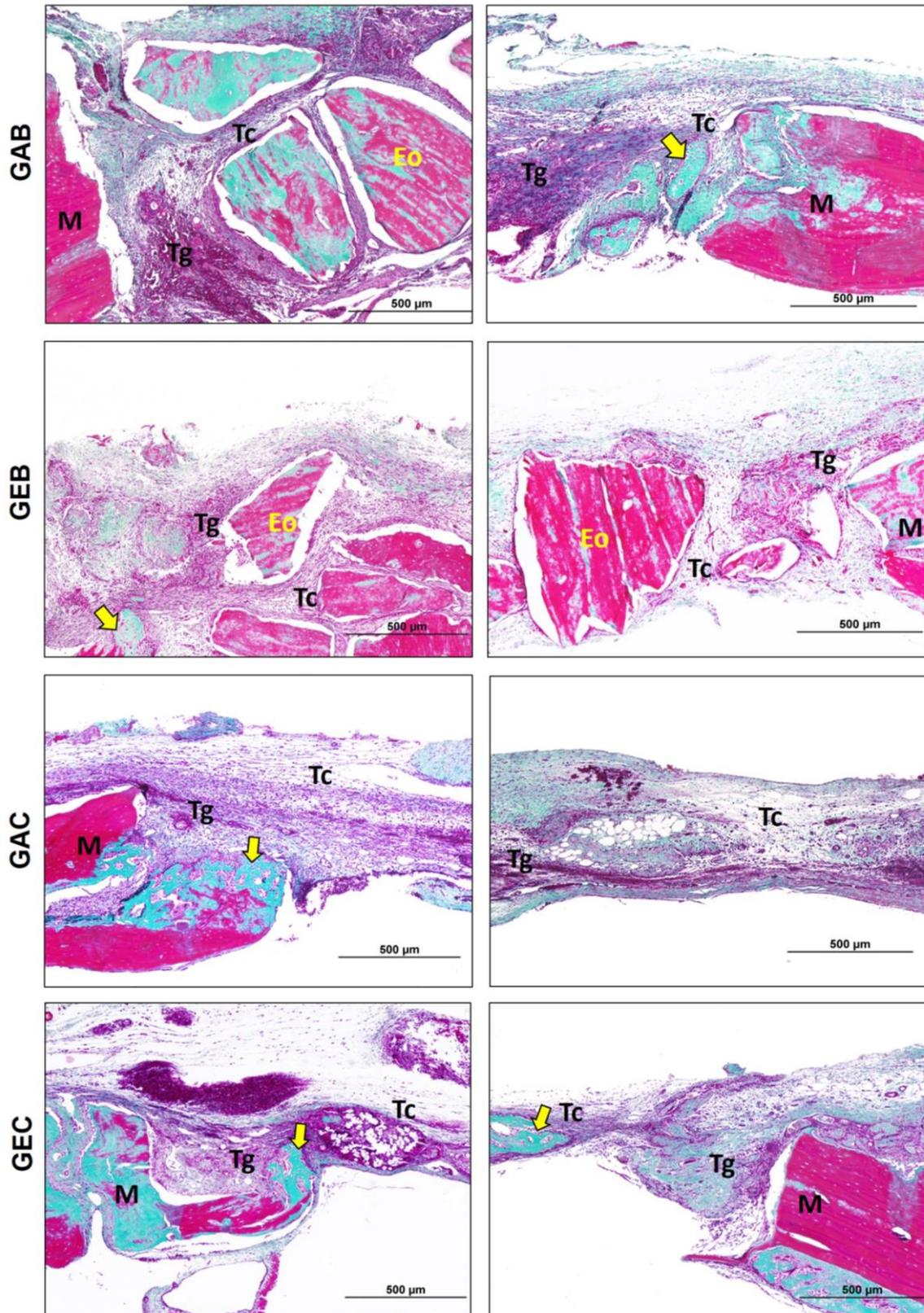


Figura 14: Objetiva de 10x. Fotomicrografia dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

5.2.2 Período de 20 dias

A análise histomorfológica dos defeitos, nos diferentes grupos no período de 20 dias, coradas pelo Tricrômico de Masson, mostraram o grupo GAB e o GEB com partículas do enxerto ósseo envolvidas por tecido conjuntivo. No grupo GAB são observadas áreas de formação óssea nas margens e no centro do defeito. Algumas partículas estão envolvidas por tecido ósseo neoformado. Os grupos GAC e GEC apresentaram uma pequena formação óssea na margem do defeito, sendo que o GEC também apresentou formação óssea no centro do defeito. Ambos os grupos apresentavam uma quantidade menor de tecido conjuntivo em relação ao período de 10 dias (Figura 15).

Nos grupos GAB e GEB apresentaram-se algumas áreas ao redor das partículas do enxerto ósseo rodeadas por tecido de granulação e algumas áreas de formação óssea no centro do defeito, circundando algumas partículas do biomaterial enxertado. Tanto o grupo GAB como o GEB não mostram sinais de reabsorção na superfície do biomaterial. Nos grupos GAC e GEC observaram-se formação óssea imatura nas margens dos defeitos, pequenas áreas isoladas de formação óssea no centro do defeito no grupo GEC, e áreas de tecido de granulação reduzidas comparado com o período de 10 dias desses grupos (Figura 16).

20 DIAS

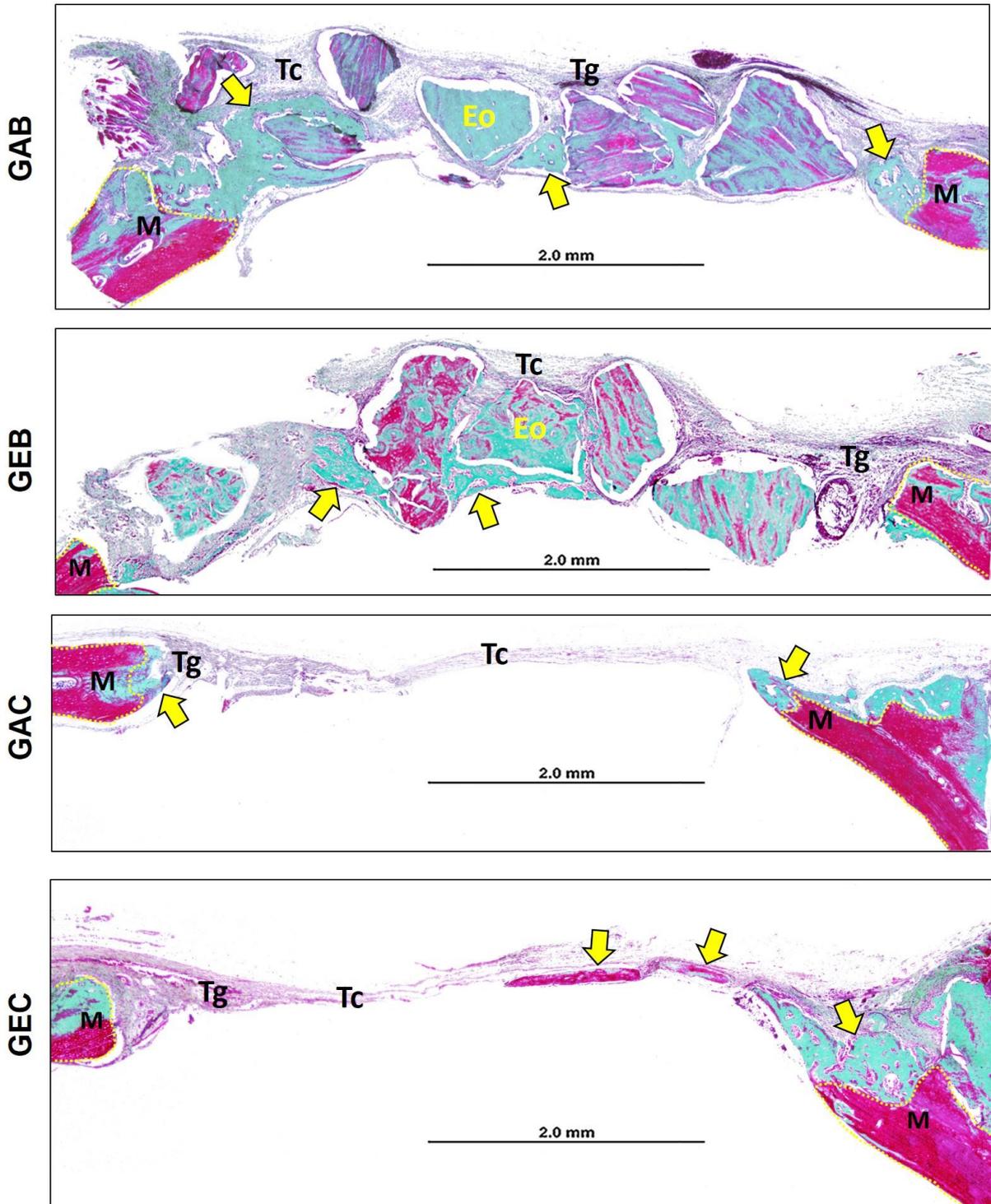


Figura 15: Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 20 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

20 DIAS

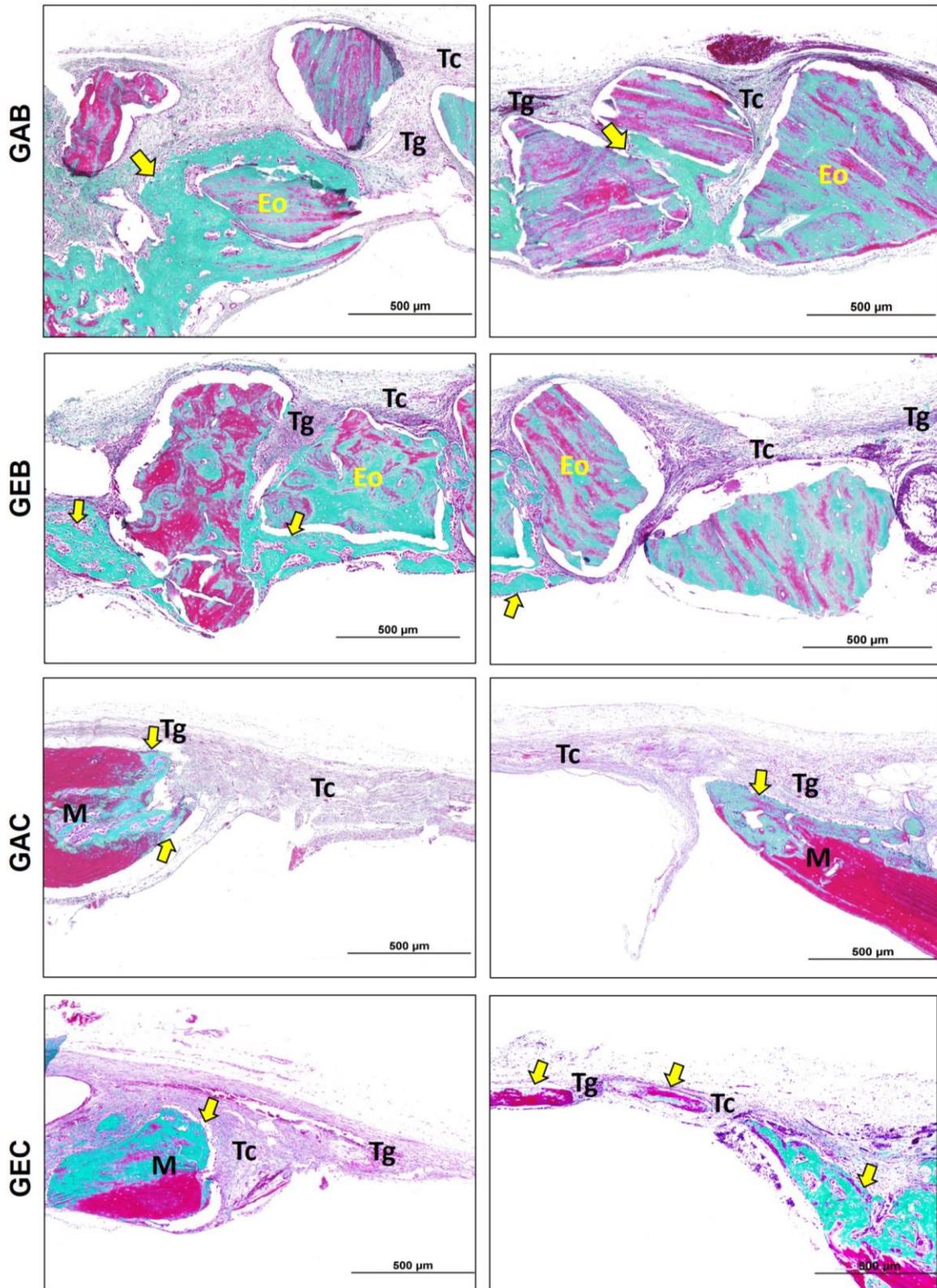


Figura 16: Objetiva de 10x. Fotomicrografia dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), tecido de granulação (Tg), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

5.2.3 Período de 40 dias

A análise dos defeitos ósseos de todos os grupos, no período de 40 dias corados pelo Tricrômico de Masson, revelaram nos grupos GAB e GEB algumas áreas de formação óssea principalmente nas margens dos defeitos e ao redor de algumas partículas. Estas partículas de biomaterial foram circundadas por tecido conjuntivo e especificamente no grupo GEB apresentam um deslocamento das mesmas. Os grupos GAC e GEC exibiram uma formação óssea nas margens do defeito e sobre a superfície da dura-máter, mais extensa que nos períodos anteriores, porém de espessura menor que o osso original. Ambos os grupos apresentavam uma menor quantidade de tecido conjuntivo em relação aos períodos de 10 e 20 dias (Figura 17).

Os grupos GAB e GEB apresentaram algumas partículas envolvidas por tecido ósseo neoformado. No grupo GEB foram observadas áreas isoladas de neoformação óssea no centro do defeito. Os grupos GAC e GEC mostraram um comportamento de formação óssea similar entre eles, sobre a superfície da dura-mater mais extensa em comparação com os períodos anteriores (Figura 18).

