UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DAYANE MARIA BRAZ NOGUEIRA

Análise comparativa do osso bovino mineralizado Orthogen® e do Bio-oss® na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Análise histológica e morfométrica

BAURU
2016

DAYANE MARIA BRAZ NOGUEIRA

Análise comparativa do osso bovino mineralizado Orthogen® e do Bio-oss® na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Análise histológica e morfométrica

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

BAURU
2016

Nogueira, Dayane Maria Braz

N689a Análise comparativa do osso bovino mineralizado Orthogen® e do Bio-oss® na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: análise histológica e morfométrica / Dayane Maria Braz Nogueira. – Bauru, 2016.

89p. : il.; 31 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 010/2014

Data: 23/06/2014

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus pais, **Marcos Davi Nogueira** que foi meu apoio, meu exemplo a ser seguido com seu ânimo, alegria em viver e perseverança diante de tantos problemas. A minha mãe **Dalila Prado Braz Nogueira**, que me ensinou a nunca desistir dos sonhos, mesmo parecendo distante de nossa realidade, me ensinou a viver com alegria e nunca reclamar, apenas agradecer.

Vocês são meus maiores valores, tudo que fiz até hoje foi pensando em trazer um simples e pequeno orgulho, para retribuir tanto amor e carinho por mim, todos estes anos, que apesar das dificuldades que passaram, me faziam sempre o melhor, mesmo não tendo para vocês, mas pensavam em me dar as oportunidades que lhes faltou na vida.

Ao meu esposo, **Richard Siqueira da Silva**, que vivenciou toda minha trajetória, que me ajudou em todos os sentidos para que pudesse seguir com este sonho, sem sua ajuda não teria chegado até aqui, meu companheiro para todas as horas, seu apoio foi fundamental para minha caminhada, hoje posso dizer que caminhamos juntos e que vive este sonho comigo, assim como tantos que ainda temos. Te amo. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que com sua imensa misericórdia, me escolheu como filha e perdoou minhas falhas, está presente em minha vida. Tem sido meu sustento, minha misericórdia, meu consolo e meu socorro. Esta trajetória é uma promessa em minha vida, abriu uma porta para que cumprisse seu querer, apenas agradecimento não será o suficiente diante de sua imensa glória e poder entre nós. Deus que me deu força para não desistir, me segurou pelas mãos no momento que me deparei perecendo, com sua imensa misericórdia me sustentou de pé até o presente momento, toda honra e toda glória só a ti pertence, que todos que lerem esta dedicatória possam te conhecer como pai.

Aos que me deram a vida e me ensinaram todos os valores dela, **Marcos Davi Nogueira** e **Dalila Prado Braz Nogueira**, tendo como princípio o amor e a caridade, me educaram como puderam e lutaram para me dar um estudo que não tiveram a oportunidade de ter. Obrigada pelo apoio e compreensão, por ter me dado este voto de confiança, e se desdobrando para me manter longe de casa, sem que me faltasse nada, nunca reclamaram, apenas agradeciam.

Aos meus irmãos **Marcos Leonardo Braz Nogueira** e **Marcel Américo Braz Nogueira**, pelo carinho de vocês, com vocês aprendi a ter humildade e lutar pelos objetivos, que a vida não é fácil, mas que vale a pena ser correto, que vale a pena ser honesto e que vale a pena trabalhar nas pequenas oportunidades que tivermos. Obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia.

[...] *Eu sei as tuas obras: eis que diante de ti pus uma porta aberta, e ninguém, a pode fechar: tendo pouca força, guardaste a minha palavra, e não negaste o meu nome [...]*

3 Apocalipse, vers. 8

Aos meus sogros **Elias Siqueira da Silva** e **Mariza Siqueira da Silva**, que me acolheram e me ampararam nesta caminhada, tendo-me como filha, participaram ativamente desta conquista, sempre me apoiando e incentivando. Me mostraram o verdadeiro caminho de Deus e me ensinaram a entregar tudo nas mãos do senhor, buscar sempre à Deus antes de qualquer decisão e diante de qualquer situação, um exemplo de casal e humildade.

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim**, que colocou uma porta aberta em minha vida, serei eternamente grata pela confiança que depositou em mim, mesmo com minhas limitações me apoiou e me ajudou. Foi também além de orientador um amigo que me aconselhou, onde sempre busquei suas opiniões para minha vida pessoal, pelo exemplo não só de profissional, mas de ser humano justo, correto, e com um coração enorme, sempre pronto para ajudar. Muito obrigada pelos conselhos e pelo exemplo de profissional, que me espelho para o resto da vida. Obrigada por todas as orientações.

Aos professores do Departamento de Anatomia **Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**, ao **Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues** e ao **Prof. Dr. André Luiz Shinohara** pelo conhecimento transmitido ao decorrer deste tempo, que tive a oportunidade de conviver, sempre prontos para ensinar, sanar dúvidas e acolher. Muito obrigada pela experiência transmitida.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia, a secretária **Daniela Ariane Alves**, **Romário Moises de Arruda** e **Ovídio dos Santos Sobrinho**, que me receberam com muito carinho, com entusiasmo, e estavam sempre prontos para ajudar.

Aos amigos de pós-graduação **Iris Jasmin Santos German**, pela alegria vista em seu olhar, sua inteligência e companheirismo, uma guerreira que me ensinou uma maneira mais leve de encarar as dificuldades. **Karina Torres Pomini Puzipe**, sempre pronta para aconselhar, ajudar e compartilhar seu carinho com todos, uma mãezona. **Idvaldo Aparecido Favaretto Júnior** e **Mizael Pereira**, amigos que o mestrado me proporcionou, companheiros, sempre me auxiliaram nas dificuldades e me ensinaram muito, não apenas no estudo, mas também como pessoas.

Em especial a amiga **Marcelie Priscila Rosso**, que me acolheu quando cheguei, sem conhecer ninguém, foi minha companheira de apartamento, sinto uma admiração inigualável pelo seu caráter e forma correta que leva todos seus objetivos. Esteve comigo nos momento mais difíceis de angustia, mas também participou dos meus momentos de felicidade, sempre ao meu lado, como irmãs, onde o carinho que temos fazia parecer que já nos conhecíamos á tempo, e morando juntas formamos um laço de amizade sincera que hoje é raro. Muito obrigada por ser tão especial.

Aos Professores presentes na Banca de defesa, muito obrigada por aceitarem o convite, por compartilharem seus conhecimentos, me auxiliando no crescimento acadêmico e participando deste momento de alegria.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo (FOB – USP), todos os funcionários, mestres e doutores, por fazerem acontecer todas as pesquisas, e dando oportunidades para que realizasse este trabalho.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, contribuindo com o auxílio financeiro, para realização da pesquisa.

Epígrafe

AQUELE qu habita no esconderijo do Altíssimo, à sombra do
Onipotente descansará. Direi do SENHOR: Ele é o meu Deus, o
meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei. [...]

Salmo 91

RESUMO

O alcoolismo é considerado uma doença crônica, trazendo prejuízos para saúde do indivíduo. O tecido ósseo também sofre sérios danos com o consumo crônico do álcool, pois induz defeitos na mineralização e redução da espessura do osso medular e cortical. Devido à grande procura por tratamentos reconstrutivos para lesões e perdas ósseas, os enxertos xenógenos vêm sendo uma boa opção para o tratamento regenerativo. Em vista da procura de pacientes que fazem consumo crônico do álcool e apresentam perdas ósseas, necessitando de enxertos xenógenos, este trabalho teve como objetivo comparar, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica, a ação de dois biomateriais, o Bio-Oss® e o OrthoGen®, no processo de reparo de defeitos ósseos em tíbia de ratos submetidos ou não ao alcoolismo experimental. Foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 60 dias de idade, separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais contendo 20 animais cada: Grupo Água Bio-Oss® (GAB), Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB), Grupo Água OrthoGen® (GAO) e Grupo Etanol OrthoGen® (GEO). Os animais dos grupos GEB e GEO foram submetidos à adaptação gradativa ao álcool e depois permaneceram a 25% por 90 dias. Após esse período, todos os animais foram submetidos à cirurgia experimental. Foi realizada uma cavidade cirúrgica de aproximadamente 3 mm de diâmetro na epífise proximal da tíbia e nos animais dos grupos experimentais GAB e GEB se fez o preenchimento com o biomaterial Bio-Oss®. Os animais dos grupos experimentais GAO e GEO receberam o preenchimento da cavidade com o biomaterial OrthoGen®. Decorridos os períodos de 10, 20, 40 e 60 dias pós-cirúrgico, cinco animais de cada grupo, por período, foram eutanasiados. Os resultados histomorfológicos demonstraram que os animais dos grupos GAB e GEB apresentaram células sanguíneas e tecido conjuntivo nos períodos de 10 e 20 dias, e nos períodos de 40 e 60 dias ocorreu a formação de novo osso, sendo que o grupo GEB apresentou um maior retardo na formação quando comparado ao GAB. Nos grupos GAO e GEO o início da formação de tecido ósseo ocorreu nos períodos de 40 e 60 dias, com um retardo na formação quando comparado ao biomaterial Bio-Oss®. Na análise histomorfométrica, comparando os grupos que receberam a dieta líquida não alcóolica com biomaterias diferentes (GAB e GAO) ocorreu diferença significativa em formação óssea em todos os períodos sendo que o grupo Água Bio-Oss® apresentou uma maior formação óssea. Nos grupos que receberam a dieta alcóolica,

com biomateriais diferentes (GEB e GEO), ocorreu diferença em formação óssea nos períodos de 20, 40 e 60 dias, onde o biomaterial Bio-Oss® apresentou maiores médias. Comparando os grupos que receberam o mesmo biomaterial, mas com dieta líquida diferente (GABXGEB e GAOXGEO), evidenciou-se diferença significativa em formação óssea em todos os períodos (exceto GAOXGEO; 10 dias), sendo que os grupos que receberam dieta líquida apenas com água apresentaram melhores resultados. Conclui-se que o biomaterial Bio-Oss® mostrou-se superior na neoformação óssea quando comparado ao Ortoghen®, e que a dieta alcoólica interferiu de forma negativa no processo de reparação.

