KARINA TORRES POMINI PUZIPE

Reparação óssea com o uso do beta fosfato tricálcico (β -tcp)® na calota craniana de ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Análises histomorfológica e histomorfométrica

KARINA TORRES POMINI PUZIPE

Reparação óssea com o uso do beta fosfato tricálcico (β -tcp)® na calota craniana de ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Análises histomorfológica e histomorfométrica

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 Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

BAURU
2016

P989r   Puzipe, Karina Torres Pomini
Reparação óssea com o uso do beta fosfato
tricálcico (β -tcp)® na calota craniana de ratos
submetidos ao alcoolismo experimental: Análises
histomorfológica e histomorfométrica / Karina Torres
Pomini Puzipe. – Bauru, 2016.
139 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Doutorado/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/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 022/2012
Data: 24/09/2012

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

“Todas as coisas são feitas de acordo com o plano e com a decisão de Deus”.

Efésios 1:11

Obrigada “Senhor” por encontrar em ti a verdadeira paz e por ser o único capaz de me proteger a todo e qualquer instante; sempre me dando força nas horas mais difíceis. Obrigada “Senhor” por me conceder mais essa conquista em minha vida!!!

A minha mãe, Vera Lúcia Pereira Torres, minha amiga fiel, companheira, meu exemplo de luta e perseverança. Meu infinito agradecimento aos ensinamentos de vida, por me passar força nos momentos mais difíceis e por sempre acreditar na minha capacidade.

Ao meu pai, José Clorivaldo Pomini (in memoriam), meu eterno agradecimento pela dedicação enquanto estive ao meu lado.

Ao meu marido, Rodrigo Puzipe, agradecimento especial por sempre estar ao meu lado, incentivando e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Através da sua dedicação e confiança este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho.

Aos meus irmãos, Thaís Torres Pomini Altúrria e Otávio Torres Pomini, obrigado pelo incentivo e orgulho que sempre tiveram de mim.

À minha cunhada, Eliana Puzipe, meu agradecimento pelo apoio incondicional.

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

“Homem de êxito é aquele que procura oferecer o que há de melhor em si mesmo, pois o que conta não é o sucesso que se vê é, ainda, dar-se sem reservas, crescer nesse dom generoso e, sobretudo fazer os outros crescerem”.

Luther J. Lebre

Gostaria de descrever resumidamente a minha caminhada até aqui. Teve início no ano 2000, com a graduação no Programa de Educação Tutorial, PET. Nessa fase, comecei a nutrir o sonho de prosseguir na vida acadêmica. Porém, nem sempre só a nossa vontade é o que nos move. Com alguns tristes acontecimentos em minha vida, retardei meu sonho por alguns anos. E, em uma conversa casual com a Profa. Dra. Roberta Okamoto, tive a oportunidade de voltar a sonhar.

Foi através dela que conheci meu orientador, Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim. E então, as portas foram abertas para que eu pudesse realizar este grande sonho.

Prof. Rogério, você é um dos grandes responsáveis por este momento tão especial em minha vida. Talvez, apenas dizer a palavra “Obrigada” não consiga transmitir minha verdadeira gratidão.

Profa. Dra. Roberta Okamoto, obrigada por ter acreditado em minha capacidade. Sua frase: “Você é uma aluna esforçada que todo orientador gostaria de ter”, me impulsionou a olhar para frente e acreditar.

Aos Professores da banca examinadora; Prof. Dr. Leonardo Rígoldi Bonjardim, Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo e Profa. Dra. Roberta Okamoto obrigada por aceitarem meu convite e por sugerir melhorias no trabalho. Fico lisonjeada por fazerem parte dessa etapa tão especial da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues, obrigada pelo carinho e disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

“Assim como os perfumes alegram a vida, a amizade sincera dá ânimo para viver”.

Provérbios 27:9

À minha amiga Íris Jasmín Santos Germán Borgo. Muito obrigada por estar em todos os momentos dessa trajetória, me apoiando, ensinando, acolhendo e acima de tudo sempre me impulsionando a olhar pra frente e acreditar que não existem barreiras quando se tem humildade e força de vontade.

Aos demais amigos que fiz no mestrado, Letícia Rossi Daré, Mízael Pereira, Dayane Maria Braz Nogueira, Idvaldo Favareto Júnior, Marcelie Priscila de Oliveira Rosso, Cleuber Rodrigo de Souza Bueno e a Jéssica Barbosa de Oliveira Gonçalves meus sinceros agradecimentos pela ajuda, dedicação, companheirismo e amizade. Levo comigo um pouco de cada um de vocês.

Aos Profs. Drs. Daniel Ventura Dias e Geraldo Marco Rosa Júnior, o agradecimento pela amizade e por todo auxílio quando solicitado.

A todos os funcionários do laboratório de Anatomia, obrigada pela paciência e pelo fiel apoio em todos os momentos práticos da pesquisa.

A todos os funcionários do laboratório de Histologia, obrigada por me acolher tão carinhosamente e por me amparar brilhantemente desde a confecção das lâminas até as análises histológicas. Um agradecimento especial a Dra. Tânia Mary Cestari.

A todos os funcionários do Biotério Central FOB-USP, obrigada pelo excepcional apoio técnico.

Em fim, a todos que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho e a aos amigos que me apoiaram no crescimento profissional, OBRIGADA!!!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo;

Ao laboratório de Anatomia do Departamento de Ciências Biológicas da FOB-USP;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudos de Mestrado.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para
que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

O uso crônico de etanol prejudica diretamente o processo biológico de reparo ósseo, principalmente pela inibição das células osteoblásticas, podendo causar retardo de consolidação ou pseudoartrose. Vários biomateriais naturais ou sintéticos, têm sido utilizados como uma alternativa aos enxertos ósseos. Os biomateriais sintéticos, como o Beta Fosfato Tricálcico (β -TCP) são biocompatíveis, biodegradáveis e osteocondutíveis, por orientar as células osteoblásticas, promovendo a neoformação óssea. Sendo assim, objetivou-se avaliar a influência da ingestão crônica de etanol no processo de reparo ósseo de defeitos cranianos tratados com β -TCP® comparativamente aos preenchidos com coágulo sanguíneo e a sua interferência sobre a massa corporal. Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: GAG - receberam água como dieta líquida, e GAL - receberam etanol a 25%. O GAL foi submetido inicialmente à adaptação gradativa ao álcool e depois permaneceu a 25% por 90 dias. Após o término desse período, todos os animais foram submetidos à cirurgia experimental. Nos ossos parietais de cada animal, foram confeccionadas duas cavidades 5,0 mm de diâmetro ao lado da sutura sagital, de forma que o parietal direito foi preenchido com β -TCP® e o esquerdo com coágulo. Dessa forma, os grupos GAG e GAL foram divididos de acordo com o preenchimento dos defeitos: GC-AG (Grupo Coágulo Água), GC-AL (Grupo Coágulo Álcool), GB-AG (Grupo Biomaterial Água) e GB-AL (Grupo Biomaterial Álcool). O reparo ósseo foi observado de acordo com o período de eutanásia: 10, 20, 40 e 60 dias após a cirurgia. Após inclusão histológica, as peças foram submetidas à análises histomorfológica e histomorfométrica. Na análise da variação da massa corporal, observou-se que as massas iniciais do GAG foram maiores que GAL e as massas finais de GAG aumentou significativamente apenas em 60 dias e no GAL em todos os períodos. Na análise histomorfológica, observou-se nos períodos iniciais de todos os grupos a presença de tecido conjuntivo fibroso preenchendo toda área central do defeito. Os grupos com os defeitos preenchidos com β -TCP apresentaram tecido reacional com as partículas envoltas por células inflamatórias. No período final de análise, observou-se em todos os grupos pequena neoformação óssea com a área central preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Nos grupos GC-AL, GB-AG e GB-AL

---

evidência de reação inflamatória menos intensa. Na análise histomorfométrica em relação à influência do tempo na neoformação óssea, os grupos GC-AG e GC-AL apresentaram o mesmo perfil gráfico em todos os períodos exceto 60 dias. O grupo GB-AG houve aumento substancial de neoformação em todo experimento e GB-AL pequeno aumento, mas não foi significativo. Em relação à interferência da dieta, observou-se maior percentual de formação óssea nos grupos que consumiram água nos períodos 40 e 60 dias. E em relação ao tipo de preenchimento, observou-se no grupo GC-AG maior formação nos períodos de 20 e 40 dias. Já nos GB-AG e GB-AL a formação foi similar durante todo experimento. Conclui-se que o β -TCP® não foi capaz de contribuir para melhor regeneração óssea, apresentando desempenho inferior nos animais que consumiram álcool.

Palavras-chave: Etanol, tecido ósseo, biomateriais, substitutos ósseos

---

ABSTRACT

Bone repair with the use of beta tricalcium phosphate (β -TCP®) in the calvarial defect of rats submitted to experimental alcoholism. histological and morphometric analysis

Chronic use of ethanol directly affects the biological process of bone repair, primarily by inhibition of osteoblastic cells. This may cause delayed consolidation or nonunion. Various natural and synthetic biomaterials have been used as alternatives to bone grafting. Synthetic biomaterials such as beta tricalcium phosphate (β -TCP) are biocompatible, biodegradable, and osteoconductive, guiding osteoblastic cells and promoting bone formation. Thus, the objective was to evaluate the influence of chronic ethanol intake on the bone healing process of cranial defects treated with β -TCP® compared to those filled with blood clot. Forty male rats were used (*Rattus norvegicus*), randomly divided into two groups: GAG received water as a liquid diet, and GAL received 25% ethanol. The GAL group was initially subjected to gradual adaptation to the alcohol and then maintained at 25% for 90 days. At the end of this period, all animals were submitted to experimental surgery. In the parietal bone of each animal, two cavities were prepared, 5.0 mm in diameter on the side of the sagittal suture, and the right parietal was filled with β -TCP® and left to clot. Thus, the GAG and GAL groups were divided according to the filling of defects: GC-AG (Clot Water Group); GC-AL (Clot Alcohol Group); GB-AG (Biomaterial Water Group); and GB-AL (biomaterial Alcohol Group). The bone repair was observed according to the euthanasia period: 10; 20; 40; and 60 days after surgery. After a histological inclusion, the pieces were submitted to histomorphological and histomorphometric analysis. The histomorphological analysis was observed in the initial periods of all groups' fibrous connective tissue filling the entire central area of the defect. The groups of defects filled with β -TCP showed tissue reaction to particles surrounded by inflammatory cells. At the end of the period of analysis, it was observed that in all groups there was little bone formation, with the central area filled with fibrous connective tissue. In the GC-AL, GB-AG, and GB-AL groups there was evidence of less intense inflammatory reaction. In histomorphometric analysis regarding the influence of time in osteogenesis, the GC-AG and GC-AL groups had the same

---

---

graphic profile in all periods except 60 days. In the GB-AG group there was a substantial increase of formation in every experiment, and in the GB-AL a small increase, but it was not significant. Regarding the influence of diet, there was a higher percentage of bone formation in the group that consumed water in the 40- and 60-day periods, and in the type of filling, increased formation in the periods of 20 and 40 days was observed in the GC-AG group. In the GB-AG and GB-AL groups, the formation was similar throughout the experiment. It is concluded that the β -TCP® was not able to contribute to better bone regeneration, with underperformance in animals that consumed alcohol.

Keywords: Ethanol, bone, biomaterials, bone substitutes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Fig. 1	Via de sinalização Wnt/ β -catenina: efeitos diretos do álcool sobre o tecido ósseo.	21
Fig. 2	Alvo do etanol na Via de sinalização Canônica Wnt durante o reparo de fratura óssea.	22
Fig. 3	Resumo das vias de metabolização do etanol.	28
Fig. 4	Mecanismos que estão implicados na perda óssea devido ao consumo crônico de etanol.....	34
Fig. 5	Demonstração esquemática dos mecanismos A- osteoindução, B- osteoindução e C- osteogênese.	37
Fig. 06	A) Penetração de vasos sanguíneos e de células formadoras de osso no biomaterial; B) Regeneração do osso novo no biomaterial.....	41
Fig. 07	Crescimento e desenvolvimento celular sobre a superfície e para o interior da microporosidade do β -TCP – microscópio eletrônico de varredura.....	43
Fig. 08	4 animais/gaiola identificadas conforme a ingestão de álcool ou água.	53
Fig. 09	Esquema do período de adaptação e alcoolização.....	55
Fig. 10	Esquema do Procedimento Cirúrgico e Períodos de Eutanásia.....	55
Fig. 11	A- Materiais utilizados no procedimento cirúrgico; B- Aplicação de Anasedan® e Dopalen®; C- tricotomia da área cirúrgica.	57
Fig. 12	Marcação da orelha do animal.	59
Fig. 13	A- Perfuração nos pavilhões auriculares; B- Infiltração de anestésico com vasoconstrictor; C- Incisão 20mm; D- Divulsão do periósteo.....	61

Fig. 14	A) Confeção dos defeitos nos ossos parietais com broca trefina 5mm; B) Exposição da área cirúrgica; C) Retirada do fragmento ósseo; D) Cavidade com coágulo no parietal esquerdo e β -TCP ® no parietal a direito.....	63
Fig. 15	A) β -TCP ® , Bionnovation Biomedical, SP, Brasil, cerâmica granulada (0,1--5mm/0,5g); B) Pesagem em balança analítica (MicroNal ® Equipamentos de Precisão, SP, Brasil).....	65
Fig. 16	A) Sutura do plano profundo (periósteo) com fio de nylon 5.0 (Mononylon ® Somerville S.A); B) Reposicionamento do periósteo sobre a área cirúrgica; C) Sutura do plano superficial (pele) com fio seda 4.0 (Ethicon ® Johnson & Johnson Company); D) Animal exposto a luz incandescente após cirurgia.	67
Fig. 17	A) Exposição da área cirúrgica coberta com periósteo; B) Remoção da calvária com broca esférica 3 Kgs ® (Kg Sorensen, SP, Brasil); C) Ossos Parietais com tecidos moles suprapariosteais.	69
Fig. 18	A- Radiografia para confirmar a desmineralização das calotas cranianas; B- Inclusão dos fragmentos em blocos de parafina; C- Micrótomos Leica ® RM 2245; D- Computador com microscópio óptico (OLYMPUS BX-50) e câmera fotográfica acoplada (OLYMPUS DP-71).....	71
Fig. 19 A	Área total do defeito (A _T); B - Área da neoformação óssea 1 e 2 (A _{NO}). Programa Image J ® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.7_67; 64-bit)	73
Fig. 20	Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com coágulo sanguíneo que receberam como dieta líquida água (GC-AG) nos diferentes períodos experimentais. Tegumento (TE); Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Neoformação óssea – osso imaturo (asterisco); Tecido conjuntivo frouxo (TC). Coloração H.E., objetivas 4x (A ₁ , B ₁ , C ₁ e D ₁) e 40x (A ₂ , B ₂ , C ₂ e D ₂).	81

Fig. 21	Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com coágulo sanguíneo que receberam como dieta líquida álcool a 25% (GC-AL) nos diferentes períodos experimentais. Tegumento (TE); Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Tecido reacional (TR); Tecido conjuntivo frouxo (TC); Formação óssea - osso imaturo (asterisco); Fragmentos de tecido ósseo trefinado (FO); Processo inflamatório (área oval tracejada). Coloração H.E., objetivas 4x (A ₁ , B ₁ , C ₁ e D ₁) e 40x (A ₂ , B ₂ , C ₂ e D ₂).....	85
Fig. 22	Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com o β -TCP ® (Bionnovation) que receberam como dieta líquida água (GB-AG) nos diferentes períodos experimentais Tegumento (TE); Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Tecido reacional (TR); Tecido conjuntivo frouxo (TC); Formação óssea - osso imaturo (asterisco). Coloração H.E., objetivas 4x (A ₁ , B ₁ , C ₁ e D ₁) e 40x (A ₂ , B ₂ , C ₂ e D ₂).....	89
Fig. 23	Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com o β -TCP ® (Bionnovation) que receberam como dieta líquida álcool a 25% (GB-AL) nos diferentes períodos experimentais. Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Tecido reacional (TR); Formação óssea - osso imaturo (asterisco). Coloração H.E., objetivas 4x (A ₁ , B ₁ , C ₁ e D ₁) e 40x (A ₂ , B ₂ , C ₂ e D ₂).	93
Fig. 24	Gráfico do percentual de formação óssea (%) nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental: ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e <i>post hoc</i> teste de Tukey. Letras diferentes p<0.05, N=5 defeitos/período.	97
Fig. 25	Gráfico do percentual de formação óssea nos animais alcoolizados e não alcoolizados para cada tratamento (coágulo e biomaterial): Teste “t” para amostras independentes. Asterisco p<0,05, N=5 defeitos/período para cada grupo.	98
Fig. 26	Gráfico 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. Asterisco p<0,05, N=5 defeitos/período para cada grupo.	99

