UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral

BRUNA GABRIELA DOS SANTOS KOTAKE

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRÍTICOS APÓS A
APLICAÇÃO DA PROTEÍNA RHBMP-2 PURA E/OU COMBINADA EM
ANIMAIS NORMAIS E SOB EFEITO DO ALCOOLISMO CRÔNICO**

RIBEIRÃO PRETO
2012

Bruna Gabriela dos Santos Kotake

**AVALIAÇÃO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS CRÍTICOS APÓS A
APLICAÇÃO DA PROTEÍNA RHBMP-2 PURA E/OU COMBINADA EM
ANIMAIS NORMAIS E SOB EFEITO DO ALCOOLISMO CRÔNICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências no Programa de
Reabilitação Oral

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa

Versão original

**Ribeirão Preto
2012**

Autorização a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citadas à fonte:

FICHA CATALOGRÁFICA

Kotake, Bruna Gabriela dos Santos

Avaliação da reparação óssea em defeitos críticos após a aplicação da proteína rhBMP-2 pura e/ou combinada em animais normais e sob efeito do alcoolismo crônico.

Orientador: João Paulo Mardegan Issa, Ribeirão Preto – 2012.

79 p.: il.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Biologia Oral.

Alcoolismo, rhBMP-2, Neoformação óssea, Calvária, Defeito ósseo crítico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Gabriela dos Santos Kotake

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de
Concentração: Biologia Oral.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais **Clóvis** e **Silvia**, pelo apoio e confiança;

A minha madrinha **Shirley** por acreditar e me apoiar sempre;

A minha avó **Maria** pelo amor e carinho;

As minhas irmãs **Suelen** e **Ana Paula** pelo companheirismo;

Ao meu noivo **Marcus Vinícius** pelo apoio, carinho, dedicação e paciência.

As minhas sobrinhas **Rafaela** e **Amanda** pelo amor.

A **Edna** e **Francisco** pelo apoio e companheirismo.

Agradecimento

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa pela a oportunidade, confiança, dedicação, companheirismo e amizade ao longo desta caminhada.

Agradeço aos professores que aceitaram fazer parte desta banca.

A Prof^ª. Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza pelo incentivo e prontidão.

Agradeço a Prof^ª. Leda Maria Pescinini Salzedas e a Prof^ª. Ana Maria Pires Soubhia, pelo ensinamento, carinho e amizade ao longo da minha caminhada.

Agradeço a Prof^ª Mamie Mizusaki Iyomasa, o Prof. Edilson Ervolino, a Prof^ª. Maria Bernadete Stuani e o Prof. Raphael, pelo apoio, parceria e companheirismo.

Agradeço aos amigos de pós-graduação: Yamba, Fernando, Ricardo, Daniela, Rodrigo, Eduardo, Andréia, Ana Beatriz, Renata, Felipe, Conrado, Cássio, Fabíola, Maya, Elaine, Miliane, Roberta e Ana Paula pela amizade.

Aos alunos de IC: Kênia, Ricardo, Mirela, Kelly, Bianca, Marina e Fernandinha.

Aos amigos do Laboratório: Nilce, Betinha, Roger, Júnia e Túlio.

Aos familiares: avó Neuza, tio Mario, tia Vera, Júnior, Fernanda, Veiga, Tia Lucia, Rafael, Cid.

Aos amigos: Érica, Regiane, Letícia e Henrique.

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro na forma de bolsa de mestrado (Proc: 2010/12452-5).

Epígrafe

Se você for uma pessoa que busca realmente a verdade, é necessário que ao menos uma vez na vida duvide de todas as coisas, da maneira mais profunda possível.

Rene Descartes

Resumo

KOTAKE, B. G. S. Avaliação da reparação óssea em defeitos críticos após a aplicação da proteína rhBMP-2 pura e/ou combinada em animais normais e sob efeito do alcoolismo crônico. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O alcoolismo é considerado um redutor da formação óssea, podendo levar a distúrbios osteometabólicos, já a rhBMP-2 é uma proteína morfogenética conhecida por desempenhar um papel importante nos processos de reparação e indução da formação óssea. O objetivo deste estudo foi investigar a ação do alcoolismo e a resposta do reparo em defeitos ósseos (DO) na calvária de ratos, após a aplicação da rhBMP-2, pura e combinada a uma matriz de colágeno. Foram utilizados 80 ratos divididos em 8 grupos, cada um deles com um período de espera até o sacrifício de 4 e 6 semanas, após a criação cirúrgica do defeito ósseo na calvária de 5 mm. Os grupos foram divididos em G1) água “*ad libitum*” + DO, G2) álcool “*ad libitum*” + DO, G3) água + DO + 5µg rhBMP-2 pura, G4) álcool + DO + 5µg rhBMP-2 pura, G5) água + DO + carreador esponja de colágeno, G6) álcool + DO + carreador esponja de colágeno, G7) água + DO + 5µg rhBMP-2/esponja de colágeno, G8) álcool + DO + 5µg rhBMP-2/esponja de colágeno. Os dados radiográficos e os dados para a análise de fibras colágena tipo I e III foram submetidos à análise estatística Kruskal-Wallis e Dunn's Multiple, os dados histológicos ao teste de análise de variância (ANOVA) e Tukey. O resultado encontrado para a análise radiográfica no tempo de 6 semanas demonstrou que os grupos tratados com rhBMP-2 independente da utilização do carreador e do etanol apresentaram maior neoformação óssea ($p < 0,05$), para o tempo de 4 semanas não foi encontrada diferença estatística. Para a análise imunoistoquímica, a osteocalcina (OC) e

sialoproteína óssea (BPS) foram predominantes nos grupos tratados com rhBMP-2. Para a análise histológica, a quantificação de fibras colágenas tipo I apresentou diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$), com aumento destas fibras principalmente nos grupos tratados com rhBMP-2 associado a esponja de colágeno; e na análise quantitativa por estereologia, o volume de tecido ósseo neoformado foi maior para os grupos tratados com rhBMP-2 pura ou associada ao carreador, porém para os grupos tratados com etanol, houve maior neoformação óssea para o grupo tratado com rhBMP-2 associado ao carreador nos períodos de 4 e 6 semanas ($p < 0,001$). Concluiu-se neste modelo experimental que, o carreador foi efetivo na bioliberação da rhBMP-2, mesmo na presença do etanol.

Palavra chave: Alcoolismo, rhBMP-2, esponja de colágeno, neoformação óssea e calvária