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

ABSTRACT

Comparative analysis of mineralized bovine bone Orthogen® and Bio-Oss® in bone formation in rats submitted to experimental alcoholism: histologic and morphometric analysis

Alcoholism is considered a chronic disease, which brings harm to an individual's health. Bones also suffer serious damage resulting from the chronic consumption of alcohol, since it induces defects in the mineralization and reduction of the thickness of the cortical and the cancellous bone. Xenografts have been a good option for regenerative treatments in response to the high search for reconstructive treatments for bone losses and lesions. Given the demand of patients who make chronic use of alcohol and present bone loss, needing xenografts, the aim of this study was to compare, by means of a histomorphological and histomorphometric analysis, the action of the biomaterials Bio-Oss® and OrthoGen® in the repair process of bone defects in the tibia of rats submitted or not to experimental alcoholism. Eighty male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) aged 60 days were randomly separated into four experimental groups with 20 animals each: Bio-Oss® Water Group (GAB), Bio-Oss® Ethanol Group (GEB), OrthoGen® Water Group (GAO) and OrthoGen® Ethanol Group (GEO). The animals in the GEB and GEO were submitted to gradual adaptation to alcohol and later kept at 25% for 90 days. After this period, all animals were submitted to experimental surgery. A surgical cavity with approximately 3 mm of diameter was made in the proximal tibial epiphysis and in animals from the experimental groups GAB and GEB it was filled with the Bio-Oss® biomaterial. Animals from the experimental groups GAO and GEO had their cavity filled with the OrthoGen® biomaterial. After 10, 20, 40 and 60 days post-surgery, five animals in each group, per period, were euthanized. The histomorphological results showed that the animals from the GAB and GEB groups presented blood cells and connective tissue in the 10 and 20 days periods, and in the periods of 40 and 60 days there was formation of new bone, with the GEB group presenting greater delay in formation when compared to the GAB. In the GAO and GEO groups, bone formation started in the periods of 40 and 60 days, with a delay in formation when compared to the Bio-Oss® biomaterial. In the histomorphometric analysis, comparing the groups that received nonalcoholic liquid diet with different

biomaterials (GAB and GAO), there was a significant difference in bone formation in all periods, with the Bio-Oss® Water Group presenting greater bone formation. In the groups that received an alcoholic diet, with different biomaterials (GEB and GEO), there was a difference in bone formation in the periods of 20, 40 and 60 days, in which the Bio-Oss® biomaterial presented greater means. Comparing the groups that received the same biomaterial, but with a different liquid diet (GABXGEB and GAOXGEO), there was a significant difference in bone formation in all periods (except for GAOXGEO; 10 days), in which the groups that received a liquid diet with only water presented better results. In conclusion, the Bio-Oss® biomaterial presented better performance in bone neoformation when compared to the Ortoghen®, and the alcoholic diet affected negatively the repair process.

Keywords: Ethanol. Bone regeneration. Bone transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lacuna com os osteócitos, lamelas, canalículos, sistema de Havers, periósteo, trabéculas, canal de Havers, canal de Volkmann.....	32
Figura 2 - Osso bovino inorgânico.	36
Figura 3 - Osso bovino misto (porção orgânica e mineral).	37
Figura 4 - (A) Incisão e exposição da tíbia; (B) Confecção da cavidade cirúrgica; (C) Cavidade preenchida com Biomaterial; (D) Sutura com fio de seda 4-0 (Ethicon). (Letras menores indicam (T) Tíbia e (B) Biomaterial).	47
Figura 5 - Tíbia removida completamente.....	48
Figura 6 - Micrótomo Leica® RM 2245 para obtenção das lâminas histológicas.....	49
Figura 7 - Tabela utilizada para morfometria por contagem de pontos sobre o novo tecido ósseo formado na cavidade cirúrgica.....	50
Figura 8 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Água Bio-Oss (GAB) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).	54
Figura 9 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Etanol Bio-Oss (GEB) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).	55
Figura 10 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Água Ortoghen® (GAO) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).	56
Figura 11 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).	57
Figura 12 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40, 60 dias) no Grupo Água-Bio-Oss® (GAB). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).	58
Figura 13 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) no Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).	59

Figura 14 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) no Grupo Água Ortoghen® (GAO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p<0,05$).	60
Figura 15 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) no Grupo Etanol Ortoghen® (GEO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p<0,05$)	61
Figura 16 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Água Bio-Oss® e Grupo Água Ortoghen® (GABXGAO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p<0,05$).....	63
Figura 17 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Água Bio-Oss® e Grupo Etanol Bio-Oss® (GABXGEB). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p<0,05$)	64
Figura 18 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Água Ortoghen® e Grupo Etanol Ortoghen® (GAOXGEO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p<0,05$)	66
Figura 19 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Etanol Bio-Oss® e Grupo Etanol Ortoghen® (GEBXGEO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p<0,05$)	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Bio-Oss® (GAB) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).... 58

Tabela 2 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias). . 59

Tabela 3 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Ortoghen® (GAO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias). 60

Tabela 4 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).
..... 61

Tabela 5 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Bio-Oss® (GAB) com o Grupo Água Ortoghen® (GAO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias)..... 63

Tabela 6 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Bio-Oss® (GAB) com o Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias)..... 64

Tabela 7 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Ortoghen® (GAO) com o Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias)..... 66

Tabela 8 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) com o Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias)..... 67

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

µm	micrômetro
ANOVA	Análise de Variância
CEEPa	Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
cm	centímetro
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GAB	Grupo Água Bio-oss®
GEB	Grupo Etanol Bio-oss®
GAO	Grupo Água Ortoghen®
GEO	Grupo Etanol Ortoghen®
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 CONSUMO CRÔNICO DO ÁLCOOL	28
2.2 EFEITOS DO ÁLCOOL AO TECIDO ÓSSEO	29
2.3 TECIDO ÓSSEO	30
2.4 TÍBIA	32
2.5 BIOMATERIAIS	33
2.6 Bio-Oss® (GEISTLICH, WOLHUSEN, SUÍÇA)	35
2.7 BAUMER ORTHOGEN®	36
3 PROPOSIÇÃO	39
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	45
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	46
4.3 EUTANÁSIA E PREPARAÇÃO DOS ESPÉCIMES	48
4.4 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA	49
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5 RESULTADOS	53
5.1 ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	53
5.1.1 GRUPO ÁGUA BIO-OSS® (GAB)	53
5.1.2 GRUPO ETANOL BIO-OSS® (GEB)	54
5.1.3 GRUPO ÁGUA ORTOGHEN® (GAO)	55
5.1.4 GRUPO ETANOL ORTOGHEN® (GEO)	56
5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA	57
5.2.1 GRUPO ÁGUA BIO-OSS® (GAB)	58
5.2.2 GRUPO ETANOL BIO-OSS® (GEB)	59
5.2.3 GRUPO ÁGUA ORTOGHEN® (GAO)	60
5.2.4 GRUPO ETANOL ORTOGHEN® (GEO)	61
5.2.5 GRUPO ÁGUA BIO-OSS® (GAB) X GRUPO ÁGUA ORTOGHEN® (GAO)	62
5.2.6 GRUPO ÁGUA BIO-OSS® (GAB) X GRUPO ETANOL BIO-OSS® (GEB)	64
5.2.7 GRUPO ÁGUA ORTOGHEN® (GAO) X GRUPO ETANOL ORTOGHEN® (GEO)	65
5.2.8 GRUPO ETANOL BIO-OSS® (GEB) X GRUPO ETANOL ORTOGHEN® (GEO)	66
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÕES	77

REFERÊNCIAS.....	79
------------------	----

ANEXO	87
-------------	----

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O alcoolismo é provocado pelo consumo excessivo de bebidas alcóolicas, onde o etanol é seu principal componente, agindo como elemento tóxico a órgãos vitais. Atualmente o alcoolismo é considerado uma doença crônica que pode afetar 13% da população mundial (HORVATH et al., 2011), trazendo uma série de prejuízos para saúde do indivíduo, como: desordens psíquicas, orgânicas e socioeconômicas (BARROS et al., 2007; VENKEN et al., 2010; HORVATH et al., 2011).

O álcool é amplamente aceito socialmente e chega até ser incentivado, uma vez que seu consumo se torna excessivo, têm como consequência um problema relevante de saúde pública, e gera custos elevados para a sociedade (HEATHER, 1992; VARGAS; LUIS, 2008; KRUMAN; HENDERSON; BERGESON, 2012).

O efeito do álcool é prejudicial e tóxico, causando algumas desordens gerais ao organismo como: sistema nervoso central, sistema muscular, doenças no fígado, pancreatite crônica, doenças cardiovasculares e pulmonares, pode causar ainda: neurotoxicidade e danos ao DNA, com morte de neurônios (LIMA et al., 2011; RONIS; MERCER; CHEN, 2011).

Um dos tecidos que sofre sérios danos com o consumo do álcool é o tecido ósseo, é conhecido por induzir a osteoporose secundária (MAUREL et al., 2012). Age na mudança óssea, alterando o processo de reabsorção e formação óssea, trazendo uma séria redução do volume e espessura óssea trabecular, causando defeitos na mineralização (SCHNITZLER; SOLOMON, 1984). Causa ainda redução da atividade e proliferação dos osteoblastos (HOWARD; FRIDAY, 1991; GONZALEZ-CALVÍN et al., 1993).

Os ossos são estruturas rígidas fundamentais na sustentação do corpo e estão sujeitos a perdas ósseas originadas de fraturas, malformações ou ressecção de tumores. Esse tecido especializado apresenta uma grande capacidade de regeneração espontânea, principalmente quando o defeito ósseo não apresenta grandes proporções. Quando ocorrem grandes perdas existe a necessidade de intervenção, sendo que uma das opções mais indicadas são os enxertos ósseos autógenos.

Esses enxertos apresentam alguns pontos desfavoráveis, como morbidade ao paciente e, com isso, o uso de biomateriais vem sendo uma boa alternativa em

casos de regenerações ósseas. (CARIA et al., 2007; LIMA et al, 2011; HORVATH et al., 2011).

Um fator de risco para fraturas que poderá levar a utilização de biomateriais é o uso crônico do álcool. Após uma fratura, alcoólatras são mais suscetíveis a terem todo o processo de cicatrização e remodelação óssea prejudicada (TREVISIOL et al., 2007).