LISTA DE TABELAS

Tab. 1: Propriedades de cada tipo de enxerto em relação aos mecanismos de neoformação (Adaptada MISCH, 2000).	39

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	ETANOL	27
2.2	METABOLISMO DO ETANOL.....	27
2.3	TECIDO ÓSSEO E AÇÃO DO ETANOL	30
2.3.1	HISTOLOGIA ÓSSEA	30
2.3.2	REPARO, REGENERAÇÃO E CICATRIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO.....	31
2.3.3	AÇÃO DO ÁLCOOL NO TECIDO ÓSSEO	32
2.3.4	EFEITOS DIRETOS	33
2.3.5	EFEITOS INDIRETOS.....	35
2.4	SUBSTITUTOS ÓSSEOS	36
2.5	CARACTERÍSTICAS IDEAIS DE UM SUBSTITUTO ÓSSEO	37
2.6	TIPOS DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS.....	38
2.7	RESPOSTA BIOLÓGICA AOS ENXERTOS ÓSSEOS	39
2.7.1	FASE DE ORGANIZAÇÃO DO COÁGULO.....	39
2.7.2	FASE INFLAMATÓRIA.....	39
2.7.3	FASE DE REVASCULARIZAÇÃO.....	40
2.7.4	FASE DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....	40
2.8	SUBSTITUTOS ÓSSEOS À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO	41
3	PROPOSIÇÃO	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	51
4.2	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
4.3	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	57

4.4	EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES.....	67
4.5	ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	71
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
4.6.1	ANÁLISE QUANTITATIVA	75
5	RESULTADOS	77
5.1	RESULTADOS CLÍNICOS	79
5.2	OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS	79
5.2.1	GRUPO COÁGULO ÁGUA (GC-AG) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 20).....	79
5.2.2	GRUPO COÁGULO ÁLCOOL (GC-AL) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 21).....	83
5.2.3	GRUPO BIOMATERIAL ÁGUA (GB-AG) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 22).....	87
5.2.4	GRUPO BIOMATERIAL ÁLCOOL (GB-AL) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 23).....	91
5.3	Comparação Morfológica entre Grupos.....	95
5.3.1	GC-AG vs. GC-AL	95
5.3.2	GC-AG vs. GB-AG.....	95
5.3.3	GB-AG vs. GB-AL.....	96
5.4	OBSERVAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICA.....	96
6	DISCUSSÃO	101
6.1	LIMITAÇÕES DA PESQUISA E APLICAÇÕES FUTURAS.....	106
7	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS	113
	ANEXO	137

---

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

O etanol é uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e até incentivado pela sociedade. Esse é um dos motivos pela qual ele é visto de forma diferenciada, quando comparado com as demais drogas. Apesar de uma ampla aceitação social, o consumo de bebidas alcoólicas, quando excessiva passa a ser um problema (CEBRID, 2015).

O uso abusivo de etanol por longo prazo, dependendo da dose-freqüência e circunstâncias, pode provocar um quadro de dependência física, química e psíquica. Anualmente o etanol é responsável pela morte de 2,5 milhões de pessoas e está relacionada a acidentes de trânsito, violência e a inúmeras doenças (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Desta forma, o consumo inadequado de etanol é um importante problema de saúde pública, acarretando altos custos para sociedade e envolvendo questões médicas, psicológicas, profissionais e familiares (CEBRID, 2015).

O alcoolismo é caracterizado por um conjunto de problemas relacionados ao consumo excessivo e prolongado do etanol, interferindo na vida pessoal, profissional, familiar, social e a saúde do indivíduo (ALDERAZI; BRETT, 2007).

O uso indiscriminado e crônico do etanol é responsável pelas alterações morfológicas em praticamente todos os órgãos e tecidos do corpo. Somente as alterações gástricas surgem imediatamente após a exposição e podem ser relacionadas com os efeitos diretos do etanol sobre a vascularização da mucosa (CEBRID, 2015).

O etanol, principal componente de bebidas alcoólicas, age como elemento tóxico a órgãos vitais, atuando nocivamente na integridade tecidual mesmo em tecidos resistentes como os ossos. Esses efeitos patológicos trazem complicações nos processos pós-lesão e/ou em cirurgias de reparação (SOARES et al., 2010). CHEN et al., (2011), afirmam que a ingestão crônica e em grande quantidade de etanol atua direta e indiretamente no tecido ósseo, induzindo a reabsorção através da proliferação, ativação dos osteoclastos e inibição dos osteoblastos. Dessa forma, o processo biológico de reparo ósseo é prejudicado podendo causar retardo da consolidação ou psedoartroses (GARCIA-SANCHES et al., 1995).

O consumo de etanol torna-se crônico com a ingestão por períodos prolongados e quando mecanismos adaptativos de tolerância e dependência são desenvolvidos (SAMSON; HARRIS, 1992).

O efeito inibitório sobre as células osteoblásticas e a glândula paratireóide pelo consumo crônico de etanol gera baixa massa óssea, aumentando a predisposição às fraturas e a osteopenia na população alcoólatra (GARCIA-SANCHES et al., 1995; KLEIN, 1997; IWANIEC et al., 2008).

Estudos laboratoriais histomorfométricos, em ratos jovens sob a ingestão crônica de etanol evidenciaram uma redução na velocidade de formação óssea a partir do endóstio e perióstio além do comprometimento das propriedades mecânicas do osso (PENG et al., 1991). Friday e Howard (1991) mostraram que o etanol reduziu a proliferação celular, a síntese protéica e a atividade da fosfatase alcalina em células ósseas humanas “in vitro”.

Os mecanismos de ação do etanol nos ossos não são completamente elucidados, mas foram divididos em direto e indireto. Os mecanismos indiretos atuam nos testículos (diminuição da testosterona), nas Glândulas Paratireóides (aumenta a produção do Paratormônio), no Fígado (aumenta a produção da molécula Osteoindutora IGF-1), nos vasos sanguíneos (estimula a expressão de IL-6 e a Oncostatina M e consequentemente o eixo de regulação RANKL-OPG), nos Rins (aumento da excreção de cálcio), nas Glândulas Adrenais (aumento da síntese do cortisol), nas Glândulas Tireóides (diminui a síntese da calcitonina) e os mecanismos diretos nos Osteócitos (diminui a síntese de esclerosina e indiretamente a ativa os osteoclastos por inibir a via de sinalização Wnt canônica), nos osteoblastos (aumento da expressão das citocinas TNF e IL-1 β que provocam a supressão da osteoblastogênese e diminuição das Proteínas Ósseas Morfogênicas). A exposição crônica ao etanol diminui a expressão de vários genes ósseos que estão associados à Via de Sinalização Wnt canônica, incluindo a codificação dos Lrp5 e β -catenina. A Análise Global Transcriptoma demonstrou que a Via de sinalização Wnt Canônica (Fig. 1) responsável pela regulação da formação óssea é alvo do etanol em estudos com ratos (HIMES et al., 2008).

Fig. 1 - Via de sinalização Wnt/β-catenina: efeitos diretos do álcool sobre o tecido ósseo.

As proteínas Wnt ligam-se a superfície dos receptores Frizzled, processo importante para estabilização e translocação da β-catenina citosólica para o núcleo. A β-catenina já no núcleo ativa a transcrição dos genes relacionados à via de sinalização Wnt necessários para formação óssea. Essa expressão gênica regula fortemente todo o processo de reparo. A exposição ao etanol antes da injúria decresce os níveis da proteína β-catenina, diminui a expressão dos genes da via de sinalização Wnt e finalmente causa queda na formação de osteoblastos no local da fratura. Esses efeitos induzidos pelo etanol causam a reparação óssea deficiente ou a não união. A figura 2 esquematiza o alvo do etanol na via de sinalização Wnt (JUNG et al., 2011).

Fonte: JUNG et al., 2011

Fig. 2 - Alvo do etanol na Via de sinalização Canônica Wnt durante o reparo de fratura óssea.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas em ratos para avaliar os efeitos do etanol sobre o tecido ósseo. Diez et al., (1997) empregaram dieta líquida com etanol 30% durante seis semanas, e verificaram que histoquimicamente o etanol reduz o metabolismo mineral ósseo. Sampson et al., (1998) utilizaram a mesma concentração durante quatro semanas, e concluíram que o etanol altera a homeostase de hormônios que atuam nos ossos. Nyquist et al., (1999) também aplicaram dieta líquida com etanol 15% por cinco semanas e observaram que o alcoolismo inibiu ou atrasou o processo de reparação óssea. Camilli et al., (2004) utilizaram etanol a 20% durante quatro semanas e, em seguida foram utilizados implantes PHA (Poli-hidroxialcanoato) na tíbia e no crânio de ratos, e o tratamento foi mantido até ao centésimo quadragésimo dia de experiência. Eles concluíram que a taxa de osteogênese e o volume de formação de osso novo em ratos tratados com álcool eram inferiores às dos animais não-tratados. Soares et al., (2010) submeteram ratos a uma dieta líquida com 10% de etanol associada a doses subcutâneas diárias de nicotina (0,125 mg/100g animal) durante 90 dias, e

observaram que o nível de cálcio no sangue, a resistência mecânica óssea e a neoformação óssea em torno dos implantes de PHA foram reduzidos quando comparados com o grupo de controle.

O tecido ósseo tem grande capacidade de reparação espontânea, mas em perdas óssea significativas necessitam de intervenções cirúrgicas com enxertos ósseos, implantes e/ou biomateriais (CARIA et al., 2007).

Visando a reconstrução total ou parcial de massas ósseas perdidas e a restauração ou aumento dos tecidos biológicos, principalmente nas áreas médicas e odontológicas, é crescente o interesse no desenvolvimento de biomateriais que possuam propriedades biológicas e físico-químicas adequadas, incorporando os avanços científico-tecnológicos de cada época (BUCHAIM et al., 2007).

Na perda ou comprometimento do tecido ósseo, vários biomateriais naturais ou sintéticos, como polímeros, cerâmicas e metais ou seus compósitos tem sido investigados e utilizados de diferentes maneiras, como uma alternativa aos enxertos ósseos. Essa aplicação é relevante, pois esses enxertos não danificam tecidos saudáveis, não aumentam os riscos de contaminações virais e bacterianas, além de serem disponibilizados comercialmente (WILLIAMS, 2010).

O tecido ósseo está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre formação e reabsorção óssea (SILVA et al., 2007). Por isso, os biomateriais utilizados como substitutos do tecido ósseo devem possuir características peculiares como biocompatibilidade, ser biodegradável e osteocondutivo, proporcionando a condução de osteoblastos ou células precursoras para o sítio lesado (LIU et al., 2004).

Os biomateriais ósseos sintéticos, como o Beta Fosfato Tricálcico (Beta TCP) foram desenvolvidos a partir de compostos minerais do osso (LI et al., 2007), ou seja, possui composição mineralógica semelhante à apatita (fosfato de cálcio sintetizado pelo organismo) do osso humano.

Beta Fosfato Tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) é uma cerâmica granulada (granulação 0,1 a 0,5mm/0,5g), sintética, biocompatível, biodegradável e parcialmente reabsorvida entre 6 a 15 semanas após o implante. A reabsorção do material é causada pela dissolução e depende da porosidade, estrutura química (polimorfismo), tamanho das partículas, solubilidade do material, do pH local no meio fisiológico, desintegração física em partículas menores e fatores biológicos. O beta TCP apresenta ausência de toxicidade local e sistêmica, de resposta a corpo estranho ou

---

inflamações e aparente habilidade ao se ligar ao tecido hospedeiro. Essas características positivas podem ser explicadas pela natureza química, síntese a partir dos íons cálcio e fosfato (BIONNOVATION, 2015).

Essas biocerâmicas são promissoras nos processos de reconstrução e regeneração de tecidos duros, tais como o osso, em procedimentos cirúrgicos médicos utilizados em ortopedia e traumatologia para casos como correções de tumores musculoesqueléticos e traumatismos raquimedulares. Em procedimentos odontológicos são utilizados em enxertia óssea, nas reconstruções de defeitos de paredes ósseas, traumáticos ou degenerativos, elevação do assoalho, aumento de cristas alveolares atrofiadas, preenchimento periodontal ou osseo alveolar, alvéolos dentários e osteotomias, assim como a preservação e preparação do local para implante (BIONNOVATION, 2015).

O Beta Fosfato Tricálcio não tem a capacidade de induzir a diferenciação de células osteoprogenitoras, mas devido a sua similaridade com o tecido ósseo facilita o processo de reconhecimento e sinalização osteoblástica que favorece a remodelação e neoformação óssea. Isso ocorre devido à precipitação de íons de cálcio e fosfato na interface osso/enxerto ocasionando a formação da camada de apatita e, conseqüentemente a colonização de células ósseas e precursoras (BIONNOVATION, 2015).

Esse estudo foi necessário para comprovar a eficácia do Biomaterial β -TCP® (Bionnovation), através dos testes histomorfológico e histomorfométrico, conhecendo sua viabilidade econômica em relação aos importados e existindo considerável demanda, torna-se possível pulverizar o tratamento de enxertia nas áreas médicas e odontológicas dentro do contexto econômico brasileiro (Custo x benefício) e através dos altos índices de consumo crônico de etanol no Brasil, se fez necessário avaliar os efeitos desse biomaterial aloplástico em alcoolismo.

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

---

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETANOL

O consumo excessivo de etanol (C_6H_5OH), vulgarmente conhecido por álcool (MIKOSCH, 2014) é responsável em média por 2,5 milhões de mortes anual em todo o mundo, o que representa 4% de toda mortalidade. O alcoolismo é o principal fator de risco na faixa etária 15-59 anos em homens e está relacionado com mais de 60 doenças e lesões acidentais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

O alcoolismo é definido como o aparecimento de problemas decorrentes do padrão de consumo de álcool, acima do considerado uso moderado, levando a prejuízo ou sofrimento clinicamente significativos físicos e psicológicos (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013).

O consumo excessivo de etanol a curto e longo prazo compensam os efeitos supostamente benéficos ao organismo. Estudos experimentais e clínicos comprovam que o uso crônico tem efeitos adversos em vários órgãos e tecidos dentre eles: fígado (O'SHEA; DASARATHY; MCCULLOUGH, 2010), pâncreas (VONLAUFEN et al., 2014), trato gastrointestinal (BENEDETTI; PARENTE; SIEMIATYCKI, 2009), trato respiratório (BOÉ et al., 2009), músculos (FERNANDEZ-SOLÀ et al., 2007), sistema imune (LAU et al., 2009) e tecido ósseo (CHAKKALAKAL, 2005).

2.2 METABOLISMO DO ETANOL

O etanol é absorvido por difusão passiva principalmente no intestino delgado e pequena quantidade no estômago (GOODMAN; GILMAN, 1996; ZAKHARI, 2006; HANG, 2008; FARFAN, 2009).

A metabolização do etanol atinge cerca de 90-98%, sendo o restante eliminado inalterados no ar expirado e na urina (GOODMAN; GILMAN, 1996). Esse processo ocorre quase inteiramente no fígado, principalmente por três vias enzimáticas sucessivas: via álcool desidrogenase, sistema microssomal de oxidação do etanol e via da catalase (LIEBER, 2004a, 2005b) (Fig. 3).

Fig. 3 – Resumo das vias de metabolização do etanol.

A primeira fase do catabolismo é comum nas três vias e resulta na formação do acetaldeído, metabólito de alta toxicidade às células (HANG, 2008). Essa molécula causa disfunção mitocondrial e induz a atividade da enzima espermina oxidase que aumenta a concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a acroleína, 10 vezes mais citotóxico (UEMURA et al., 2013).

A metabolização do etanol após a ingestão moderada ativa a via da enzima citosólica álcool desidrogenase que apresenta cinética de saturação, isto é, há uma relação dose-dependência, na qual em alta concentração o sistema torna-se saturado (HANG, 2008). Isso ocorre devido a necessidade da presença do co-fator nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada (NAD) que capta hidrogênio da molécula de etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase formando NADH. A disponibilidade de NAD limita o uso desta via, mais utilizada por “bebedores sociais” (LIEBER, 2005).