40 DIAS

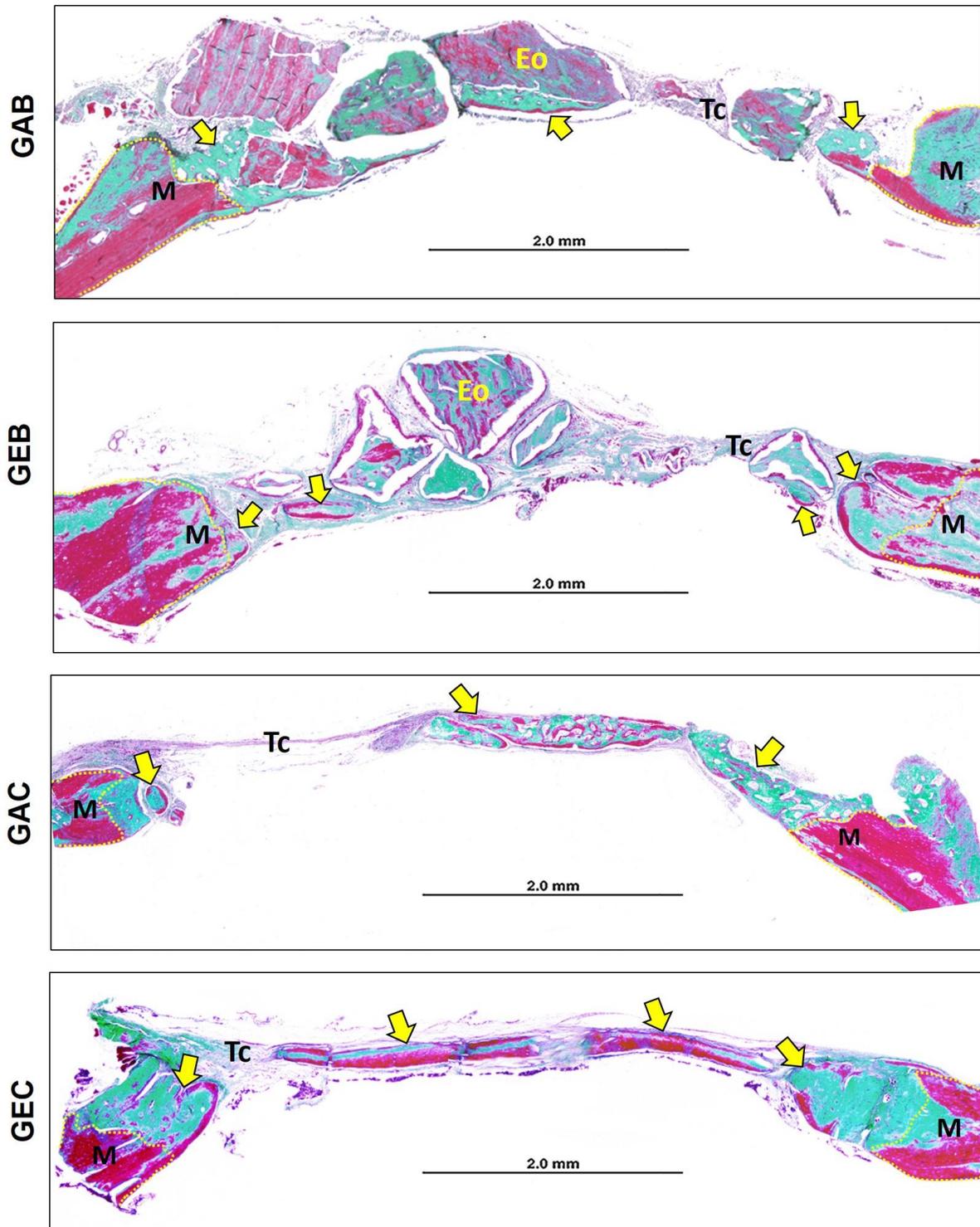


Figura 17: Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

40 DIAS

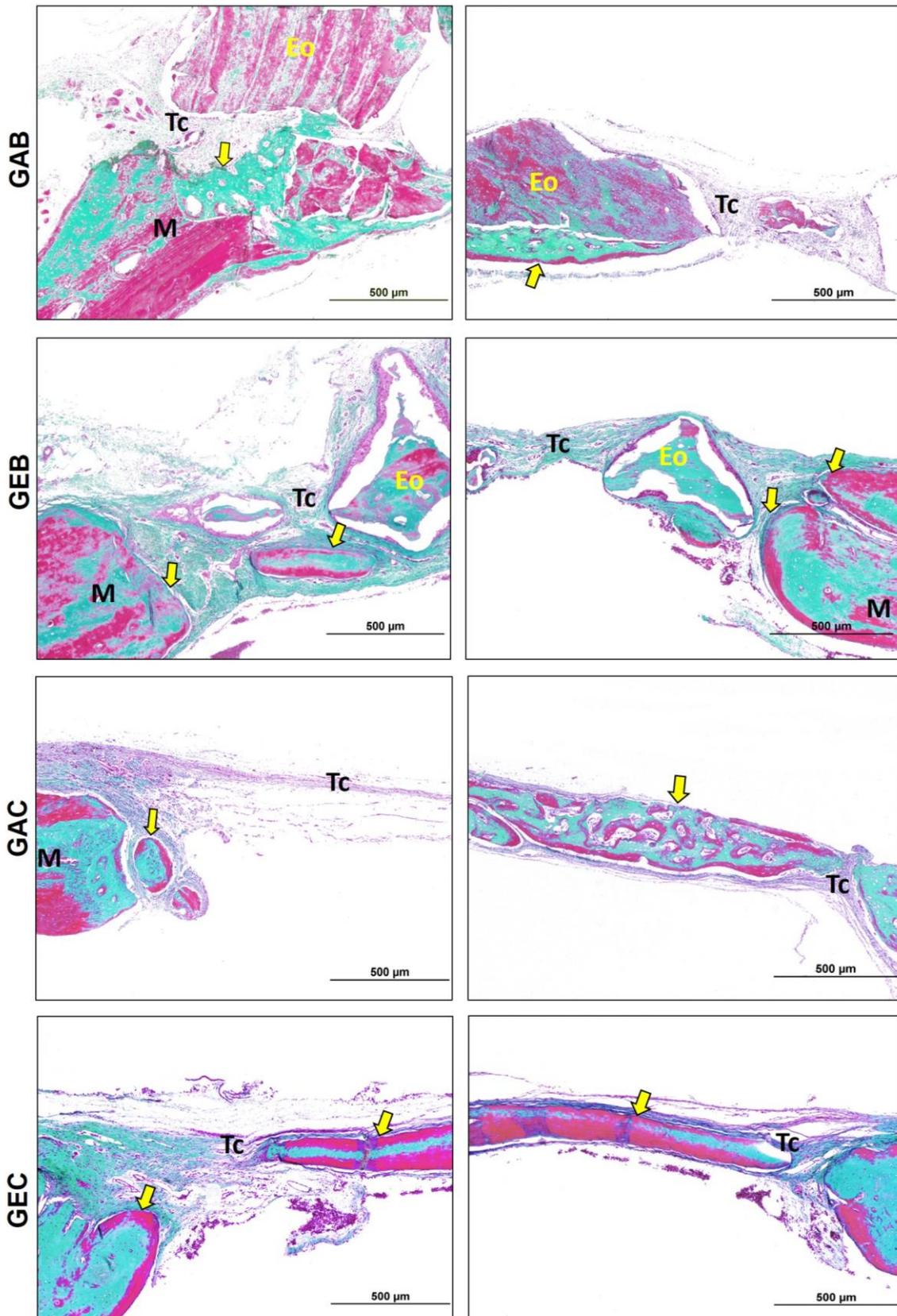


Figura 18: Objetiva de 10x. Fotomicrografia do defeito dos diferentes grupos no período de 10 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

5.2.4 Período de 60 dias

A análise histomorfológica dos defeitos nos diferentes grupos, no período de 60 dias coradas pelo Tricrômico de Masson, mostraram o grupo GAB e o GEB com áreas de formação óssea principalmente nas margens do defeito. Observaram-se partículas do enxerto ósseo circundadas por tecido conjuntivo, pequenas áreas de osso neoformado ao redor de algumas partículas e poucas áreas que revelaram sinais de reabsorção da superfície do biomaterial. Os grupos GAC e GEC apresentaram uma extensa formação óssea na margem do defeito, sendo que o GEC também apresentou tecido ósseo neoformado no centro do defeito, porém sem preenchimento total da área do defeito (Figura 19).

Os grupos GAB e GEB apresentaram as partículas do enxerto ósseo circundados por tecido conjuntivo, com pequenas áreas de reabsorção na superfície das partículas. Nos grupos GAC e GEC observou-se uma grande área de formação óssea com semelhança no aspecto físico da maturação óssea. Todos os grupos deste período exibiram um estágio mais avançado de remodelação óssea (Figura 20).

60 DIAS

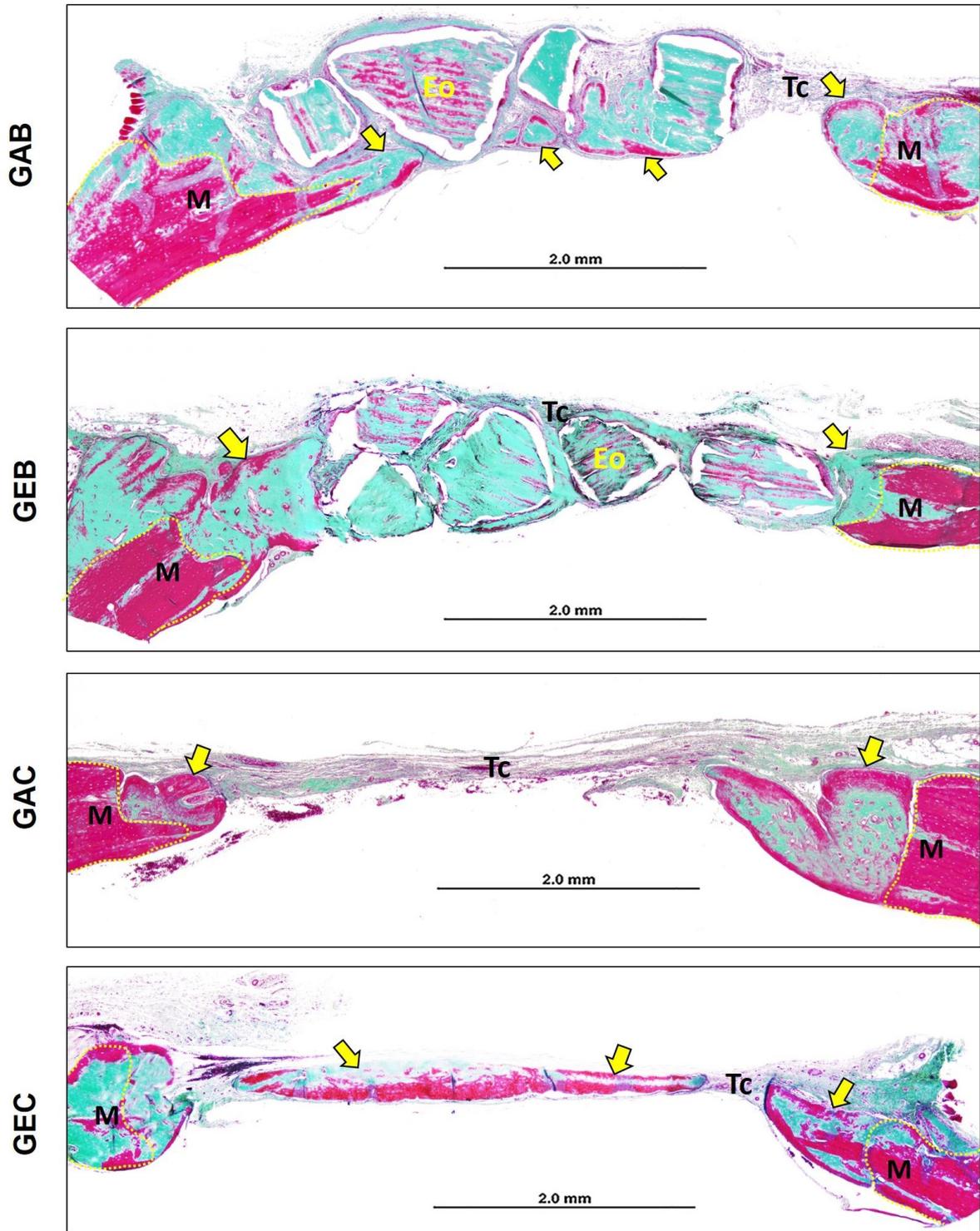


Figura 19: Objetiva de 4x. Aspecto panorâmico dos defeitos dos diferentes grupos no período de 60 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