O expressivo desenvolvimento e uso de biomateriais para clínica odontológica e médica na última década tem representado um poderoso instrumento terapêutico nas atividades cirúrgicas, especialmente nas correções de defeitos ósseos (GARBIN; GARBIN, 1994; BUGARIN JÚNIOR; GARRAFA, 2007; PERES; LAMANO, 2011). Dois biomateriais que são encontrados no mercado, Bio-Oss® e o Ortoghen® são muito utilizados e acessíveis para enxertia óssea.

A matriz óssea inorgânica Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça) é composta por osso bovino inorgânico e é amplamente utilizada em diversos procedimentos de regeneração óssea em cirurgias orais. Este biomaterial altera a expressão genética dos osteoblastos para promover a formação óssea, consegue-se integrar no processo de modelação e remodelação óssea (WEIBRICH et al., 2000) (CARINCI et al., 2006).

O enxerto ósseo Baumer OrthoGen® apresenta uma estrutura típica de osso medular com poros interconectados, a presença dos poros e a manutenção da estrutura trabeculada do osso são fatores fundamentais para sucesso dos fenômenos celulares de deposição de células osteoprogenitoras sobre o enxerto, reabsorção e formação de osso novo no lugar, é constituído por uma porção orgânica (25-30% de proteínas colagenosas) e uma porção mineral (65-70% de hidroxiapatita) (BAUMER BIOMATERIAIS). Possui uma excelente biocompatibilidade, favorecendo o crescimento e desenvolvimento de novo tecido ósseo (GALIA et al., 2011).

O Bio-Oss® é muito pesquisado na literatura, encontrando-se trabalhos de referência, porém utilizamos esse biomaterial consagrado mundialmente em enxertos xenógenos comparando-o com um nacional, com custo mais acessível. Justifica-se ainda este trabalho no fato de que na literatura consultada não se encontrou nenhuma comparação entre esses dois biomateriais, principalmente quando se associa ao uso crônico do álcool presente em bebidas alcóolicas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

O etanol é o principal componente de bebidas alcóolicas, com a fórmula $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, apresenta algumas características específicas como: hidrossolubilidade e uma baixa massa molecular. Devido a essa hidrossolubilidade o etanol consegue atravessar todos os tecidos, isso dependerá da concentração de água presente, seja internamente ou externo a cada tecido (OGA, 1999).

No estômago inicia-se a sua reabsorção, com aproximadamente 20% do seu volume total ingerido. Posteriormente essa absorção passa para o intestino delgado com um valor ainda mais alto, podendo chegar a 80%, seus níveis plasmáticos apresentam-se mais elevados nos períodos próximos a sua ingestão, de meia hora até uma hora e meia (OGA, 1999).

Já a sua metabolização (etanol), ocorre no fígado, onde há a atuação de três principais enzimas: álcool desidrogenase (ADH); CYP2E1 e acatalase. Ou então o álcool pode ser metabolizado por uma segunda via, conhecida como não oxidativa, com a presença de ácidos graxos, produzindo então ésteres etílicos de ácidos graxos (SAFFIOTI; WALDEMAR, 1968).

O termo alcoolismo foi criado para tratar de problemas relacionados com o consumo excessivo de álcool, ou seja, um alto índice de ingestão de bebidas alcóolicas. (GOODWIN et al., 1973; CADORET; GATH, 1978).

Porém o conceito aplicado ao alcoolismo, só foi instituído no ano de 1967 pela Organização Mundial de Saúde. Dividiram os inúmeros problemas de consumo abusivo e separaram em estágios: dependência a bebidas alcóolicas, o excesso de ingestão destas bebidas e beber abusivamente e grandes proporções (LARANJEIRA et al., 2000). Para definirmos uma dependência alcóolica, o indivíduo precisa consumir excessivamente bebidas alcóolicas e sofrer como consequência a manifestação de sintomas típicos, como a crise de abstinência alcóolica, quando não houver a ingestão (VONGHIA et al., 2008).

O álcool tem seu consumo a nível mundial, sendo parte da cultura de vários países, tem impacto na parte social e econômica. O alcoolismo vem destacando-se em longo prazo, como um dos principais problemas de saúde pública, devido aos seus grandes danos somáticos e psíquicos no indivíduo, além de repercutir no meio social, devastando o convívio com familiares e com a sociedade (VONGHIA et al., 2008;

MAUREL et al., 2012). Alguns dados ainda apontam o alcoolismo como uma das maiores causas de internação psiquiátrica, e um número elevado de aposentadorias por invalidez, relatados também, muitos acidentes de trabalho e principalmente de trânsito (CABERNITE, 1982).

Estima-se que anualmente ocorrem milhões de mortes, pelo consumo excessivo de bebidas alcóolicas, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). No Brasil o consumo cresce aceleradamente todo ano, sendo maior o consumo por homens em comparação com mulheres. O mais preocupante é o consumo entre adolescentes excedendo os níveis de consumo de vários países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

A influência na dependência alcóolica pode ocorrer por alguns fatores como: gênero, hábitos do indivíduo, algumas condições biológicas e psicológicas, o incentivo sociocultural e a hereditariedade apresentam-se como 50% de fator de risco (GOODWIN et al., 1973; CADORET, 1978; LARANJEIRA et al., 2000; KOHNKE, 2008).

2.1 Consumo crônico do álcool

O consumo crônico do álcool dá-se pela ingestão por períodos prolongados e o indivíduo acaba desenvolvendo uma tolerância de adaptação ao álcool durante a ingestão. O alcoolismo é uma doença crônica no ponto de vista médico, que tem como principal fator o consumo compulsivo de bebidas que contém álcool, o indivíduo torna-se tolerante e desenvolve crise de abstinência quando retirada esta droga de seu consumo (KENDELL, 1980).

O consumo crônico é o mais preocupante, trazendo anormalidades fisiológicas e clínicas como: cirrose hepática, anemia macrocítica, alterações neurológicas, deficiências de vitaminas, úlceras, varizes esofágicas, gastrite e cirrose neuromuscular, câibras, formigamentos e perda de força muscular; ou cardiovascular, além de impotência ou infertilidade (CHEN et al., 2009).

O consumo de etanol crônico pode inibir áreas do cérebro e levar a redução de neurônios (CHEN et al., 2009).

Quando o consumo é crônico, ele causa alterações em vários tecidos e órgãos, levando a sérios danos ao tecido ósseo. Ocorre uma grande incidência de fraturas ósseas em alcóolatrás, sendo que, essas fraturas podem ocorrer por fatores

como a embriaguez ou a desnutrição alcóolica (CHEN et al., 2009). O seu consumo crônico pode causar uma redução de volume ósseo prejudicando a formação e desenvolvimento (BUCHAIM et al., 2002). O consumo crônico do álcool pode causar osteoporose por agir diretamente no seu metabolismo (NICHIGUCHI et al., 2000; NYQUIST et al., 2002).

O consumo crônico de bebidas alcóolicas, em alguns casos pode apresentar sintomas no indivíduo como: rubor e edema moderado da face; edemas das pálpebras; olhos lacrimejantes; eritrose palmar; hálito alcóolico; falta de coordenação motora; vertigens e desequilíbrio; suores e tremor fino nas extremidades. Usuários crônicos de álcool costumam obter 50% das calorias necessárias para o metabolismo. Por isso, frequentemente desenvolvem deficiências nutricionais de proteína e vitaminas do complexo B (DUBOWSKI, 1985).

2.2 Efeitos do álcool ao tecido ósseo

Sendo prejudicial para muitos órgãos e tecidos, o álcool também tem efeito sobre os ossos, e é conhecido por induzir a osteoporose secundária (MAUREL et al., 2012). Ele age na mudança óssea, se associando com a alteração da reabsorção e formação óssea, com a redução do volume e espessura de osso trabecular e causa ainda, defeito da mineralização (SCHNITZLER; SOLOMON, 1984).

A exposição frequente ao álcool contido nas bebidas alcóolicas, pode inibir a formação do tecido ósseo (WAHL et al., 2006), induzindo à osteopenia, onde o principal fator desta inibição é a redução da atividade e proliferação osteoblástica (FRIDAY; HOWARD, 1991; GONZALEZ-CALVÍN et al., 1993).

A modificação que ocorre no processo complexo de remodelação óssea causada pelo álcool, se estende também aos níveis relacionados de osteocalcina sérica (marcador bioquímico de formação óssea), comprometendo até a expressão genética do colágeno atingindo as proteínas da matriz não colagenosa (HIDIROGLOU et al., 1994; WEZEMAN et al., 2000; ALVISA-NEGRÍN et al., 2009; MAUREL et al., 2012).

Estudos recentes relataram novos mecanismos pelos quais o álcool pode agir na remodelação óssea, incluindo a apoptose do osteócito e o estresse oxidativo (MAUREL et al., 2012). Sua principal ação de comprometimento ao tecido ósseo é em alguns casos a inibição de osteoblastos, ou o aumento de osteoclastos, uma alteração

na homeostase celular, resultando em diminuição na massa óssea, deixando o indivíduo mais susceptível a fraturas (CHAKKALAKAL, 2005).

O consumo do álcool tem influenciado a saúde do tecido ósseo e aumentando o risco de fraturas. Compreender o impacto em longo prazo do consumo regular de álcool sobre os ossos é importante, pois as fraturas representam uma das principais causas de morbidade e mortalidade (GADDINI, 2016).

2.3 Tecido ósseo

O tecido ósseo é o principal responsável por toda sustentação do esqueleto dos vertebrados, é um tecido altamente resistente, serve de suporte e proteção para órgãos vitais do organismo, além de proporcionar apoio às contrações musculares e movimentos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O tecido ósseo é considerado um depósito de substâncias fundamentais para o organismo como: cálcio, fosfato e alguns outros íons, este depósito libera ao organismo constantemente e de forma bem controlada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo é considerado especializado pelo tecido conjuntivo, formado por algumas células e principalmente por uma matriz extracelular calcificada, sua nutrição dá-se da passagem de alguns canalículos, que compreende os capilares, possibilitando a troca de íons e outras moléculas entre as células ósseas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os ossos são revestidos externamente pelo perióstio e internamente por endóstio que são membranas conjuntivas que possuem células que atuam na formação do tecido ósseo, são as células osteogênicas. Seu revestimento externo, que é feito pelo perióstio, contém muitas fibras colágenas e fibroblastos, além da presença de células osteoprogênicas, importantes no crescimento ósseo e na reparação de algumas fraturas. O revestimento interno ósseo é feito pelo endóstio, coberto por células osteogênicas de forma mais achatadas, revestindo todo osso esponjoso, canal medular e alguns canalículos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A composição do tecido ósseo dá-se por um conjunto de células, osteócitos, osteoblastos e osteoclastos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Os osteócitos são encontrados internamente à matriz óssea, entre as lacunas, que apresenta apenas um osteócito, eles estabelecem contatos através de

seus prolongamentos, conseguem realizar a troca de íons e moléculas de um osteócito para o outro, estas células são muito importantes para manutenção de toda matriz óssea (Figura 1) (WHITE; WALLIS, 2001).