A metabolização por essa via causa um desequilíbrio na relação do NAD/NADH inibindo a metabolização de ácidos graxos, síntese de proteínas e aumento da peroxidação lipídica que necessitam desse co-fator. Isso causa o acúmulo de gorduras nos hepatócitos conhecida como esteatose (LIEBER, 2004a, 2005b).

A segunda via enzimática de metabolização do etanol é o Sistema de oxidação microsomal do etanol (MEOS- microsomal ethanol oxidation system) ativada em níveis superiores a 500mg/l de etanol, em casos de consumo crônico. É uma classe de isoenzimas do citocromo P450, localizadas no retículo endoplasmático liso dos hepatócitos com alta especificidade ao etanol (LIEBER,

2005). Essa via de oxidação do etanol é a mais eficiente comparada a álcool desidrogenase e a catalase, mas causa maior dano hepático devido a produção de metabólitos tóxicos (WU; CERDEBAUM, 2005). Esses metabólitos são espécies reativas de oxigênio, superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxietila altamente reativas, que reagem com proteínas, DNA, lipídeos de membranas causando comprometimento ou perda funcional até apoptose celular (PATEL et al., 2005).

Existem mecanismos de defesa na forma de enzimas tais como superóxido dismutase, catalase e antioxidante ácido ascórbico, glutathione e α -tocoferol na tentativa de bloquear a propagação dessa cadeia de reações. A produção de radicais livres aumenta a ação e consumo dos antioxidantes e gerando consequentemente um desequilíbrio celular entre antioxidantes e radicais livres, fenômeno conhecido como Estresse Oxidativo. Esse fenômeno refere-se a situações nas quais os mecanismos protetores estão comprometidos; acumulam-se espécies reativas de oxigênio e as células tornam-se mais suscetíveis à lesão excitotóxica (HANG, 2008), reações proinflamatórias, envelhecimento acelerado e distúrbios de imunidade (PAPAS, 1996; COMPORTI et al., 2010).

O stress oxidativo ocorre em muitos tecidos e a gravidade dos seus efeitos depende da resposta inflamatória e da função imune local e sistêmica. Isso difere em cada tecido devido à intensidade e duração do stress oxidativo, o estado metabólico das células e a habilidade em metabolizar os subprodutos do etanol. Secundariamente, as respostas de cada tecido podem contribuir para o desenvolvimento de um quadro patológico (JUNG et al., 2011).

A terceira via de metabolização do etanol, via da Catalase apresenta menor participação, devido à limitada produção endógena de peróxido de hidrogênio para a peroxidação do etanol. Essa via tem recurso tóxico, devido à necessidade de síntese de peróxido de hidrogênio, altamente tóxico aos ácidos nucleicos (LIEBER, 2004a, 2005b).

As três vias têm em comum o produto final acetaldeído. Na segunda fase ocorre a formação de acetato, uma reação essencialmente hepática (90 a 95%) catalizada pela enzima aldeído desidrogenase (LIEBER, 2004a, 2005b).

2.3 TECIDO ÓSSEO E AÇÃO DO ETANOL

2.3.1 HISTOLOGIA ÓSSEA

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que apesar do aspecto aparentemente inerte apresenta estruturas plásticas altamente dinâmicas, pois estão em permanente remodelação. É formado por células, matriz extracelular orgânica e a matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A matriz extracelular contém substância fundamental orgânica, fibras colágenas do tipo I e proteínas osteonectina, osteocalcina, proteína morfogênica óssea, proteoglicanas, glicoproteínas e sialoproteínas. Já a matriz óssea é permeada por cristais de hidroxiapatita. Antes da calcificação, a matriz óssea é denominada osteóide (CORMACK, 1996). As células ósseas são compostas por os osteoblastos (síntese e secreção da matriz extracelular), osteócitos (manutenção da matriz óssea), osteoclastos (reabsorção óssea) e as osteoprogenitoras (células indiferenciadas) (CORMACK, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

De acordo com Junqueira e Carneiro, o tecido ósseo pode ser formado por dois tipos de ossificação: intramembranosa e endocondral. A intramembranosa ocorre à condensação das células mesenquimais que formam uma membrana conjuntiva, onde em alguns pontos nessa membrana inicia a transição das células mesenquimais para osteoblastos. Esses pontos são denominados centros de ossificação primária. Esse tipo de ossificação ocorre nos ossos frontal, parietal, partes do occipital do temporal, maxilar, mandíbula, ossos curtos e aumento da espessura de ossos longos. A ossificação endocondral tem início sobre um molde de cartilagem hialina e é responsável pela formação de ossos curtos e longos. Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo de acordo com a ordem cronológica: primário ou imaturo e secundário ou maduro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo maduro apresenta a matriz óssea moderadamente hidratada (10-20%), 60-70% são compostos de material inorgânico, sais minerais (cristais semelhantes à hidroxiapatita e fosfato de cálcio amorfo), 30-40% são colágeno e o restante, aproximadamente 5%, são proteínas e carboidratos, principalmente conjugados com glicoproteínas (osteonectina, osteocalcina). As proporções destes

---

diversos componentes variam com a idade, sexo, condição metabólica, e localização (osso cortical - denso ou compacto - porção externa da matriz óssea ou trabecular - poroso ou esponjoso- porção interna da matriz óssea), ou mistura destes (BOSKEY, 1990).

2.3.2 REPARO, REGENERAÇÃO E CICATRIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO

Imediatamente após a lesão no tecido ósseo, ocorre a formação de hematoma por rompimento dos vasos sanguíneos e preenchimento da cavidade por coágulo. A lesão inicia uma resposta inflamatória necessária para o processo de cicatrização. (GERSTENFELD et al., 2003a). Ocorre à destruição da matriz óssea adjacente à região lesada, com a apoptose das células ósseas e após 48 horas há a remoção dos restos celulares e do coágulo através da ação dos macrófagos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; MATSUMOTO et al., 2008). Inicialmente a essa fase inflamatória há o recrutamento de células-tronco mesenquimais oriundas do periósteo e endósteo próximos à lesão e subsequente diferenciação em condrócitos e/ou osteoblastos (GERSTENFELD et al., 2003b). Além disso, cria-se um microambiente com baixa tensão de oxigênio e baixa concentração de nutrientes, condições de um quadro de avascularidade. As células-tronco mesenquimais ou osteoprogenitoras sofrem divisão mitótica e tem alta capacidade de se diferenciar em osteoblastos e em condições, de avascularidade, estas células podem se diferenciar em células condrogênicas (CAPLAN; KOUTROUPAS, 1973).

Na ossificação intramembranosa, ocorre primeiramente à condensação celular mesenquimal em vários locus da lesão, e a formação de membrana conjuntiva pela diferenciação em células condrogênicas (CAPLAN; KOUTROUPAS, 1973). Depois de formado esses centros de condensação celular, há a apoptose dos condrócitos, a degradação cartilaginosa, a remoção de células e matrizes extracelulares, eventos necessários para permitir a angiogênese no local do reparo (Al-AQL et al., 2008). As células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos, expressam marcadores de diferenciação (fator de crescimento endotelial vascular-VEGF e osteocalcina) e ativa o sistema de regulação de reabsorção óssea RANKL/RANK/OPG – osteoprotegerina. RANKL/RANK regulam a formação de osteoclastos multinucleados a partir de seus precursores e OPG protege contra a reabsorção excessiva, por se ligar ao RANKL evitando a ligação RANKL - RANK

(KHOSLA; WESTERNDORF; OURSLER, 2008). O osso neoformado é do tipo primário e é substituído por osso secundário sob a estimulação de forças mecânicas quando o órgão retorna as suas funções (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A reorganização da fratura pode ser considerada um processo de reparo por regeneração óssea. No entanto, apesar da capacidade regenerativa do tecido ósseo esse processo pode falhar e as fraturas serem reparadas em posições anatômicas desfavoráveis, ter um atraso no tempo de cicatrização, ou até mesmo desenvolver uma pseudoartrose (fratura curada por fibrose) ou não união óssea (MARSELL; EINHORN, 2010).

2.3.3 AÇÃO DO ÁLCOOL NO TECIDO ÓSSEO

No tecido ósseo, o álcool apresenta vários efeitos diretos e indiretos sobre as atividades das células ósseas, prejudicando a neoformação e o processo de remodelamento (CHAKKALAKAL 2005; SUH et al., 2005). Ocorre diminuição de síntese e da capacidade proliferativa dos osteoblastos (TORRICELLI, 2008), dos níveis séricos dos minerais essenciais na composição óssea, cálcio, fosfato (CONFAVREUX, 2011), magnésio (SCHNITZLER et al., 1994), aumento da osteoclastogênese (DAI et al., 2000), diminuição da mineralização e consequentemente aumento da concentração de osteóide (BOSKEY, 1990).

Estudos clínicos e experimentais fornecem evidências significativas dos efeitos negativos do consumo crônico do etanol no metabolismo ósseo (CHAKKALAKAL 2005). Tais dados são comprovados pelo aumento dos riscos de fraturas com ou sem perda óssea e de intervenções cirúrgicas ortopédicas e odontológicas por complicações na neoformação e no remodelamento, o que limita ou inviabiliza determinados procedimentos em pacientes (NYQUIST et al., 1997).

Askew et al., (2011) demonstraram em estudos clínicos que o tempo de cicatrização de fraturas em pacientes de uso crônico é aproximadamente duas vezes maior que os não alcoólicos.

Diferentes estudos vêm sendo usados para avaliar os efeitos do etanol no tecido ósseo. Diez et al., (1997) submeteu os ratos a um alcoolismo experimental de 30% por 6 semanas e observou redução no metabolismo mineral ósseo. Sampson et al., (1998) empregou algumas concentrações alcoólicas durante 4 semanas e concluiu que o etanol altera a homeostase dos hormônios com ação direta no osso.

Nyquist et al., (1999) forneceu aos ratos uma dieta líquida de etanol a 15% por 5 semanas e verificou que o alcoolismo inibe ou atrasa o processo de reparo ósseo. Soares et al., (2010) submeteu os ratos ao menor consumo crônico de etanol observada na literatura associado a nicotina por 90 dias e afirmou que o etanol diminui a osteogênese e o volume ósseo neoformado. De acordo com os estudos clínicos de Albrektsson et al., (1981), o etanol interfere negativamente com o processo de integração óssea do biomaterial, e, assim, impede o prognóstico da reparação. Esses dados foram confirmados por estudos experimentais em ratos de Camilli et al., (2004) que usou 20% de etanol por 4 semanas. Após esse período empregou o biomaterial HA em defeitos na tíbia e calvária e manteve por 140 dias. Concluíram que o etanol diminui a osteogênese e o volume ósseo neoformado.

2.3.4 EFEITOS DIRETOS

O álcool inibe a diferenciação e proliferação das células-tronco mesenquimais da medula óssea em osteoblastos (WANG et al., 2003; SUH et al., 2005), prejudica a síntese de DNA, causa o desequilíbrio no remodelamento ósseo por aumentar a osteoclastogênese (MAUREL et al., 2012), altera os níveis das citocinas responsáveis na regulação do metabolismo ósseo; aumento de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), de IL-6 (interleucina-6) e OPG (osteoprotegerina) e diminui IGF-1 (somatomedina-C) e também do sistema OPG/RANK/RANKL (GARCIA-VALDECASAS-CAMPELO et al., 2006) (Fig. 4).

Fonte: MAUREL et al., 2012.

Fig. 4 - Mecanismos que estão implicados na perda óssea devido ao consumo crônico de etanol.

Alguns pesquisadores investigaram o efeito do etanol nos osteócitos e comprovaram alterações na morfologia e no número de apoptose dessas células (WANG et al., 2003). A apoptose dos osteócitos envia sinais de recrutamento de osteoclastos confirmando a ação de inibição dos osteócitos sobre a atividade osteoclásticas (BONEWALD, 2011).

Outro fator fundamental que está envolvido no comprometimento da função osteoblástica é a inibição da via de sinalização Wnt/ β -catenina pelo aumento dos níveis de esclerosina pelos osteócitos (GONZÁLEZ-REIMERS et al., 2013).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina é ativada pela ligação ao co-receptor transmembrânicos Lrp5 ou Lrp6, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares para translocar a β -catenina até ao núcleo. A β -catenina interfere na transcrição de genes responsáveis pela diferenciação, proliferação, apoptoses e funcionalidade das células ósseas (BONEWALD, 2011).

Na via Wnt, as proteínas Wnt ligam-se aos receptores de membrana Frizzled (Fzd) e aos co-receptores Lipoprotein receptor related protein (Lrp) que permitem o recrutamento de proteínas Dishevelled (Dsh), que inibem a degradação de β -catenina, auxiliando-a na translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, a β -catenina interagem com os fatores LEF/TCF ativando a transcrição gênica (CALLACI et al., 2009).

O etanol diminui a osteogênese e aumenta a adipogênese através da regulação da via de sinalização Wnt e reduz a translocação intracelular da beta-catenina (SEZER, 2009). Valentin-Opran, et al., (1982) afirmaram que a via de sinalização Wnt promove a osteogênese pelo estímulo direto da expressão do gene Runx2. A expressão de Runx2 é importante para que as células mesenquimais se diferenciem em osteoblastos (CROUCHER et al., 2001; HEIDER et al., 2003) . O etanol também diminui a expressão gênica de BMP2 (proteína morfogenética óssea), da osteocalcina, do gene LRP5 e Wnt 3a (SEZER, 2009).

Estudos experimentais com ratos, fêmeas alcoolizadas, indicaram que o etanol suprime a via de sinalização Wnt e consequentemente a osteoblastogênese, através da estimulação do stress oxidativo (CHEN et al., 2010).

2.3.5 EFEITOS INDIRETOS

A proteína leptina, sintetizada pelos adipócitos, é um regulador da massa óssea (CIRMONOVA et al 2008). A exposição crônica ao etanol diminui a concentração de leptina em ratos e humanos (MAUREL et al., 2011), assim como a osteoblastogênese e aumenta a adipogênese nas células da medula óssea (CHEN et al., 2010).

A ação anabólica do Paratormônio (PHT) no osso está diretamente relacionada com a concentração da citocina IGF-1. Na presença de etanol os níveis de IGF-1 diminuem e do PHT (WANG et al., 2007). O PHT ativa a vitamina D, que possui efeito positivo na função e diferenciação dos osteoblastos (ATKINS et al., 2007). O etanol pode diminuir o nível sérico da vitamina D resultando na má absorção do cálcio pelo intestino e em hipocalcemia (GRIFFITH; PARANTAINEN; OLSON, 1993).

Os níveis dos hormônios sexuais testosterona (MANEESH et al., 2006) e estradiol (DORGAN et al., 1994) apresentaram níveis reduzidos em estudos com animais experimentalmente alcoolizados. A diminuição dos níveis séricos do estradiol aumenta a via RANKL induzida pelo etanol, responsável pela reabsorção óssea (RONIS et al., 2007).

As alterações dos níveis séricos dos minerais fósforo, cálcio e magnésio devido ao consumo de álcool podem contribuir para perda óssea (TURNER, 2000).

O magnésio em baixa concentração modifica os níveis séricos do PTH prejudicando a reposta desse hormônio (SCHNITZLER; MESQUITA; SHIRES, 2010).

Determinados tamanhos de defeitos ósseos podem cicatrizar normalmente devido à capacidade plástica, altamente dinâmica do osso. Schmitz e Hollinger (1986) descreveram que o tamanho do defeito ósseo que não cicatriza durante a vida, pode ser considerado como defeito de tamanho crítico (PARIKH, 2002). Dados na literatura indicam o tamanho do defeito crítico acima de 2-3 cm em humanos (KRISHNAN; WILLETT; GULDBERG, 2014) e em calvária de modelo de roedores 8mm (SZPALSKI et al., 2010).

2.4 SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Os defeitos de tamanho crítico requerem tratamento adicional desde implantes a substitutos ósseos de diferentes origens (PARIKH, 2002).

Os enxertos ósseos ou substitutos ósseos têm como função gerar novo osso no sítio do defeito através de três mecanismos: osteogênese, osteocondução e osteoindução (Fig. 5):

- A osteogênese é a capacidade que o enxerto tem de carregar células osteoprogenitoras e osteoblásticas para iniciar a primeira fase do reparo.
  - A osteoindução é a capacidade de estimular as células mesenquimais precursora presentes nos tecidos adjacentes a se transformar e células ósseas para formar o novo osso.
  - A osteocondução é a capacidade que o enxerto tem de se comportar como um arcabouço ou scaffold para que as células do paciente possam proliferar.
-

Fonte: MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012.