60 DIAS

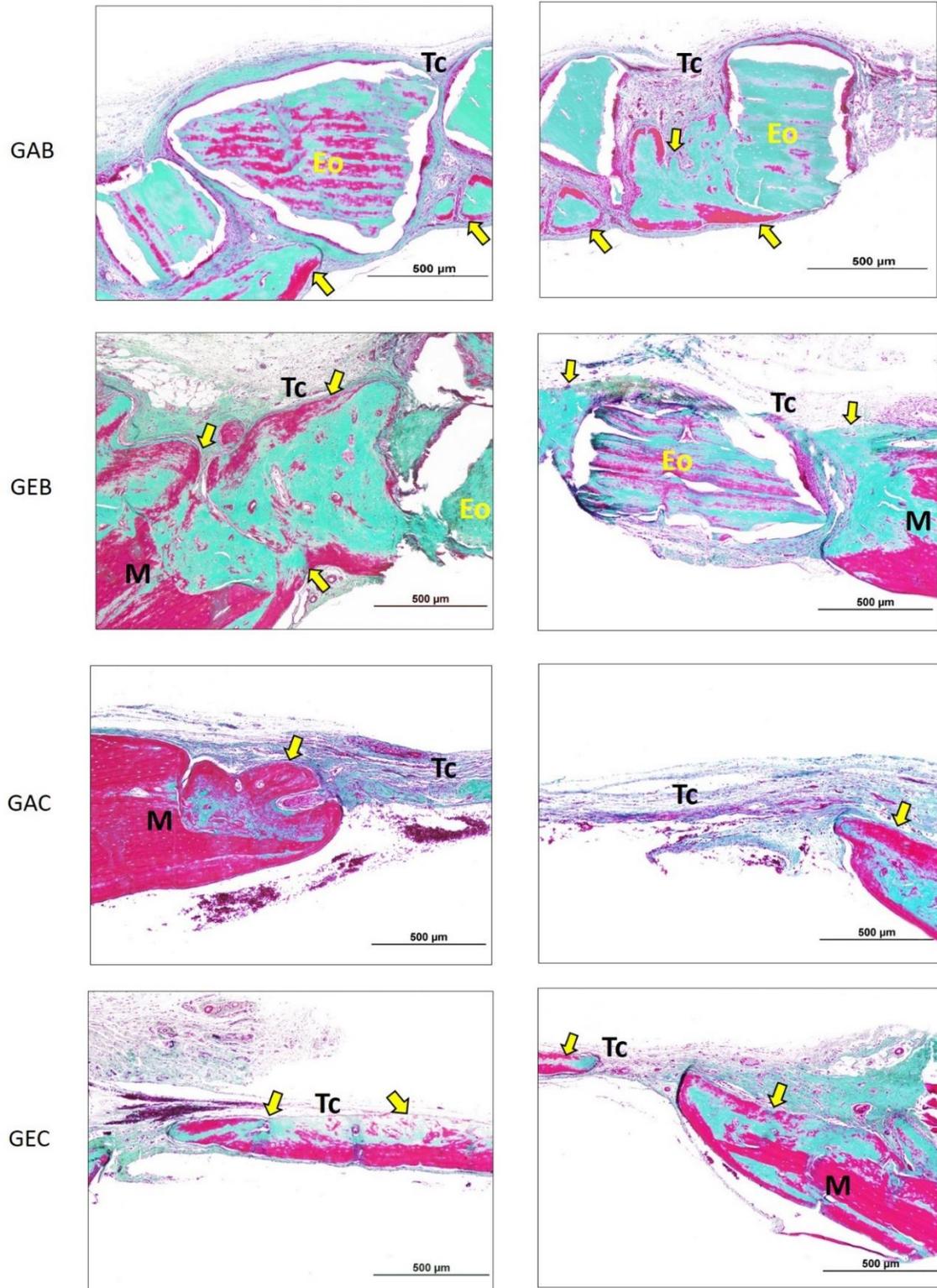


Figura 20: Objetiva de 10x. Fotomicrografia dos defeitos dos diferentes grupos no período de 60 dias coradas pelo Tricrômico de Masson. Enxerto ósseo (Eo), tecido conjuntivo (Tc), Margem do defeito (M), formação óssea (seta amarela)

5.2.5 GAB e GEB nos períodos de 10 20, 40 e 60 dias (HE):

A análise microscópica dos defeitos dos grupos GAB e GEB, nos diferentes períodos corados pela Hematoxilina-Eosina, mostraram no período de 10 dias em ambas as condições clínicas o biomaterial estava circundado por tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos. No período de 20 dias observou-se no grupo GAB uma fina camada de tecido conjuntivo separando as partículas, sendo que no grupo GEB esta camada de tecido conjuntivo era mais extensa. No período de 40 dias o GEB apresentou células gigantes multinucleadas e um tecido conjuntivo em processo de organização. Aos 60 dias foi possível observar sinais de reabsorção da matriz óssea por células mononucleares (Figura 21).

5.1.6 GAC e GEC nos períodos de 10 20, 40 e 60 dias (HE):

A análise microscópica dos defeitos dos grupos GAC e GEC, nos diferentes períodos corados pela Hematoxilina-Eosina, apresentaram no período de 10 dias, formação óssea imatura nas bordas do defeito, intensa proliferação de células inflamatórias mononucleares e osteócitos. Aos 20 dias foi possível observar uma maior quantidade de tecido ósseo imaturo nas margens do defeito e presença de vários canais nutritivos. O período de 40 dias mostrou neoformação óssea em íntimo contato com a margem do defeito sem interposição de tecido conjuntivo fibroso. Aos 60 dias foi observado um tecido ósseo mais compacto presente nas margens dos defeitos (Figura 22).

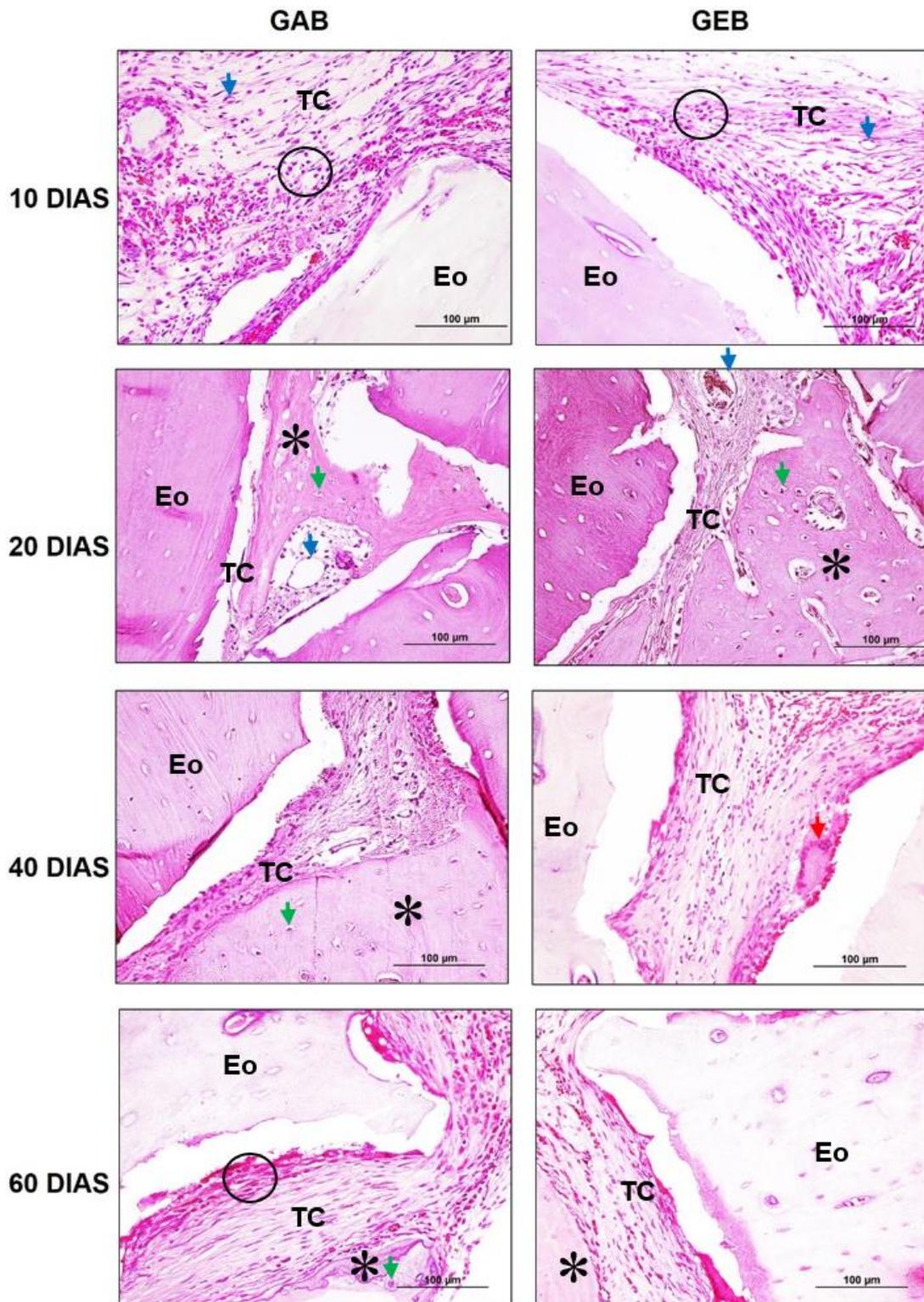


Figura 21: Objetiva de 40x. Aspectos microscópicos do defeito dos grupos GAB e GEB nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias corados pela Hematoxilina-Eosina. Tecido conjuntivo frouxo (TC); vasos sanguíneos (seta azul); células inflamatórias mononucleares (círculo preto); enxerto ósseo (Eo); neoformação óssea (asterisco); osteócitos (seta verde); células gigantes multinucleadas (seta vermelha)

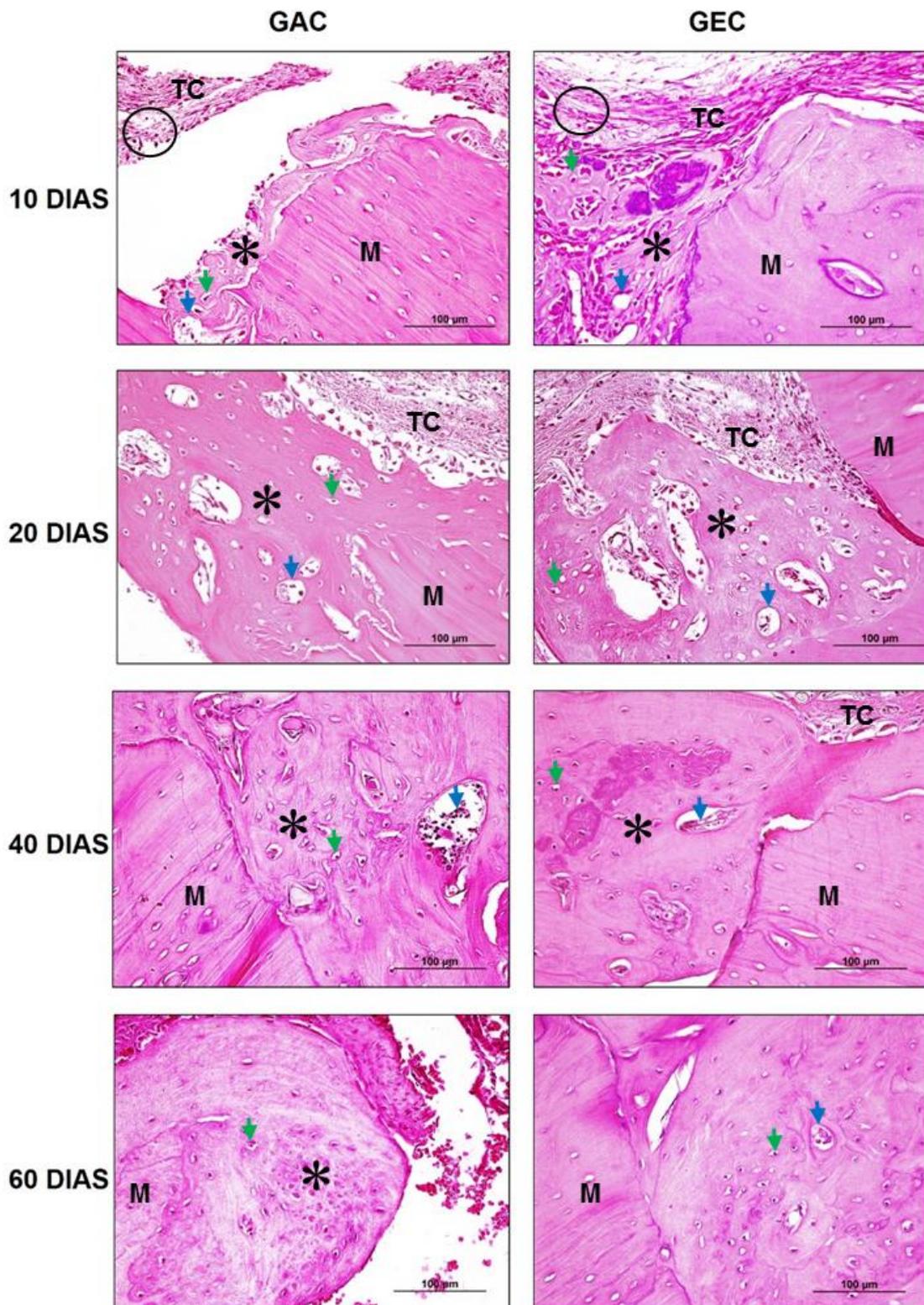


Figura 22: Objetiva de 40x. Aspectos microscópicos do defeito dos grupos GAC e GEC nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias corados pela Hematoxilina-Eosina. Tecido conjuntivo frouxo (TC); vasos sanguíneos (seta azul); células inflamatórias mononucleares (círculo preto); margem do defeito (M); neoformação óssea (asterisco); osteócitos (seta verde)

5.3 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS

Quando se avaliou a influência do tempo na formação óssea dentro de cada grupo experimental (Tabela 4) foi verificado que no GEC o percentual de osso neoformado foi de 6,67% aos 10 dias. Entre 10 e 40 dias o percentual de osso neoformado aumentou gradualmente 1,61 vezes (161%) e se manteve até os 60 dias.

No GAC, o percentual de osso neoformado apresentou o mesmo padrão de formação óssea observado no GEC (Tabela 4).

Nos grupos tratados com biomaterial independentemente do tipo de consumo líquido o percentual de tecido ósseo (Tabela 4) e biomaterial (Tabela 5) dos grupos GAB e GEB não variou estatisticamente entre os períodos, sendo em média de respectivamente 24,6% e 10%. Estes dados estão representados na figura 23 para o percentual de formação óssea, e figura 24 e tabela 5 para o percentual de biomaterial.