Os osteoblastos são os principais responsáveis por sintetizarem a parte orgânica da matriz e participarem da mineralização, conseguem armazenar fosfato de cálcio. Encontram-se sempre nas superfícies ósseas lado a lado, e quando estão em alta atividade, apresentam-se de forma cuboide, quando em pouca atividade, achatado, e quando se aprisiona esta célula na matriz óssea, torna-se um osteócito (WHITE; WALLIS, 2001).

Os osteoclastos são conhecidos por células gigantes, móveis, com inúmeros núcleos e extensamente ramificados. Estas células são as principais responsáveis pela remodelação óssea durante o período de crescimento ósseo, ou na de reabsorção óssea em região de fratura. Sua localização é em lacunas de Howship, mas podem migrar para outras áreas de acordo com a necessidade através da quimiotaxia (WHITE; WALLIS, 2001).

Histologicamente o tecido ósseo pode ser dividido em imaturo ou primário e maduro, secundário ou lamelar, os dois apresentam as mesmas células e os mesmos constituintes. O tecido primário é assim chamado por ser o primeiro a aparecer, sendo temporário e posteriormente substituído aos poucos por tecido lamelar, e este tecido apresenta fibras colágenas organizadas em lamelas, que darão origem aos sistemas de Havers (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo macroscopicamente divide-se ainda em dois tipos: Osso compacto e osso esponjoso (WHITE; WALLIS, 2001). O osso compacto possui canalículos e espaços que abrigam os canais de Volkmann e canais de Havers, não possuem espaço medular, mas apresentam canais que abrigam nervos e vasos sanguíneos (Figura 1) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O osso esponjoso é caracterizado por amplos espaços, formado por trabéculas, proporcionando ao osso um aspecto de porosidade, contendo a medula óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A regeneração do tecido ósseo ocorre quando sua estrutura e sua funcionalidade foram danificadas, porém ocorre uma renovação. A regeneração óssea é o processo de cicatrização mais desejado, entretanto, não é processo que mais acontece por isso diversas terapias têm sido desenvolvidas com intuito de restaurar estes tecidos parcialmente perdidos (KINANE et al., 2000).

Fonte: Adaptada de JUNQUEIRA; CARNEIRO 2004.

Figura 1 - Lacuna com os osteócitos, lamelas, canalículos, sistema de Havers, periosteio, trabéculas, canal de Havers, canal de Volkmann.

2.4 Tíbia

A tíbia é considerada um osso longo, sua localização é entre os pés e os joelhos, na parte anterior da perna, considerada o segundo maior osso presente no esqueleto, possui um corpo (diáfise) e duas extremidades (epífises) (JARMEY, 2008). A tíbia vem sendo muito utilizada em vários experimentos com animais, principalmente em ratos, com o objetivo de realizar um defeito ósseo e posteriormente avaliar e controlar a regeneração óssea (MANKANI et al., 2006).

Todo processo de regeneração implica a capacidade de células em se diferenciarem, com características osteogênicas, na tíbia há a presença destas células propiciando a regeneração (BRADLEY et al., 1997; GREENWALD et al., 2000).

O uso de experimentos em animais realizados defeitos em tíbia dá-se pela fácil exposição óssea, fácil acesso, a realização de defeitos ósseos e o reparo que ocorre em tíbias são semelhantes ao reparo mandibular, apresentando uma qualidade celular que propicia a regeneração (PINHEIRO; GERBI, 2006). Outro fator de muita importância para que ocorra todo este processo, está no tamanho do defeito que será realizado, geralmente realiza-se um defeito considerado crítico, para que ocorra o processo de regeneração óssea, um defeito crítico experimental é aquele que no

período de duração de todo experimento, não sofra o reparo (GOSAIN et al., 2000; MARQUES et al., 2010).

A tíbia é muito utilizada em experimentos em ratos, pois é semelhante a mandíbula quando analisados sua remodelação. No entanto apresentam origens embriológicas diferentes, porém ambas estão em tensão muscular (NAJJAR; KAHN, 1977).

2.5 Biomateriais

O desenvolvimento de biomateriais tem aumentado expressivamente na atualidade, sua utilização é ampla e pode ser aplicada em clínica odontológica e médica, na última década tem representado um poderoso instrumento terapêutico nas atividades cirúrgicas, especialmente nas correções de defeitos ósseos (GARBIN; GARBIN, 1994; BUGARIN JÚNIOR; GARRAFA, 2007; PERES; LAMANO, 2011). Todo esse desenvolvimento trouxe avanços bem significativos, fortalecendo a ciência, contudo aumentou-se a responsabilidade por parte do profissional que se obriga a uma constante atualização dos conhecimentos (GARRAFA, 2007).

Em sentido amplo, biomaterial é definido como qualquer substância natural ou não, farmacologicamente inerte, que é capaz de interagir com um organismo vivo. Além disso, ele não deve induzir reações adversas no sítio de implantação ou mesmo sistemicamente, tratando ou substituindo qualquer tecido, órgão ou função do organismo (BUGARIN JÚNIOR; GARRAFA, 2007).

Apesar dos biomateriais terem uma ampla aplicabilidade, um dos seus maiores desafios é recuperar o tecido ósseo, que foi lesado ou perdido, seja por traumas, fraturas, acidentes entre outros fatores (YOUNG et al., 2007).

O tecido ósseo apresenta-se em remodelação constante, onde precisa haver um equilíbrio entre formação e reabsorção, em áreas onde o defeito é extenso, prejudica-se o reparo e a regeneração, por isso os biomateriais que são utilizados como substitutos ósseos devem possuir algumas características específicas para que ocorra o equilíbrio e a regeneração óssea local (WERNER et al., 2002; CHEN et al., 2009).

Os biomateriais devem apresentar biocompatibilidade, serem biodegradáveis e osteocondutivos, para conduzir os osteoblastos ou células precursoras até o local da lesão ou então fazer o recrutamento e o crescimento de

células no local, ainda ter um suporte para que ocorra a neoformação óssea (LIU; MA, 2004; WAN; NACAMULI; LONGAKER, 2006; CHEN, 2009).

Quando o biomaterial é utilizado em um procedimento visando regeneração, seja óssea ou tecidual, precisa ter algumas propriedades que não cause danos ao local e ao paciente. Ele ainda não deve desencadear resposta inflamatória, seu tempo de degradação tem que ser compatível ao de regeneração e deve possuir algumas características mecânicas para adequada aplicação. Na degradação não pode gerar produtos tóxicos e que sejam facilmente metabolizados e consigam ser liberados do organismo (CAO; WANG, 2009).

Os biomateriais utilizados em técnicas de enxertia podem ser classificados em: autógenos (obtidos do mesmo indivíduo), aloenxertos (transplantados entre indivíduos da mesma espécie), xenoenxertos (obtidos de outra espécie) e aloplásticos (materiais sintéticos ou naturais utilizados como substitutos ósseos) (CARRANZA; MCCLAIN; SCHALLHORN, 2004). Os enxertos autógenos foram muito utilizados há décadas, e são considerados ideais, por serem colhidos do mesmo indivíduo, porém apresenta desvantagem de trazer um desconforto na área doadora e submeter o indivíduo a dois sítios cirúrgicos, com risco de contaminação, além de ser restrita a quantidade do material doador que geralmente são insuficientes (OLIVEIRA et al., 2009).

Com a presença dessas limitações os xenoenxertos e aloenxertos foram uma opção para acabar com a limitação da área doadora, porém também apresentam algumas limitações, risco de rejeição ou transmissão de algumas doenças (PRECHEUR, 2007). Os enxertos aloplásticos que se dividem de acordo com sua origem em natural ou sintético e podem ter sua composição química feita de metais, cerâmicas, polímeros ou compostos (OLIVEIRA et al., 2009).

Diante das amplas opções de substitutos ósseos, e biomateriais disponíveis, cabe ao profissional adequar a melhor opção a cada caso em específico, porém os enxertos obtidos de outra espécie (xenoenxertos) estão sendo muito utilizados e com resultados promissores, e tem se tornado a cada dia uma boa opção como substituto ósseo, pois o risco de contaminação tem sido eliminado (ABUKAWA et al., 2006). Entretanto os resultados mais favoráveis ainda são os obtidos com a utilização dos enxertos ósseos autógenos, apesar das inconveniências de morbidade e disponibilidade limitada de material (PERES; LAMANO, 2011).

A avaliação desses materiais é feita com relação ao seu potencial osteogênico (desenvolvimento de um novo osso através de osteoblastos existentes); osteoindutivo (formação de um novo osso através da conversão de células adjacentes em osteoblastos por BMPs ou proteínas ósseas morfogenéticas); e osteocondutivo (a superfície do material de enxerto que serve como suporte para o crescimento do osso novo) (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001; WOLF; RATEITSCHAK, 2006; PRECHEUR, 2007).

2.6 Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça)

A matriz óssea inorgânica Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça) é composta por osso bovino inorgânico e é amplamente utilizada em diversos procedimentos de regeneração óssea em cirurgias orais. Este biomaterial tem características específicas que promovem a formação óssea, através da proliferação de células osteoblásticas (Figura 2) (CARINCI et al., 2006).

Devido à sua semelhança ao osso humano, o Bio-Oss® consegue se integrar ao processo de modelação e remodelação (WEIBRICH et al., 2000). Sua estrutura fortemente porosa oferece muito espaço para a proliferação dos vasos sanguíneos (angiogênese) e a formação de osso novo (osteogênese). A microestrutura da superfície do Bio-Oss® favorece o crescimento ideal dos osteoblastos responsáveis pela formação dos ossos. Desta forma, suas partículas tornam-se parte integrante da estrutura óssea que se está em formação. Devido ao fato do Bio-Oss® se transformar apenas lentamente em osso natural (remodelação), a estrutura estabiliza-se e o volume de regeneração pode ser preservado em longo prazo (GEISTLICH BIOMATERIAIS, 2008).