Fig. 5 – Demonstração esquemática dos mecanismos A- osteoindução, B- osteoindução e C- osteogênese.

A finalidade do enxerto, além de substituir o tecido, é reforçar a área, incentivando crescimento ósseo no sítio lesado. As células ósseas devem, idealmente, penetrar e substituir o enxerto através de ciclos de remodelação sequenciais, permitindo o reparo do local e um equilíbrio entre forma e função inicialmente prejudicadas (GOULET et al., 1997).

2.5 CARACTERÍSTICAS IDEAIS DE UM SUBSTITUTO ÓSSEO:

- Atóxico;
- Sem reposta imunológica desfavorável;
- Não carcinogênico;
- Não alergênico;
- Não desenvolver reposta inflamatória aguda ou crônica que impossibilite a diferenciação dos tecidos;
- Não interferir negativamente no fluxo sanguíneo;
- Não formar trombos biomaterial-sangue;
- Resistente e resiliente;
- Disponível em quantidades satisfatórias;
- Fácil adaptação;
- Custo acessível.

2.6 TIPOS DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS

A necessidade de substitutos ósseos vem aumentando nas áreas cirúrgicas maxilofacial e ortopédica com o objetivo de promover a consolidação desses defeitos (BODEN, 2002).

Nas últimas décadas há uma grande procura por materiais que eliminassem a necessidade de abordagem da área doadora do paciente levando a novos avanços por pesquisas de substitutos ósseos. Dessa forma é possível classificar esses materiais de acordo com a fonte e a resposta imune, ilustrados na tabela 1:

- Autógenos: ou autólogos, autoenxertos ou enxertos próprios. São obtidos do próprio paciente para qual se destina o enxerto;
- Homógenos: ou alógeno, aloenxerto ou homoenxerto. São obtidos de paciente doador e transferidos para o paciente receptor, geralmente são disponíveis em banco de ossos;
- Heterógenos: ou xenógenos, xenoenxertos. São provenientes de indivíduos de espécies diferentes, principalmente de matriz óssea bovina mineralizada;
- Aloplásticos: são produzidos e sintetizados em laboratórios com a finalidade de atuar como substituto ósseo. Esses materiais podem ser reabsorvidos ou não, porosos ou não, em partículas ou blocos, possuindo a vantagem de não apresentar riscos imunológicos, promovendo regeneração óssea no leito receptor.

Tab. 1: Propriedades de cada tipo de enxerto em relação aos mecanismos de neoformação (Adaptada MISCH, 2000).

Tipo de enxerto	Osteocondução	Osteoindução	Osteogênese
Autógeno	Sim	Sim	Sim
Homógeno	Sim	Não	Não
Heterógeno	Sim	Não	Não
Aloplástico	Sim	Não	Não

Por décadas, o enxerto autógeno foi considerado padrão ouro no reparo ósseo, no entanto, limitação do sítio doador, morbidade e complicações restringem o uso. Os alógenos por sua vez podem desencadear reações imunológicas e doenças infecciosas (BURCHARDT, GLOWCZEWSKIE; ENNEKING, 1983). Por esse motivo, os pesquisadores vêm dando mais atenção ao desenvolvimento de materiais sintéticos com desempenho semelhante ao osso autólogo (ZHANG et al., 2014).

2.7 RESPOSTA BIOLÓGICA AOS ENXERTOS ÓSSEOS

“...de forma didática, é possível dividir o complexo processo de incorporação de um enxerto ósseo em algumas etapas, de acordo com a cronologia” (MAZZONETTO; DUQUE NETTO; NASCIMENTO, 2012, p.59)

2.7.1 FASE DE ORGANIZAÇÃO DO COÁGULO

Após a deposição do enxerto, a área enxertada estará envolvida por coágulo sanguíneo, dando início a processos bioquímicos e celulares.

2.7.2 FASE INFLAMATÓRIA

Ocorre proliferação vascular intensa ao redor do enxerto; a resposta das células osteoblásticas pode modificar o equilíbrio entre a produção/secreção de citocinas e as metaloproteinase da matriz (LISIGNOLI et al., 1999; PENOLAZZI et al., 2008; BRAUX et al., 2011) (grupo de enzimas responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular) (GROSS, LAPIÈRRE, 1962) que conduz a uma

resposta inflamatória, caracterizada pelo recrutamento e ativação de células imunes (GOLDRING; CLARK; WRIGHT, 1993; MALONEY et al., 1995; PRYSTOWSKY et al., 1995; CHEUNG; DEVINE; HUBBARD, 1997), polimorfonucleares e monócitos (ANDERSON; MILLER, 1984; HALLAB ; JACOBS, 2009), podendo haver a degradação da biocerâmica.

2.7.3 FASE DE REVASCULARIZAÇÃO

Os pequenos vasos sanguíneos recém-formados penetram no enxerto propiciando o aparecimento e a proliferação osteoblástica (Fig.6 – A);

2.7.4 FASE DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

Durante a integração no sítio do defeito ocorre à dissolução, precipitação e troca de íons na superfície do enxerto, o que, também pode contribuir para a formação óssea (HABIBOVIC et al., 2005; BARRADAS et al., 2011). Estas reações são acompanhadas por adsorção e incorporação de proteínas adesivas e fatores de crescimento (VELARD et al., 2013). Nessa fase, os osteoclastos iniciam o processo de reabsorção de algumas porções do enxerto, enquanto os osteoblastos depositam o tecido neoformado. Dessa forma, toda a periferia do enxerto ósseo é recoberta por tecido osteóide (Fig.6 – B). Esse processo de remodelação, deposição-reabsorção ocorre até a completa incorporação do enxerto ao leito receptor, aproximadamente três a seis meses.

O efeito adverso indesejável que ocorre com algumas biocerâmicas é a produção de muitas partículas oriundas do processo de degradação do biomaterial. Elas que interagem com as células imunológicas levando à ativação celular e a liberação de mediadores da inflamação (HALLAB ; JACOBS, 2009). O quadro inflamatório instalado prejudica a remodelação, pois estimula a reabsorção óssea descontrolada (SUN et al., 1997; SUN et al., 1999).

O processo de dissolução/degradação da biocerâmica é modulado por vários parâmetros, tais como as propriedades químicas da própria cerâmica, o local de implantação (ectópica e ortotópica) e a presença de várias proteínas, tais como citocinas, hormônios, vitaminas e peptidomiméticos HABIBOVIC et al., 2005; BARRADAS et al., 2011

Fonte: Disponível em: <http://www.geistlich.com.br/pt/pacientes/geistlich/regeneracao-dental/enxerto-osseo>

Acesso em 15 dez 2015

Fig. 06 – A) Penetração de vasos sanguíneos e de células formadoras de osso no biomaterial; B) Regeneração do osso novo no biomaterial.

2.8 SUBSTITUTOS ÓSSEOS À BASE DE FOSFATO DE CÁLCIO

Os biomateriais de origem sintética, aloplásticos, são comumente utilizadas como substitutos ósseos de hidroxiapatita (HA), beta fosfato tricálcico (β -TCP) e o fosfato de cálcio bifásico (compósito de HA e β -TCP), conhecidos como compostos à base de fosfato de cálcio (Yang et al., 2014).

Os enxertos aloplásticos estão sendo amplamente utilizados devido à semelhança com a composição química do osso, a biocompatibilidade, bioatividade e baixa imunogenicidade (BOHNER; GBURECK; BARRALET, 2005).

Dados na literatura demonstram que a integração do enxerto no sítio do defeito envolve processos físico-químicos como dissolução, precipitação, troca de íons na superfície do biomaterial e por fim a reabsorção (HABIBOVIC et al., 2005; BARRADAS et al., 2011).

A velocidade de dissolução do β -TCP é de 3 a 12 vezes mais rápida comparada a HA. Dessa forma, um substituto ósseo de HA permanecerá em média 3 a 4 anos após implantação, devido à baixa capacidade de dissolução e reabsorção. Por outro lado, β -TCP desaparece parcialmente, em períodos de 6 a 15 semanas dependendo da composição e porosidade (RENOOIJ et al., 1985; TENHUISEN et al., 1998), possibilitando a substituição pelo novo tecido (TADIC; EPPLE, 2004).

Muitas pesquisas têm procurado desenvolver e aperfeiçoar biomaterias sintéticos, biocompatíveis, que apresentem propriedades osteocondutoras, que sejam bioinertes ou bioativos, com forma e dimensões que devem favorecer o crescimento ósseo pelo seu interior e ocorrer à deposição óssea por substituição. Esses substitutos osteocondutores não têm a capacidade de induzir a citodiferenciação de osteoblastos, mas desempenham papel importante no preenchimento do defeito, no apoio, na fixação e orientam as células migratórias originadas por proliferação das margens do defeito a promoverem a neoformação (SUGAWARA 2006a, 2006b, 2006c).

A composição química dos enxertos aloplásticos tem sido tópico de muitos estudos incluindo diferentes materiais; biocerâmica, biovidro, polímeros naturais e compósitos (ROY et al., 2003).

As biocerâmicas são produtos minerais inorgânicos e biocompatíveis obtidos por sinterização a altas temperaturas, com características físico-químicas específicas. São isentos de reações orgânicas indesejáveis, como processos inflamatórios e imunológicos, eliminando o risco de doenças infecto-contagiosas (EINCOBIO, 2015).

Dentre os vários biomateriais sintéticos, as biocerâmicas de fosfato de cálcio, principalmente o beta fosfato tricálcico (β -TCP), tornaram-se populares nas áreas médicas e odontológicas, devido à estrutura semelhante ao osso e a boa dissolução quando aplicados em meios biológicos ou simulados (BIGNON; CHEVALIER; FANTOZZI, 2002; YANG et al., 2014).

Os fosfatos tricálcicos podem ser encontrados na forma de pó, grânulos microporosos e gel, sendo a forma de grânulos a mais utilizada nos centros cirúrgicos, devido à porosidade que favorece a moliabilidade nas interfaces entre os grânulos e a proliferação das células progenitora para formação do novo tecido (GUTIERRES et al., 2006).

Os fosfatos tricálcicos (TCP) existem em várias fases (α , β e super- α), sendo as fases α e β as mais utilizadas como biomateriais (AL-SANABANI, J.; MADFA; AL-SANABANI, F. 2013). No entanto, a maior atenção tem sido dada ao β -TCP por não apresentar instabilidade e citotoxicidade (DOS SANTOS et al., 2002).

O β -TCP é um biomaterial sintético com a capacidade de orientar a migração das células progenitoras, provenientes das margens do defeito e do periósteo, e as células oriundas da sua proliferação ao redor e no interior na estrutura porosa

---

(SUGAWARA 2006a, 2006b, 2006c). Também é capaz de proporcionar espaço suficiente para a neoformação tecidual com uma organização celular e estrutural semelhante ao observado in vivo (RUMPLER et al., 2008; MUKHERJEE et al., 2009).

Essas características foram comprovadas pelo estudo in vitro realizado por Orii et al., (2005) com o β -fosfato tricálcico imerso em cultura de células da medula óssea estromal sob as condições: 100mmHg/min, incubação 3 horas a 37°C (Fig.7).

Fonte: ORII et al., 2005.

Fig. 07 - Crescimento e desenvolvimento celular sobre a superfície e para o interior da microporosidade do β -TCP – microscópio eletrônico de varredura.

Atualmente, um dos parâmetros mais estudados em relação às biocerâmicas sintéticas é o tamanho dos poros. Na literatura observa-se uma grande dispersão dos valores do tamanho dos poros considerado ideal para possibilitar o crescimento de vasos sanguíneos, migração celular, infiltração de prolongamentos dos osteócitos e aumento da resposta biológica (ROSE et al., 2004; ELEFTHERIADIS et al., 2010).

Muitas pesquisas tem investigado o efeito do tamanho dos poros de β -TCP, 150, 260, 510 e 1220 μm sobre a neoformação óssea. Os resultados demonstram uma grande variação entre a formação do novo tecido e a reabsorção do biomaterial, indicando que o tamanho do poro afeta diretamente a nova estrutura óssea (VON DOERNBERG et al., 2006).

Baseado nos estudos da caracterização da estrutura porosa das biocerâmicas de fosfato de cálcio, Liu, (1997) classificou três categorias quanto ao tamanho dos poros: microporo (abaixo 3 μm), intermediário (entre 3-80 μm) e macroporo (acima 80 μm).

Hench (1991) classificou as biocerâmicas de fosfatos de cálcio como densa e porosa, sendo a forma densa, também chamada de microporosa, com microporos de aproximadamente 1µm de diâmetro.

Muitos pesquisadores indicam que os diâmetros maiores dos poros, aumenta a área de superfície e a interconectividade entre eles, proporcionando melhor ligação dos poros às moléculas de proteínas adesivas e minerais. Também são capazes de carregar fatores de crescimento, células mesenquimais, vasos sanguíneos para induzir o crescimento tecidual (UCHIDA et al., 1992; SILVERMAN, et al., 2007; SLOWING, et al., 2008; GALBUSERA et al., 2009; ZHU, KASKEL, 2009).

A vascularização desempenha um papel importante no reparo e na regeneração funcional de muitos tecidos, dentre eles o osso. Após a injúria, há uma redução da densidade capilar funcional, vasoconstrição local e um aumento da permeabilidade capilar. Apresenta inicialmente um microambiente isquêmico agudo até estabelecer anastomoses entre os vasos dos tecidos ósseos e musculares (KRISHNAN; WILLETT; GULDBERG, 2014).

Embora o tecido ósseo apresente alta tolerância a hipóxia transitória (Lee et al., 2007), uma continua ou generalizada ausência de suporte vascular prejudicará gravemente a consolidação óssea como é comprovado pela alta incidência de amputações em fraturas de membros inferiores (GLASS; PEARSE; NANCHAHAL, 2009).

Dessa forma, as biocerâmicas macroporosa de β -TCP tem sido estudada extensamente como arcabouço para a neoformação óssea e como matriz de várias proteínas e fatores de crescimento (HENCH, 1998).

O β -TCP vem sendo muito utilizado na neoformação óssea em uma grande variedade de procedimentos cirúrgicos clínicos e em modelos de animais experimentais, com resultados clínicos e histológicos satisfatórios (BRKOVIC et al., 2008). Na área odontológica, é empregado em defeitos ósseos verticais, preenchimentos de fendas palatinas, revestimentos de implantes e como anteparo (AI-SANABANI, J.; MADFA; AI-SANABANI, F., 2013).

O β -TCP® (Bionnovation) Beta Fosfato Tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) é uma cerâmica granulada (granulação 0,1 a 0,5mm/0,5g), sintética, biocompatível, biodegradável, 57% de porosidade total (BIONNOVATION, 2015).

---

3 PROPOSIÇÃO

---

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da ingestão crônica de etanol a 25% no processo de reparo ósseo de defeitos cranianos tratados com Beta Fosfato Tricálcico (β -TCP®, Bionnovation Biomedical, SP, Brasil) comparativamente aos preenchidos com coágulo sanguíneo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) avaliar morfológica e morfometricamente a influência do etanol no processo de reparo ósseo dos defeitos preenchidos somente por coágulo sanguíneo comparativamente aos animais que consumiram água;
  - b) verificar morfológica e morfometricamente se o tratamento do defeito craniano com β -TCP® promove maior formação óssea comparativamente aos defeitos contralaterais preenchidos com coágulo sanguíneo;
  - c) avaliar histomorfometricamente uma possível influência negativa ou positiva do tratamento de defeitos cranianos com β -TCP® em ratos alcoolizados comparativamente aos tratados com coágulo.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

---

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O Projeto de pesquisa foi encaminhado à Comissão de ética no ensino e Pesquisa em animais da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB/USP, protocolado e aprovado sob o número CEEPA-Proc nº022/2012.

4.2 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com 60 dias de idade, peso corporal aproximadamente de 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP. Os critérios de inclusão empregados foram: ratos machos, adultos jovens, saudáveis e com peso corporal em torno de 250 gramas para evitar interferências de fatores hormonais, assegurar condições metabólicas e fisiológicas acentuadas.

O tamanho da amostra foi baseado na literatura científica, na qual o número de animais era compatível com a necessidade de resultados confiáveis do ponto de vista de significância estatística, como também às questões bioéticas (LIMEIRA JÚNIOR et al., 2003; LIMEIRA JÚNIOR, 2004).