Abstract

KOTAKE, B. G. S. Assessment of the bone healing process in critical defects after application of the rhBMP-2 pure protein and / or combined in normal animals and under the effect of chronic alcoholism. 2012. 79p. Thesis (Master Degree in Sciences) - Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Alcoholism is considered a reducer for new bone formation, may leading to osteometabolic disturbance, considering that the rhBMP-2 is a morphogenetic protein known to play an important role in the bone healing processes. The aim of this study was to investigate the action of alcoholism and its effect on the repair of bone defects (DO) performed in rat calvaria after the rhBMP-2 application, pure or combined with a collagen matrix. We used 80 rats divided into eight groups, each one with a waiting period for sacrifice of 4 and 6 weeks after the bone defect (5mm) delineation in the rat skull. The groups were divided into: G1) water "ad libitum" + DO, G2) alcohol "ad libitum" + DO, G3) water + DO + 5µg pure rhBMP-2, G4) alcohol + DO + 5µg pure rhBMP-2, G5) DO + water + collagen sponge carrier, G6) alcohol + DO + collagen sponge carrier, G7) and water + DO + 5µg rhBMP-2/collagen sponge, G8) alcohol + DO + 5µg of rhBMP-2/collagen sponge. The radiographic data were submitted to statistical analysis Kruskal-Wallis and Dunn's Multiple, histological data to analysis of variance (ANOVA) and Tukey test. Radiographically, it was found after 6 weeks that the groups treated with rhBMP-2, independently of the carrier use and ethanol administration, more new bone formation ($p<0.05$), at 4 weeks it was not found statistical difference. For immunohistochemical analysis, osteocalcin (OC), and bone sialoprotein (BPS) were predominant in groups treated with rhBMP-2. For histological quantification of collagen type I fibers, statistical difference

between groups was found ($p < 0.05$) with the increasing of these fibers in the groups treated with rhBMP-2 combined with collagen sponge; and quantitative by stereology, aiming to calculate the volume of new bone, it was found higher values for the groups treated with rhBMP-2 pure or combined to the carrier; but for the groups treated with ethanol, it was found higher bone formation in the groups treated with rhBMP-2 associated to the carrier in the periods of 4 and 6 weeks ($p < 0.001$). It was concluded in this experimental model that the carrier was effective for rhBMP-2 delivery, even in the presence of ethanol.

Keywords: Alcoholism, rhBMP-2, collagen sponge, bone formation, and calvaria

SUMÁRIO

RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	Erro! Indicador não definido.
2.1. ALCOOLISMO.....	Erro! Indicador não definido.
2.2. BMP-2.....	23
2.3. ESPONJA DE COLÁGENO.....	25
3. OBJETIVO.....	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. OBTENÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	30
4.2. SELEÇÃO DE ANIMAIS.....	30
4.3. METODOLOGIA DE INDUÇÃO DO ALCOOLISMO CRÔNICO.....	30
4.4. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	31
4.5. TÉCNICA CIRÚRGICA.....	32
4.5.1. ANESTESIA.....	32
4.5.2. INCISÃO E DIVULSAO DOS TECIDOS.....	32
4.5.3. CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO.....	32
4.5.4. SUTURA DOS TECIDOS E MEDICAÇÃO.....	Erro! Indicador não definido.
4.6. CONTROLE PÓS-OPERATÓRIO	34
4.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	34
4.8. ANÁLISE MICROSCÓPICA	34
4.9. VOLUME DE TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO ARA O COMPÓSITO HELIOMOLAR.....	35
4.10. ANÁLISE DE FIBRAS COLÁGENOS TIPO I E III	38
4.11. IMUNOISTOQUÍMICA PARA FATORES DE CRESCIMENTO ANGIOGÊNICOS E OSTEOGÊNICOS	41

4.12. ANÁLISE DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS À IMUNOPEROXIDASE.....	42
4.13. ANÁLISE RADIOGRÁFICA.....	42
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
6. RESULTADOS.....	46
6.1. ANÁLISE DA MASSA CORPORAL.....	47
6.2. ANÁLISE DA DENSIDADE RADIOGRÁFICA PARA O TEMPO DE 4 E 6 SEMANAS.....	48
6.3. ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA NO TEMPO DE 4 E 6 SEMANAS.....	50
6.4. IMUNOMARCAÇÃO PARA OC, BPS E CD-31.....	55
6.5. ANÁLISE QUANTITATIVA DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO NOS ANIMAIS PERTENCENTES AO TEMPO DE 4 SEMANAS	56
6.6. ANÁLISE QUANTITATIVA DO TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO NO PERÍODO DE 6 SEMANAS.....	57
6.7. QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS COLÁGENAS DO TIPO I E III.....	59
7. DISCUSSÃO.....	60
8. CONCLUSÃO.....	66
9. REFERÊNCIAS.....	68
10. ANEXO.....	80
10.1. COMITÊ DE ÉTICA.....	81

Introdução

1- INTRODUÇÃO

As bebidas alcoólicas apesar de serem classificadas como drogas têm seu consumo com grande aceitação pela sociedade, e parece ser o hábito social mais antigo e disseminado entre as populações, estando associado a rituais religiosos e sendo atribuída a ele uma variedade de efeitos dependendo da dosagem utilizada, como sedativo, afrodisíaco, estimulante de apetite, desinibidor de comportamento, entre outros (Cardim et al., 1986; Oliveira e Luis, 1996).

Dentre a população que consome bebidas alcoólicas, aproximadamente 10% desenvolvem o quadro de dependência ao álcool (alcoolismo), que se caracteriza por alterações decorrentes do consumo excessivo, afetando o comportamento social, psicológico e orgânico (Almeida e Coutinho, 1993). Alcoolismo é uma doença de natureza complexa, na qual o álcool se torna um fator determinante sobre as causas psicossomáticas preexistentes no indivíduo e para cujo tratamento é preciso recorrer a processos profiláticos e terapêuticos de grande amplitude (OMS, 1970).

O consumo excessivo e prolongado de álcool, além de estar relacionado a várias patologias comportamentais, causa uma multiplicidade de anormalidades bioquímicas, fisiológicas e clínicas. Segundo Tirapelli et al. (2001), a ingestão crônica de etanol produz uma variedade de modificações sistêmicas em órgãos vitais e no sistema digestivo incluindo cirrose hepática, hipoproteïnemia, ascite, anemia macrocítica, alterações neurológicas e deficiências vitamínicas. Esta ingestão crônica de álcool pode provocar, portanto alterações estruturais em vários tecidos, inclusive no tecido ósseo, podendo levar à osteoporose (Balzan et al., 2001; Gali, 2001). O consumo crônico de álcool é considerado um redutor da formação óssea nos processos de cicatrização em animais (Elmali et al.,

2002), além de inibir a proliferação de células osteoblásticas e sua atividade *in vivo* (Dyer et al., 1998). Dessa forma, o alcoolismo é considerado uma causa secundária da osteoporose, levando, conseqüentemente, à ocorrência de fraturas.

No entanto, com relação aos efeitos do etanol no tecido ósseo, a literatura é pouco esclarecedora. Enquanto alguns autores acreditam que o uso crônico do álcool pode interferir no metabolismo ósseo e causar osteoporose (Gonzáles-Calvin et al., 1993; Nishiguchi et al., 2000) pela inibição de células osteoblásticas (Dyer et al., 1998) ou pelo aumento da reabsorção osteoclástica (Koo et al., 2004), outros crêem que apesar do etanol exercer um impacto negativo no conteúdo mineral dos ossos, ele não influencia nas suas propriedades mecânicas, e que efeitos colaterais secundários do etanol como traumas repetitivos associados à embriaguez, má-nutrição e doenças hepáticas talvez sejam as principais causas da alta incidência de fraturas ósseas entre os alcoólatras (Nyquist et al., 2002).

Callaci et al. (2009) verificaram em um estudo experimental em modelo animal, diversas alterações relacionadas ao metabolismo ósseo decorrentes da exposição crônica ao álcool. Entre elas, observaram mudança no padrão de expressão de genes reguladores da formação óssea, redução de marcadores dos genes de osteocalcina e fosfatase alcalina, diminuição significativa na expressão de reguladores da ativação osteoblástica assim como de proteínas morfogenéticas (BMP-2, BMP-4 e BMP-5) e de receptores do hormônio da paratireóide, concluindo que o alcoolismo perturba a expressão de genes responsáveis pela remodelação óssea e, conseqüentemente, promove a perda da homeostase, podendo levar a uma perda da integridade óssea.