Tabela 4 – Comparação do **percentual de formação óssea** nos diferentes períodos de reparo para cada grupo: ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e *post hoc* teste de Tukey

	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias	ANOVA (p)
GAC	5,30±3,08* ^a	8,41±5,17 ^{a,b}	15,50± 7,14 ^b	14,51±7,69 ^b	0,049
GAB	7,54±6,56 ^a	13,79±11,14 ^a	12,97±7,07 ^a	13,34±12,45 ^a	0,618
GEC	6,67±3,09 ^a	12,33±1,89 ^b	17,42±2,78 ^b	18,29±7,89 ^b	0,007
GEB	6,98±5,97 ^a	7,96±4,40 ^a	9,59±4,59 ^a	12,85±7,94 ^a	0,466

* Média ± Desvio Padrão de 5 animais/grupo

Letras diferentes p<0,05 (teste de Tukey)

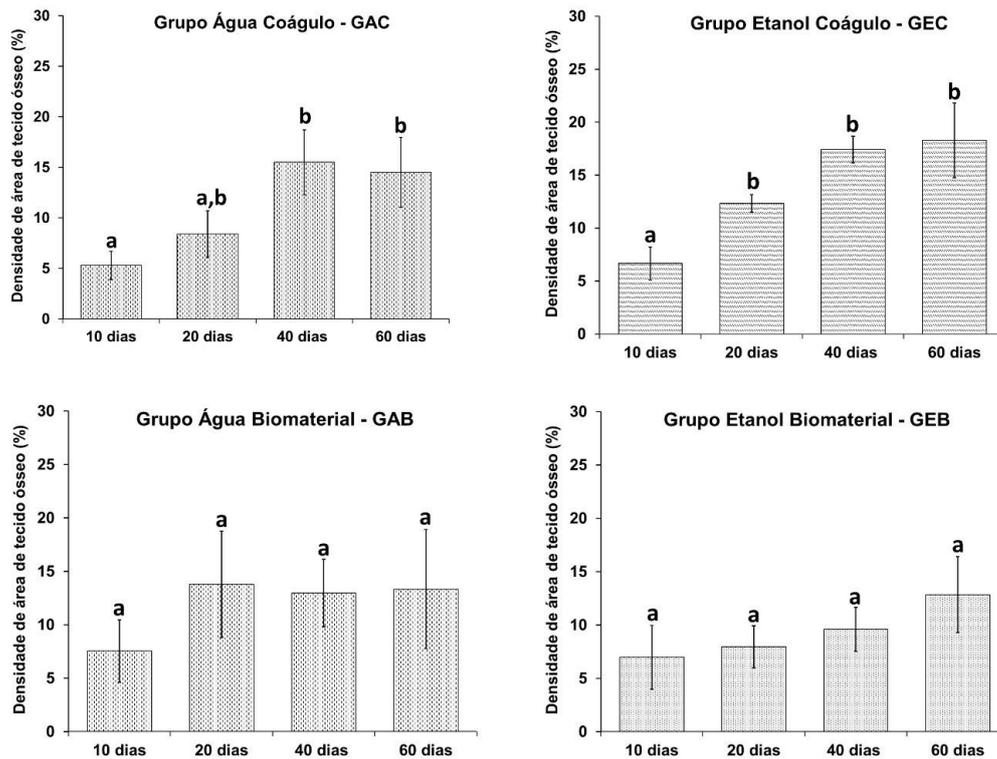


Figura 23 – Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAC, GEC, GAB e GEB nos diferentes períodos experimentais. n=5, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Tabela 5 – Comparação do **percentual de Biomaterial** nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental tratados com biomaterial: ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e *post hoc* teste de Tukey

	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias	ANOVA (p)
GAB	32,69±11,71 ^a	21,60±5,16 ^a	28,03±10,64 ^a	18,43±11,86 ^a	0,160
GEB	28,24±11,60 ^a	22,93±11,46 ^a	25,58±4,00 ^a	19,54±11,06 ^a	0,601

* Média ± Desvio Padrão de 5 animais/grupo

Letras diferentes $p < 0,05$ (teste de Tukey)

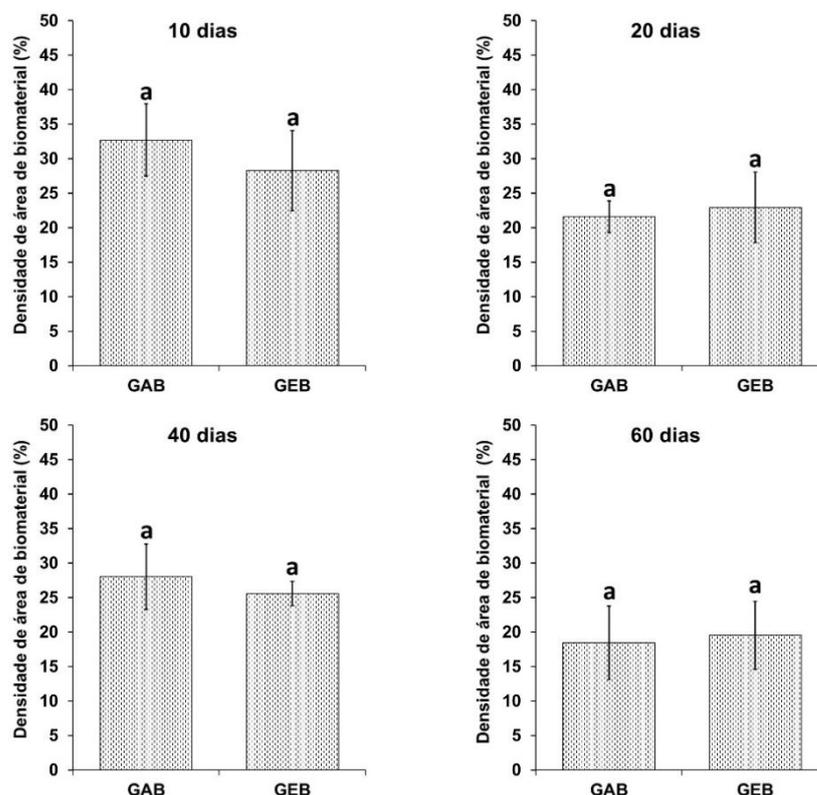


Figura 24 – Representação gráfica do percentual de Biomaterial nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental tratados com biomaterial obtido para os grupos GAC e GEC nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

Para avaliarmos possíveis interferências na formação óssea associado ao quadro clínico dos animais (alcoolidado e não alcoolidado) foi confrontado o percentual de osso neoformado obtidos entre GAC versus GEC e GAB versus GEB para cada período experimental. Nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada (Tabela 6; Figuras 25 e 26).

Tabela 6 – Comparação do percentual de formação óssea nos animais alcoolizados e não alcoolizados para cada tratamento (biomaterial ou coágulo) nos diferentes períodos experimentais para cada grupo experimental: Teste “t” para amostras independentes

Período em dias	Tratamento com Coágulo		Teste “t” (p)	Tratamento com Biomaterial		Teste “t” (p)
	GAC	GEC		GAB	GEB	
10 dias	5,30±3,08 ^a	6,67±3,09 ^a	0,528	7,54±6,56 ^a	6,98±5,97 ^a	0,899
20 dias	8,41±5,17 ^a	12,33±1,89 ^a	0,151	13,79±11,14 ^a	7,96±4,40 ^a	0,307
40 dias	15,50±7,14 ^a	17,42±2,78 ^a	0,591	12,97±7,07 ^a	9,59±4,59 ^a	0,678
60 dias	14,51±7,69 ^a	18,29±7,89 ^a	0,464	13,34±12,45 ^a	12,85±7,94 ^a	0,942

* Média ± Desvio Padrão de 5 animais/grupo

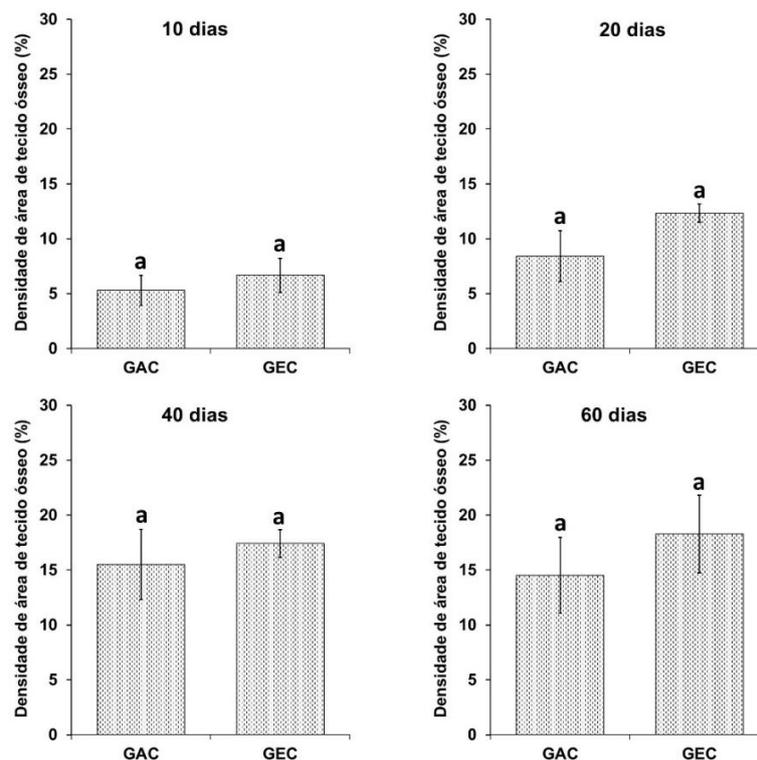


Figura 25 – Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAC e GEC nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

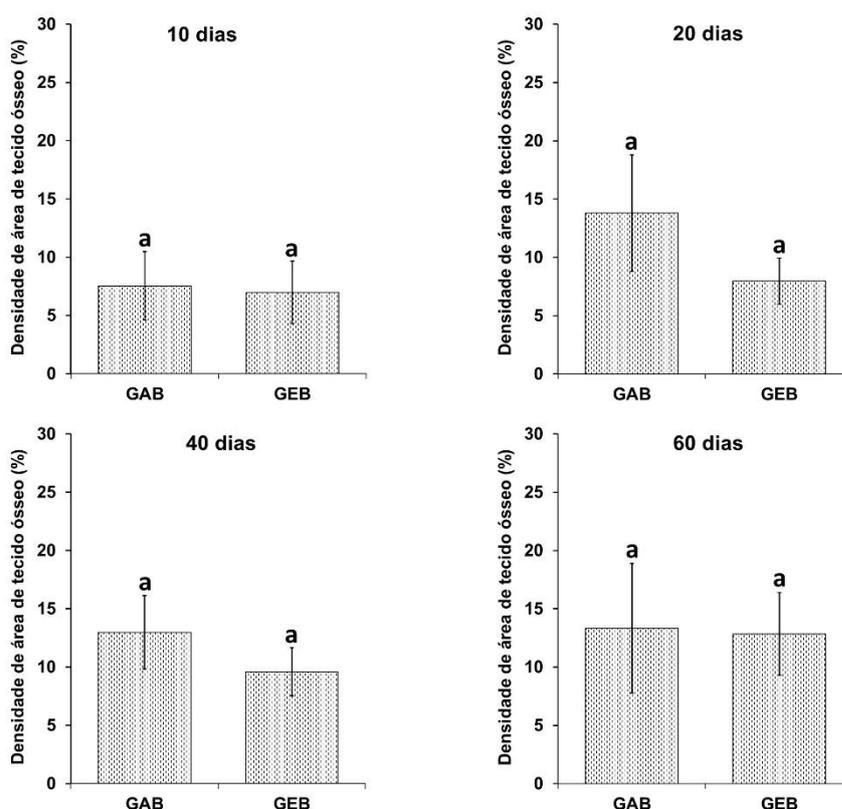


Figura 26– Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAB e GEB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

Para se comparar a interferência do tipo de tratamento na formação óssea foram confrontados os dados dos defeitos preenchidos com o biomaterial em relação aos preenchidos com coágulo em cada condição clínica e período experimental. Verificou-se que nos animais não alcoolizados (GAC versus GAB) o percentual de formação óssea foi similar entre os grupos preenchidos com coágulo e com biomaterial em todos os períodos experimentais. Porém, nos animais alcoolizados (GEC versus GEB) a formação óssea foi mais lenta/menor nos animais tratados com o biomaterial quando comparados com os preenchidos com coágulo, sendo observadas diferenças estatisticamente significantes apenas no período de 40 dias (formação óssea 0,45 vezes menor nos tratados com biomaterial versus coágulo) (Tabela 7; Figuras 27 e 28).