No Biotério os animais foram criados em gaiolas com as dietas líquidas identificadas na garrafa (Fig.8A e B) contendo 04 animais cada, com comedouros e bebedouros, iluminação artificial comandada por “timer”, que controla o ciclo claro/escuro de 12 horas, exaustor e ar condicionado, que mantém a temperatura média de 21°C, confirmada por um termômetro de temperatura ambiente.

Fig. 8 - 4 animais/gaiola identificadas conforme a ingestão de álcool ou água.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de 20 animais:

Grupo Água (GAG): receberam água como dieta líquida e ração sólida *ad libitum* (Purina, Brasil);

Grupo Álcool (GAL): receberam álcool etílico (Álcool etílico absoluto, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil) diluído em água a 25% e ração sólida *ad libitum* (Purina, Brasil), conforme Lieber, DeCarli; Sorrel (1989).

O Grupo GAL seguiram o modelo de alcoolismo crônico determinado como “semi-voluntário”, sendo o álcool o único alimento líquido disponível. Inicialmente foram submetidos à administração gradual de álcool para adaptar os animais ao modelo experimental de alcoolização e evitar morte. (TIRAPELLI; TAMEGA; PETRONI, 2000).

Essa adaptação gradativa foi uma dieta líquida de álcool etílico diluído, na primeira semana a 8%, segunda semana a 16% e na terceira semana a 25% permanecendo nessa concentração por um período de 90 dias, seguindo protocolo proposto por Gil-Martín, Calvo e Fernández-Briera, (1998) (Fig.9).

Fig. 9 - Esquema do período de adaptação e alcoolização

Após o término desse período de alcoolização, todos os animais (Grupos GAG e GAL), foram submetidos à cirurgia experimental (Fig 10).

A - Fonte: BARRET; HARRIS, 1993. Figura modificada sobreposta à foto real do animal.

Fig. 10 – Esquema do Procedimento Cirúrgico e Períodos de Eutanásia.

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de mesoscopia do laboratório de Anatomia do Departamento de Ciências Biológicas FOB/USP.

Os animais foram submetidos à anestesia geral com injeção de Cloridrato de Xilazina (Anasedan®, CEVA Saúde Animal Ltda, SP, Brasil) 0,1ml/Kg associado com Cloridrato de Ketamina (Dopalen®, CEVA Saúde Animal Ltda, SP, Brasil) 6 a 10mg/kg recomendado pelo fabricante (Fig. 11B).

Os ratos foram tricotomizados, com auxílio de Aparador de Pêlos (Philips® Multigroom QG3250, SP, Brasil) na região superior da cabeça, compreendida entre os pavilhões auriculares externos (Fig.11C).

Fig. 11 - A- Materiais utilizados no procedimento cirúrgico; B- Aplicação de Anasedan® e Dopalen®; C- tricotomia da área cirúrgica.

Cada animal foi identificado com furos nos pavilhões auriculares externos com auxílio do Alicate Perfurador Ainsworth® (Golgran, SP, Brasil) (Fig.12; 13A).

Fonte: FOB/USP.

Fig. 12 – Marcação da orelha do animal.

A antisepsia da região tricotomizada, incluindo a pelagem em torno dessa área, foi realizada com solução tópica de Polivinil Pirrolidona Iodo (PVPI, Povidine Antisséptico®, Vic Pharma Ind e Comércio Ltda, SP, Brasil) a 10%. O procedimento cirúrgico ocorreu de forma independente, sobre uma bancada coberta, em mesa de madeira revestida de cortiça com troca de material para cada espécime.

Foram fixados a mesa operatoria, posicionados em decubito ventral. A seguir procedeu-se a infiltração anestésica com vasoconstritor na área cirúrgica, Cloridrato de Mepivacaína 2% com Epinefrina 1:1000.000 (Mepiadre® Nova DFL, RJ, Brasil) a fim de obter-se campo operatório exangue (Fig.13B).

Foi realizada uma incisão longitudinal crânio-caudal, com uma lâmina de bisturi de aço carbono nº 15 (Embramax, SP, Brasil), no couro cabeludo sobre a sutura sagital da calvária, com aproximadamente 20 mm de extensão (Fig.13C). O periósteo foi divulsionado e afastado juntamente com os demais tecidos, expondo a superfície externa dos ossos parietais, com auxílio de afastadores (confeção própria; ganchos de metal e elástico) (Fig.13D) e irrigou-se a região com seringa descartável de 20 ml contendo soro fisiológico estéril, com o objetivo de evitar a desnaturação da enzima fosfatase alcalina, responsável pela liberação de fosfato inorgânico necessário no processo de mineralização e consequentemente necrose óssea, prejudicando a integração com o biomaterial (ERIKSSON; ALBREKTSSON, 1983).

Fig 13 - A- Perfuração nos pavilhões auriculares; B- Infiltração de anestésico com vasoconstrictor; C- Incisão 20mm; D- Divulsão do periósteo.

Estes defeitos ósseos de 5,0 mm de diâmetro interno foram confeccionados com o auxílio da broca Trefina (Neodent, PR, Brasil) adaptada no contra-ângulo a um micromotor (KaVo® Dental Excellence, SC, Brasil), (Fig.14A), em baixa velocidade (20 000 rpm), sob irrigação de solução fisiológica constante para se obter um fragmento de osso arredondado (Fig.14C), preservando a integridade da dura-máter e do cérebro. As duas cavidades, direita e esquerda, foram distribuídas lateralmente a sutura sagital mediana, nos ossos parietais de acordo com os estudos de Bosch, Melsen e Vargervik (1998) (Fig.14B).

Fig. 14 – A) Confecção dos defeitos nos ossos parietais com broca trefina 5mm; B) Exposição da área cirúrgica; C) Retirada do fragmento ósseo; D) Cavidade com coágulo no parietal esquerdo e β -TCP® no parietal a direito.

Pesou-se o β -TCP® (Bionnovation Biomedical, SP, Brasil) (Fig.15A) em balança analítica (MicroNal® Equipamentos de Precisão, SP, Brasil) aproximadamente 0,015g (Fig.15B) e em seguida, o depositou na cavidade do parietal esquerdo nos animais dos Grupos GAG e GAL procurando o completo preenchimento. As cavidades do parietal direito foram confeccionadas da mesma forma que o parietal esquerdo, porém sem a inserção da biocerâmica, sendo preenchidas por coágulo sanguíneo (Fig.14D).

Fig. 15 – A) β -TCP®, Bionnovation Biomedical, SP, Brasil, cerâmica granulada (0,1--5mm/0,5g); B) Pesagem em balança analítica (MicroNal® Equipamentos de Precisão, SP, Brasil)

Os tecidos moles foram reposicionados (Fig.16A), cuidando para que o periósteo recobrisse as cavidades, suturando-o (sutura simples) com fio de nylon 5.0 (Mononylon® Somerville S.A) (Fig.16B) e o couro cabeludo (sutura contínua espiral) com fio seda 4.0 (Ethicon® Johnson & Johnson Company) (Fig.16C). A região foi limpa com gaze umedecida em soro fisiológico, para remoção dos resíduos de sangue. Os animais foram colocados na posição de decúbito ventral em suas gaiolas correspondentes e expostos à luz incandescente para recuperação da anestesia (Fig.16D). Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos os animais receberam antibiótico em dose única Flotril® 2,5%, (Schering-Plough S.A., RJ, Brasil), na dose de 0,2mL/Kg e analgésico dipirona Analgex® V (Agener União, SP, Brasil), na dose de 0,06mL/Kg, em aplicações intramusculares (Fig.11A) A aplicação do analgésico foi mantida a cada 12 horas, durante 3 dias.

Fig. 16 – A) Sutura do plano profundo (periósteo) com fio de nylon 5.0 (Mononylon® Somerville S.A); B) Reposicionamento do periósteo sobre a área cirúrgica; C) Sutura do plano superficial (pele) com fio seda 4.0 (Ethicon® Johnson & Johnson Company); D) Animal exposto a luz incandescente após cirurgia.

4.4 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES

Por injeção de dose excessiva do anestésico utilizado anteriormente, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados após 10, 20, 40 e 60 dias pós-operatório.

A calvária foi exposta (Fig.17A), e em seguida removida com auxílio da Broca Esférica 3 Kgs® (Kg Sorensen, SP, Brasil) (Fig.16B) e os ossos parietais foram separados preservando os tecidos moles suprapariosteais (Fig.17C). Os animais foram descartados em sacos plásticos, colocados por 24 horas no freezer -80°C e enviados para incineração, conforme protocolo do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP.

Fig. 17 – A) Exposição da área cirúrgica coberta com periósteo; B) Remoção da calvária com broca esférica 3 Kgs® (Kg Sorensen, SP, Brasil); C) Ossos Parietais com tecidos moles suprapariosteais.

As peças foram fixadas em formol tamponado a 10% (tampão fosfato com pH aproximadamente 7,2) por um período de 48 horas. Após esse período, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e colocadas em EDTA a 10% (ácido etilenodiamino tetra-acético), trocadas a cada 48 horas. Durante esses intervalos de troca de EDTA foram realizadas análises radiográficas com filme Oclusal Insight Kodac® (Kodac Eastman Co, EUA) para confirmar o processo de desmineralização (Fig.18A). Em seguida, o tecido foi processado pela técnica de inclusão em parafina (Fig.18B). As secções histológicas foram obtidas por cortes transversais com espessura de 5,0 μ m no MicrótoMO semi-automático (Leica® RM 2245), levando em consideração a região central do defeito (de maior diâmetro) (Fig.18C).

Foram confeccionadas 6 lâminas com 5 cortes cada, submetidas à coloração Hematoxilina e Eosina para estudo histomorfológico e histomorfométrico.

Fig. 18 - A- Radiografia para confirmar a desmineralização das calotas cranianas; B- Inclusão dos fragmentos em blocos de parafina; C- Micrótomo Leica® RM 2245; D- Computador com microscópio óptico (OLYMPUS BX-50) e câmera fotográfica acoplada (OLYMPUS DP-71).

4.5 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

Para a descrição histomorfológica das áreas do defeito ósseo, em todos os espécimes foram consideradas as regiões central e da borda, para avaliar a incorporação do biomaterial no leito receptor, a formação de tecido de granulação, infiltrado de células inflamatórias e sanguíneas, e formação dos tecidos ósseo primário (osso imaturo) e ósseo secundário (osso lamelar - maturação óssea). Para isso, foram avaliados cinco cortes semisseriados do leito cirúrgico por lâmina de cada espécime.

Para a análise histomorfométrica, as lâminas coradas com a Hematoxilina e Eosina foram observadas no microscópio de luz Olympus BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) e as fotografias foram capturadas em objetivas 4x e 40x com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71, Tokyo, Japan).

A análise quantitativa foi realizada no computador (Processador Pentium Core 2 Duo; Intel Corporation, Santa Clara, CA, USA) utilizando o Programa Image J® 1.50d (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.7_67; 64-bit) . Dos cortes semi-seriados obtidos, dois cortes mais centrais do defeito com distância

entre eles de 300 μm foram capturados. A área total do bloco ósseo removido ou área total do defeito (A_T) e a área de formação de novo osso (A_{NO}) de cada defeito foi determinado (Fig. 19A e B). O percentual de tecido ósseo neoformado (P_{ON}) foi calculado pela seguinte relação: $P_{ON} = A_{NO} \times 100/A_T$.

Fig. 19 A - Área total do defeito (A_T); B - Área da neoformação óssea 1 e 2 (A_{NO}). Programa Image J® (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, Java 1.7_67; 64-bit)

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

Foi realizada no computador utilizando o Programa ImagePro-Plus® 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA).

Para análise da influência do tempo na formação óssea dentro de cada grupo experimental foi utilizado ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e *post hoc* teste de Tukey.

Para avaliar possíveis interferências na formação óssea associado ao quadro clínico dos animais submetidos ou não ao alcoolismo para cada tratamento (coágulo e biomaterial) foi utilizado Teste “t” para amostras independentes

Para verificar a interferência do tipo de tratamento (coágulo e biomaterial) na formação óssea em cada condição clínica (alcoolizado ou não) e em cada período experimental foi utilizado Teste “t” pareado.

Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. $N=5$ defeitos/período para cada grupo.

---

5 RESULTADOS

---

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS CLÍNICOS

Ao longo do experimento não ocorreram alterações visuais quanto aos aspectos da urina, fezes e pelos. Na área cirúrgica não foi observado ulcerações ou complicações no processo de cicatrização.

5.2 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOLÓGICAS

Os resultados histomorfológicos de cada Grupo experimental serão descritos detalhadamente nos períodos analisados e posteriormente por comparação entre GC-AG vs. GC-AL; GC-AG vs. GB-AG e GB-AG vs. GB-AL de acordo com os objetivos propostos.

5.2.1 GRUPO COÁGULO ÁGUA (GC-AG) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 20)

10 dias: A1-A2) Notar formação óssea na borda do defeito (B) e o preenchimento do defeito por tecido conjuntivo fibroso (TCf). Em destaque (A2) a formação óssea – osso imaturo (asterisco) envolto por tecido conjuntivo frouxo (TC);

20 dias: B1-B2) Notar pequena formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) e a formação de uma fina faixa de conjuntivo fibroso (TCf) preenchendo grande parte do defeito. Em destaque (B2) pequena formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) e o tecido conjuntivo fibroso (TCf);

40 dias: C1-C2) Observe discreto aumento da formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) comparativamente ao período de 20 dias com fina faixa de tecido conjuntivo fibroso preenchendo o centro do defeito;

---

60 dias: D1-D2) Observe parcial fechamento centrípeto do defeito por tecido ósseo maduro (asterisco) e a região central preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Em destaque o novo osso maduro (asterisco) próximo à borda do defeito e a faixa de tecido conjuntivo fibroso (TCf).

Fig. 20 - Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com coágulo sanguíneo que receberam como dieta líquida água (GC-AG) nos diferentes períodos experimentais. Tegumento (TE); Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Neoformação óssea – osso imaturo (asterisco); Tecido conjuntivo frouxo (TC). Coloração H.E., objetivas 4x (A₁, B₁, C₁ e D₁) e 40x (A₂, B₂, C₂ e D₂).

5.2.2 GRUPO COÁGULO ÁLCOOL (GC-AL) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 21)

10 dias: A1-A2) Notar mínima formação óssea na borda do defeito (B) e o preenchimento do defeito por tecido conjuntivo fibroso. Em destaque (A2) pequena formação de osso imaturo na borda do defeito e a presença de tecido reacional (TR) contendo células inflamatórias, devido o extravasamento das partículas do β -TCP® do orifício bilateral;

20 dias: B1-B2) Notar aumento da formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) comparada ao período anterior. Observe que o defeito atingiu a sutura sagital mediana. Em destaque (B2) pequena formação óssea na borda do defeito (B) e restos/fragmentos de tecido ósseo trefinado (FO);

40 dias: C1-C2) Observe formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) e o processo inflamatório decorrente do extravasamento do biomaterial;

60 dias: D1-D2) Observe formação/remodelação do tecido ósseo da borda do defeito (asterisco) e a região central preenchida por uma fina faixa de tecido conjuntivo fibroso. Note que o defeito atingiu a sutura sagital mediana. Em destaque (D2) do tecido ósseo maduro da borda do defeito (asterisco) e o tecido conjuntivo fibroso (TCf) com áreas contendo células inflamatórias (área oval tracejada).

Fig. 21- : Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com coágulo sanguíneo que receberam como dieta líquida álcool a 25% (GC-AL) nos diferentes períodos experimentais. Tegumento (TE); Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Tecido reacional (TR); Tecido conjuntivo frouxo (TC); Formação óssea - osso imaturo (asterisco); Fragmentos de tecido ósseo trefinado (FO); Processo inflamatório (área oval tracejada). Coloração H.E., objetivas 4x (A₁, B₁, C₁ e D₁) e 40x (A₂, B₂, C₂ e D₂).

5.2.3 GRUPO BIOMATERIAL ÁGUA (GB-AG) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 22)

10 dias: A-A2) Notar ausência de formação óssea na borda do defeito (B) e o preenchimento do defeito por tecido reacional (TR). Em destaque (A2) o tecido reacional (TR) contendo pequenas partículas do material envoltas por tecido conjuntivo frouxo (TC) com inúmeras células inflamatórias mononucleares (ver detalhe);

20 dias: B1-B2) Notar pequena formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B), presença de tecido conjuntivo fibroso (TCf) separando o tecido reacional (TR). Observe a diminuição do tecido reacional (TR) em relação ao período anterior;

40 dias: C1-C2) Observe o aumento da formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) comparativamente ao período de 20 dias com redução do tecido reacional e a substituição por tecido conjuntivo fibroso;

60 dias: D1-D2) Observe parcial fechamento centrípeto do defeito por tecido ósseo maduro (asterisco) e a região central preenchida por tecido reacional de menor intensidade comparativamente aos períodos anteriores. Em destaque a formação óssea (asterisco) próximo a borda do defeito mostrando a faixa de tecido conjuntivo fibroso (TCf) separando a área central ocupada pelas partículas de material envoltas por células inflamatórias.