Marques, 2008; Silva et al. (2007) analisaram fêmur de ratos tratados com aguardente de cana de açúcar e verificaram uma diminuição significativa na densidade radiográfica óssea, do conteúdo mineral ósseo (CMO) e da densidade mineral óssea (DMO). Semeanoff Segundo et al. (2009) estudaram os efeitos deletérios do álcool na progressão da periodontite induzida e sugeriram que o consumo crônico de álcool alterou o funcionamento do hipotálamo, induzindo o sistema neuroimunológico a ter um predomínio ainda maior de células *T helper* do tipo 2, que são responsáveis por produzirem uma maior quantidade de metaloproteinases e interleucinas, que resulta na maior destruição no periodonto.

Diante disso, inúmeras substâncias e materiais vêm sendo estudados com o objetivo de promover a regeneração de tecido ósseo e dentre estes podemos citar a utilização da BMP-2 (proteína óssea morfogenética do tipo 2), mais comumente encontrada na forma de recombinante humana (rhBMP-2) que está sendo utilizada na recuperação de defeitos ósseos de diferentes origens, congênitas ou adquiridas. Estas proteínas foram identificadas e purificadas a partir da matriz óssea humana (Bessho et al., 1989) e correspondem a uma grande família de proteínas que desempenham um papel importante no tecido ósseo, regulando processos de reparação óssea, pois agem na diferenciação de fatores de crescimento, células progenitoras, proliferação de células mesenquimais, na diferenciação de células osteogênicas ou condrogênicas, invasão vascular e remodelação óssea (Reddi, 1997; Rauch et al., 2000; Spector et al., 2001; Freitas et al., 2003), e a literatura aponta que estas proteínas, especialmente a rhBMP-2, têm um grande número de indicações quando se deseja obter tecido ósseo neoformado, como em processos patológicos ou fraturas envolvendo grandes perdas ósseas (Boyne et al., 1998; Suk, 2008; Spagnoli, 2008), pois suas propriedades osteoindutoras são conhecidas e comprovadas (Freitas et al., 2003). No

entanto, apesar da rhBMP-2 possuir capacidade de osteoindução, um material carreador se faz necessário para aplicação desta proteína, para que possa disponibilizá-la por um período maior de tempo, já que esta além de ser um material de alto custo, se difunde rapidamente do sítio onde foi aplicada, abreviando, portanto seu papel osteogênico (Fushimura et al., 1995).

Dentre os carreadores comumente utilizados, estão a hidroxiapatita, sulfato de cálcio, matriz óssea desmineralizada e a esponja de colágeno. Esta última constitui um material biodegradável e biocompatível, além de ser de baixo custo e permitir uma adequada adaptabilidade às paredes do defeito ósseo (Geiger et al., 2003; Sarban et al., 2009; Dawson et al., 2009). Deste modo, inúmeros pesquisadores atualmente vêm utilizando este material, entre esses estudos encontramos o de Moom et al. (2010), em que, ao utilizarem a esponja de colágeno como carreador da rhBMP-2, observaram a formação de um tecido ósseo neoformado, permitindo, portanto concluir que este material promoveu a liberação sustentada da rhBMP-2. Assim como nos estudos de Jaime et al. (2005) e Oliveira et al. (2010), que verificaram propriedades interessantes da esponja de colágeno no processo cicatricial ósseo, além de representar um material maleável, biocompatível, poroso, radiotransparente e de fraca antigenicidade.

Revisão de Literatura

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Alcoolismo

O alcoolismo é um fator desencadeante da osteoporose secundária cuja ação se faz através da alteração da homeostase do tecido ósseo, levando a diminuição de parâmetros biomecânicos, da densidade mineral (DMO) e espessura cortical óssea, bem como, diminuição nos níveis de cálcio, fósforo e fatores de crescimento como osteocalcina, associando-se a perda óssea, em situação de ingestão de altas concentrações de etanol por períodos prolongados (Rai et al., 2008; Broulik et al., 2010; Ruiz et al., 2010; Liberman et al., 2011; Maurel et al., 2012).

Os efeitos degenerativos do etanol sobre o tecido ósseo são bem relatados na literatura, no entanto, o mecanismo exato com qual o alcoolismo induz a perda óssea e, conseqüentemente, leva a osteoporose ainda é desconhecido. Callaci et al. (2009), Turner et al. (2010), Chen et al. (2011), acreditam que a ingestão crônica e em grande quantidade do álcool atua direta e indiretamente no tecido ósseo, induzindo reabsorção óssea através da proliferação e ativação dos osteoclastos e inibição dos osteoblastos. Chen et al. (2011) ainda correlacionam a osteoclastogênese na reabsorção óssea induzida pelo alcoolismo com a indução do receptor ativador nuclear kB ligante (RANKL), que está expresso na medula e tecido ósseo, relacionando-se ao aumento da reabsorção óssea.

Os efeitos crônicos e agudos do consumo de álcool em concentrações de 20% e 30% demonstraram que, cronicamente, o etanol, nas diferentes concentrações, diminui a resistência mecânica do fêmur de ratos. Esta relação é dose-dependente, pois quanto maior a dose, menor a resistência e peso ósseo. Na ingestão aguda, o efeito do álcool na concentração de 20% gerou um aumento de peso ósseo, bem como, maior resistência

mecânica. Este benefício foi correlacionado ao aumento da liberação do hormônio calcitonina, responsável pela manutenção do tecido ósseo, impedindo sua reabsorção (Rai et al., 2008).

Semelhantemente, Broulik et al. 2010 verificaram diminuição de 12% da resistência mecânica óssea e redução de 10% da densidade mineral óssea, além de decréscimo da espessura cortical óssea, que foi analisada histomorfometricamente e comparada com os animais do grupo controle. Os níveis de cálcio e fósforo também se apresentaram diminuídos nos grupos tratados cronicamente com etanol, e estas alterações ósseas foram correlacionadas com o aumento da TrACP (fosfatase ácida tartarato resistente), enzima marcadora de reabsorção óssea por osteoclastos e diminuição da ALP (fosfatase alcalina), enzima marcadora da formação óssea.

As estruturas bucais bem como outras partes do organismo também podem sofrer alterações geradas pelo consumo de álcool. Em virtude da conhecida associação entre alcoolismo e doença periodontal, tem-se realizado estudos com a finalidade de esclarecer tal relação.

Avaliando o tecido periodontal, Souza et al. (2009) utilizaram 36 ratas Wistar para analisar a influência do alcoolismo crônico na perda óssea periodontal de animais com ou sem periodontite e observaram que o alcoolismo afetou diferentemente o nível ósseo alveolar, pois na concentração de etanol a 20%, os animais com periodontite apresentaram perda óssea alveolar significativa em comparação com o controle. Contudo, o etanol não foi capaz de induzir a periodontite em animais saudáveis, mas correlacionou-se com o agravamento da doença nos animais já acometidos por aquela condição.

As alterações ósseas geradas pelo alcoolismo no processo alveolar podem apresentar uma relação positiva entre álcool e periodonto, como foi observado por Liberman et al. (2011), que verificaram, ao analisar o processo alveolar de ratos sem ligadura, que o consumo de álcool em concentrações de 5 %, por 9 semanas, pode levar a um efeito preventivo na perda óssea alveolar destes animais, quando comparados ao grupo controle. Ainda observou-se que os ratos submetidos à ligadura nos molares, para a indução da doença periodontal e ao consumo de álcool a 5%, não apresentaram progressão da destruição óssea, fato atribuído ao efeito antimicrobiano do álcool e a diminuição da produção de monócitos e citocinas circulantes.