Tabela 7: Comparação do percentual de formação óssea conforme o grupo de tratamento (biomaterial versus coágulo) para cada situação clínica dos animais (alcoholizados e não alcoholizados): Teste “t” pareado

Período em dias	Tratamento com Água		Teste “t” (p)	Tratamento com Álcool		Teste “t” (p)
	GAC	GAB		GEC	GEB	
10 dias	5,30±3,08* ^a	7,54±6,56 ^a	0,326	6,67±3,09 ^a	6,98±5,97 ^a	0,852
20 dias	8,41±5,17 ^a	13,79±11,14 ^a	0,370	12,33±1,89 ^a	7,96±4,40 ^a	0,156
40 dias	15,50±7,14 ^a	12,97±7,07 ^a	0,610	17,42±2,78 ^a	9,59±4,59 ^b	0,018
60 dias	14,51±7,69 ^a	13,34±12,45 ^a	0,865	18,29±7,89 ^a	12,85±7,94 ^a	0,122

* Média ± Desvio Padrão de 5 animais/grupo

Letras diferentes p<0,05 (teste de Tukey)

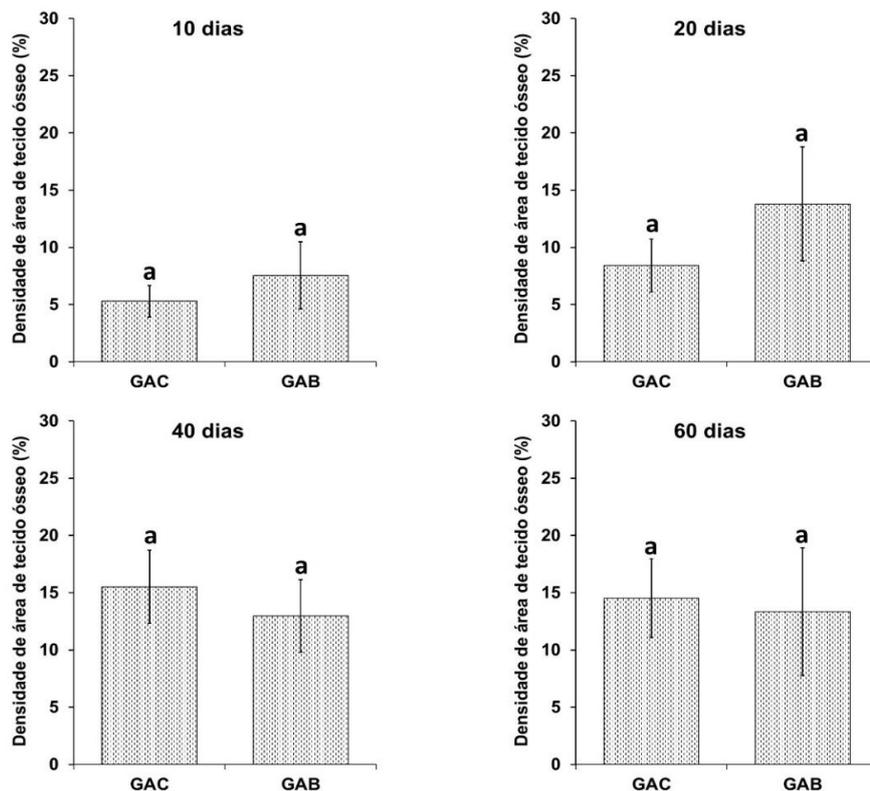


Figura 27 – Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GAC e GAB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante

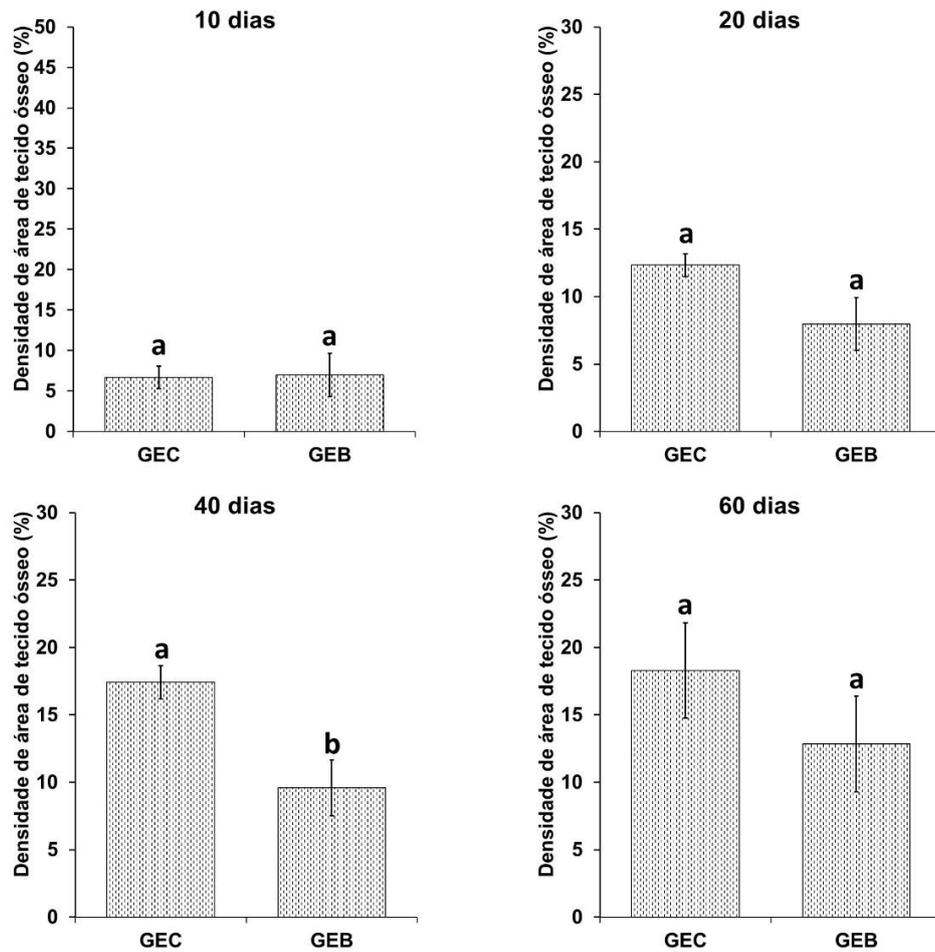


Figura 28 – Representação gráfica da densidade de área de tecido ósseo obtido para os grupos GEC e GEB nos diferentes períodos experimentais. $n=5$, Barra=Erro Padrão da média. Anova a um critério ($p = 0,049$). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo analisar a ação da matriz óssea bovina inorgânica desmineralizada (Bonefill®) na neoformação óssea em ratos submetidos ou não ao alcoolismo experimental, por meio de análise histológica e histométrica. Os resultados mostraram que a presença do biomaterial não estimulou a neoformação óssea nas condições de alcoolismo experimental, quando se comparou com a cavidade cirúrgica preenchida somente por coágulo. Nos animais não alcoolizados o tratamento (coágulo x biomaterial) teve um percentual similar de formação óssea.

Os efeitos deletérios do álcool sobre o tecido ósseo têm sido investigados desde a década de 80 (DE VERNEJOU; BIELAKOFF; HERVE, 1983). A partir dessa data, vários estudos têm direcionado os seus objetivos para a avaliação dos efeitos diretos e indiretos do álcool na dinâmica do *turnover* ósseo (FEITELBERG et al., 1987; CHAVASSIEUX et al., 1993; (WANG et al., 2003; BUCHAIM et al. 2009, MAUREL et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

A utilização de animais nessa pesquisa está baseada na vantagem de fornecer informações fisiológicas e de condições patológicas com relevância clínica, além de prover uma melhor aproximação dos resultados em humanos (GOMES; FERNANDES, 2011). O motivo da escolha de ratos, com idade de 60 dias, foi por causa da influência que exerce a idade sobre a cicatrização, vascularização e conseqüentemente na angiogênese no processo de reparo de fraturas. Sendo assim, ratos mais jovens apresentam um reparo ósseo mais próximo às condições fisiológicas normais, fornecendo dados mais confiáveis (LU et al., 2008).

Quanto ao sexo dos animais, a escolha por ratos machos foi em razão da influência dos hormônios sexuais no tecido ósseo. Apesar da participação do androgênio, estrogênio e seus respectivos receptores no crescimento e manutenção óssea, tem sido atribuída uma ação inibidora no perióstio do osso em formação, relacionada ao estrogênio nas mulheres. Além disso, o esqueleto masculino está caracterizado por apresentar maior massa óssea, ser mais resistente e possuir um risco à fratura óssea de 15% em contraste com um 40% nas mulheres (VENKEN et al., 2008; OURY, 2012).

A preferência do uso da calvária foi devido à similaridade embriológica com os ossos da face, obtendo resultados que podem ser aplicados na clínica

odontológica (DEVELIOGLU, UNVER SARAYDIN, KARTAL, 2009). O uso da calvária permite a reprodução e standardização, podendo ser avaliada radiograficamente e histologicamente; permite um acesso cirúrgico para implantação de um biomaterial; além das razões econômicas (REICHERT et al., 2010). Em contrapartida, as pesquisas em calota craniana tem como limitação a incapacidade de realizar avaliação mecânica (GOMES; FERNANDES, 2011).

A escolha pela dieta líquida de consumo de álcool foi baseada na eficiência desta técnica no estudo dos efeitos do etanol devido à flexibilidade de ajustar as necessidades fisiológicas, à facilidade de estudar os efeitos tóxicos do álcool e a sua inter-relação com os nutrientes ingeridos (LIEBER; DECARLI; SORRELL, 1989). A técnica da dieta líquida foi descoberta 25 anos atrás e tem melhorado até então, sendo considerada uma ferramenta no estudo experimental dos efeitos do álcool (LIEBER; DECARLI; SORRELL, 1989), podendo simular o consumo de etanol em humanos (GIL-MARTÍN; CALVO; FERNÁNDEZ-BRIERA, 1998).

Outras técnicas como a as injeções intraperitoneais e a gavagem como método de alcoolismo experimental são consideradas estressantes, além do risco de necrose tecidual e de processo inflamatório (GIL-MOHAPEL et al., 2010).

Em diversas pesquisas têm sido relatados procedimentos cirúrgicos em ratos para avaliar a regeneração óssea em defeitos ósseos críticos maior ou igual a 5 mm (WINN et al., 1999; CACCIAFESTA et al., 2001; VERNA et al., 2002; LUTOLF et al., 2003; QIU et al., 2007). No entanto, Porto et al. (2012), consideram que osteotomias de 5 mm utilizadas como defeitos críticos não devem ser usados em análises por um período maior de 30 dias, devido a que o defeito tem uma propensão ao reparo após esse período, sem a necessidade de biomaterial como preenchimento. Esses dados não condizem com os resultados da atual pesquisa, já que não foi observado preenchimento total dos defeitos em nenhum dos grupos, nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

No presente estudo as duas cavidades, de 5 mm de diâmetro, foram distribuídas lateralmente à sutura sagital, nos ossos parietais direito e esquerdo. Os defeitos ósseos de 5 mm de diâmetro na calota craniana de ratos possibilitam a realização de osteotomias de ambos os lados, podendo assim avaliar no mesmo animal o grupo controle e o grupo experimental (QIU et al., 2007), além do mais se evita lesão da sutura sagital, reduzindo o risco de danos do seio sagital superior (BOSCH, MELSEN, VARGERVIK, 1998).

Com relação ao biomaterial empregado, em todos os períodos analisados, o biomaterial Bonefill® formou uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, mostrando ser um substituto ósseo biotolerado, teve um comportamento bioinerte e não demonstrou biofuncionalidade. Este encapsulado de tecido fibroso foi observado anteriormente por Develioglu, Unver Saraydin e Kartal (2009), em um estudo no qual utilizaram um xenoenxerto de origem bovina em defeitos realizados no osso parietal em ratos. Os resultados mostraram a presença de tecido fibroso ao redor das partículas após 30 dias. Segundo Kasper et al. (2006), essa reação ocorre pela tentativa do organismo de isolar o biomaterial.

Quanto ao peso dos animais, o GE mostrou um peso corporal menor no período inicial (dia da cirurgia experimental) quando comparado ao GC, em que posteriormente não ocorreu perda de massa corporal no pós-cirúrgico. Tem sido relatada a ocorrência da diminuição da massa corporal em ratos alcoolizados (LIEBER; JONES; DECARLI, 1965). A diminuição da ingestão de alimentos em ratos submetidos ao alcoolismo é causada pelos danos hepáticos, pelas mudanças químicas e anormalidades estruturais no fígado (LIEBER; JONES; DECARLI, 1965).

Na análise histomorfológica e na fotomicrografia de todos os grupos, no período de 10 dias, foi observado uma grande quantidade de tecido conjuntivo e uma formação de osso imaturo principalmente nas margens do defeito. O grupo GEC mostrou uma reabsorção mais intensa das margens, em comparação com os outros grupos do mesmo período. Este mecanismo é conhecido como “primeiro evento” do processo de remodelação óssea, onde os osteoblastos produzem colagenase na interfase das margens, reabsorvendo o osso existente (DYM, HUANG, STERN 2012, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

No período de 10 dias, de todos os grupos, foram observadas algumas espículas ósseas localizadas nas margens do defeito. Tem sido relatado que após 14 dias da perfuração de defeitos ósseos críticos na calota craniana, espículas podem ser observadas na periferia dos defeitos ósseos (SILVEIRA et al., 2008).

O Grupo GAB, no período de 10 dias, apresentou um deslocamento do biomaterial, sendo que algumas áreas não estavam preenchidas pelo enxerto ósseo implantado, o que pode ter limitado a formação óssea e ser o motivo pelo qual esse grupo obteve as médias mais baixas. Stevenson, Emery e Goldberg (1996), relataram a importância da estabilização inicial do biomaterial na osseointegração. Visto que, as micromovimentações podem inibir o crescimento ósseo, causando

uma união de tipo fibrosa (HJORTING-HANSEN; WORSAAE; LEMONS; 1990; CESTARI et al., 2009).

A avaliação histomorfológica, no período de 20 dias, mostrou nos grupos GAB e GEB algumas partículas parcialmente circundadas por tecido ósseo neoformado, com maior formação óssea em áreas próximas às partículas de biomaterial. Aos 40 dias foi possível observar uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado em relação aos períodos anteriores, porém sem sinais de reabsorção do biomaterial e com tecido fibroso ao redor de várias partículas, assim como foi observado por Develioglu, Unver Saraydin, Kartal (2009).

No período de 60 dias o reparo ósseo apresentou um estágio mais avançado de remodelação e consolidação, assim como relatado por Hyun et al. (2005), no entanto sem reparo completo do defeito. O reparo incompleto do defeito ósseo, aos 60 dias, demonstrou que osteotomias de 5 mm realizadas em calota craniana de ratos podem ser consideradas como defeitos críticos, o que vem de encontro com pesquisas anteriores (WINN et al., 1999; CACCIAFESTA et al., 2001; VERNA et al., 2002; LUTOLF et al., 2003; QIU et al., 2007).

O mecanismo do reparo aconteceu das bordas do defeito para o centro (de forma centrípeta) em todos os períodos, sendo que nos períodos de 20, 40 e 60 dias houve também formação óssea no centro do defeito pela proliferação de células osteogênicas vindas da dura-máter. Hyun et al. (2005), observaram o crescimento inicial de osso nas bordas do defeito. Cestari et al. (2009), perceberam também uma formação óssea centralmente na superfície da dura-máter.

Nas observações microscópicas, os grupos GAB x GEB e GAC x GEC no período de 10 mostraram uma maior quantidade de células inflamatórias mononucleares em comparação com os períodos posteriores. Esse período é descrito como o mais crítico das fases da reparação óssea, onde ocorre a inflamação e revascularização (KALFAS, 2001). Nessa fase, agentes citotóxicos como o etanol, podem inibir a proliferação de células ósseas (KALFAS, 2001). O processo inflamatório apresentou uma redução significativa aos 20 dias, assim como observado por Silveira et al. (2008).