Fig. 22 - Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com o β -TCP® (Bionnovation) que receberam como dieta líquida água (GB-AG) nos diferentes períodos experimentais Tegumento (TE); Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Tecido reacional (TR); Tecido conjuntivo frouxo (TC); Formação óssea - osso imaturo (asterisco). Coloração H.E., objetivas 4x (A₁, B₁, C₁ e D₁) e 40x (A₂, B₂, C₂ e D₂).

5.2.4 GRUPO BIOMATERIAL ÁLCOOL (GB-AL) NOS PERÍODOS 10, 20, 40 E 60 DIAS (Fig. 23)

10 dias: A1-A2) Notar pequena formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) e o preenchimento do defeito por tecido reacional (TR). Em destaque (A2) o tecido reacional (TR) contendo pequenas partículas do material envoltas por tecido conjuntivo frouxo (TC) com inúmeras células inflamatórias mononucleares (ver detalhe);

20 dias: B1 e B2) Notar ausência de formação óssea na borda do defeito (B) e a formação de um tecido conjuntivo fibroso (TCf) separando o tecido reacional (TR). Observe a diminuição do tecido reacional (TR) em relação ao período anterior;

40 dias: C1 e C2) Observe aumento na formação óssea (asterisco) na borda do defeito (B) comparativamente aos períodos anteriores. Em destaque (C2) o tecido reacional contendo inúmeros aglomerados de partículas do material envoltos por células inflamatórias mononucleares;

60 dias: D1-D2) Observe parcial fechamento centrípeto do defeito por tecido ósseo (asterisco), com destaque para a formação de ilha óssea (asterisco') e a região central preenchida por tecido conjuntivo fibroso (TCf). Note em D2, a formação óssea (asterisco), a faixa de tecido conjuntivo fibroso (TCf) separando a região central preenchida por tecido reacional.

Fig. 23 - Fotomicrografias de corte transversal do defeito ósseo craniano preenchido com o β -TCP® (Bionnovation) que receberam como dieta líquida álcool a 25% (GB-AL) nos diferentes períodos experimentais. Tecido conjuntivo fibroso (TCf); Borda (B); Tecido reacional (TR); Formação óssea - osso imaturo (asterisco). Coloração H.E., objetivas 4x (A₁, B₁, C₁ e D₁) e 40x (A₂, B₂, C₂ e D₂).

5.3 Comparação Morfológica entre Grupos

No quadro histológico de todos os animais mostrou que a formação óssea ocorreu de forma centrípeta a partir das bordas do defeito, sendo mais evidente nos grupos que consumiram água (GAG) em relação aos de álcool (GAL) nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias.

5.3.1 GC-AG vs. GC-AL

Ao compararmos a influência do consumo crônico de etanol no processo de reparo ósseo verificamos que, os defeitos do GC-AG (Fig. 20) apresentaram evidências de maior formação óssea na borda do defeito e preenchimento por tecido conjuntivo mais organizado em comparação ao GC-AL (Fig. 21) em todos os períodos experimentais. No caso dos animais alcoolizados observaram-se evidências de maior reação inflamatória em relação ao GC-AG em todos os períodos experimentais (Compare cada período da Fig. 20 com o respectivo na Fig. 21).

5.3.2 GC-AG vs. GB-AG

Ao compararmos a eficácia do biomaterial β -TCP como substituto ósseo no processo de reparo craniano verificou-se que todos os defeitos GB-AG apresentaram evidências de menor formação óssea em comparação aos defeitos tratados apenas com coágulo GC-AG (compare a formação óssea da Figura 20 com a Figura. 22 em todos os períodos experimentais). O tecido reacional ao redor das partículas do biomaterial era caracterizado inicialmente por grande quantidade de células inflamatórias mononucleares, principalmente macrófagos e linfócitos (Fig. 22A e 22B) e poucas fibras colágenas. Aos 20 dias, ocorreu a formação de uma cápsula fibrosa separando a formação óssea da borda do defeito e o tecido reacional (ver detalhe da Fig. 2B). Conforme o biomaterial foi sendo reabsorvido, a reação inflamatória diminuiu e foi substituída por tecido conjuntivo fibroso (compare as Fig. 22A e B com as Figs 22C e 22D). Nestes períodos mais tardios alguns aglomerados de biomateriais mostravam-se envoltos por células gigantes multinucleadas, cápsula inflamatória.

5.3.3 GB-AG vs. GB-AL

Ao compararmos a influência do álcool nos defeitos tratados com β -TCP observou-se no GB-AL evidências de menor formação óssea em relação GB-AG durante todo estudo experimental, sendo mais pronunciado nos períodos finais de 40 e 60 dias (comparar as Figuras: 22 C₁ e D₁ e 23 C₁ e D₁). Além disso, verificou-se nos defeitos do GB-AL extravasamento do biomaterial que contaminou o defeito contralateral tratado com coágulo (observe a presença de partículas do biomaterial nas bordas dos defeitos do GC-AL, Fig. 23 A e 23 C).

5.4 OBSERVAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICA

Quando avaliamos a influência do tempo na formação óssea dentro de cada grupo experimental (Fig. 24) observou-se o mesmo perfil gráfico para os grupos preenchidos com coágulo que consumiram água ou álcool. O percentual de osso neoformado no GC-AG e GC-AL foi de, respectivamente, 1,49%% e 0,56% aos 10 dias, aumentando gradualmente 4,8 vezes aos 40 dias e não apresentando diferenças significativas no período de 60 dias.

Nos grupos tratados com biomaterial o perfil gráfico mostrou-se diferente com relação ao tipo de dieta líquida. No GB-AG, o percentual de osso neoformado aumentou substancialmente durante todo período experimental, passando de 1,04% aos 10 dias para 9,8% aos 60 dias. No GB-AL, a média do percentual de formação óssea apresentou um pequeno aumento entre 10 dias (1,6%) e 60 dias (4,05%), porém não foi estatisticamente significativa.

Fig. 24 - Gráfico do percentual de formação óssea (%) nos diferentes períodos de reparo para cada grupo experimental: ANOVA a um critério (tempo) para amostras independentes e *post hoc* teste de Tukey. Letras diferentes $p < 0.05$, $N = 5$ defeitos/período.

Para avaliar possíveis interferências na formação óssea associado ao quadro clínico dos animais (alcoolizado e não alcoolizado) confrontou-se o percentual de osso neoformado obtidos entre GC-AG versus GC-AL e GB-AG versus GB-AL para cada período experimental. Gráficamente (Fig. 25) observou-se maior percentual de formação óssea nos grupos que consumiram água (GC-AG e GB-AG) comparativamente aos que consumiram álcool (GC-AL e GB-AL), sendo estatisticamente significativa nos períodos finais de 40 e 60 dias.

Fig. 25 - Gráfico do percentual de formação óssea nos animais alcoolizados e não alcoolizados para cada tratamento (coágulo e biomaterial): Teste "t" para amostras independentes. Asterisco $p < 0,05$, $N=5$ defeitos/período para cada grupo.

Para verificar a interferência do tipo de tratamento (Coágulo e Biomaterial) na formação óssea, confrontaram-se os defeitos preenchidos com o biomaterial e coágulo em cada condição clínica em cada período experimental. Graficamente (Fig. 26) nos defeitos tratados com coágulo observou-se maior formação óssea nos animais não alcoolizados quando comparados com os alcoolizados nos períodos de 20 (5,54% vs. 3,2%) e 40 dias (8,7% vs. 6,4%). Já nos defeitos tratados com biomaterial a formação óssea foi similar entre os animais alcoolizados e não alcoolizados durante todo o período experimental.

Fig. 26 - Gráfico 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. Asterisco $p < 0,05$, $N=5$ defeitos/período para cada grupo.

6 DISCUSSÃO

---

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo experimental objetivou-se avaliar a influência do consumo de etanol no processo de reparo ósseo de defeitos cranianos tratados com Beta Fosfato Tricálcico (β -TCP®, Bionnovation Biomedical, SP, Brasil) comparativamente aos preenchidos com coágulo sanguíneo. Após as análises, conclui-se que o álcool interfere negativamente no processo natural de reparo ósseo e na eficácia do biomaterial β -TCP®.

Atualmente existem numerosas estratégias clínicas aplicadas à regeneração óssea por injúrias de diferentes origens. No entanto, essas estratégias foram primeiramente analisadas por testes adequados em modelos de animais padronizados para serem extrapoladas em seres humanos (EINHORN, 1999). Dessa forma, se torna necessário considerar alguns fatores antes de desenvolver um estudo experimental tais como: modelo de animal, idade e a área do defeito.

A maioria das pesquisas concentra-se em modelos de roedores principalmente pela reprodutibilidade, viabilidade econômica, relevante clinicamente, permite vários tipos de análises, oferece pouca morbidade/mortalidade antes da etapa final do experimento e possibilita gerar dados estatisticamente adequados devido à relação da idade do animal com a idade humana, (SCHIMITZ; HOLLINGER, 1986; EINHORN, 1999. CANCEDDA; GIANNONI; MASTROGIACOMO, 2007; PEARCE et al., 2007; BODDE et al., 2008; REICHERT et al., 2010).

A escolha por animal jovem adulto foi devido aos dados relatados por Chan; Duque, (2002), Lu et al., (2005) e Lu et al., (2008), onde há nessa fase, maior número de células osteoprogenitoras, alta taxa de diferenciação osteogênica e grande densidade de novos vasos sanguíneos – angiogênese. Sendo assim, a metodologia aplicada nesse estudo experimental está de acordo à literatura, os quais visam à avaliação do comportamento dos biomateriais de preenchimento ósseo (MOGHADAM et al., 2004)

O uso da calvária de ratos em estudos experimentais permite um defeito reprodutível que pode ser gerado de forma rápida, não requer a fixação para estabilização do esqueleto, por ser um sítio anatômico com stress mecânico limitado

---

e estabilidade relativa das estruturas circundantes incluindo a borda do defeito, os músculos temporais e o ventre frontal do occipitofrontal criando um ambiente protegido, possibilitando análises da neoformação na área cirúrgica (TAKAGI; URIST, 1982; MANKANI et al., 2006). Além disso, o defeito de calvária serve como um modelo de formação óssea intramembranosa e, portanto, pode ser aplicável a enxertos de biomateriais indicado a osso laminar, predominantemente cortical, como nos casos de defeitos do complexo craniofacial em seres humanos (FERLAND et al., 2011).

O modelo experimental empregado nessa pesquisa foi à confecção de dois orifícios bilaterais, preenchidos com biomaterial e outro por coágulo sanguíneo. Isso permite um estudo pareado, sendo adequado para avaliar a eficácia do β -TCP no reparo ósseo como observado nos estudos de Grandi, (2006) e León, (2008).

Existem muitas controvérsias quanto às dimensões de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos, a idade e o padrão experimental (GOMES; FERNANDES, 2011). Estudos anteriores definiram um defeito ósseo como tamanho crítico quando apresentava dimensão, em determinado osso e modelo animal, que impediria a regeneração espontânea, considerando todo período de vida (SCHMITZ; HOLLIGER, 1986) Porém esse conceito não corresponde ao tempo experimental da maioria das pesquisas que não se estendem por toda vida do animal. Mais recentemente, a definição de defeito de tamanho crítico seriam dimensões que impeçam a cicatrização completa ao longo do período experimental (GOSAIN et al., 2000).

Nesse presente estudo foram confeccionados dois orifícios circulares de 5,0 mm, bilateralmente à sutura sagital mediana na calvária de ratos conforme estudos de Bosch, Melser e Vargervik, (1998). A dimensão do tamanho desses defeitos é considerada de tamanho crítico por não haver cicatrização completa durante todo período experimental. Essa afirmação está de acordo com resultados da literatura que apontam cicatrização incompleta em defeitos de 2,3 mm por 6 semanas (COOPER et al., 2010) e em 5,0 mm por 8 semanas (PETRIDIS et al., 2015)

O tempo de exposição ao álcool nesse estudo foi em média 24 semanas podendo ser considerado um modelo experimental de alcoolização crônica, visto que à vida média do rato é relativamente curta ao compará-la à perspectiva de vida humana (STIPP, 2003; QUIN, 2005; DE DECO et al., 2015).

Vários autores acreditam que a ingestão crônica, e em grande quantidade do etanol, atua direta e indiretamente na maioria dos tecidos e órgãos, incluindo o metabolismo ósseo. (CALLACI et al., 2009; CHEN et al., 2011; JUNG et al., 2011). A importância de estudar os efeitos do uso prolongado de etanol no tecido ósseo, como nesse trabalho, deve-se ao efeito redutor na formação óssea durante o processo de cicatrização (ELMALI et al., 2002).

A escolha do design experimental de alcoolização em ratos com garrafa de etanol separada do alimento é devido à facilidade do uso e a capacidade de simular o consumo em humanos (GIL-MARTIN et al., 1998).

Alguns dados histomorfológicos dos animais do grupo GC-AL, (Fig. 21), apresentaram contaminação por partículas do β -TCP. Tal fato pode ser atribuído à proximidade dos defeitos, ao menor diâmetro da calvária dos animais alcoolizados em relação ao grupo água, ao contato das partículas do biomaterial com o exsudato formando uma pasta e a ação mecânica do tegumento propicia o extravasamento do biomaterial para área adjacente (CESTARI et al., 2009). Esse fato pode ter interferido em alguns resultados histomorfométricos nos períodos de 40 e 60 dias

Em alguns animais dos grupos GC-AL e GB-AL a lesão se estendeu até a sutura sagital mediana, podendo ter influenciado negativamente no processo de reparo ósseo (ALBERIUS et al., 1990)

A avaliação da influência do tempo entre os grupos GB-AG vs. GB-AL apresentaram diferença significativa quanto à formação óssea. Esses resultados podem ser elucidados por alguns estudos que apontam o retardo da cicatrização óssea pelos efeitos deletérios diretos e indiretos do álcool (CHAKKALAKAL, 2005; SUH et al., 2005; ASKEW et al., 2011).

As análises histomorfológica GC-AG vs. GC-AL e GB-AG vs. GB-AL mostraram o efeito prejudicial do consumo crônico de etanol no processo de reparo ósseo (BUCHAIM et al., 2009; LIMA et al., 2011; DOS S KOTAKE et al., 2015). Os resultados histomorfométricos confirmaram a interferência negativa do etanol sobre a homeostase fisiológica, consequentemente no reparo ósseo e na ação osteocondutora do β -TCP (Fig. 25).

Na comparação entre os grupos GB-AG vs. GC-AG (Fig. 22 e 20), observaram-se intensa reação inflamatória, com retardo na formação óssea, Esses dados foram confirmados por estudos de Yun et al., (2011) e Muniz, (2012). Dessa forma, sugere-se que a frequência do tecido reacional devido à presença das

---

partículas do β -TCP, por todo período experimental pode justificar o retardo da cicatrização óssea.

Corroborando com esse achado, estudos recentes sugere que a lesão óssea (por fratura ou intervenção cirúrgica) desencadeia uma cascata de eventos, alguns dos quais são dependentes da presença de determinados mediadores pró-inflamatórios necessários para o processo de cicatrização natural. Porém se a inflamação persistir, devido à presença de determinados substitutos ósseos e/ou implantes contaminados, acarretará em retardo ou até a não regeneração óssea (GERSTENFELD et al., 2001; THOMAS; PULEO, 2011).

Estudos em humanos apontam que o β -TCP na fase pura pode ser reabsorvido em 5 a 6 meses (REY, 1990; TRISI et al., 2003; BIONNOVATION, 2015). Pela falta de dados na literatura sobre a degradação do biomaterial em animais e considerando a meia vida do rato ser menor em relação ao ser humano, pode-se sugerir que o β -TCP demorou a ser reabsorvido, prolongando o processo inflamatório e conseqüentemente o retardo da neoformação óssea. Pode ser observados nos últimos períodos, aglomerados do biomaterial envoltos por células gigantes multinucleadas (ver destaque Fig 22A₂ e 22D₂).