Outra alteração conhecida gerada pelo álcool é a cirrose hepática que pode se desenvolver em pessoas que consomem álcool. Esta por sua vez é motivo de estudos dos pesquisadores que buscam respostas e conhecer melhor a relação entre estes dois fatores.

Estudos com pacientes portadores de cirrose hepática oriunda do consumo excessivo de álcool observaram que esta alteração está associada a outras enfermidades como, por exemplo, a diminuição significativa da densidade mineral óssea (DMO) da coluna vertebral e do fêmur, bem como, o aumento de receptores do fator de necrose tumoral neopterinina (sTNF-R55) e receptores da interleucina-2 (sIL-2R) no plasma destes pacientes. Estes últimos são marcadores da ativação da imunidade celular e são correlacionados com a severidade da cirrose. O estudo observou que os aumentos desta citocinas são inversamente proporcionais a DMO, podendo estar relacionadas ao processo de indução da osteoporose (Díez-Ruiz et al., 2010).

2.2- BMP-2

Em 2009 FDA (Food and Drug Administration) aprovou a utilização da rhBMP-2 para fusão vertebral na cirurgia de artrodese e cirurgias craniofaciais como, o aumento do seio e aumento do rebordo alveolar. Por tratar-se de uma proteína com um grande poder osteoindutor, tem sido relacionada à regeneração óssea, deste modo, torna-se um método alternativo aos enxertos autólogos, que mesmo sendo considerado o padrão ouro em cirurgias reconstrutivas, devido a suas propriedades osteogênicas, acabam proporcionando morbidade ao paciente, bem como, possuem quantidade limitada de área doadora (Jang et al., 2011; Woo et al., 2011; Lee et al., 2011).

Em estudo com 195 pacientes submetidos à cirurgia de fusão vertebral, Lee et al. (2011) verificaram que os pacientes sem os fatores de risco relacionados à falha de fusão (tabagismo, osteoporose, hipertensão e diabetes) submetida à aplicação da rhBMP-2 apresentaram fusão vertebral em tempo significativamente menor que o enxerto autólogo na mesma condição.

Conhecendo os efeitos osteoindutores na regeneração óssea a respeito da rhBMP-2 e buscando métodos alternativos para a obtenção destes resultados positivos na neoformação óssea, Freira et al. (2011) observaram que, através da aplicação dos anticorpos anti-BMP-2 endógena em esponja de colágeno colocados em calvárias de ratos, esta proteína capturada foi capaz de mediar à regeneração tecidual local aumentando significativamente a neoformação óssea verificada pela histomorfometria, histomicrografia e micro-CT, bem como, o aumento na produção de osteocalcina.

Usualmente a rhBMP-2 é associada à esponja de colágeno, carreador mais estudado e utilizado, que tem a capacidade de disponibilizar a proteína lentamente ao meio, desta

maneira, a rhBMP-2 consegue permanecer e agir por mais tempo no tecido, intensificando a reparação e aumentando neoformação óssea (Geiger et al., 2003).

Jung et al. (2011) estudando a rhBMP-2 associada à esponja de colágeno como carreador observaram que a aplicação da proteína aumentou significativamente a neoformação óssea em defeito ósseo (DO) realizado em calvária de ratos quando comparados com o controle, não havendo diferença estatística entre a segunda e a oitava semana do experimento. Semelhantemente, Rosa et al. (2011) observaram aumento na neoformação óssea após aplicação rhBMP-2 em DO na calvária de animais principalmente associada à aplicação de laser de baixa intensidade.

Alguns estudos buscam encontrar outros biomateriais que sejam mais eficientes que a esponja de colágeno como carreador de rhBMP-2, como é caso do fosfato de cálcio bifásico (BCP), que se apresenta efetivo e biocompatível com o tecido ósseo. Jang et al. (2011), buscando unir as propriedades osteoindutoras da rhBMP-2 e as propriedades osteocondutoras da BCP, avaliaram a regeneração óssea de calvária de ratos tratados com diferentes concentrações de rhBMP-2 associada à BCP como carreador e observaram que a neoformação óssea foi significativamente maior que o controle quando a BMP foi associada a esta matriz carreadora, não demonstrando diferença de reparação óssea para as diferentes concentrações de rhBMP-2 aplicada no defeito ósseo.

Issa et al. (2012) avaliando a P-1 proteína extraída da seringueira *Hevea brasiliensis* (associada à angiogênese) e a rhBMP-2 na reparação tecidual óssea em calvária, observaram que P-1 aumentou significativamente a quantidade de fibras colágenas e a rhBMP-2 aumentou significativamente o osso neoformado sendo que, a neoformação óssea demonstrou ser dose dependente a proteína.

Apesar da rhBMP-2 apresentar efeitos que contribuam na neoformação, outros estudos tem reportado complicações associadas a sua aplicação, dentre estas temos a ocorrência de edema, eritema, formação de seroma, pseudoartrose e dor não devendo ser utilizada em pacientes com tumores malignos ou que estejam em tratamento deste, em pacientes grávidas ou com algum tipo de infecção local (Carrage et al., 2011; Kang, 2011; Woo et al., 2011). Contudo a aplicação da proteína tem se estendido a outros procedimentos ainda não autorizados como reconstrução mandibular, reparo alveolar e outras cirurgias orofaciais inespecíficas, no entanto, mais estudos devem ser feitos para avaliar os seus efeitos nestes casos (Sweeny et al., 2011; Woo et al., 2011; Hart et al., 2011; Kang, 2011; Hussein et al., 2012).

2.3- Esponja de Colágeno

Os efeitos da esponja de colágeno sobre reparação tecidual são relatados há muito tempo na literatura. Este biomaterial tem grande aceitação, pois apresenta características importantes como biocompatibilidade, rápida degradação fisiológica, adequada interação macromolecular e celular e mais recentemente, tem demonstrado boa interação com as proteínas morfogenéticas, como a rhBMP-2, na reparação tecidual óssea (Fujimura et al., 1995; Geiger et al., 2003, Freire et al., 2010).

A esponja de colágeno no tecido ósseo tem capacidade osteocondutora e atua como suporte no crescimento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas locais em osteoblastos, promovendo a formação e mineralização óssea, e na angiogênese, promovendo a formação de novos vasos sanguíneos. Sua atuação neste tecido é muito estudada, sendo associada à maior e mais rápida formação óssea nas áreas de defeitos ósseos (Shimoji et al., 2009).

Sua associação com as proteínas morfogenéticas, em especial a rhBMP-2, no tecido ósseo, tem demonstrado aumentar significativamente a neoformação óssea, bem como acelerar o processo de reparo, mesmo em defeitos ósseos críticos (Fujimura et al., 1995; Jung et al., 2011). O poder osteocondutor da esponja de colágeno, em associação com o poder osteoindutor da proteína, potencializou o efeitos da rhBMP-2, aumentando a biodisponibilidade desta ao meio, de forma lenta e contínua, fazendo com que o efeito osteoindutor seja prolongado.

Sobre a associação entre esponja de colágeno e rhBMP-2, é importante ressaltar que o uso de grandes quantidades de rhBMP-2, aplicada sobre o defeitos ósseo, não é necessária, pois a esponja otimiza a ação da proteína, diminuindo os riscos de efeitos colaterais proporcionados por altas doses, bem como os custos, já que a rhBMP-2 apresenta valores elevados e difícil aquisição.