As excelentes propriedades osteocondutivas de Geistlich Bio-Oss® conduzem a uma regeneração óssea com boa previsibilidade e prognóstico. As suas partículas se tornam parte integral da estrutura óssea recém-formada e conservam seu volume em longo prazo. É fácil sua manipulação e aplicação podendo ser utilizado na maior parte das indicações, foi validado em mais de 25 anos de uso e testes bem-sucedidos e foi documentado em mais de 900 publicações científicas (GEISTLICH BIOMATERIAIS, 2008).

Fonte: Figura adaptada do Catálogo GEISTLICH BIO-OSS®, 2008.

Figura 2 - Osso bovino inorgânico.

2.7 Baumer OrthoGen®

O enxerto ósseo Baumer OrthoGen® apresenta estrutura típica de osso medular pela presença de poros interconectados, e que, após todo o processo de fabricação, foi possível manter sua estrutura porosa característica do tecido ósseo medular. A presença dos poros e a manutenção de sua estrutura trabeculada são fatores fundamentais para sucesso dos fenômenos celulares de deposição de células osteoprogenitoras sobre o enxerto, reabsorção do mesmo e formação de osso novo no lugar (BAUMER BIOMATERIAIS). O Biomaterial Ortoghen® apresenta uma boa compatibilidade a região implantada, favorecendo a regeneração e formação de novo tecido ósseo (GALIA et al., 2008, GALIA et al., 2011).

Segundo a Baumer, OrthoGen® apresenta estrutura porosa e firme facilita a deposição de células osteogênicas e formação de osso novo por osteocondução; por sua natureza trabeculada intacta e sem resíduos, permite rápida vascularização; processamento físico-químico comprovadamente eficaz quanto a agentes infecciosos; excelente alternativa ao osso alógeno e autógeno; e é um produto de fácil manipulação. É constituído de uma estrutura mista, composta por uma porção orgânica (25-30% de proteínas colagenosas) e uma porção mineral (65-70% de hidroxiapatita) (Figura 3).

Fonte: Figura adaptada do Catálogo BAUMER, 2010.

Figura 3 - Osso bovino misto (porção orgânica e mineral).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi de comparar, por meio de análise histomorfológica e histomorfométrica, a ação de dois biomateriais, o Bio-Oss® e o OrthoGen®, no processo de reparo de defeitos ósseos em tíbia de ratos submetidos ou não ao alcoolismo experimental.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a formação de novo osso após a implantação do Bio-Oss® ou do OrthoGen® em defeitos criados cirurgicamente na tíbia de ratos que tiveram a água como dieta líquida.
 - Avaliar a formação de novo osso após a implantação do Bio-Oss® ou do OrthoGen® em defeitos criados cirurgicamente na tíbia de ratos que tiveram o álcool etílico a 25% como dieta líquida.
 - Comparar os resultados obtidos nas avaliações realizadas de cada grupo em todos os períodos.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos e etapas aplicadas para o desenvolvimento da pesquisa nos animais foram desenvolvidos no Laboratório de Mesoscopia da Disciplina de Anatomia, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

O projeto de pesquisa foi aprovado em 23 de junho de 2014, depois de ser submetido à Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo CEEPA - PROC nº 010/2014 (ANEXO).

4.1 Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados 80 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, adultos (60 dias de idade), pesando aproximadamente 250 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da FOB/USP/Bauru.

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

No Biotério, os animais foram criados em gaiolas contendo 04 animais cada, uso de 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.

Os animais foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais contendo 20 animais cada, sendo:

1. GAB, que recebeu água como dieta líquida e cavidade cirúrgica na tíbia preenchida por Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça);
 2. GEB, que recebeu álcool etílico a 25% diluído em água e cavidade cirúrgica na tíbia preenchida por Bio-Oss®;
-
-

3. GAO, que recebeu água como dieta líquida e cavidade cirúrgica na tíbia preenchida por OrthoGen® (Baumer, Mogi Mirim, Brasil);
4. GEO, que recebeu álcool etílico a 25% diluído em água e cavidade cirúrgica na tíbia preenchida por OrthoGen®.

Os animais receberam a mesma dieta sólida “ad libitum” durante todo o experimento. O álcool utilizado para diluição foi o álcool absoluto (Álcool Etílico Absoluto; Labsynth, Diadema, SP, Brasil).

Os ratos dos Grupos GEB e GEO foram submetidos à adaptação gradativa ao álcool, para induzir ao alcoolismo crônico e para evitar a sua morte (TIRAPELLI; TAMEGA; PETRONI, 2000). Essa adaptação progressiva corresponde ao fornecimento de álcool etílico diluído na dieta líquida, na primeira semana de 8%, na segunda semana de 16% e, na terceira semana de 25%. Os animais continuaram a receber dieta alcoólica por um período de 90 dias, na concentração final. Decorridos 90 dias os animais foram submetidos à cirurgia experimental e a dieta alcoólica continua, após realização da cirurgia até a eutanásia dos animais.

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

Os ratos foram previamente pesados e submetidos à anestesia geral com injeção intramuscular de Cloridrato de tiletamina (125,0 mg) associado ao Cloridrato de zolazepam (125,0 mg) na posologia de 50,0 mg/kg IM (Zoetil 50, Virbac, São Paulo, SP, Brasil).

Foi realizada a tricotomia na região ventral do membro posterior e desinfecção do campo operatório com digluconato de clorexidina a 2%. A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma incisão linear de 20 mm de extensão, no sentido crânio-caudal, no membro pélvico esquerdo, seccionando-se a pele e as fáscias musculares, para exposição e divulsão do tecido muscular que envolve a tíbia (Figura 4A).

A incisão foi até o periósteo, permitindo seu deslocamento, afastando-o no sentido ântero-posterior, obtendo-se assim uma ampla área de trabalho sobre a tíbia (figura 4A). Com uma broca esférica de aço nº 6, montada em micromotor de baixa rotação, preparou-se uma cavidade de aproximadamente 3 mm de diâmetro e, em

profundidade, atingindo a medula óssea. Esse procedimento foi realizado com abundante irrigação de solução de Cloreto de Sódio a 0,9% (figura 4B).

Os animais dos grupos experimentais GAB e GEB receberam o preenchimento da cavidade com o biomaterial Bio-Oss® (Geistlich, Wolhusen, Suíça). Os animais dos grupos experimentais GAO e GEO receberam o preenchimento da cavidade com o biomaterial OrthoGen® (Baumer, Mogi Mirim, Brasil). A quantidade de biomaterial para o preenchimento da cavidade foi de aproximadamente 0,010 gramas de biomaterial para todos os grupos preenchendo por completo a perfuração (figura 4C).

Após o preenchimento das cavidades, os tecidos da área cirúrgica foram reposicionados e suturados utilizando-se fio de seda 4-0 (Ethicon) (figura 4D).

Figura 4 - (A) Incisão e exposição da tíbia; (B) Confecção da cavidade cirúrgica; (C) Cavidade preenchida com Biomaterial; (D) Sutura com fio de seda 4-0 (Ethicon). (Letras menores indicam (T) Tíbia e (B) Biomaterial).

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

4.3 Eutanásia e Preparação dos Espécimes

Decorridos os períodos de 10, 20, 40 e 60 dias pós-cirúrgico, cinco animais de cada grupo, por período, foram eutanasiados por injeção de dose excessiva do anestésico citado anteriormente.

A tíbia foi removida, preservando os tecidos moles suprapariosteais (Figura 5). As peças foram fixadas em formol a 10% tamponado, por um período de 48 horas.

Figura 5 - Tíbia removida completamente.

Após esse período, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e colocadas em EDTA a 10%, trocada a cada 48 horas, para o processo de desmineralização. Em seguida, o tecido passou pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina. As secções histológicas foram realizadas a 6 μ m no micrótomo semiautomático Leica RM 2245 para estudo histomorfológico e histomorfométrico (Figura 6).

Figura 6 - Micrótomo Leica® RM 2245 para obtenção das lâminas histológicas.

4.4 Análise Histomorfológica e Histomorfométrica

Na análise histomorfológica, para cada grupo em todos os períodos de tempo (10, 20, 40 e 60 dias), avaliou-se a área cirúrgica superficial, os bordos corticais, região medular e o material enxertado.

Todos os cortes histológicos, da região central do defeito que receberam biomaterial, foram observados em fotomicroscópio com a objetiva de aumento de 4x.

As imagens de interesse para análise foram capturadas por meio da câmera acoplada ao microscópio. A análise histomorfométrica foi realizada nas imagens obtidas com a objetiva de 4x. Essa avaliação foi executada em todas as lâminas, cada lâmina continha 4 cortes histológicos, sendo que a área central do defeito foi priorizada para a análise. Os cortes foram feitos de todos os animais de cada grupo e de todos os períodos (10, 20, 40 e 60 dias) para se determinar a quantidade e densidade óssea em formação.

O método utilizado para contagem de tecido ósseo em formação foi por contagem de pontos diferenciais, através de uma tabela teste contendo 88 pontos, esta tabela foi sobreposta à tela do computador de 15 polegadas para contagem ideal de formação óssea. Foram contados cada ponto que sobrepuseram sobre tecido ósseo, e os que incidiram também fora do tecido ósseo. Este teste contendo 88 pontos, contidos em um quadrado com o mesmo espaçamento entre todos os pontos

de 1,2 cm, foi impresso em folha transparente para que fosse possível a sobreposição na tela do computador, para contagem de tecido ósseo neoformado (Figura 7).

Fonte: Figura adaptada de tabela utilizada em tese de mestrado, USP-SP Estudo da reparação do alvéolo dental de ratos Wistar preenchido com osso autógeno particulado após exodontia, MELO, 2007

Figura 7 - Tabela utilizada para morfometria por contagem de pontos sobre o novo tecido ósseo formado na cavidade cirúrgica.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada em todos os grupos e em todos os períodos analisados, observando-se a área central do defeito, cortical óssea rompida e tecido ósseo em formação. Para a análise comparativa dentro de cada grupo, em todos os períodos avaliados, realizou-se o teste de análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey, com níveis de significância e considerações determinados em $p < 0,05$. Para a análise comparativa entre os grupos, no mesmo período avaliado, realizou-se o teste t não pareado, com nível de significância $p < 0,05$.