Sabendo os efeitos do β -TCP, era esperado que a análise histomorfométrica entre os grupos GC-AL vs. GB-AL apresentasse maior formação óssea no grupo tratado com o coágulo. Porém os resultados foram similares, possivelmente pela contaminação de partículas no grupo GC-AL.

Com essas observações é possível afirmar que o β -TCP (Bionnovation®) não foi capaz de contribuir para regeneração óssea, apresentando pior desempenho nos animais que consumiram álcool.

6.1 LIMITAÇÕES DA PESQUISA E APLICAÇÕES FUTURAS

Para futuras pesquisas envolvendo reparo ósseo em calvária de ratos alcoolizados ou não e com o tratamento de β -TCP devem ser apontados os fatores que podem ter influenciado na resposta cicatricial do defeito tais como: extravasamento das partículas do biomaterial para a área adjacente, causando a contaminação do defeito preenchido por coágulo sanguíneo, a não padronização da quantidade ingerida de etanol por cada animal durante todo experimental, a

---

dificuldade em executar o protocolo cirúrgico na confecção de dois orifícios bilaterais de 5 mm nos ossos parietais em animais alcoolizados e o não acompanhamento da massa corporal do animal, embora nesse experimento seguiu-se o protocolo utilizado nos estudos de Buchaim et al., (2009).

Portanto para os próximos trabalhos seria viável a utilização da regeneração guiada por meio de membrana reabsorvível para impedir a dispersão das partículas, bem como a padronização da quantidade de álcool, a fim de estabelecer uma relação dose-dependência entre a massa corporal vs. ingestão de etanol e analisar a dimensão entre as suturas Parieto temporais dos animais alcoolizados para em seguida determinar o diâmetro dos defeitos.

---

7 CONCLUSÕES

---

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa levam a concluir que:

- a) O etanol apresentou efeitos deletérios diretos e indiretos sobre o processo de reparo ósseo natural em comparação aos animais que consumiram água;
  - b) de acordo com os resultados histomorfológicos e histomorfométricos o tratamento do defeito craniano com β -TCP® não promoveu maior formação óssea comparativamente aos defeitos contralaterais preenchidos com coágulo sanguíneo;
  - c) o tratamento de defeitos cranianos com β -TCP® em ratos alcoolizados influencia negativamente o reparo ósseo em relação aos tratados com coágulo.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

(FORMATO VANCOUVER)

Aguiar AS, Da-Silva VA, Boaventura GT. Can calories from ethanol contribute to body weight preservation by malnourished rats? *Braz J Med Bio Res.* 2004;37:841-6.

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res.* 2008 Feb;87(2):107-18.

Alberius P, Isaksson S, Klinge B, Sjögren S, Jönsson J. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits. Implications for positioning of osteotomies. *J Craniomaxillofac Surg.* 1990 Aug;18(6):271-9.

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-70.

Alderazi, Y, Brett, F. Alcohol and the nervous system. *Diagn Pathol.* 2007;13(3):203-9.

Al-Sanabani JS, Madfa AA, Al-Sanabani FA. Application of calcium phosphate materials in dentistry. *Int J Biomater.* 2013;2013:876132.

American Psychiatric Association. Alcohol Use Disorder. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* Arlington: American Psychiatric Publishing; 2013.

Anderson JM, Miller KM. Biomaterial biocompatibility and the macrophage. *Biomaterials.* 1984 Jan;5(1):5-10.

Apte M, Pirola R, Wilson J. New insights into alcoholic pancreatitis and pancreatic cancer. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009 Oct;24 Suppl 3:S51-6.

Askew A, Chakkalakal D, Fang X, McGuire M. Delayed Fracture Healing in Alcohol Abusers: a Preliminary Retrospective Study. *Open Bone J.* 2011; (3):1-5.

Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, Zannettino AC, O'Loughlin PD, Morris HA. Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone*. 2007 Jun;40(6):1517-28.

Barradas AM, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater*. 2011 May 15;21:407-29.

Barrett RL, Harris EF. Anabolic steroids and craniofacial growth in the rat. *Angle Orthod*. 1993 Winter;63(4):289-98.

Benedetti A, Parent ME, Siemiatycki J. Lifetime consumption of alcoholic beverages and risk of 13 types of cancer in men: results from a case-control study in Montreal. *Cancer Detect Prev*. 2009;32(5-6):352-62.

Bignon A, Chevalier J, Fantozzi G. Effect of ball milling on the processing of bone substitutes with calcium phosphate powders. *J Biomed Mater Res*. 2002;63(5):619-26.

BIONNOVATION – Bionnovation Produtos Biomédicos LTDA [homepage na internet]. Bauru, São Paulo: Beta TCP, Descrição da biocerâmica fosfofáltica bifásica micro-macroporosa de β -TCP/HA; [acesso em 2015 abr 27]. Disponível em: <http://www.bionnovation.com.br>; <http://www.bionnovation.com.br/downloads/bulas/betatcp/BetaTCP-03.pdf>.

Blokland A, Prickaerts J, Raaijmakers W. Reduced level of anxiety in adult Lewis rats after chronic ethanol consumption. *Physiol Behav*. 1992 Feb;51(2):245-8.

Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Apr;85(1):206-17.

Boden SD. Overview of the biology of lumbar spine fusion and principles for selecting a bone graft substitute. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002 Aug 15;27(16 Suppl 1):S26-31.

Boé DM, Vandivier RW, Burnham EL, Moss M. Alcohol abuse and pulmonary disease. *J Leukoc Biol*. 2009 Nov;86(5):1097-104.

Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(33):6423-9.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):229-38.

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.

Boskey AL. Bone mineral and matrix. Are they altered in osteoporosis? *Orthop Clin North Am*. 1990 Jan;21(1):19-29.

Braux J, Velard F, Guillaume C, Bouthors S, Jallot E, Nedelec JM, Laurent-Maquin D, Laquerrière P. A new insight into the dissociating effect of strontium on bone resorption and formation. *Acta Biomater*. 2011 Jun;7(6):2593-603.

Brkovic BM, Prasad HS, Konandreas G, Milan R, Antunovic D, Sándor GK, Rohrer MD. Simple preservation of a maxillary extraction socket using beta-tricalcium phosphate with type I collagen: preliminary clinical and histomorphometric observations. *J Can Dent Assoc*. 2008 Jul-Aug;74(6):523-8.

Buchaim RL, Buchaim DV, Andreo JC, Roque DD, Roque JS, Rodrigues AC. Efeitos de 03 dietas alcoólicas na reparação óssea em tíbia de ratos. *Cienc Odontol Bras*. 2009 abr./jun; 12 (2):17-23.

Buchaim, RL, Goissis, G, Andreo, JC, Roque, DD, Roque, JS, Buchaim, DV, Rodrigues, AC. Biocompatibility of anionic collagen matrices and its influence on the orientation of cellular growth. *Cienc Odontol Bras*. 2007; 10(3):12-20.

Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition*. 1999 Jul- Aug;15(7-8):583-9.

Burchardt H, Glowczewskie FP Jr, Enneking WF. The effect of Adriamycin and methotrexate on the repair of segmental cortical autografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am*. 1983 Jan;65(1):103-8.

Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int.* 2009;84(6):474-84.

Camilli JA, da Cunha MR, Bertran CA, Kawachi EY. Subperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Arch Oral Biol.* 2004 Sep;49(9):747-53.

Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials.* 2007 Oct;28(29):4240-50.

Caplan AI, Koutroupas S. The control of muscle and cartilage development in the chick limb: the role of differential vascularization. *J. Embryol. exp. Morph.* 1973; 29(3):571-83.

Caria PH, Kawachi EY, Bertran CA, Camilli JA. Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 May;65(5):847-54.

Casamenti F, Scali C, Vannucchi MG, Bartolini L, Pepeu G. Long-term ethanol consumption by rats: effect on acetylcholine release in vivo, choline acetyltransferase activity, and behavior. *Neuroscience.* 1993 Sep;56(2):465-71.

CEBRID - Departamento Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas [homepage internet]. São Paulo: folheto_alcool. São Paulo; [acesso em 2015 ago 15]. Disponível em: http://www2.unifesp.br/dpsicobio/cebrid/folhetos/alcool_.htm.

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. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Dec;29(12):2077-90.

Chan GK, Duque G. Age-related bone loss: old bone, new facts. *Gerontology.* 2002 Mar-Apr;48(2):62-71.

Chen H, Gilbert LC, Lu X, Liu Z, You S, Weitzmann MN, Nanes MS, Adams J. A new regulator of osteoclastogenesis: estrogen response element-binding protein in bone. *J Bone Miner Res*. 2011 Oct;26(10):2537-47.

Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ. A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res*. 2010 May;25(5):1117-27.

Cheung HS, Devine TR, Hubbard W. Calcium phosphate particle induction of metalloproteinase and mitogenesis: effect of particle sizes. *Osteoarthritis Cartilage*. 1997 May;5(3):145-51.

Cirmanová V, Bayer M, Stárka L, Zajícková K. The effect of leptin on bone: an evolving concept of action. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 1:S143-51.

Comarck DL. Fundamentos de histologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. P.132-49.

Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Gardi C, Ciccoli L, Giardini A, Vecchio D, Arezzini B. Ethanol-induced oxidative stress: basic knowledge. *Genes Nutr*. 2010 Jun;5(2):101-9.

Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int Suppl*. 2011 Apr;(121):S14-9.

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.

Cornier MA, Gayles EC, Bessesen DH. The effects of chronic ethanol consumption on energy balance in rats. *Metabolism*. 2002 Jun;51(6):787-91.

Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, Brabbs AC, van Beek EJ, Holen I, Skerry TM, Dunstan CR, Russell GR, Van Camp B, Vanderkerken

---

K. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3534-40.

Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, Fu Z, Yao Z, Qi Y, Keller ET. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(7):887-95.

Daré LR. Efeitos do β -hidroxi- β -metilbutirato sobre os músculos da mastigação e desenvolvimento craniofacial de ratos. 2012. 113f. [Dissertação] – Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo (SP). 2012.

de Deco CP, da Silva Marchini AM, Marchini L, da Rocha RF. Extended Periods of Alcohol Intake Negatively Affects Osseointegration in Rats. *J Oral Implantol*. 2015 Jun;41(3).

Diez A, Serrano S, Cucurull J, Mariñoso L, Bosch J, Puig J, Nogués X, Aubia J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. *Calcif Tissue Int*. 1997 Aug;61(2):168-71.

Dorgan JF, Reichman ME, Judd JT, Brown C, Longcope C, Schatzkin A, Campbell WS, Franz C, Kahle L, Taylor PR. The relation of reported alcohol ingestion to plasma levels of estrogens and androgens in premenopausal women (Maryland, United States). *Cancer Causes Control*. 1994 Jan;5(1):53-60.

dos S Kotake BG, Salzedas LM, Ervolino E, Calzzani RA, Sebald W, Issa JP. Bone Recuperation After rhBMP-2 Insertion in Alcoholic Animals-Experimental Study. *Curr Pharm Des*. 2015;21(24):3557-64.

dos Santos LA, Carrodéguas RG, Rogero SO, Higa OZ, Boschi AO, de Arruda AC. Alpha-tricalcium phosphate cement: "in vitro" cytotoxicity. *Biomaterials*. 2002 May;23(9):2035-42.

EINCOBIO - Einco Biomaterial Ltda [homepage na internet]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Pesquisa & Desenvolvimento / Biomateriais; [acesso em 2015 jul 16]. Disponível em: <http://www.eincobio.com.br/2011/port/pesquisa/biomateriais.php>.

Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. *Clin Orthop Relat Res*. 1999 Oct;(367 Suppl):S59-67.

Eleftheriadis E, Leventis MD, Tosios KI, Faratzis G, Titsinidis S, Eleftheriadi I, Dontas I. Osteogenic activity of β -tricalcium phosphate in a hydroxyl sulphate matrix and demineralized bone matrix: a histological study in rabbit mandible. *J Oral Sci*. 2010 Sep;52(3):377-84.

Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Güner G, Bora A. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Apr;26(4):509-13.

Eriksson AR, Albrektsson T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit. *J Prosthet Dent*. 1983 Jul;50(1):101-7.

Farfán Labonne BE, Gutiérrez M, Gómez-Quiroz LE, Königsberg Fainstein M, Bucio L, Souza V, Flores O, Ortiz V, Hernández E, Kershenovich D, Gutiérrez-Ruiz MC. Acetaldehyde-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocytes to oxidative damage. *Cell Biol Toxicol*. 2009 Dec;25(6):599-609.

Ferland CE, Lavery S, Beaudry F, Vachon P. Gait analysis and pain response of two rodent models of osteoarthritis. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011 Jan;97(3):603-10.

Fernandes EV, Goessler KF, Ramos SP, Altimari LR, Venancio EJ, Andrade FG. The effects of chronic alcohol ingestion and physical exercise in the body mass, food consumption and liquid ingestion of wistar rats. *Reveducfis*. 2010;21(3):527-33.

Fernandez-Solà J, Preedy VR, Lang CH, Gonzalez-Reimers E, Arno M, Lin JC, Wiseman H, Zhou S, Emery PW, Nakahara T, Hashimoto K, Hirano M, Santolaria-Fernández F, González-Hernández T, Fatjó F, Sacanella E, Estruch R, Nicolás JM, Urbano-Márquez A. Molecular and cellular events in alcohol-induced muscle disease. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Dec;31(12):1953-62.

Friday KE, Howard GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*. 1991 Jun;40(6):562-5.

Galbusera F, Bertolazzi L, Balossino R, Dubini G. Combined computational study of mechanical behaviour and drug delivery from a porous, hydroxyapatite-based bone graft. *Biomech Model Mechanobiol*. 2009 Jun;8(3):209-16.

García-Sánchez A, Gonzalez-Calvin JL, Díez-Ruiz A, Casals JL, Gallego-Rojó F, Salvatierra D. Effect of acute alcohol ingestion on mineral metabolism and osteoblastic function. *Alcohol Alcohol*. 1995 Jul;30(4):449-53.

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.

Gerstenfeld LC, Cho TJ, Kon T, Aizawa T, Cruceta J, Graves BD, Einhorn TA. Impaired intramembranous bone formation during bone repair in the absence of tumor necrosis factor-alpha signaling. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(3):285-94.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003 Apr 1;88(5):873-84a.

Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem*. 2003 Apr 1;88(5):873-84b.

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.

Giuliani N, Girasole G, Vescovi PP, Passeri G, Pedrazzoni M. Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Feb;23(2):381-5.

Glass GE, Pearse MF, Nanchahal J. Improving lower limb salvage following fractures with vascular injury: a systematic review and new management algorithm. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009 May;62(5):571-9.

Goldring SR, Clark CR, Wright TM. The problem in total joint arthroplasty: aseptic loosening. *J Bone Joint Surg Am*. 1993 Jun;75(6):799-801.

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 Z, Wezeman FH. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004 Mar;28(3):468-79.

González-Reimers E, Martín-González C, de la Vega-Prieto MJ, Pelazas-González R, Fernández-Rodríguez C, López-Prieto J, Alvisa-Negrín J, Santolaria-Fernández F. Serum sclerostin in alcoholics: a pilot study. *Alcohol Alcohol*. 2013 May-Jun;48(3):278-82.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Aug;106(2):360-71.

Goulet JA, Senunas LE, DeSilva GL, Greenfield ML. Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clin Orthop Relat Res*. 1997 Jun;(339):76-81.

Grandi G. Avaliação histomorfométrica comparativa entre o cimento de α -TCP e os grânulos de β -TCP/HA no reparo ósseo de calotas cranianas de ratos [dissertação]. Porto Alegre (RS): Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2006.

Griffiths HJ, Parantainen H, Olson P. Alcohol and Bone Disorders. *Alcohol Health Res World*. 1993;(17):299-304.

Gross J, Lapière CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci*. 1962; 54: 1197-204.

Gutierrez M, Hussain NS, Lopes MA, Afonso A, Cabral AT, Almeida L, Santos JD. Histological and scanning electron microscopy analyses of bone/implant interface using the novel Bonelike synthetic bone graft. *J Orthop Res*. 2006 May;24(5):953-8.

Habibovic P, Yuan H, van der Valk CM, Meijer G, van Blitterswijk CA, de Groot K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials*. 2005 Jun;26(17):3565-75.

Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2009;67(2):182-8.

Hang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. Farmacologia. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008. 829p.

Heider U, Langelotz C, Jakob C, Zavrski I, Fleissner C, Eucker J, Possinger K, Hofbauer LC, Sezer O. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2003 Apr;9(4):1436-40.

Hench LL. Bioceramics. *J Am Ceram Soc*. 1998; 81: 1705–28.