Deste modo, o colágeno como carreador à proteína apresenta grandes vantagens reportadas por outros trabalhos, que demonstram os benefícios desta associação (Jung et al. 2011; Issa et al., 2012).

Objetivo

3- OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi investigar a ação do alcoolismo crônico e a resposta do reparo em defeitos ósseos na calvária de ratos após a aplicação da rhBMP-2, pura e combinada a uma matriz de colágeno, mediante as análises histológica qualitativa e quantitativa por estereologia, imunoistoquímica para fatores angiogênicos e osteogênicos e radiográfica.

Materiais e Métodos

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Obtenção das formulações

A proteína osteoindutora rhBMP-2 foi dissolvida na proporção de 1:1 em uma solução neutra, representada aqui pela solução de tampão fosfato em p.H. 7,2. Deste modo ela foi aplicada na concentração de 5µg de rhBMP-2 com o auxílio de uma micropipeta (Eppendorf 0.5 a 10µL) previamente calibrada sobre a área estudada.

4.2- Seleção dos animais

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), machos, com peso em média de 225 gramas oriundos do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto, USP. Esses animais foram divididos em 8 grupos, cada um deles com um período de espera de eutanásia de 4 e 6 semanas. Todos os animais foram alojados em caixas com 5 animais cada, e receberam ração balanceada, com temperatura controlada ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas, sendo o início do período de claro às 07:00 horas.

Para maior controle dos grupos foram realizadas pesagens semanais, bem como, a mensuração diária do volume ingerido por caixa, para a obtenção da média ingerida ao dia por animal. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEUA) do Câmpus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo nº:10.1.1011.53.9 que segue os padrões internacionais para uso de animais.

4.3- Metodologia de indução do alcoolismo crônico

A indução do alcoolismo foi efetuada nos grupos 2, 4, 6 e 8, conforme a metodologia escrita por Tirapelli et al. (2006a); Tirapelli et al. (2006b); Tirapelli et al. (2007); Tirapelli et al. (2008). Os animais destes grupos receberam ração comercial e etanol “*ad libitum*” em concentrações crescentes da seguinte forma: na primeira semana os

animais receberam etanol a 5%, na semana subsequente, etanol a 10%, e a partir da terceira semana, etanol a 20% por um período de 6 semanas.

4.4- Planejamento experimental

Os animais foram divididos em oito grupos experimentais, os quais após os tratamentos descritos abaixo na sequência a realização do defeito ósseo cirúrgico (DOC), foram submetidos à eutanásia após 4 semanas pós-operatório (**4s**) e 6 semanas pós-operatório (**6s**):

G1 (4s e 6s): submetidos à ingestão de água e DOC preenchido exclusivamente com coágulo sanguíneo;

G2 (4s e 6s): submetidos à ingestão de álcool e DOC preenchido exclusivamente com coágulo sanguíneo;

G3 (4s e 6s): submetidos à ingestão de água “*ad libitum*” e DOC preenchido com 5 µg rhBMP-2;

G4 (4s e 6s): submetidos à ingestão de álcool “*ad libitum*” e DOC preenchido com 5 µg rhBMP-2;

G5 (4s e 6s): submetidos à ingestão de água “*ad libitum*” e DOC preenchido exclusivamente com esponja de colágeno;

G6 (4s e 6s): submetidos à ingestão de álcool “*ad libitum*” e DOC preenchido exclusivamente com esponja de colágeno;

G7 (4s e 6s): submetidos à ingestão de água “*ad libitum*” e DOC preenchido com esponja de colágeno em associação a 5 µg rhBMP-2;

G8 (4s e 6s): submetidos à ingestão de álcool “*ad libitum*” e DOC preenchido com esponja de colágeno em associação a 5 µg rhBMP-2.

4.5- Técnica Cirúrgica

4.5.1-Anestesia

Os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina)- sedativo analgésico e relaxante muscular; e Dopalen (Ketamina)- anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA- Campinas, SP, Brasil, na proporção de 75-100mg/Kg de Ketamina e de 5-10mg/Kg de Xylazina, injetada por via intramuscular. Também foram colocados em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, gazes estéreis embebidas em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas (Fig.1 a).

4.5.2- Incisão e divulsão dos tecidos

Os animais foram anestesiados e submetidos a uma incisão sagital de aproximadamente 1 cm de extensão na região central da calvária, com a lâmina de bisturi estéril número 15, previamente montada em cabo de bisturi número 3, de modo a expor a região óssea (Fig. 1 b).

4.5.3- Criação do defeito ósseo

Na calvária exposta, foi realizada a criação de um defeito ósseo na região do lobo parietal esquerdo. Para isso foi utilizada uma broca cirúrgica tipo trefina 5 mm de diâmetro interno, adaptada em contra-ângulo cirúrgico (Kavo, São Paulo, Brasil) e com o auxílio de um motor elétrico para implantes, ajustado em 3000rpm, com constante e abundante irrigação com soro fisiológico 0,9% procedeu-se a perfuração criando-se um defeito ósseo

cilíndrico de 5 mm de diâmetro na região do lobo parietal esquerdo, estando esta dimensão dentro dos padrões citados na literatura para defeitos ósseos críticos (Fig.1c).

4.5.4- Sutura dos tecidos e medicação

Após a cirurgia, foi feita a aplicação das substâncias e procedeu-se à sutura dos tecidos, sendo a pele do animal, juntamente do periósteo reposicionada a sua posição original, suturada com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil), de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu uma dose de 0,1mL/100g de peso do antibiótico Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte (Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil) (Fig. 1 d).

Figura 1. a) técnica anestésica, b) incisão e divulsão, c) criação do DOC, d) sutura

4.6- Controle pós-operatório

Os animais operados ficaram sob observação constante, receberam ração comum para animais de pequeno porte, sendo feita à limpeza de suas caixas, com troca da maravalha semanalmente.

4.7- Processamento Histológico

A calvária foi removida, utilizando-se para isso tesouras e pinças adequadas. Os tecidos moles presentes foram cuidadosamente separados deste tecido ósseo do crânio, para a obtenção do fragmento ósseo contendo o defeito com margem de segurança. As calvárias foram divididas ao meio e esses fragmentos foram imersos na mesma solução fixadora por 24 horas. Em seguida, os espécimes foram descalcificados em EDTA a 0,5M. Após o período de 1 mês de descalcificação as peças passaram pelo processo de diafanização. Sendo desidratados em série crescente de álcoois: 70%, 90%, 95%, 100% (I, II e III). Feito isso, esses blocos ósseos foram colocados em partes iguais de álcool e xilol e diafanizados em xilol, com trocas a cada 1 hora em cada solução, sendo executadas 3 trocas; as peças foram incluídas em parafina.

4.8- Análise microscópica

Para a análise microscópica, nas amostras emblocadas em parafina foram realizados cortes semi seriados de 5µm de espessura percorrendo toda calvária, estes cortes foram corados em hematoxilina-eosina, PicroSirius e Tricômio de Masson para a quantificação da neoformação óssea e quantificação de fibras colágenas do tipo I e III por meio de um microscópio óptico AxioImager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss).