O programa utilizado para a análise estatística foi o GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise histomorfológica

5.1.1 Grupo Água Bio-Oss® (GAB)

Nos períodos de 10 e 20 dias (Figuras 8A e 8B) observou-se a cortical rompida, o local de realização do defeito bem delimitado e uma fácil visualização dos grânulos do biomaterial, assim como a presença de tecido conjuntivo e uma pequena quantidade de tecido ósseo em formação, contendo ainda células sanguíneas.

A partir do período de 40 dias (Figura 8C), a cortical que se encontrava rompida, já se iniciou o processo de regeneração. A quantidade de tecido ósseo em formação é mais evidente em relação aos períodos anteriores de 10 e 20 dias, com a presença de células como osteócitos.

No período de 60 dias a proliferação de tecido ósseo recém-formado é visivelmente maior quando comparado aos outros períodos (10, 20 e 40 dias), mas ainda há a presença de tecido conjuntivo e células sanguíneas, além da cortical em processo de regeneração (Figura 8D).

Figura 8 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Água Bio-Oss (GAB) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).

5.1.2 Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB)

Quando foram analisados os períodos iniciais de 10 e 20 dias (Figuras 9A e 9B) não houve um grande desenvolvimento de tecido ósseo em formação. Notou-se a presença de tecido conjuntivo e células sanguíneas, além da cortical rompida. O tamanho e a forma do defeito ainda são muito evidentes, assim como as partículas do biomaterial e a presença de células inflamatórias.

Nos períodos de 40 e 60 dias (Figuras 9C e 9D) a cortical encontrava-se em regeneração, ainda com o defeito bem evidente. Observou-se a presença de tecido conjuntivo em todos os períodos (10, 20, 40 e 60 dias), mas a formação do novo tecido ósseo é maior no período de 60 dias (Figura 9D).

Figura 9 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Etanol Bio-Oss (GEB) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).

5.1.3 Grupo Água Ortoghen® (GAO)

Observando-se os períodos de 10 e 20 dias (Figuras 10A e 10B) notou-se a presença da cortical totalmente rompida, com evidente presença do biomaterial enxertado, além de abundante tecido conjuntivo quando comparado ao tecido ósseo em formação.

Nos períodos de 40 e 60 dias (Figuras 10C e 10D) observou-se a cortical que foi rompida encontrava-se em formação, principalmente no período de 60 dias. A cavidade cirúrgica contava ainda com a presença de partículas de biomaterial e a presença de tecido ósseo em formação foi maior quando comparado aos primeiros períodos (10 e 20 dias). Ainda observou-se a presença de tecido conjuntivo e células sanguíneas.

Figura 10 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Água Ortoghen® (GAO) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).

5.1.4 Grupo Etanol Ortoghen® (GEO)

Nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias (Figura 11A-D) notou-se que a nova cortical não se formou completamente, mesmo no período final de análise. Na cavidade cirúrgica observou-se presença abundante de partículas do biomaterial e tecido conjuntivo, principalmente nos períodos iniciais de análise.

Figura 11 - Aspecto microscópico da cavidade cirúrgica dos animais do Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) corados em H.E. Objetiva de 4x. A) 10 dias; B) 20 dias; C) 40 dias; D) 60 dias. Biomaterial (b), tecido ósseo (to), tecido conjuntivo (tc).

5.2 Análise Histomorfométrica

Inicialmente, serão apresentados os resultados por Grupos, nos períodos analisados de 10, 20, 40 e 60 dias:

5.2.1 Grupo Água Bio-Oss® (GAB)

Observou-se que, em relação aos percentuais de tecido ósseo em formação, de acordo com os períodos analisados, ocorreu diferença significativa entre todos os períodos (10, 20, 40 e 60 dias) (Figura 12 e Tabela 1).

Figura 12 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40, 60 dias) no Grupo Água-Bio-Oss® (GAB). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Bio-Oss® (GAB) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Água Bio-Oss® (GAB)	10,22 $\pm$ 1,42 ^a	13,66 $\pm$ 1,15 ^b	21,60 $\pm$ 2,26 ^c	32,9 $\pm$ 1,15 ^d

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

5.2.2 Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB)

Observou-se que em todos os períodos, na comparação do percentual de tecido ósseo em formação, houve uma média crescente de desenvolvimento ósseo entre os grupos, com diferença significativa entre todos os períodos (Figura 13 e Tabela 2).

Figura 13 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) no Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Etanol-Bio-Oss® (GEB)	6,58 $\pm$ 0,92 ^a	11,57 $\pm$ 0,92 ^b	16,16 $\pm$ 1,48 ^c	22,74 $\pm$ 1,15 ^d

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

5.2.3 Grupo Água Ortoghen® (GAO)

Pode-se observar que na avaliação do percentual de formação óssea, em relação aos períodos, não ocorreu diferença significativa entre os períodos de 10 e 20 dias.

Nos períodos de 40 e 60 dias, houve um gradativo desenvolvimento ósseo, com diferença significativa entre eles e também em relação aos períodos anteriores (10 e 20 dias) (Figura 14 e Tabela 3).

Figura 14 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) no Grupo Água Ortoghen® (GAO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Ortoghen® (GAO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Água Ortoghen® (GAO)	7,02 $\pm$ 0,56 ^a	7,92 $\pm$ 0,81 ^a	12,72 $\pm$ 2,18 ^b	20,66 $\pm$ 2,12 ^c

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

5.2.4 Grupo Etanol Ortoghen® (GEO)

Em relação ao percentual de formação de novo tecido ósseo, ocorreu diferença significativa apenas no período de 60 dias em relação a todos os períodos anteriores analisados (10, 20 e 40 dias) (Figura 15 e Tabela 4).

Figura 15 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo comparando-se os períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) no Grupo Etanol Ortoghen® (GEO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Tabela com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Etanol- Ortoghen® (GEO)	6,28 $\pm$ 0,52 ^a	6,04 $\pm$ 0,53 ^a	7,94 $\pm$ 1,15 ^a	15,32 $\pm$ 1,71 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os períodos analisados ($p < 0,05$).

Na sequência, serão comparados os resultados entre os Grupos, nos períodos analisados de 10, 20, 40 e 60 dias:

5.2.5 Grupo Água Bio-Oss® (GAB) X Grupo Água Ortoghen® (GAO)

Na avaliação do percentual de tecido ósseo em formação nos períodos analisados, nos grupos que receberam água como dieta líquida (GAB e GAO), porém com biomateriais diferentes (Bio-Oss® e Orthogen®), ocorreu diferença significativa entre os grupos em todos os períodos.

O grupo Água Bio-Oss® apresentou um maior percentual de formação óssea, comparado ao grupo Água Ortoghen®, em todos os períodos (10, 20, 40 e 60 dias) (Figura 16 e Tabela 5).

Figura 16 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Água Bio-Oss® e Grupo Água Ortoghen® (GABXGAO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Bio-Oss® (GAB) com o Grupo Água Ortoghen® (GAO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Água Bio-Oss® (GAB)	10,22 $\pm$ 1,42 ^a	13,66 $\pm$ 1,15 ^a	21,60 $\pm$ 2,26 ^a	32,9 $\pm$ 1,15 ^a
Grupo Água Ortoghen® (GAO)	7,02 $\pm$ 0,56 ^b	7,92 $\pm$ 0,81 ^b	12,72 $\pm$ 2,18 ^b	20,66 $\pm$ 2,12 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados (colunas; $p < 0,05$).

5.2.6 Grupo Água Bio-Oss® (GAB) X Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB)

Analisando o percentual ósseo nos períodos avaliados, com o mesmo biomaterial (Bio-Oss®), entretanto com dieta líquida diferente (água ou etanol), observou-se diferença significativa estatisticamente entre todos os períodos avaliados (10, 20, 40 e 60 dias), sendo que o grupo que recebeu água como dieta líquida (GAB) obteve um melhor resultado (Figura 17 e Tabela 6).

Figura 17 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Água Bio-Oss® e Grupo Etanol Bio-Oss® (GABXGEB). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Bio-Oss® (GAB) com o Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Água Bio-Oss® (GAB)	10,22 $\pm$ 1,42 ^a	13,66 $\pm$ 1,15 ^a	21,60 $\pm$ 2,26 ^a	32,9 $\pm$ 1,15 ^a
Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB)	6,58 $\pm$ 0,92 ^b	11,57 $\pm$ 0,92 ^b	16,16 $\pm$ 1,48 ^b	22,74 $\pm$ 1,15 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados (coluna; $p < 0,05$).

5.2.7 Grupo Água Ortoghen® (GAO) X Grupo Etanol Ortoghen® (GEO)

Quando se comparou o percentual de formação óssea nos períodos de pesquisa, com o mesmo biomaterial (Ortoghen®), porém com dietas líquidas diferentes (água ou etanol), observou-se que no período de 10 dias não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

Nos períodos de 20, 40 e 60 dias notou-se diferença significativa no percentual de formação óssea, sendo que o grupo que recebeu a dieta líquida a base de água (GAO) obteve uma maior formação óssea (Figura 18 e Tabela 7).

Figura 18 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Água Ortoghen® e Grupo Etanol Ortoghen® (GAOXGEO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Água Ortoghen® (GAO) com o Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Água Ortoghen® (GAO)	7,02 $\pm$ 0,56 ^a	7,92 $\pm$ 0,81 ^a	12,72 $\pm$ 2,18 ^a	20,66 $\pm$ 2,12 ^a
Grupo Etanol Ortoghen® (GEO)	6,28 $\pm$ 0,52 ^a	6,04 $\pm$ 0,53 ^b	7,94 $\pm$ 1,15 ^b	15,32 $\pm$ 1,71 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados (colunas; $p < 0,05$).

5.2.8 Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) X Grupo Etanol Ortoghen® (GEO)

Quando os Grupos GEB e GEO foram comparados, com relação ao percentual de tecido ósseo formado, com a mesma dieta líquida (etanol), porém com biomateriais diferentes, observou-se que no período de 10 dias não ocorreu diferença significativa.