Aos 20 dias, em todos os grupos, houve presença de vasos sanguíneos, dentro de canais nutritivos, sendo essa proliferação vascular correspondente às fases iniciais no processo de incorporação dos substitutos ósseos (MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012), e também está presente no mecanismo

normal de reparo ósseo (CONSOLARO, 2009). Aos 40 dias foi observado um tecido conjuntivo em processo de organização, em comparação com os períodos anteriores, o que também foi descrito por De Oliveira et al. (2008). Além disso, no grupo GEC foi evidenciada a presença de células gigantes multinucleadas, o que caracteriza uma reação de corpo estranho. A presença dessas células foi relatada no estudo de Carneiro et al. (2005), localizadas ao redor do biomaterial de origem bovina implantado em tíbias em todos os períodos analisados (30, 90 e 180 dias).

No período de 60 dias encontrou-se um tecido ósseo mais maduro (HYUN et al., 2005), porém com tecido conjuntivo preenchendo algumas áreas do defeito. Essa condição do preenchimento parcial do defeito ocorreu até mesmo no grupo controle aos 60 dias, o que também foi percebido no estudo de Cestari et al. (2009), nos períodos finais analisados.

As observações histomorfométricas mostraram uma diferença estatisticamente significativa na evolução (períodos de reparo) de formação óssea somente nos grupos GAC e GEC, o que sugere que a presença do biomaterial interferiu no processo de reparo do tecido ósseo. Em estudos *in vivo* e *in vitro* tem sido demonstrado que o tamanho dos poros tem um papel importante na formação óssea, sendo que *in vitro*, a baixa porosidade estimula a formação óssea, enquanto uma maior porosidade produz um maior crescimento ósseo *in vivo* pela deposição de osteoblastos e formação de capilares (KARAGEORGIU; KAPLAN 2005), além da migração celular (KUBOKI et al. 1998). O comportamento biológico de todo biomaterial depende das suas características físicas e químicas, cristalinidade, composição química, o tamanho das partículas, a morfologia da superfície e a sua porosidade (JOSCHEK et al. 2000; XU et al. 2003; OKAMOTO et al. 2006). Assim, a presença dos poros nos biomateriais é essencial para a colonização celular (IKEDA; KAWANABE; NAKAMURA, 1999). Até a presente data, na literatura consultada, não se encontraram pesquisas relatando o tamanho dos poros do biomaterial Bonfill®.

Comparando o percentual de Biomaterial nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental (tratados com biomaterial – GAB e GEB), não houve diferença estatisticamente significativa, mostrando que o biomaterial praticamente não sofreu absorção/reabsorção, nem mesmo aos 60 dias da implantação. Este comportamento pode estar relacionado com a baixa cristalinidade do biomaterial Bonfill®, o que pode interferir nas propriedades físico-químicas dos cristais de

hidroxiapatita e conseqüentemente na sua substituição por osso novo (DO DESTERRO et al., 2014).

A avaliação da interferência do álcool no coágulo e no biomaterial (GAC x GEC e GAB x GEB) com relação à formação óssea, não mostrou diferença estatística significativa, indicando que o consumo de álcool não atingiu os níveis deletérios na formação óssea comparando cada situação clínica (alcoholizado x não alcoholizado) com o tipo de tratamento (coágulo x biomaterial). As condições fisiológicas, o tempo e a dose de consumo podem ter sido o motivo pelo qual nessa pesquisa, com o desenho experimental utilizado em ratos, não alcançou o nível necessário de consumo de etanol que causasse inibição da formação óssea. Além disso, se observou uma variabilidade na resposta dos animais, o que poderia estar relacionado às características fisiológicas de cada animal e à diferença no consumo de álcool, sendo considerado crônico quando a sua ingestão é por longo período, assim desencadeando mecanismos adaptativos de dependência e tolerância (SAMSON; HARRIS, 1992). Como já tem sido relatado na literatura, as sequelas do álcool no tecido ósseo estão diretamente relacionadas com a dose e tempo de consumo, a idade, sexo e aspectos hormonais (MAUREL et al., 2012a).

Quando avaliada a formação óssea nos grupos GAC e GAB não se encontrou diferença significativa estatisticamente, o que levanta a hipótese de que o biomaterial Bonafill® não estimulou uma maior formação óssea. Esse resultado vai de encontro com o estudo de Cooper et al. (2010), em que os autores observaram que, nos defeitos de 5 mm de diâmetro realizados no osso parietal em ratos, o xenoinxerto de origem bovina utilizado não apresentou diferença estatística em comparação com o grupo controle.

Na análise da interferência do tipo de tratamento (coágulo x biomaterial) na formação óssea, foi verificado que nos animais alcoholizados (GEC versus GEB) a formação óssea foi mais lenta/menor nos animais tratados com o biomaterial (GEB) quando comparados com os preenchidos com coágulo (GEC), sendo observadas diferenças estatisticamente significantes apenas no período de 40 dias. Estes resultados indicam que o biomaterial na presença do alcoolismo não propiciou a neoformação óssea. Os fatores nocivos do álcool associados às propriedades físicas e químicas do biomaterial Bonafill® (tamanho dos poros, baixa cristalinidade e tamanho das partículas) podem ter limitado o crescimento ósseo.

Apesar de ser difícil a comparação do rato e o humano, além de gerar controvérsias (QUINN, 2005), várias pesquisas estabelecem uma relação de idades. Sendo assim, um dia do rato, na idade adulta, equivale a 30 dias de vida no homem, dessa forma 30 dias do rato corresponde a 2,5 anos no humano (GITTES, 1986; KLEE et al., 1990). Se fossem considerados esses dados, as partículas do biomaterial circundadas por osso observadas a partir dos 20 dias do rato seria o equivalente a 1 ano e 6 meses no humano, sendo que o fabricante (BIONNOVATION®, São Paulo, Brasil) afirma que o processo de crescimento ósseo ao redor das partículas do biomaterial Bonefill® ocorre entre 6-8 meses no homem. No entanto, existem diferentes fatores (fisiológicos, anatômicos e biológicos) que tem que ser considerados ao correlacionar estudos em animais com a vida humana (ANDREOLLO et al., 2012).

O processo de remodelação óssea é realizado por um difícil equilíbrio de reabsorção pelos osteoclastos, e deposição de osso lamelar pelos osteoblastos. Embora o processo tenha início em torno de três a quatro semanas em modelos animais e humanos, a remodelação pode levar anos para ser completada e alcançar uma estrutura óssea totalmente (WENDEBERG, 1961).

Em vista da necessidade de terapias regenerativas e reconstrutivas associadas ao alcoolismo, os enxertos ósseos tornam-se uma ferramenta útil na bioengenharia tecidual. O estudo dos biomateriais, disponíveis atualmente no mercado, fornecem dados *in vitro* necessários para conhecer o seu comportamento, reação biológica e viabilidade para seu uso clínico. Limitações ocorreram nesse estudo, como por exemplo, a ausência de testes imunológicos para avaliar marcadores ósseos e mensurar os níveis de fosfatase alcalina e cálcio além de testes sanguíneos da concentração do álcool para confirmação do grau de alcoolismo. Como perspectiva futura seria de grande aporte a combinação de biomateriais com fatores de crescimento para estimular o reparo ósseo, além da utilização de membranas biológicas com o intuito de evitar movimentações e deslocamentos do biomaterial enxertado.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Considerando a metodologia e os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

a-) O biomaterial Bonefill® não estimulou a nova formação de tecido ósseo em defeitos críticos;

b-) A dieta alcoólica não atingiu os seus efeitos deletérios na formação óssea, e os animais alcoolizados (GE) demonstraram formação de novo osso similar e sem diferença significativa em relação aos animais do GC (água).

c-) A dieta líquida de etanol, quando comparada à de água, interferiu negativamente na massa corporal dos animais, tanto no período inicial quanto no final do experimento.

Referências

REFERÊNCIAS**(Formato Vancouver)**

Addolorato G, Capristo E, Greco AV, Stefanini GF, Gasbarrini G. Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 Sep;21(6):962-7.

Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kuzushita N, Wands JR. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. *Gastroenterology*. 2007 Feb;132(2):698-708.

Alvisa-Negrín J, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, García-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, Pelazas-González R, Durán-Castellón MC, de Los Angeles Gómez-Rodríguez M. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol*. 2009 Sep-Oct;44(5):468-75.

Andreollo NA, Dos Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir*. 2012;25(1):49-51.

Axhausen W, Cohen J, Milch H. The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historial and experimental study. *J Bone Joint Surg Am*. 1956 Jun;38-A(3):593-600.

Bardag-Gorce F. Effects of ethanol on the proteasome interacting proteins. *World J Gastroenterol*. 2010 Mar;16(11):1349-57.

Best CA, Laposata M. Fatty acid ethyl esters: toxic non-oxidative metabolites of ethanol and markers of ethanol intake. *Front Biosci*. 2003 Jan 1;8:e202-17.

Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol*. 2008 Jun;9(2):73-80.

BIONNOVATION® - Bionnovation Produtos Biomédicos LTDA [homepage na internet]. Bauru, São Paulo. [acesso em 2015 dec 11]. Disponível em: <http://www.bionnovation.com.br/biomateriais.html>.

Bohman M. Some genetic aspects of alcoholism and criminality. *Arch Gen Psychiatry*. 1978;35(3):269-276.

Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*. 1998 Jul;9(4):310-6.

Boss JH, Shajrawi I, Aunullah J, Mendes DG. The relativity of biocompatibility. A critique of the concept of biocompatibility. *Isr J Med Sci*. 1995 Apr;31(4):203-9.

Bradley JP, Levine JP, McCarthy JG, Longaker MT. Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines in vitro cranial suture fusion. *Plast Reconstr Surg*. 1997 Oct;100(5):1091-9.

- Brunout D, Gattás V, Iturriaga H, Pérez C, Pereda T, Ugarte G. Nutritional status of alcoholic patients: it's possible relationship to alcoholic liver damage. *Am J Clin Nutr.* 1983 Sep;38(3):469-73.
- Buchaim RL, Buchaim DV, Andreo JC, Roque DD, Rodrigues AC. Efeitos de 3 dietas alcoólicas na reparação óssea em tibia de ratos. *Cienc Odontol Bras.* 2009 Abr-Jun;12(2):17-23.
- Buchaim RL. Ação da matriz óssea bovina desmineralizada na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: avaliação histológica e histométrica [Tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2011.
- Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Eur J Orthod.* 2001 Dec;23(6):733-40.
- Cadoret R, Gath A. Inheritance of alcoholism in adoptees. *Br J Psychiatry.* 1978 Mar;132:252-258.
- Camarini ET, Iamashita HY, Farah GJ, Iwaki Filho L, Pavan AJ. Utilização de biomateriais associados ou não ao plasma rico em plaquetas em cavidades ósseas craneanas. Estudo microscópico em cães. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2006 Maio-Ago;6(2):199-206.
- Carbonari M, Ludtke J, Dos Santos PCV, Carvalho NTA, Gehrke SA. Caracterização físico-química e biológica de enxerto ósseo bovino, Bonefill, em bioensaios-Parte 1. *ImplantNews.* 2009;6(6):679-83.
- Carneiro E, Garcia RB, Oliveira RC, Moraes FG, Menezes R, Letra A, Canova GC, Cestari TM, Granjeiro JM. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. *J Appl Oral Sci.* 2005 Jun;13(2):157-62.
- Carranza FA, McClain P, Schallhorn R. Cirurgia óssea regenerativa. In: Newman, M. G.; Takei H. H.; Carranza, F. A. *Periodontologia Clínica.* Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A; 9ª.ed: 2004. p. 717-732.
- Castro-Silva JL, Zambuzzi WF, Granjeiro JM. Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica. *Innov Implant J.* 2009 Set-Dez;4(3):70-75.
- Cestari TM, Granjeiro JM, de Assis GF, Garlet GP, Taga R. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Apr;20(4):340-50.
- Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Garvin KL, McGuire MH, Donohue TM. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol.* 2005b Jul;36(3):201-14.
- Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005a Dec;29(12):2077-90.

- Chavassieux P, Serre CM, Vergnaud P, Delmas PD, Meunier PJ. In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. *Bone Miner.* 1993 Aug;22(2):95-103.
- Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone.* 1995 Jan;16(1):143-7.
- Consolaro, A. *Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas.* Maringá: Dental Press; 1a. ed: 2009.
- Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Jun;125(6):1685-92.
- Curtis BJ, Zahs A, Kovacs EJ. Epigenetic targets for reversing immune defects caused by alcohol exposure. *Alcohol Res.* 2013;35(1):97-113.
- Da Silva RC, Joly JC, De Carvalho PFM. Características biológicas e aplicações clínicas dos biomateriais. In: Joly JC; Mesquita PFC; Silva RC. *Reconstrução tecidual estética: procedimentos plásticos e regenerativos periodontais e peri-implantares.* São Paulo: Artes Médicas; 2010. p.192-99.
- De Carvalho PSP, Rosa AL, Bassi APF, Pereira LAVD. Biomateriais aplicados a Implantodontia. *ImplantNews.* 2010;7(3a-PBA):56-65.
- De Oliveira RC, de Oliveira FH, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res.* 2008 Aug;19(8):749-54.
- De Vernejoul MC, Bielakoff J, Herve M. Evidence for defective osteoblastic function: a role for alcohol and tobacco smoking in osteoporosis in middle aged men. *Clinical Orthopaedics.* 1983;179:107-115.
- Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J.* 2009 Jul;28(4):396-400.
- Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology.* 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S63-74.
- Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Posen S. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med.* 1989 Mar;86(3):282-8.
- Díez-Ruiz A, García-Saura PL, García-Ruiz P, González-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fuchs D. Bone mineral density, bone turnover markers and cytokines in alcohol-induced cirrhosis. *Alcohol Alcohol.* 2010 Sep-Oct;45(5):427-30.
- Do Desterro Fde P, Sader MS, Soares GD, Vidigal GM Jr. Can inorganic bovine bone grafts present distinct properties? *Braz Dent J.* 2014;25(4):282-8.