4.9- Volume de tecido ósseo neoformado

Para a quantificação do volume de tecido ósseo neoformado (μm^3) foram selecionados 16 cortes histológicos aleatoriamente ao longo do defeito ósseo, valor esse definido após o plano piloto. Estes cortes foram analisados na objetiva de 20X com o uso do mesmo microscópio dotado de “Z motorizado”, permitindo ao pesquisador analisar qualitativamente e quantitativamente o tecido em profundidade. Para esta quantificação, foi utilizado o software estereológico StereoInvestigator (MBF, USA) em que o programa possibilita a análise do volume tecidual pelo método de Cavalieri estimando deste modo a neoformação óssea em 3 dimensões, através da aplicação de um sistema teste, composto de grades com $150\mu\text{m}$ de distância sobre o contorno da área de interesse. Os resultados foram obtidos através da somatória de pontos do sistema teste sobre a área de tecido ósseo neoformado demarcado, tomando a espessura de $5\mu\text{m}$ (Figura de 2-5).

Figura 2. Sequência de quantificação estereológica do volume de tecido ósseo neoformado em (μm^3) através do Software StereoInvestigator. Linha em azul: demarcação da área de interesse.

Figura 3. Seleção e inserção da sonda estereológica que, através do Método de Cavalieri, possibilita o cálculo do volume de tecido ósseo neoformado demarcado na área de interesse.

Figura 4. Inserção do sistema teste com grades de 150µm de distância sobre o contorno da área de interesse. O programa calcula o número de pontos que caíram dentro desta área e multiplica pela espessura do corte com 5 µm.

Figura 5. Resultado do volume estimado em µm³ de tecido ósseo neoformado.

4.10- Análise de densitometria óptica das fibras colágenos tipo I e III

Para a análise das fibras colágenas, as lâminas histológicas foram coradas com a coloração de Picrosirius red que permite observar as fibras colágenas do tipo I e III através da birrefringência das fibras no microscópio com luz polarizada, que capta as fibras colágenas do tipo I com a cor vermelha ou alaranjada, e as fibras do tipo III na cor verde ou amarela (Pereira et al., 1998; Aranha 2009). Para esta análise quantitativa destas fibras foram capturados 16 campos histológicos na área de tecido ósseo neoformado, dentro do DOC, escolhidos aleatoriamente ao longo deste. Foram capturadas 16 imagens de cada animal, em um total de 80 imagens por grupo. Foi realizada a análise de densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III através do programa Axiovision que capta as diferentes tonalidades de vermelho e verde e quantifica a somatória das áreas em pixel² referentes às diferentes fibras sobre a luz polarizada. Os resultados foram submetidos à análise estatística de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (Figura 6-9).

Figura 6. Seleção da imagem para quantificação da densitometria óptica de fibras colágenas tipo I e III em pixel^2 , através do Programa Axiovision. Coloração em Picrosirius red sob a luz polarizada, na área de tecido ósseo neoformado.

Figura 7. Seleção das fibras de colágeno tipo I que sob a luz polarizada apresenta-se na cor vermelha ou laranja. O programa reconhece estas cores, calcula o somatório destas áreas e fornece em pixel^2 os resultados. Em azul toda área demarcada como sendo colágeno tipo I.

Figura 8. Seleção das fibras de colágeno tipo III que sob a luz polarizada apresenta-se na cor verde ou amarela. O programa reconhece estas cores, calcula o somatório destas áreas e fornece em pixel²os resultados. Em vermelho escuro está a área demarcada como sendo colágeno tipo III.

Figura 9. Resultado da quantificação das fibras colágenas tipo I e III, fornecido em somatório de áreas em pixel².

4.11- Imunoistoquímica para fatores de crescimento angiogênicos e osteogênicos

Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão *Diva Decloaker*® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada *Decloaking Chamber*® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em solução de tampão fosfato salina (PBS) 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois das lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados em 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram divididas em três lotes, e cada lote foi submetido à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OC (osteocalcina) do rato gerado em cabra (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-BPS (sialoproteína óssea) do rato gerado em cabra (1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-CD31 do rato gerado em coelho (1:180; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes empregou-se o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de

lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracolorados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

4.12- Análise das amostras submetidas à imunoperoxidase

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. A imunomarcção foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. Em cada animal foi analisada toda a extensão do DOC com um aumento de 100x. A análise semi-quantitativa foi efetuada utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal e ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado de uma modificação daqueles estabelecidos por Faria *et al.* (2008), onde 0 = ausência de imunomarcção; 1 = baixo padrão de imunomarcção; 2 = moderado padrão de imunomarcção; 3 = alto padrão de imunomarcção; 4 = padrão extremamente alto de imunomarcção.

4.13- Análise radiográfica

As calvárias removidas dos animais foram submetidas à análise radiográfica. Para a obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 Kvp, 10 mA, 12 pulsos. À distância foco-filme foi de 30 cm, com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto. A imagem digital direta foi obtida com a placa óptica fósforo-ativada do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Sobre cada placa óptica foi colocada uma peça óssea e uma identificação com letras de chumbo.

As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora, e as imagens foram manipuladas no software Digora for Windows 1.51. As imagens dos defeitos ósseos foram avaliadas visualmente por três diferentes examinadores cegos, com experiência em interpretação radiográfica, e classificada o grau de preenchimento por tecido calcificado de acordo com o seguinte critério (Pryor et al. 2006):

0= o defeito apresenta 0% a 25% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;

1= o defeito apresenta 25,1% a 50% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;

2= o defeito apresenta 50,1% a 75% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado;

3= o defeito apresenta 75,1% a 100% de sua área total com imagem radiopaca visível, compatível com tecido ósseo mineralizado.

Análise estatística

5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir dos resultados da análise radiográfica e da análise de consumo de etanol e de fibras colágenas tipo I e III, foram analisados pelos testes estatísticos de Kruskal-Wallis (para os fatores grupo e tempo) e teste de Dunn's (para análise comparada), com intervalo de confiança de 95%, para a neoformação óssea a partir da dos tempos de 4 e 6 semanas. Para a análise de volume de tecido ósseo neoformado e de massa corporal foi utilizado ANOVA e teste de Tukey.

Resultados

6- RESULTADOS

6.1- Análise massa corporal e ingestão alcoólica

Os resultados demonstraram que todos os grupos tratados com etanol apresentaram diminuição da massa corporal com diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos controles tanto no tempo de 4, quanto de 6 semanas (G1-4s e G1-6s). Na comparação entre os grupos tratados com rhBMP-2 aplicados ao DOC (G3-4s e G4-4s) e os grupos tratados com rhBMP-2 associada a esponja de colágeno (G7-4s e G8-4s) não apresentaram diferença estatística significante ($p > 0,05$) quanto à massa corporal quando comparados com os grupos em que houve ingestão de álcool. Com estes resultados, podemos demonstrar que o consumo de etanol propiciou redução do peso corporal em relação ao controle e aos seus homólogos, sem a ingestão do álcool, após 6 semanas (Gráfico 1).

A ingestão média diária de etanol a 20% foi maior para os grupos de 6 semanas, sendo $p < 0,001$ em relação aos de 4 semanas (Tabela 1).

GRUPO		INGESTÃO DIÁRIA
4S	G2	113g/Kg
	G4	106g/Kg
	G6	105g/Kg
	G8	113g/Kg
6S	G2	179g/Kg *
	G4	181g/Kg*
	G6	181g/kg*
	G8	220g/Kg*

Tabela 1. Ingestão média diária de etanol para o tempo de 4 e 6 semanas. Sendo * = $p < 0,001$.

Gráfico 1: Análise da massa corporal no tempo de 4 e 6 semanas. * ($p<0,05$); **($p<0,01$); ***($p<0,001$).

6.2- Análise da densidade radiográfica para o tempo de 4 e 6 semanas

No tempo de 4 semanas não foi encontrada diferença estatística entre os diferentes tratamentos. Já no tempo de 6 semanas houve diferença extremamente significativa entre os grupos neste período, sendo ($p<0,0001$) (Gráfico 2).