Nos períodos de 20, 40 e 60 dias obteve-se uma diferença significativa entre os grupos, onde o grupo com o biomaterial Bio-Oss® apresentou um maior percentual de formação óssea quando comparado ao grupo Ortoghen® (Figura 19 e Tabela 8).

Figura 19 - Representação gráfica do percentual de formação de novo tecido ósseo nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias) comparando dois grupos experimentais Grupo Etanol Bio-Oss® e Grupo Etanol Ortoghen® (GEBXGEO). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Tabela de comparação com os valores obtidos do percentual de novo tecido ósseo (média $\pm$ desvio padrão) do Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB) com o Grupo Etanol Ortoghen® (GEO) nos períodos analisados (10, 20, 40 e 60 dias).

Grupos	10 dias	20 dias	40 dias	60 dias
Grupo Etanol Bio-Oss® (GEB)	6,58 $\pm$ 0,92 ^a	11,57 $\pm$ 0,92 ^a	16,16 $\pm$ 1,48 ^a	22,74 $\pm$ 1,15 ^a
Grupo Etanol Ortoghen® (GEO)	6,28 $\pm$ 0,52 ^a	6,04 $\pm$ 0,53 ^b	7,94 $\pm$ 1,15 ^b	15,32 $\pm$ 1,71 ^b

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$)

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como finalidade comparar o processo de reparo de defeitos ósseos utilizando-se uma matriz óssea bovina mista de produção nacional (OrthoGen®) em relação à um biomaterial de consagrado uso mundial (Bio-Oss®), em ratos submetidos ao alcoolismo experimental. Diante dos resultados obtidos, os dois biomateriais promoveram formação de novo osso sendo que o comportamento do Bio-Oss® se mostrou mais efetivo.

Pesquisou-se ainda o uso crônico de álcool, para avaliar os seus possíveis efeitos na regeneração óssea. Observou-se que o etanol ingerido como dieta líquida exclusiva pelos animais interferiu de forma negativa no processo de formação de novo tecido ósseo.

Na avaliação histomorfológica com a utilização do biomaterial Bio-Oss®, nos animais que receberam água como dieta líquida (GAB), observou-se um grande infiltrado de células sanguíneas e tecido conjuntivo, com formação de novo osso e regeneração constante, em todos os períodos analisados. O Bio-Oss® interviu de maneira positiva, servindo de arcabouço para proliferação de células ósseas no processo de remodelação, concordando com os resultados da literatura consultada, na qual se observou que ele promove a formação óssea por meio da proliferação de células osteoblásticas (WEIBRICH et al., 2000; CARINCI et al., 2006). O Bio-Oss® apresenta excelentes propriedades, previsibilidade no tratamento e bom prognóstico (CARINCI et al., 2006).

Os resultados apresentados com o uso do Bio-Oss®, nos animais que receberam álcool como dieta líquida (GEB), demonstraram neoformação óssea, porém com um maior atraso em relação aos animais que ingeriram água. Observou-se a presença de células inflamatórias, tecido conjuntivo e tecido ósseo em início de remodelação. O álcool interferiu de forma negativa na neoformação óssea, apresentando um maior atraso em todo processo. A literatura concorda com os resultados obtidos, pois aponta que o uso crônico do álcool inibe e atrasa formação óssea (WAHL et al., 2007).

Ainda concordando com os resultados desta pesquisa, a presença de células inflamatórias no processo de remodelação e formação óssea, interfere e atrasa todo o processo de neoformação óssea, podendo ainda inibir a proliferação de osteoblastos, que é a célula fundamental na formação óssea (CHAKKALAKAL, 2005).

Os resultados obtidos com o biomaterial Ortoghen®, nos grupos que receberam a dieta alcóolica ou não (GEO e GAO), notou-se a formação óssea, porém apresentou menor quantidade de tecido ósseo neoformado e um maior tempo em sua formação, quando comparado ao biomaterial Bio-Oss®.

Nas cavidades cirúrgicas em que o Orthogen® foi implantado notaram-se células sanguíneas no local enxertado, tecido conjuntivo e um processo de remodelação ocorrendo com o decorrer dos períodos analisados. Estudos prévios, na literatura consultada, apontaram que o biomaterial Ortoghen® tem um grande potencial para formação de novo tecido ósseo devido a sua estrutura, que é fundamental para deposição de células osteoblásticas, trazendo rapidamente a formação de osso novo ao local enxertado (GALIA et al., 2008).

O Orthogen® se mostrou biocompatível servindo de arcabouço para a formação de novo tecido ósseo (GALIA et al., 2011). O álcool interferiu de maneira negativa atrasando o processo de remodelação e neoformação óssea, estando de acordo com a literatura consultada, apontando que o consumo crônico do álcool inibe mecanismos responsáveis pela proliferação de células que atuam diretamente na formação e remodelação óssea (GADDINI, 2016).

Os resultados obtidos na análise histomorfométrica apontaram que nos grupos que receberam a dieta alcóolica (GEB e GEO), apresentaram um retardo em formação óssea na região cortical e no tecido ósseo esponjoso onde recebeu o biomaterial, concordando com a literatura relacionada ao consumo do álcool de maneira crônica. Os efeitos do etanol suprimem a cortical óssea e o tecido esponjoso no período de remodelação óssea (GADDINI, 2016). O usuário crônico de bebidas alcóolicas pode apresentar uma baixa densidade mineral óssea, estando totalmente ligado ao risco de fraturas e retardo na remodelação óssea (SEO et al., 2015).

O uso do biomaterial Bio-Oss® apresentou uma maior formação óssea em relação ao Orthogen®, proporcionando com suas partículas um bom arcabouço para proliferação de novas células ósseas em todos os períodos de tempo analisados. A literatura atual apresenta pesquisas com esse biomaterial que vem sendo de primeira escolha nos procedimentos de enxertia óssea de origem xenógena, pois as partículas do enxerto inorgânico são progressivamente reabsorvidas e logo substituídas por um novo osso, com características estruturais semelhantes à de osso humano (JENSEN et al., 2012).

A quantidade de estudos com esse biomaterial tem motivado os pesquisadores em implantodontia, pois não há dúvidas de sua eficácia e eficiência como substituo ósseo (FERREIRA et al., 2009).

Concordando com este estudo, o Bio-Oss® mostrou um bom aspecto na mineralização, pois sua partícula teve uma boa incorporação, visualizado nas lâminas histológicas. Ocorreu a incorporação de partículas ao osso neoformado, presente em grande quantidade, e que com o decorrer dos períodos, observou-se a reabsorção do biomaterial, onde alguns grânulos apresentaram incorporação de novo osso dentro deles, devido provavelmente a sua porosidade (MANFRO et al., 2014).

O Biomaterial Orthogen®, pelos resultados obtidos, também pode ser utilizado como substituto ósseo, como material osteocondutor, mesmo não sendo eficaz como Bio-Oss®, pois se demonstrou biocompatível e um arcabouço para o processo de reparo, concordando com a literatura pesquisada, na qual apontou que o Orthogen® possui capacidade de osseointegração com deposição de osso novo e manutenção das trabéculas acelulares em curto período de tempo e também em longo prazo (ORSI et al., 2007).

Os estudos também mostram que esse biomaterial tem bons resultados quando analisados em longo prazo, afirmando que qualquer biomaterial ou implante para uso ortopédico ou odontológico só tem real valor se possuir resultados clínicos favoráveis em longo prazo. Orthogen® vem sendo testado com resultados consistentes no longo prazo, sendo, portanto, um biomaterial de uso seguro e eficaz como substituto ósseo (ROSITO et al., 2008).

Apesar de toda pesquisa e análises realizadas no presente estudo, apresentam-se algumas limitações, como: estudos em períodos mais tardios ou a realização uma análise imuno-histoquímica, abrindo então o vasto campo para compreensão da formação óssea em todos os grupos.

Existe a necessidade de novos estudos, pois o número de pacientes que recebem procedimentos médicos e odontológicos, e que fazem o uso crônico de bebidas alcóolicas, tem aumentado consideravelmente.

Cada vez mais existe a necessidade de se esclarecer os riscos e os malefícios das bebidas alcóolicas, principalmente aos pacientes em recuperação de perdas ósseas, seja por fratura ou trauma.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Ao final desta pesquisa, utilizando a metodologia específica e analisando os dados obtidos, foi possível concluir que:

- Ocorreu a formação óssea nos defeitos que receberam o biomaterial Bio-Oss® e o OrthoGen® em todos os períodos, em ratos com a dieta líquida apenas com água, porém o biomaterial Bio-Oss® mostrou-se superior em todos os períodos avaliados.
 - Houve a formação óssea nos defeitos que receberam o biomaterial Bio-Oss® e o OrthoGen® em ratos com a dieta líquida alcóolica diluída em água, porém o álcool interferiu de forma negativa em todos os períodos analisados, e o biomaterial Bio-Oss® mostrou-se superior no processo de reparação.
 - Analisando os resultados de todos os grupos e todos os períodos avaliados, o biomaterial Bio-Oss® mostrou-se superior na neoformação óssea quando comparado ao OrthoGen®, e o álcool interferiu de forma negativa em todas as análises.
-
-

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

(Formato Vancouver)

- Abukawa H, Papadaki M, Abulikemu M, Leaf J, Vacanti JP, Kaban LB, Troulis MJ. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. *Dent Clin North Am*. 2006 Apr;50(2):205-16, viii. Review.
- Alvisa-Negrín J, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, García-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, Pelazas-González R, Durán-Castellón MC, de Los Angeles Gómez-Rodríguez M. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. *Alcohol Alcohol*. 2009 Sep-Oct;44(5):468-75.
- Barros MB, Botega NJ, Dalgalarondo P, Marín-León L, de Oliveira HB. Prevalence of alcohol abuse and associated factors in a population-based study. *Rev Saude Publica*. 2007 Aug;41(4):502-9.
- Baumer – home page. Biomateriais: OrthoGen®. Disponível em: <http://www.baumer.com.br/Baumer/Portugues>. Acesso em: 17 de setembro de 2012.
- Buchaim RL, Roque DD, Roque JS, Toledo Filho JL, Andreo JC, Okamoto T. Genphos implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. *Rev FOB*. 2002;10(1):17-22.
- Bugarin Júnior JG, Garrafa V. Bioética e biosegurança: uso de biomateriais na prática odontológica. *Rev. Saúde Pública, São Paulo*, v. 41, n. 2, Apr. 2007.
- Bradley JP, Levine JP, McCarthy JG, Longaker MT. Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines in vitro cranial suture fusion. *Plast Reconstr Surg*. 1997 Oct;100(5):1091-9.
- Cabernite LO. alcoolismo no Brasil e as dificuldades na área-epidemiologia e prevenção. *J. Bras. Psiqu.*, 31: 89-112,1982.
- Cadoret R, Gath A. Inheritance of alcoholism in adoptees. *Br J Psychiatry*. 1978 Mar;132:252-258.
- 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.
- Cao Y, Wang B. Biodegradation of Silk Biomaterials. 2009 *Int. J. Mol. Sci.*, v.10, 1514-1524.
- Carinci F, Piattelli A, Degidi M, Palmieri A, Perrotti V, Scapoli L, Martinelli M, Laino G, Pezzetti F. Genetic effects of anorganic bovine bone (Bio-Oss) on osteoblast-like MG63 cells. *Arch Oral Biol*. 2006 Feb;51(2):154-63.
-

Carranza FA, McClain P, Schallhorn R. Cirurgia óssea regenerativa. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA. 2004 (9) Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan AS 1;717-732, Periodontia Clínica.