- Do Desterro FP. Comparação das características físico-químicas de três ossos bovinos inorgânicos e seu comportamento in vitro [dissertação]. Duque de Caxias, (Rio de Janeiro): Universidade do Grande Rio; 2012.
- Dolganiuc A, Bakis G, Kodys K, Mandrekar P, Szabo G. Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006 Jan;30(1):76-85.
- Dopico AM. Ethanol sensitivity of BK(Ca) channels from arterial smooth muscle does not require the presence of the beta 1-subunit. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003 Jun;284(6):1468-80.
- Dym H, Huang D, Stern A. Alveolar bone grafting and reconstruction procedures prior to implant placement. *Dent Clin North Am*. 2012 Jan;56(1):209-18.
- Engin NO, Tas AC. Manufacture of Macroporous Calcium Hydroxyapatite Bioceramics, *Journal of The European Ceramic Society*. 1999 Oct;19(13-14):2569-72.
- Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010 Dec;11(4):219-27.
- Fábrega E, Orive A, García-Suarez C, García-Unzueta M, Antonio Amado J, Pons-Romero F. Osteoprotegerin and RANKL in alcoholic liver cirrhosis. *Liver Int*. 2005 Apr;25(2):305-10.
- Farley JR, Fitzsimmons R, Taylor AK, Jorch UM, Lau KH. Direct effects of ethanol on bone resorption and formation in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 1985 Apr;238(1):305-14.
- Faustino SE, Stipp AC. Effects of chronic alcoholism and alcoholic detoxication on rat submandibular glands: morphometric study. *J Appl Oral Sci*. 2003 Mar;11(1):21-6.
- Feitelberg S, Epstein S, Ismail F, D'Amanda C. Deranged bone mineral metabolism in chronic alcoholism. *Metabolism*. 1987 Apr;36(4):322-6.
- Friday KE, Howard GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*. 1991 Jun;40(6):562-5.
- Friedlaender GE. Bone grafts. The basic science rationale for clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 1987 Jun;69(5):786-90.
- Fry DE, Milholen L, Harbrecht PJ. Iatrogenic ureteral injury. Options in management. *Arch Surg*. 1983 Apr;118(4):454-7..
- Ganry O, Baudoin C, Fardellone P. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: The EPIDOS Study. *Epidémiologie de l'Ostéoporose. Am J Epidemiol*. 2000 Apr 15;151(8):773-80.
- García-Valdecasas-Campelo E, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, De la Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sánchez-Pérez MJ, Martínez-Riera A, Gómez-

Rodríguez Mde L. Serum osteoprotegerin and RANKL levels in chronic alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol*. 2006 May-Jun;41(3):261-6.

Gardner E. *Anatomia: Estudo Regional do Corpo Humano*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 4a. ed: 1998.

Gigliotti A, Bessa, MA. Síndrome de Dependência do Álcool: critérios diagnósticos. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004 Maio;26(1):11-13.

Gil-Martín E, Calvo P, Fernández-Briera A. Chronic alcoholization in rats by free-choice ingestion of a hydroalcoholic solution. *Food Chem Toxicol*. 1998 Nov;36(11):941-6.

Gil-Mohapel J, Boehme F, Kainer L, Christie BR. Hippocampal cell loss and neurogenesis after fetal alcohol exposure: insights from different rodent models. *Brain Res Rev*. 2010 Sep 24;64(2):283-303.

Gittes RF. Carcinogenesis in ureterosigmoidostomy. *Urol Clin North Am*. 1986 May;13(2):201-5.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan;45(1):14-24.

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 2001 Nov 16;107(4):513-23.

González-Calvín JL, Garcia-Sanchez A, Bellot V, Muñoz-Torres M, Raya-Alvarez E, Salvatierra-Rios D. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 1993 Sep;28(5):571-9.

González-Pérez JM, González-Reimers E, Durán-Castellón Mdel C, Santolaria-Fernández F, Galindo-Martín L, RosVilamajó R, de la Vega-Prieto MJ, Viña-Rodríguez J, Abreu-González P. Relative and combined effects of selenium, protein deficiency and ethanol on bone. *J Trace Elem Med Biol*. 2011 Apr;25(2):113-7.

González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, Fernández-Rodríguez CM, Quintero-Platt G. Alcoholism: a systemic proinflammatory condition. *World J Gastroenterol*. 2014 Oct 28;20(40):14660-71.

- Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiatry*. 1973 Feb;28(2):238-43.
- Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Chin GS, Steinbrech DS, Saadeh PB, Luchs JS, Paccione MF, Gittes GK, Longaker MT. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: immature versus mature dura mater. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Apr;105(4):1382-92.
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Dec;1092:385-96.
- Hames G. Alcohol in world history. London: Routledge; 1a. ed: 2012. p. 160.
- Hanson JW, Sayers MP, Knopp LM, Macdonald C, Smith DW. Subtotal neonatal calvariectomy for severe craniosynostosis. *J Pediatr*. 1977 Aug;91(2):257-60.
- Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw Hill; 12a. ed. 2012.
- Hidiroglou N, Camilo ME, Beckenhauer HC, Tuma DJ, Barak AJ, Nixon PF, Selhub J. Effect of chronic alcohol ingestion on hepatic folate distribution in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1994 Apr;47(9):1561-6.
- Hih MF, Taberner PV. Effects of acute and chronic ethanol administration on the response of mouse adipose tissue hormone-sensitive lipase to alpha(2)-adrenoceptor activation by UK 14304. *Alcohol Alcohol*. 2001 Sep-Oct;36(5):381-7.
- Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell*. 2005 May;8(5):727-38.
- Hjorting-Hansen E, Worsaae N, Lemons JE. Histologic response after implantation of porous hydroxylapatite ceramic in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1990 Fall;5(3):255-63.
- Hoensch H. Ethanol as enzyme inducer and inhibitor. *Pharmac Ther*. 1987 33(1):121-8.
- Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*. 1990 Jan;1(1):60-8.
- Hopper RA, Zhang JR, Fourasier VL, Morova-Protzner I, Protzner KF, Pang CY, Forrest CR. Effect of isolation of periosteum and dura on the healing of rabbit calvarial inlay bone grafts. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Feb;107(2):454-62.
- Horvath RO de, Da Silva TD, Calil Neto J, Nakagaki WR, Garcia JAD, Soares EA. Efeitos do alcoolismo e da desintoxicação alcoólica sobre o reparo e biomecânica óssea. *Acta Ortop Brás*. 2011 Abr;19(5):305-308.

-
- Hsu MK, Qiao L, Ho V, Zhang BH, Zhang H, Teoh N, Dent P, Farrell GC. Ethanol reduces p38 kinase activation and cyclin D1 protein expression after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*. 2006 Feb;44(2):375-82.
- Hyun SJ, Han DK, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK, Kim CS. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol*. 2005 Oct;76(10):1667-74.
- Ikeda N, Kawanabe K, Nakamura T. Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A-W glass-ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granule and pore sizes). *Biomaterials*. 1999 Jun;20(12):1087-95.
- Joly JC, Mesquita PFC, Silva RC. Reconstrução tecidual estética: procedimentos plásticos e regenerativos periodontais e peri-implantares. São Paulo: Artes Médicas; 2010. p.192-99
- Joschek S, Nies B, Krotz R, Göferich A. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials*. 2000 Aug;21(16):1645-58.
- Jung MK, Callaci JJ, Lauing KL, Otis JS, Radek KA, Jones MK, Kovacs EJ. Alcohol exposure and mechanisms of tissue injury and repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011 Mar;35(3):392-9.
- Junior JGB, Garrafa V. Bioethics and biosafety: the use of biomaterials in dental practices. *Rev Saúde Pública*. 2007 Abr;41(4):1-6.
- Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 9a. ed: 1999.
- Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001 Apr;10(4):1-4.
- Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474-91.
- Kasper FK, Young S, Tanahashi K, Barry MA, Tabata Y, Jansen JA, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration by DNA release from composites of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) and cationized gelatin microspheres in a critical-sized calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2006 Aug;78(2):335-42.
- Kendell RE. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. *Am J Psychiatry*. 1980 Dec;137(12):1630-31.
- Kim MJ, Nepal S, Lee ES, Jeong TC, Kim SH, Park PH. Ethanol increases matrix metalloproteinase-12 expression via NADPH oxidase-dependent ROS production in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 Nov 15;273(1):77-89.
- Klee LW, Hoover DM, Mitchell ME, Rink RC. Long term effects of gastrocystoplasty in rats. *J Urol*. 1990 Nov;144(5):1283-7.

- Klokkevold PR, Jovanovic SA. Técnicas avanzadas para cirugía de implantes e injerto óseo. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA. Periodontología Clínica. México: Mc Graw Hill; 9a. ed: 2004. P. 962.
- Köhnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol.* 2008 Jan 1;75(1):160-77.
- Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, Nagai N, Dohi Y, Ohgushi H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. *J Biomed Mater Res.* 1998 Feb;39(2):190-9.
- Laranjeira R, Nicastrí S, Jerônimo C, Marques AC. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Álcool (SAA) e o seu tratamento. *Rev Bras psiquiatr.* 2000 Jun; 22(2):62-71.
- Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008 Oct;58(5):424-30.
- Leraci A, Herrera DG. Single alcohol exposure in early life damages hippocampal stem/progenitor cells and reduces adult neurogenesis. *Neurobiol Dis.* 2007 Jun;26(3):597-605.
- Levi B, Nelson ER, Li S, James AW, Hyun JS, Montoro DT, Lee M, Glotzbach JP, Commons GW, Longaker MT. Dura mater stimulates human adipose-derived stromal cells to undergo bone formation in mouse calvarial defects. *Stem Cells.* 2011 Aug;29(8):1241-55.
- Li J, Wang HL. Common implant-related advanced bone grafting complications: classification, etiology, and management. *Implant Dent.* 2008 Dec;17(4):389-401.
- Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology.* 1989 Oct;10(4):501-10.
- Lieber CS, Jones DP, Decarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest.* 1965 Jun;44:1009-21.
- Lima I, Rocha MS, Lopes RT. Ethanol bone evaluation using 3D microtomography. *Micron.* 2008 Jul;39(5):617-22.
- Lindhe J, Karring TA. Anatomia do Periodonto. In: Lindhe J. Tratado de Periodontologia Clínica . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2a. ed: 1999.
- Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de Periodontia clínica e implantologia oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 5a. ed: 2010.
- Lindsey RW, Gugala Z, Milne E, Sun M, Gannon FH, Latta LL. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res.* 2006 Jul;24(7):1438-53.
- Liu L, Cao JX, Sun B, Li HL, Xia Y, Wu Z, Tang CL, Hu J. Mesenchymal stem cells inhibition of chronic ethanol-induced oxidative damage via upregulation of

phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and modulation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in PC12 cells and neurons. *Neuroscience*. 2010 Jun 2;167(4):1115-24.

Lorenz R, Jänicke-Lorenz J. Electron microscopic observation on osteocytes of chronically alcoholized rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1983;102(2):118-22.

Lu C, Hansen E, Sapozhnikova A, Hu D, Miclau T, Marcucio RS. Effect of age on vascularization during fracture repair. *J Orthop Res*. 2008 Oct;26(10):1384-9.

Lutolf MP, Weber FE, Schmoekel HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, Hubbell JA. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices. *Nat Biotechnol*. 2003 May;21(5):513-8.

Mabbutt LW, Kokich VG. Calvarial and sutural re-development following craniectomy in the neonatal rabbit. *J Anat*. 1979 Sep;129(Pt 2):413-22.

Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, Iwaniec UT. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int*. 2009 Sep;20(9):1529-38.

Maier H, Seitz HK, Mayer B, Adler D, Mall G, Born IA. Lipomatous atrophy of the parotid gland in chronic alcohol consumption. *Laryngorhinootologie*. 1990 Nov;69(11):600-4.

Malik P, Gasser RW, Kemmler G, Moncayo R, Finkenstedt G, Kurz M, Fleischhacker WW. Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 Feb;33(2):375-81.

Malik P. Alkoholinduzierte Reaktion der Knochenmineraldichte: eine Übersicht. *J Miner Stoffwechs*. 2008;15:123–8.

Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg*. 2014 Oct-Dec; 13(4):464–70.

Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells*. 2006; Sep;24(9):2140-9.

Marchini AMPS. Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a variação de estequiometria da hidroxiapatita na crista ossea alveolar de ratas [dissertacao]. Sao Jose dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista; 2010.

Marques JM, Viegas C, Dias MI, Zagalo C, Gomes P, Fernandes MH. Modified model of sub-critical size cranial defect in the rabbit. *Int J Morphol*. 2010;28:525–8.

Maurel DB, Benaitreau D, Jaffré C, Toumi H, Portier H, Uzbekov R, Pichon C, Benhamou CL, Lespessailles E, Pallu S. Effect of the alcohol consumption on

- osteocyte cell processes: a molecular imaging study. *J Cell Mol Med.* 2014 Aug;18(8):1680-93.
- Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.* 2012a Jan;23(1):1-16.
- Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Cortical bone is more sensitive to alcohol dose effects than trabecular bone in the rat. *Joint Bone Spine.* 2012b Oct;79(5):492-9.
- Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, Dolleans E, Benhamou CL, Jaffre C. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: study in a rat model. *Eur J Appl Physiol.* 2011a Dec;111(12):2931-40.
- Maurel DB, Jaffre C, Rochefort GY, Aveline PC, Boisseau N, Uzbekov R, Gosset D, Pichon C, Fazzalari NL, Pallu S, Benhamou CL. Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia. *Bone.* 2011b Sep;49(3):543-52.
- Mazzonetto R, Duque Neto H, Nascimento FF. *Enxertos ósseos em implantodontia.* Nova Odessa: Napoleão; 1a. Ed: 2012.
- Meek'ren JJV. *Observations Medico-Chirurgicae.* Amsterdam: H & T Boon, 1632; apud Yaszemski MJ, Payne RG, Hayes WC, Langer R, Mikos AG. Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone. *Biomaterials.* 1996 Jan;17(2):175-85.
- Mehrara BJ, Most D, Chang J, Bresnick S, Turk A, Schendel SA, Gittes GK, Longaker MT. Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta-1 expression in the developing dura mater correlates with calvarial bone formation. *Plast Reconstr Surg.* 1999 Aug;104(2):435-44.
- Mikosch P. Alcohol and bone. *Wien Med Wochenschr.* 2014 Jan;164(1-2):15-24.
- Miller MW. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995 Dec;19(6):1500-9.
- Moraes E, Campos GM, Figlie NB, Laranjeira R, Ferraz MB. Conceitos introdutórios de economia da saúde e o impacto social do abuso de álcool. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006 Dez;28(4):321-325.
- Nagem Filho H N, Nagem HD, D'Aazevedo MTF, Fiuza CT. Neoformação do tecido ósseo. *Dental Science.* 2009 3(9):86-93.
- Nakashima K, de Crombrughe B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.* 2003 Aug;19(8):458-66.
- Nyquist F, Ljunghall S, Berglund M, Obrant K. Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone.* 1996 Jul;19(1):51-4.