Nos grupos de 6 semanas foi observada diferença estatística entre o grupo controle (G1-6s) e o grupo que recebeu rhBMP-2 apenas ($p<0,05$)(G3-6s), sendo que este último apresentou a densidade radiográfica maior. Sob efeito do alcoolismo crônico ou não, a aplicação da rhBMP-2, isolada ou associada ao carreador, não demonstrou aumentar a densidade radiográfica, pois este grupo foi semelhante ao controle ($p>0,05$).

O grupo G6-6s (alcoolismo) recebeu apenas o carreador de colágeno e apresentou menor densidade radiográfica em comparação com os grupos G4-6s, G7-6s e G8-6s sendo ($p<0,05$) e que G3-6s ($p<0,01$).

De acordo com os parâmetros de neoformação óssea, os grupos de 6 semanas apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, sendo que os grupos G3-6s, G4-6s, G7-6s e G8-6s (grupos que receberam rhBMP-2) apresentaram densidade radiográfica maiores que G6-6s (Figura 10).

Figura 10. Imagens radiográficas dos defeitos ósseos em calvária. A) G3-6s, B) G4-6s, C) G6-6s, D) G7-6s.

Gráfico 2: Análise da densidade radiográfica no período de 6 semanas para os diferentes tratamentos. Sendo **a** diferente de **b** ($p < 0,05$); **c** diferente de **b** ($p < 0,01$) e de **d** ($p < 0,05$).

6.3- Análise histológica qualitativa no tempo de 4 e 6 semanas

Em G1 (4s e 6s) e G2 (4s e 6s) as características histológicas se mostraram muito similares. Constatamos a presença de uma faixa muito estreita de tecido ósseo neoformado confinada exclusivamente as bordas da ferida cirúrgica. A quase totalidade do DOC se mostrava preenchida por um tecido conjuntivo apresentando grande quantidade de fibras colágenas, orientadas paralelamente à superfície da ferida, entre as quais se observou a presença de moderada quantidade de fibroblastos, muitos vasos sanguíneos e poucas células inflamatórias (Fig. 11a-d; Fig. 12a-d).

Houve semelhança entre as características estruturais apresentadas pelas feridas cirúrgicas em G3 (4s e 6s). Dois espécimes do G3-4s e cinco espécimes do G3-6s apresentaram neoformação óssea em toda a extensão do defeito cirúrgico. Nos demais espécimes, o osso neoformado ocupava mais de 2/3 da ferida cirúrgica. Nestes casos as vertentes ósseas voltadas para o centro do DOC se mostravam repletas de uma grande

quantidade de osteoblastos demonstrando características morfológicas de intensa atividade. Em G3-4s uma delicada rede de trabéculas de osso imaturo circunscrevia amplos espaços medulares, enquanto que em G3-6s, as trabéculas ósseas eram mais espessas e os pequenos espaços medulares se mostravam ocupados de um tecido hematopoiético bem organizado. Nestes casos, o pequeno remanescente do DOC se apresentava ocupado por um tecido conjuntivo bem estruturado. Este tecido era composto por grande quantidade de fibras colágenas, entre as quais estavam presentes uma moderada quantidade de fibroblastos e vasos sanguíneos (Fig. 11e-f; Fig. 12e-f). Nos grupos submetidos à ingestão de álcool e cujos DOC foram preenchidos com rhBMP-2, G4-4s e G4-6s, as características histológicas dos tecidos que ocupavam a ferida cirúrgica se mantiveram similares aquelas apresentadas por G3-4s e G3-6s, respectivamente. No entanto, comparativamente, embora não tenha ocorrido alteração qualitativa, houve uma diminuição na quantidade de osso neoformado (Fig. 11g-h; Fig. 12g-h).

A resposta tecidual de G5 (4s e 6s) e G6 (4s e 6s) foi muito semelhante entre si, e a aquela apresentada por seus respectivos controles, ou seja, que receberam o mesmo tratamento (ingestão de água ou álcool), no entanto, com os DOCs preenchidos exclusivamente com o coágulo sanguíneo. A neoformação óssea ficou restrita a uma pequena faixa nas bordas do defeito ósseo. A quase totalidade do DOC se apresentava ocupada por poucas células inflamatórias, abundância de fibras colágenas, fibroblastos, vasos sanguíneos e em alguns espécimes, pequena quantidade de resquícios da esponja de colágeno (Fig. 11i-m; Fig. 12i-m).

Em G7 (4s e 6s) e G8 (4s e 6s) houve muita similaridade entre as características histológicas dos tecidos que preenchiam os DOCs. Dois espécimes do G7-4s, dois espécimes do G8-4s, cinco espécimes do G7-6s e cinco espécimes de G8-6s apresentaram

neoformação óssea em toda a extensão do defeito cirúrgico. Nestas amostras o perióstio se restituiu por completo, mostram-se composto por uma porção externa com predomínio de fibras colágenas e uma porção interna rica em células. Nos demais espécimes o osso neoformado ocupava mais de 2/3 da ferida cirúrgica. Nestes casos as vertentes ósseas voltadas para o centro do DOC se mostravam repletas de osteoblastos em franca atividade. Em G7-4s e G8-4s as trabéculas de osso imaturo eram mais finas e circunscreviam espaços medulares mais amplos, enquanto que em G7-6s e G8-6s, as trabéculas ósseas eram bem mais espessas e os espaços medulares menores e ocupados por tecido hematopoiético bem estruturado. Nos espécimes em que o DOC não foi totalmente ocupado por tecido ósseo, um tecido conjuntivo bem organizado ocupava o remanescente do defeito cirúrgico. Este tecido apresentava raros vestígios da esponja de colágeno, se mostrava intensamente vascularizado e com grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas (Fig. 11n-q; Fig. 12n-q).

Figura 11. Fotomicrografia dos DOCs no período de 4 semanas, aumento real de 40X e 400X, respectivamente. **a)** G1-4s (40X), **b)** G1-4s (400X), **c)** G2-4s (40X), **d)** G2-4s (400X) **e)** G3-4s (40X), **f)** G3-4s (400X), **g)** G4-4s (40X), **h)** G4-4s (400X), **i)** G5-4s (40X), **j)** G5-4s (400X), **k)** G6-4s (40X), **l)** G6-4s (400X), **m)** G7-4s (40X), **n)** G7-4s (400X), **o)** G8-4s (40X), **p)** G8-4s (400X). **ON-** osso neoformado, **TC-** tecido conjuntivo.

Figura 12. Fotomicrografia dos DOCs no período de 6 semanas, aumento real de 40X e 400X, respectivamente. **a)** G1-6s (40X), **b)** G1-6s (400X), **c)** G2-6s (40X), **d)** G2-6s (400X) **e)** G3-6s (40X), **f)** G3-6s (400X), **g)** G4-6s (40X), **h)** G4-6s (400X), **i)** G5-6s (40X), **j)** G5-6s (400X), **k)** G6-6s (40X), **l)** G6-6s (400X), **m)** G7-6s (40X), **n)** G7-6s (400X), **o)** G8-6s (40X), **p)** G8-6s (400X). **ON-** osso neoformado, **TC-** tecido conjuntivo.