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

Chen KY, Shyu PC, Dong GC, Chen YS, Kuo WW, Yao CH. Reconstruction of calvarial defect using a tricalcium phosphate-oligomeric proanthocyanidins cross-linked gelatin composite. Biomaterials. 2009 Mar;30(9):1682-8.

Dubowski KM. Absorption, distribution and elimination of alcohol: highway safety aspects. J Stud on Alcohol 1985; (Suppl.10):98-108.

Ferreira AL, Silva AF, Pereira LGR, Braga LGT, Moraes SAA. Production and nutritional value of alcohol, 2009; 10 (1): 983-990. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.

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

Gaddini GW, Turner RT, Grant KA, Iwaniec UT. Alcohol: A Simple Nutrient with Complex Actions on Bone in the Adult Skeleton. Alcohol Clin Exp Res. 2016 Mar 12.

Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. Clinics (Sao Paulo). 2008 Dec;63(6):801-6.

Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. Clinics (Sao Paulo). 2011 Dec;63(6):801-6.

Garrafa V, Bugarin Júnior JG. [Bioethics and biosafety: the use of biomaterials in dental practice. 2007 Rev Saude Publica.

Garbin CM, Garbin NM. Enxertos ósseos e regeneração tecidual guiada: noções básicas. 1994; São Paulo: Pancast, 61-79.

Geistlich Biomateriais – Home page. Geistlich Bio-Oss®: Características. Disponível em: <http://www.geistlich.com.br>. Acesso em: 17 de setembro de 2015.

Greenwald JA, Mehrara BJ, Spector JA, Chin GS, Steinbrech DS, Saadeh PB, Luchs JS, Paccione MF, Gittes GK, Longaker MT. Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: immature versus mature dura mater. Plast Reconstr Surg. 2000 Apr;105(4):1382-92.

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. Plastic Reconstr Surg 2000 Aug.

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

Goodwin DW, Schulsinger F, Hermansen L, Guze SB, Winokur G. Alcohol problems in adoptees raised apart from alcoholic biological parents. *Arch Gen Psychiatry*. 1973 Feb;28(2):238-43.

Heather N. Why alcoholism is not a disease. Feb. 1992; *Med J Aust*. 156, (3).

Hidiroglou N, Camilo ME, Beckenhauer HC, Tuma DJ, Barak AJ, Nixon PF, Selhub J. Effect of chronic alcohol ingestion on hepatic folate distribution in the rat. *Biochem Pharmacol*. 1994 Apr 29;47(9):1561-6.

Horvath RO, Silva TD, Neto JC, Nakagaki WRJ, Soares EA. Efeitos do alcoolismo e da desintoxicação alcoólica sobre o reparo e biomecânica óssea. 2011; 19 (5) *Acta Ortop*; São Paulo.

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

Jarmey C. *Corpo em movimento: uma abordagem concisa*. 2008 Barueri: Manole.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clin. Oral Impl. Res.* 23, 2012; 263-273.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 2008; (11). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 2004; (10). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

Kendell RE. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. *Am J Psychiatry*. 1980 Dec;137(12):1630–31.

Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006;40:107-19. Review.

Köhnke MD. Approach to the genetics of alcoholism: a review based on pathophysiology. *Biochem Pharmacol*. 2008 Jan 1;75(1):160-77.

Kruman II, Henderson GI, Bergeson SE. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 Jul;237(7):740-7.

Laranjeira R, Nicastrí S, Jerônimo C, Marques AC. Consenso sobre a Síndrome de Abstinência do Alcool (SAA) e o seu tratamento. *Rev Bras psiquiatr*. 2000 Jun; 22(2):62-71.

Lima CC, Silva TD, Santos L, Nakagaki WR, Loyola YC, Resck MC, Camilli JA, Soares EA, Garcia JA (2011) Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Braz J Biol* 71:115–119.

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

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.

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

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

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

Maurel DB, Benaitreau D, Jaffré C, Toumi H, Portier H, Uzbekov R, Pichon C, Benhamou CL, Lespessailles E, Pallu S. Effect of the alcohol consumption on osteocyte cell processes: a molecular imaging study. *J Cell Mol Med*. 2014 Aug;18(8):1680-93.

Maurel DB, Boisseau N, Ingrand I, Dolleans E, Benhamou CL, Jaffre C. Combined effects of chronic alcohol consumption and physical activity on bone health: study in a rat model. *Eur J Appl Physiol*. 2011a Dec;111(12):2931-40.

Maurel DB, Jaffre C, Rochefort GY, Aveline PC, Boisseau N, Uzbekov R, Gosset D, Pichon C, Fazzalari NL, Pallu S, Benhamou CL. Low bone accrual is associated with osteocyte apoptosis in alcohol-induced osteopenia. *Bone*. 2011b Sep;49(3):543-52.

Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. 2001; Jun, 71(6): 354-361, *ANZ J Surg*.

Nishiguchi S, et al. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *Journal of Bone Mineral Metabolism*. 2000;18:317-20.

Nyquist F, Düppe H, Obrant KJ, Bondeson L, Nordsletten L. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol and Alcoholism*. 2002;37(1):21-4.

Najjar T, Kahn D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. *J Oral Surgery* 1977 May; 35:375-9

Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, et al. Osso liofilizado bovino não desmineralizado com células tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico. *Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac* 2007; 10(4): 133-9.

OGA S. In: Atheneu. Fundamentos de toxicologia.1999, São Paulo.

Oliveira SM, Mijares DQ, Turner G, Amaral IF, Barbosa MA, Teixeira CC. Engineering endochondral bone: in vivo studies. *Tissue Eng Part A*. 2009 Mar;15(3):635-43.

Oury F. A crosstalk between bone and gonads. *Ann N Y Acad Sci*. 2012 m Jul;1260:1-7.

Peres JA, Lamano T. Strategies for stimulation of new bone formation: a critical review. *Braz Dent J*. 2011;22(6):443-8. Review.

Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Surg*. 2006 Apr;24(2):169-78.

Precheur HV. Bone Graft Materials. *Dent. Clin. N. Am.*, v.51, p.729746, 2007.

Rosito R, Galia CR, Macedo CA, Moreira LF, Quaresma LM, Palma HM. Acetabularreconstruction with human and bovine freeze-dried bone grafts and a reinforcementdevice. *Clinics (Sao Paulo)*. 2008 Aug;63(4):509-14.

Ronis MJ, Mercer K, Chen JR. Effects of nutrition and alcohol consumption onbone loss. *Curr Osteoporos Rep*. 2011 Jun;9(2):53-9.

Saffioti W. Fundamentos de Química. 1968 Companhia Editora Nacional; São Paulo, Brasil.

Seo D, Ho J, Vemuri BC. Covariant Image Representation with Applications to Classification Problems in Medical Imaging. *Int J Comput Vis*. 2016 Jan;116(2):190-209.

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.

Schnitzler CM, Solomon L. Bone changes after alcohol abuse. *S Afr Med J*. 1984 Nov 10;66(19):730-4.

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

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.

Vargas Dd, Luis MA. Alcohol, alcoholism and alcohol addicts: conceptions and attitudes of nurses from district basic health centers. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2008 Jul-Aug;16 Spec No:543-50.

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

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

Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial Bone Tissue Engineering. 2006 50 (2): 175-190 *Dent. Clin. N. Am*.

Wahl EC, Aronson J, Liu L, Liu Z, Perrien DS, Skinner RA, Badger TM, Ronis MJ, Lumpkin CK Jr. Chronic ethanol exposure inhibits distraction osteogenesis in amouse model: role of the TNF signaling axis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 May 1;220(3):302-10.

Wahl EC, Perrien DS, Aronson J, Liu Z, Fletcher TW, Skinner RA, Feige U, Suva LJ, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Ethanol-induced inhibition of bone formation in a rat model of distraction osteogenesis: a role for the tumor necrosis factor signaling axis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005 Aug;29(8):1466-72.

Werner J, Linner-Krcmar B, Friess W, Greil P. Mechanical properties and in vitro cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure. *Biomaterials*. 2002 Nov;23(21):4285-94.

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

Weibrich G, Trettin R, Gnoth SH, Götz H, Duschner H, Wagner W. [Determining the size of the specific surface of bone substitutes with gas adsorption]. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2000 May;4(3):148-52. German

Wolf HF, Rateitschak KH. *Periodontia*. 2006; 554 (3):Porto Alegre: Artmed.

World Health Organization (WHO) [homepage na internet]. Global Information System on Alcohol and Health (GISAH). Geneva: World Health

White A, Wallis G. Endochondral ossification: a delicate balance between growth and mineralisation. *Curr Biol*. 2001 Aug 7;11(15):R589-91.

Young S. et al. Oral and maxillofacial surgery. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering*. 2007; (3) 71: 1079- 1094.

ANEXOS

ANEXO

Anexo 1 – Carta de aprovação do comitê de ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 010/2014

Bauru, 23 de junho de 2014.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Análise comparativa do osso bovino mineralizado Orthogen® e do Bio-Oss® na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: análise histológica e morfométrica**, de autoria de Dayane Braz Nogueira, sob sua orientação foi enviado ao relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rogério Leone Buchaim
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

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