Hench, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.

Himes R, Wezeman FH, Callaci JJ. Identification of novel bone-specific molecular targets of binge alcohol and ibandronate by transcriptome analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Jul;32(7):1167-80.

HOBBS, W. R.; RALL T. W.; VERDOORN, T. A. Hipnóticos e Sedativos; Etanol. In: Goodman L. S.; Gilman A. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2007. cap. 17, p.264-289.

Hurley MM, Martin DL, Kream BE, Raisz LG. Effects of ethanol and acetaldehyde on collagen synthesis, prostaglandin release and resorption of fetal rat bone in organ culture. *Bone*. 1990;11(1):47-51.

Iwaniec UT, Trevisiol CH, Maddalozzo GF, Rosen CJ, Turner RT. Effects of low-dose parathyroid hormone on bone mass, turnover, and ectopic osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone*. 2008 Apr;42(4):695-701.

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.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

Khosla S, Westendorf JJ, Oursler MJ. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):421-8.

Klein RF, Carlos AS. Inhibition of osteoblastic cell proliferation and ornithine decarboxylase activity by ethanol. *Endocrinology*. 1995 Aug;136(8):3406-11.

Klein RF, Fausti KA, Carlos AS. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 May;20(3):572-8.

Klein RF. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 May;21(3):392-9.

Krishnan L, Willett NJ, Guldberg RE. Vascularization strategies for bone regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2014 Feb;42(2):432-44.

Lands WE. A summary of the workshop "alcohol and calories: a matter of balance". *J Nutr*. 1993 Jul;123(7):1338-41.

Lau A, von Dossow V, Sander M, MacGuill M, Lanzke N, Spies C. Alcohol use disorder and perioperative immune dysfunction. *Anesth Analg*. 2009 Mar;108(3):916-20.

Lee CM, Genetos DC, You Z, Yellowley CE. Hypoxia regulates PGE(2) release and EP1 receptor expression in osteoblastic cells. *J Cell Physiol*. 2007 Jul;212(1):182-8.

León MEA. Uso do cimento de fosfato de cálcio (Bonesource®) associado ou não a células tronco adultas de medula óssea no processo de reparação óssea [tese]. Camaragibe (PE): Faculdade de Odontologia de Pernambuco, Universidade de Pernambuco; 2008.

Li J, Habibovic P, Yuan H, van den Doel M, Wilson CE, de Wijn JR, van Blitterswijk CA, de Groot K. Biological performance in goats of a porous titanium alloy-biphasic calcium phosphate composite. *Biomaterials*. 2007 Oct;28(29):4209-18.

Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*. 1989 Oct;10(4):501-10.

Lieber CS. Alcohol, liver, and nutrition. *J Am Coll Nutr*. 1991 Dec;10(6):602-32.

Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis*. 2005 Feb;9(1):1-35.

Lieber CS. The discovery of the microsomal ethanol oxidizing system and its physiologic and pathologic role. *Drug Metab Rev*. 2004 Oct;36(3-4):511-29.

Lima CC, Silva TD, Santos L, Nakagaki WR, Loyola YC, Resck MC, Camilli JA, Soares EA, Garcia JA. Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Braz J Biol*. 2011 Feb;71(1):115-9.

Limeira júnior, F.A. Estudo do reparo de defeitos ósseos irradiados com laser 830nm submetidos ou não a implante de hidroxiapatita sintética e/ou membrana de osso bovino. 2004. 150f. [Tese] – Universidade Federal da Bahia, Bahia (BA). 2004.

Limeira Júnior, FA, Pinheiro, ALB, Gerbi, MEMM. Assessment of bone repair following the use of anorganic bone graft and membrane associated or not to 830nm laser light [abstract]. *SPIE*.2003; 4950: 30-36. *Lasers in Dentistry IX*; 2003 jan 26-27; Bellingham, WA.

Lisignoli G, Toneguzzi S, Pozzi C, Piacentini A, Riccio M, Ferruzzi A, Gualtieri G, Facchini A. Proinflammatory cytokines and chemokine production and expression by

---

human osteoblasts isolated from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol*. 1999 Apr;26(4):791-9.

Liu DM. Influence of porous microarchitecture on the in-vitro dissolution and biological behaviour of porous calcium phosphate ceramics. *Mater Sci Forum*. 1997; 250:183-208.

Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng*. 2004 Mar;32(3):477-86.

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.

Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, Marcucio RS. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*. 2005 Nov;23(6):1300-7.

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.

Malatová Z, Cízková D. Effect of ethanol on axonal transport of cholinergic enzymes in rat sciatic nerve. *Alcohol*. 2002 Feb;26(2):115-20.

Maloney WJ, Smith RL, Schmalzried TP, Chiba J, Huene D, Rubash H. Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement. *J Bone Joint Surg Am*. 1995 Sep;77(9):1301-10.

Maneesh M, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM. Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol*. 2006 Jul-Sep;50(3):291-6.

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.

Marsell R, Einhorn TA. Emerging bone healing therapies. J Orthop Trauma. 2010 Mar;24 Suppl 1:S4-8.

Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, Kuroda R, Shoji T, Iwasaki H, Suzuki T, Oyamada A, Horii M, Yokoyama A, Nishimura H, Lee SY, Miwa M, Doita M, Kurosaka M, Asahara T. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. J Cell Physiol. 2008 Apr;215(1):234-42.

Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. Osteoporos Int. 2012 Jan;23(1):1-16.

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. 2011 Sep;49(3):543-52.

MAZZONETTO, R.; DUQUE NETTO, H.; NASCIEMNTO, F.F. Enxertos ósseos em Implantodontia. São Paulo: Napoleão, 2012. 573p.

Mescher AL, Neff AW. Regenerative capacity and the developing immune system. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2005;93:39-66.

Mikosch P. Alcohol and bone. Wien Med Wochenschr. 2014 Jan;164(1-2):15-24.

Misch Carl E, DDS, MDS. Implantes Dentários Contemporâneos. 2a ed. **Santos**. 2000. São Paulo. 521-535.

Moghadam HG, Sándor GK, Holmes HH, Clokie CM. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. J Oral Maxillofac Surg. 2004 Feb;62(2):202-13.

Mukherjee DP, Smith DF, Rogers SH, Emmanuel JE, Jadin KD, Hayes BK. Effect of 3D-microstructure of bioabsorbable PGA:TMC scaffolds on the growth of chondrogenic cells. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2009 Jan;88(1):92-102.

Muniz YS. Avaliação histomorfométrica do reparo em defeitos de tamanho crítico criados em calvária de ratos, realizados com broca trefina ou instrumento piezoelétrico, preenchidos com biomaterial (Fosfato tricálcio). 2012. 55f. [Dissertação] - Faculdade de Odontologia de Barretos, São Paulo. 2009.

Murgatroyd PR, Van De Ven ML, Goldberg GR, Prentice AM. Alcohol and the regulation of energy balance: overnight effects on diet-induced thermogenesis and fuel storage. *Br J Nutr.* 1996 Jan;75(1):33-45.

Nery EB, LeGeros RZ, Lynch KL, Lee K. Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/beta TCP in periodontal osseous defects. *J Periodontol.* 1992 Sep;63(9):729-35.

Nyquist F, Berglund M, Nilsson BE, Obrant KJ. Nature and healing of tibial shaft fractures in alcohol abusers. *Alcohol Alcohol.* 1997 Jan-Feb;32(1):91-5.

Nyquist F, Halvorsen V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ. Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. *Acta Orthop Scand.* 1999 Apr;70(2):212-6.

Orii H, Sotome S, Chen J, Wang J, Shinomiya K. Beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. *J Med Dent Sci.* 2005 Mar;52(1):51-7.

O'Shea RS, Dasarathy S, McCullough AJ; Practice Guideline Committee of the American Association for the Study of Liver Diseases; Practice Parameters Committee of the American College of Gastroenterology. Alcoholic liver disease. *Hepatology.* 2010 Jan;51(1):307-28.

Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids.* 1996 Mar;31 Suppl:S77-82.

Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med.* 2002 Apr-Jun;48(2):142-8.

Patel VB, Worrall S, Emery PW, Preedy VR. Protein adduct species in muscle and liver of rats following acute ethanol administration. *Alcohol Alcohol*. 2005 Nov-Dec;40(6):485-93.

Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007 Mar 2;13:1-10.

Peng TC, Lian JB, Hirsch PF, Kusy RP. Lower serum osteocalcin in ethanol-fed rats. *J Bone Miner Res*. 1991 Feb;6(2):107-15.

Penolazzi L, Lambertini E, Tavanti E, Torreggiani E, Vesce F, Gambari R, Piva R. Evaluation of chemokine and cytokine profiles in osteoblast progenitors from umbilical cord blood stem cells by BIO-PLEX technology. *Cell Biol Int*. 2008 Feb;32(2):320-5.

Petridis X, Diamanti E, Trigas GCh, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 May;43(4):483-90.

Prystowsky JB, Huprikar JS, Rademaker AW, Rege RV. Human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis of crystalline cholesterol, bilirubin, and calcium hydroxyapatite in vitro. *Dig Dis Sci*. 1995 Feb;40(2):412-8.

Reichert JC, Epari DR, Wulschleger ME, Saifzadeh S, Steck R, Lienau J, Sommerville S, Dickinson IC, Schütz MA, Duda GN, Hutmacher DW. Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Feb;16(1):93-104.

Renooij W, Hoogendoorn HA, Visser WJ, Lentferink RH, Schmitz MG, Van Ieperen H, Oldenburg SJ, Janssen WM, Akkermans LM, Wittebol P. Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clin Orthop Relat Res*. 1985 Jul-Aug;(197):272-85.

Rey C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties. *Biomaterials*. 1990 Jul;11:13-5.

Robbins, Cotran. Patologia: Bases patológicas das doenças. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

Ronis MJ, Wands JR, Badger TM, de la Monte SM, Lang CH, Calissendorff J. Alcohol-induced disruption of endocrine signaling. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007 Aug;31(8):1269-85. Epub 2007 Jun 9.

Rose FR, Cyster LA, Grant DM, Scotchford CA, Howdle SM, Shakesheff KM. In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials*. 2004 Nov;25(24):5507-14.

Roy TD, Simon JL, Ricci JL, Rekow ED, Thompson VP, Parsons JR. Performance of degradable composite bone repair products made via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A*. 2003 Aug 1;66(2):283-91.

Rumpler M, Woesz A, Dunlop JW, van Dongen JT, Fratzl P. The effect of geometry on three-dimensional tissue growth. *J R Soc Interface*. 2008 Oct 6;5(27):1173-80.

Sampson HW, Hebert VA, Booe HL, Champney TH. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Nov;22(8):1746-53.

Sampson HW, Perks N, Champney TH, DeFee B II. Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 1996;20(8):1375–1384.

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.

Schnitzler CM, Macphail AP, Shires R, Schnaid E, Mesquita JM, Robson HJ. Osteoporosis in African hemosiderosis: role of alcohol and iron. *J Bone Miner Res*. 1994 Dec;9(12):1865-73.

Schnitzler CM, Mesquita JM, Shires R. Cortical and trabecular bone microarchitecture and turnover in alcohol-induced chronic pancreatitis: a histomorphometric study. *J Bone Miner Metab*. 2010 Jul;28(4):456-67.

Sezer O. Myeloma bone disease: recent advances in biology, diagnosis, and treatment. *Oncologist*. 2009 Mar;14(3):276-83.

Silva, ARS, Ribeiro, ACP, Salzedas, LMP, Soubheia, AMP, Suldefeld, MLMM. Radiographic bone density analysis of rats submitted to cronical alcoholism using digital image. *J Dent Sci*. 2007 Jan/Marc; 22(55):77-81.

Silverman LD, Lukashova L, Herman OT, Lane JM, Boskey AL. Release of gentamicin from a tricalcium phosphate bone implant. *J Orthop Res*. 2007 Jan;25(1):23-9.

Sing KSW, Everett DH, Haul RAW, Moscou L, Pierotti RA, Rouquerol J, Siemieniowska T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure Appl Chem*. 1985; 57: 603-19.

Slowing II, Vivero-Escoto JL, Wu CW, Lin VS. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008 Aug 17;60(11):1278-88.

Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(1):101-7.

Sugawara A. New generation of bone graft material. Part 1. Requirements for bone regeneration. *J Oral Implants*. 2006;26(1):55-74.

Sugawara A. New generation of bone graft material. Part 2. Tactics for bone regeneration. *J Oral Implants*. 2006;27(1):31-56.

Sugawara A. New generation of bone graft material. Part 3. Animal studies and clinical applications. *Jof Oral Implants*. 2006;28(1):47-84.

Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Feb;(431):220-5.

Sun JS, Lin FH, Hung TY, Tsuang YH, Chang WH, Liu HC. The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities. *J Biomed Mater Res*. 1999 Jun 15;45(4):311-21.

Sun JS, Tsuang YH, Chang WH, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials*. 1997 May;18(9):683-90.

Szpalski C, Barr J, Wetterau M, Saadeh PB, Warren SM. Cranial bone defects: current and future strategies. *Neurosurg Focus*. 2010 Dec;29(6):E8.

Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*. 2004 Mar;25(6):987-94.

Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg*. 1982 Jul;196(1):100-9.

TenHuisen KS, Brown PW. Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 1998 Dec;19(23):2209-17.

Thomas MV, Puleo DA. Infection, inflammation, and bone regeneration: a paradoxical relationship. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1052-61.

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.

Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Tschon M, Rimondini R, Carrassi A, Giardino R. Chronic alcohol abuse and endosseous implants: linkage of in vitro osteoblast dysfunction to titanium osseointegration rate. *Toxicology*. 2008 Jan 14;243(1-2):138-44.

Trisi P, Rao W, Rebaudi A, Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 Feb;23(1):69-77.

Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000 Nov;24(11):1693-701.

Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K. Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic. *J Orthop Res*. 1992 May;10(3):440-5.

Uemura T, Tanaka Y, Higashi K, Miyamori D, Takasaka T, Nagano T, Toida T, Yoshimoto K, Igarashi K, Ikegaya H. Acetaldehyde-induced cytotoxicity involves induction of spermine oxidase at the transcriptional level. *Toxicology*. 2013 Aug 9;310:1-7.

Valentin-Opran A, Charhon SA, Meunier PJ, Edouard CM, Arlot ME. Quantitative histology of myeloma-induced bone changes. *Br J Haematol*. 1982 Dec;52(4):601-10.

Velard F, Braux J, Amedee J, Laquerriere P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview. *Acta Biomater*. 2013 Feb;9(2):4956-63.

Von Doernberg MC, von Rechenberg B, Böhner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J. In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes. *Biomaterials*. 2006 Oct;27(30):5186-98.

Vonlaufen A, Spahr L, Apte MV, Frossard JL. Alcoholic pancreatitis: A tale of spirits and bacteria. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014 May 15;5(2):82-90.

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.

Wang Y, Nishida S, Boudignon BM, Burghardt A, Elalieh HZ, Hamilton MM, Majumdar S, Halloran BP, Clemens TL, Bikle DD. IGF-I receptor is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *J Bone Miner Res*. 2007 Sep;22(9):1329-37.

Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF 2nd, Woods M, Suri M, Steiner J, LaPaglia N. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Sep;23(9):1534-42.

Williams EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab*. 2010;28(1):101-7.

World Health Organization. Global status report on alcohol and health. 2012.

Wu D, Cederbaum AI. Oxidative stress mediated toxicity exerted by ethanol-inducible CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):70-6.

Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014 Jan;102(1):80-8.

Yun JI, Wikesjö UM, Borke JL, Bisch FC, Lewis JE, Herold RW, Swiec GD, Wood JC, McPherson JC 3rd. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol*. 2010 May;37(5):419-26.

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006;29(4):245-54.

Zhang J, Luo X, Barbieri D, Barradas AM, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Yuan H. The size of surface microstructures as an osteogenic factor in calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater*. 2014 Jul;10(7):3254-63.

Zhu Y, Kaskel S. Comparison of the in vitro bioactivity and drug release property of mesoporous bioactive glasses (MBGs) and bioactive glasses (BGs) scaffolds. *Micropor Mesopor Mat.* 2009; 118: 176-82.

ANEXO

ANEXO

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 022/2012

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 **Reparação óssea com o uso do beta fosfato tricálcio (β -TCP)® na calota craniana de ratos submetidos ao alcoolismo experimental: análise histológica e morfométrica**, de autoria de Karina Torres Pomini Puzipe, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO "ad referendum"** desta Comissão, nesta data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Prof. Dr. Adis Antônio 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