- Okamoto M, Dohi Y, Ohgushi H, Shimaoka H, Ikeuchi M, Matsushima A, Yonemasu K, Hosoi H. Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Apr;17(4):327-36.
- Oliva J, Dedes J, Li J, French SW, Bardag-Gorce F. Epigenetics of proteasome inhibition in the liver of rats fed ethanol chronically. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(6):705-12.
- Oury FA. Crosstalk between bone and gonads. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 Jul;1260(1):1-7.
- Passaglia P, Ceron CS, Mecawi AS, Antunes-Rodrigues J, Coelho EB, Tirapelli CR. Angiotensin type 1 receptor mediates chronic ethanol consumption-induced hypertension and vascular oxidative stress. *Vascul Pharmacol*. 2015 Nov;74:49-59.
- Perrien DS, Liu Z, Wahl EC, Bunn RC, Skinner RA, Aronson J, Fowlkes J, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Chronic ethanol exposure is associated with a local increase in TNF-alpha and decreased proliferation in the rat distraction gap. *Cytokine*. 2003 Sep 21;23(6):179-89.
- Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*. 2006 Apr;24(2):169-78.
- Pollock R, Alcelik I, Bhatia C, Chuter G, Lingutla K, Budithi C, Krishna M. Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *Eur Spine J*. 2008 Jun;17(6):845-52.
- Polo TOB, Ponzoni D, Aranega AM, De Carvalho PSP. Análise histomorfométrica do processo de reparo de cavidades cirúrgicas preenchidas com osso inorgânico de origem bovina (Bonfill®) em tíbia de ratos. *Braz Oral Res*. 2011 Sep;25(1):107-28.
- Porto GG, Vasconcelos BC, Andrade ES, Carneiro SC, Frota MS. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical? *Acta Cir Bras*. 2012 Nov;27(11):757-60.
- Qiu QQ, Mendenhall HV, Garlick DS, Connor J. Evaluation of bone regeneration at critical-sized calvarial defect by DBM/AM composite. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 May;81(2):516-23.
- Quinn, 2005 R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005 Jun;21(6):775-7
- Rabin RA, Acara MA. Regulation of Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase by chronic ethanol exposure of PC 12 cells. *Biochem Pharmacol*. 1993 Apr 22;45(8):1653-8.
- Radek KA, Kovacs EJ, Gallo RL, DiPietro LA. Acute ethanol exposure disrupts VEGF receptor cell signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H174-84.

- Radek KA, Matthies AM, Burns AL, Heinrich SA, Kovacs EJ, Dipietro LA. Acute ethanol exposure impairs angiogenesis and the proliferative phase of wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Sep;289(3):H1084-90.
- Reichert JC, Epari DR, Wullschleger ME, Saifzadeh S, Steck R, Lienau J, Sommerville S, Dickinson IC, Schütz MA, Duda GN, Hutmacher DW. Establishment of a preclinical bovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Feb;16(1):93-104.
- Ronis MJ, Mercer K, Chen JR. Effects of nutrition and alcohol consumption on bone loss. *Curr Osteoporos Rep*. 2011 Jun;9(2):53-9.
- Ross MH, Romrell LJ. *Histologia: Texto e Atlas*. São Paulo: Médica Panamericana; 1993 (Figura 2).
- Sampson HW. Alcohol's harmful effects on bone. *Alcohol Health Res World*. 1998;22(3):190-4.
- Samson HH, Harris RA. Neurobiology of alcohol abuse. *Trends Pharmacol Sci*. 1992 May;13(5):206-11.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986 Apr;(205):299-308.
- Schmitz JP, Schwartz Z, Hollinger JO, Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)*. 1990;138(3):185-92.
- Schnitzler CM, Solomon L. Bone changes after alcohol abuse. *S Afr Med J*. 1984;66:730-4.
- Schuckit MA. Alcohol y Alcoholismo. In: kasper D. L.; Fauci A.S.; Longo D. L. *Harrison Principios de Medicina Interna*. México: Mac Graw Hill; 16a. ed: 2005 p. 3546-51.
- Schuckit MA. Alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009 Feb 7;373(9662):492-501.
- Seitz HK, Poschl G, Salaspuro M. Interaction of alcohol and tobacco. In: Cho CH, Purohit V. *Alcohol tobacco and cancer*. Suíça: Karger; 1a. ed: 2006.
- Seth D, D'Souza El-Guindy NB, Apte M, Mari M, Dooley S, Neuman M, Haber PS, Kundu GC, Darwanto A, de Villiers WJ, Vonlaufen A, Xu Z, Phillips P, Yang S, Goldstein D, Pirola RM, Wilson JS, Moles A, Fernández A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC, Meyer C, Meindl-Beinker NM. Alcohol, signaling, and ECM turnover. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010 Jan;34(1):4-18.
- Sévère N, Dieudonné FX, Marie PJ. E3 ubiquitin ligase-mediated regulation of bone formation and tumorigenesis. *Cell Death Dis*. 2013 Jan;17(4):e463.
- Shih MF, Taberner PV. Dose-dependent effects of chronic ethanol on mouse adipose tissue lipase activity and cyclic AMP accumulation. *Br J Pharmacol*. 1997 Feb;120(4):721-7.

- Shih MF, Taberner PV. Effects of acute and chronic ethanol administration on the response of mouse adipose tissue hormone-sensitive lipase to alpha(2)-adrenoceptor activation bu UK 14304. *Alcohol Alcohol*. 2001 Sep-Oct;36(5):381-7.
- Shukla SD, Aroor AR. Epigenetic effects of ethanol on liver and gastrointestinal injury. *World J Gastroenterol*. 2006 Sep 7;12(33):5265-71.
- Shulman A, Wolf R. Alcohol ingestion, hormonal changes, and the skin. *Clin Dermatol*. 1999 Jul-Aug;17(4):405-9.
- Silveira RL, Machado RA, Silveira CR, Oliveira RB. Bone repair process in calvarial defects using bioactive glass and calcium sulfate barrier. *Acta Cir Bras*. 2008 Jul-Aug;23(4):322-8.
- Singer MV, Brenner DA. *Alcohol and the gastrointestinal tract*. Basel Suíça: Karger; 2005.
- Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Oct;7(10):1918-29.
- Stanley B, Prusiner. Prions. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Nov;95: 13363–13383.
- Stephan EB, Jiang D, Lynch S, Bush P, Dziak R. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. *J Periodontol*. 1999 Apr;70(4):364-9.
- Stevenson S, Emery SE, Goldberg VM. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res*. 1996 Mar;(324):66-74.
- Szabo G, Dolganiuc A, Dai Q, Pruett SB. TLR4, ethanol, and lipid rafts: a new mechanism of ethanol action with implications for other receptor-mediated effects. *J Immunol*. 2007 Feb;178(3):1243-9.
- Ten Cate NA. *Histologia Oral: Desenvolvimento, Estrutura e Função*. Rio de Janeiro: Elsevier; 7a. ed: 2008.
- Therapondos G, Delahooke TES, Hayes PC. Health effects of alcohol and alcoholism. *Clin Dermatol*. 1999 Jul-Aug;17(4):381-389.
- Tirapelli CR, Casolari DA, Yogi A, Tostes RC, Legros E, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM. Effect of chronic ethanol consumption on endothelin-1 generation and conversion of exogenous big-endothelin-1 by the rat carotid artery. *Alcohol*. 2007a Mar;41(2):77-85.
- Tirapelli CR, Legros E, Brochu I, Honoré JC, Lanchote VL, Uyemura SA, de Oliveira AM, D'Orléans-Juste P. Chronic ethanol intake modulates vascular levels of endothelin-1 receptor and enhances the pressor response to endothelin-1 in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol*. 2008a Jul;154(5):971-81.
- Tirapelli CR, Leone AF, Coelho EB, Resstel LB, Corrêa FM, Lanchote VL, Uyemura SA, Padovan CM, de Oliveira AM. Effect of ethanol consumption on blood pressure

and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J Pharm Pharmacol.* 2007b Jul;59(7):985-93.

Tirapelli CR, Leone AF, Yogi A, Tostes RC, Lanchote VL, Uyemura SA, Resstel LB, Corrêa FM, Padovan CM, de Oliveira AM, Coelho EB. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2008b Mar;60(3):331-41.

Tirapelli LF, Tamega OJ, Petroni S. Ultrastructural alterations of choroid plexuses of lateral ventricles of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Arq Neuropsiquiatr.* 2000 Mar;58(1):25-31.

Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K, Ho E, Iwaniec UT. Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone.* 2007 Aug;41(2):175-80.

Tsonis PA. Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation.* 2002 Oct;70(8):397-409.

Turner RT, Greene VS, Bell NH. Demonstration that ethanol inhibits bone matrix synthesis and mineralization in the rat. *J Bone Miner Res.* 1987 Feb;2(1):61-6.

Udoh US, Swain TM, Filiano AN, Gamble KL, Young ME, Bailey SM. Chronic ethanol consumption disrupts diurnal rhythms of hepatic glycogen metabolism in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015 Jun 1;308(11):G964-74.

Venken K, Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporos Int.* 2008 Nov;19(11):1517-25.

Verna C, Dalstra M, Wikesjö UM, Trombelli L; Carles Bosch. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats. A micro-CT scan analysis. *J Clin Periodontol.* 2002 Sep;29(9):865-70.

Vonghia L, Leggio L, Ferrulli A, Bertini M, Gasbarrini G, Addolorato G; Alcoholism Treatment Study Group. Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern Med.* 2008 Dec;19(8):561-7.

Wahl EC, Aronson J, Liu L, Liu Z, Perrien DS, Skinner RA, Badger TM, Ronis MJ, Lumpkin CK Jr. Chronic ethanol exposure inhibits distraction osteogenesis in a mouse model: role of the TNF signaling axis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 May ;220(3):302-10.

Wahl EC, Liu L, Perrien DS, Aronson J, Hogue WR, Skinner RA, Hidestrand M, Ronis MJ, Badger TM, Lumpkin CK Jr. A novel mouse model for the study of the inhibitory effects of chronic ethanol exposure on direct bone formation. *Alcohol.* 2006 Jul;39(3):159-67.

Waldschmidt TJ, Cook RT, Kovacs EJ. Alcohol and inflammation and immune responses: summary of the 2005 Alcohol and Immunology Research Interest Group (AIRIG) meeting. *Alcohol.* 2006 Feb;38(2):121-5.

Wang Y, Li Y, Mao K, Li J, Cui Q, Wang GJ. Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 May;(410):213-24.

Wendeberg B. Mineral metabolism of fractures of the tibia in man studied with external counting of Sr85. *Acta Orthop Scand Suppl*. 1961;52:1-79.

Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(12):1599-606.

West JR, Hamre KM, Cassell MD. Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986 Mar-Apr;10(2):190-7.

Wezeman FH, Emanuele MA, Moskal SF, Steiner J, Lapaglia N. Alendronate administration and skeletal response during chronic alcohol intake in the adolescent male rat. *J Bone Miner Res*. 2000 Oct;15(10):2033-41.

Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53.

Winn SR, Schmitt JM, Buck D, Hu Y, Grainger D, Hollinger JO. Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jun 15;45(4):414-21.

Wolf HF, Rateitschak KH. *Periodontia*. Porto Alegre: Artmed; 3. Ed: 2006.

Wolf R, Tüzün B, Tüzün Y. Alcohol ingestion and the cutaneous vasculature. *Clin Dermatol*. 1999 Jul-Aug;17(4):395-403.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) [homepage da internet]. Country profiles. Geneva: World Health Organization; 2015a [acesso em 2015 abr 4]. Disponível em:http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/ms_gsr_2014_2.pdf?ua=1.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) [homepage na internet]. Global Information System on Alcohol and Health (GISAH). Geneva: World Health Organization; 2015b [acesso em 2015 abr 4]. Disponível em: <http://www.who.int/gho/alcohol/en/>.

Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Implants Res*. 2003 Oct;14(5):548-55.

Zahs A, Cook RT, Waldschmidt TJ, Choudhry MA, Kovacs EJ, Bird MD. Alcohol and inflammation and infection: clinical and experimental systems--summary of the 2010 Alcohol and Immunology Research Interest Group Meeting. *Alcohol*. 2012 Mar;46(2):147-53.

Zhang H, Zhang F, Zhu Z, Luong D, Meadows GG. Chronic alcohol consumption enhances iNKT cell maturation and activation. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2015 Jan 15;282(2):139-50.

Zimatkin SM, Phedina EM. Influence of chronic alcohol consumption on hitaminergic neurons of the rat brain. *Alcohol Alcohol.* 2015 Jan;50(1):51-5.

Anexos

ANEXO A – Ofício de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais



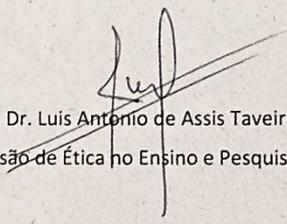
CEEPA-Proc. Nº 023/2012

Bauru, 24 de setembro de 2012.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Ação da matriz inorgânica de osso bovino (Bonefill®) na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental. Análise histológica e morfométrica**, de autoria de Íris Jasmin Santos German Borgo, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO "ad referendum"** desta Comissão, nesta data.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Prof. Dr. Luis Antonio de Assis Taveira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>