6.4- Imunomarcção para OC, BPS E CD-31

O padrão de imunomarcção de OC e BPS foi muito semelhante (Fig. 13a-b). Ambas as proteínas foram expressas predominantemente por osteoblastos, no entanto, a matriz extracelular exibiu uma discreta imunomarcção. Em G1 (4s e 6s), G2 (4s e 6s), G5 (4s e 6s) e G6 (4s e 6s) o padrão de imunomarcção predominante para OC e BPS foi baixo. Em G3 (4s e 6s) e G4 (4s e 6s) prevaleceu um padrão de imunomarcção alto e moderado, respectivamente. Nos grupos G3 (4s e 6s), G7 (4s e 6s) e G8 (4s e 6s) houve um padrão de imunomarcção que variou de alto a extremamente alto. Constatou-se que o padrão de imunomarcção para OC e BPS se mostrou dependente da quantidade de osso neoformado no DOC.

A imunomarcção para CD-31 ficou confinada às células endoteliais dos vasos neoformados e se mostrou em um padrão que variou de ausente a baixo, na maioria dos espécimes, não diferindo quando se considerou os diferentes grupos experimentais (Fig. 13c).

Figura 13. Fotomicrografia das reações de imunoistoquímica com aumento real de 1000X. **a) seta verde**-osteoblastos imunorreativos para a sialoproteína óssea, **b) seta vermelha**-osteoblastos imunorreativos para a osteocalcina óssea, **c) seta pretas**-células endoteliais neoformadas de vasos sanguíneos imunorreativos para CD-31.

6.5- Análise quantitativa do tecido ósseo neoformado nos animais pertencentes ao tempo de 4 semanas

Os grupos G1-4s e G2-4s apresentaram diferença estatística em relação aos grupos G3-4s ($p<0,05$), G7-4s ($p<0,01$) e G8-4s ($p<0,001$), de modo que nestes últimos grupos a proteína rhBMP-2 foi aplicada ao defeito ósseo, sendo que, G7-4s e G8-4s estavam associados ao carreador de colágeno.

O grupo G3-4s apresentou diferença estatística em relação ao grupo G6-4s ($p<0,01$) e este último, por sua vez, foi menor estatisticamente que G7-4s e G8-4s ($p<0,001$).

O grupo G8-4s foi o grupo que apresentou a maior neoformação óssea sendo diferente estatisticamente em relação aos grupos G4-4s ($p<0,01$) e G5-4s ($p<0,001$) (Tabela 2 e Gráfico 3).

Tabela 2: Resultados da análise estatística (ANOVA e teste Tukey).

G1 VS G3	$p<0,05$
G1 VS G7	$p<0,01$
G1 VS G8	$p<0,001$
G2 VS G3	$p<0,05$
G2 VS G7	$p<0,01$
G2 VS G8	$p<0,001$
G3 VS G6	$p<0,01$
G4 VS G8	$p<0,01$
G5 VS G8	$p<0,001$
G6 VS G7	$p<0,001$
G6 VS G8	$p<0,001$

Gráfico 3: Volume de tecido ósseo neoformado aos diferentes tratamentos, no tempo de 4 semanas, após a criação do defeito ósseo.

6.6- Análise quantitativa do tecido ósseo neoformado no período de 6 semanas

Os grupos que receberam apenas o defeito ósseo G1-6s e G2-6s, apresentaram diferença estatística em relação a G7-6s e G8-6s ($p<0,001$), que são os grupos que receberam a esponja de colágeno como carreador associado à aplicação de rhBMP-2, este último grupo por sua vez apesar de estar sob o efeito do alcoolismo obteve grande neoformação óssea. G8-6s (DO+colágeno+rhBMP-2) apresentou-se diferente de G4-6s (DO+álcool+rhBMP-2) ($p<0,01$), G5-6s (DO+colágeno) ($p<0,001$) e G6-6s (DO+álcool+colágeno) ($p<0,001$), sendo que o grupo G3-4s (rhBMP-2) apresentou diferença em relação a G6-6s ($p<0,01$) (Tabela 3 e Gráfico 4).

Tabela 3: Resultados da análise estatística (ANOVA e teste Tukey).

G1 VS G3	p<0,01
G1 VS G7	p<0,001
G1 VS G8	p<0,001
G2 VS G3	p<0,001
G2 VS G4	p<0,05
G2 VS G7	p<0,001
G2 VS G8	p<0,001
G4 VS G6	p<0,05
G4 VS G7	p<0,01
G4 VS G8	p<0,01
G5 VS G7	p<0,001
G5 VS G8	p<0,001
G6 VS G7	p<0,001
G6 VS G8	p<0,001

Gráfico 4: Volume do tecido ósseo neoformado aos diferentes tratamentos, no tempo de 6 semanas, após a criação do defeito ósseo.

6.7-Quantificação das fibras colágenas do tipo I e III

Para a quantificação das fibras colágenas do tipo I e III analisadas em luz polarizada, na área de DOC, foram encontradas diferenças estatísticas ($p < 0,05$), apenas para o colágeno tipo I, sendo que G3-4s foi diferente estatisticamente de G7-4s, G7-6s e G8-6s com ($p < 0,05$). Os grupos G7-4s, G7-6s e G8-6s receberam o tratamento com a rhBMP-2 associada esponja de colágeno (Tabela 4 e Figura 14).

Figura 14. Fotomicrografia da coloração de Picrosirius sob luz polarizada. A) G3-4s, B) G7-4s, C) G7-6s e D) G8-6s.

Tabela 4: Resultado da análise estatística (Kruskal-Wallis e teste de Dunn)

G3-4S VS G7-4S	$p < 0,05$
G3-4S VS G7-6S	$p < 0,05$
G3-4S VS G8-6S	$p < 0,05$

Discussão

7- DISCUSSÃO

Neste estudo utilizou-se o modelo experimental de indução do alcoolismo crônico em ratos Wistar, objetivando-se avaliar através de diferentes metodologias os efeitos desta substância no metabolismo ósseo. A literatura aponta que os efeitos deletérios do álcool podem ser observados em vários tecidos e órgãos, inclusive o tecido ósseo, sendo considerado um fator causador da osteoporose, no entanto, o mecanismo exato de como o álcool pode alterar a homeostase não é bem esclarecido (Calvin et al., 1993; Nishiguchi et al., 2000; Gonzáles-Balzan et al., 2001; Gali et al., 2001, Jung et al., 2011). Hipóteses fisiopatológicas são baseadas nos efeitos diretos e indiretos do álcool sob o metabolismo ósseo, desencadeando a diminuição da massa óssea, com consequente perda das propriedades biomecânicas (Callaci et al., 2009; Chen et al., 2010; Turner et al., 2010; Chen et al., 2011). Os efeitos indiretos se caracterizariam pela redução do consumo de nutrientes essenciais para a manutenção da integridade do tecido ósseo, em virtude da substituição de uma dieta de valor nutritivo por uma dieta com alto teor calórico, baixo teor nutritivo propiciada pelo consumo de álcool. Já os efeitos diretos ocorreriam pela alteração do turnover ósseo, aumentando a reabsorção óssea e diminuindo sua neoformação, em resposta ao aumento da osteoclastogênese, redução do número de osteoblastos, aumento do estresse oxidativo, apoptose de osteócitos, aumento de lipídeos na medula e em microvasos ósseos (Gonzáles-Calvin et al., 1993; Dyer et al., 1998; Jung et al., 2011; Ronis et al., 2011; Maurel et al., 2012).

Nossos resultados demonstraram que a ingestão de álcool foi capaz de diminuir o peso corporal de todos os grupos tratados com esta solução, principalmente no período de 6 semanas. Esta diminuição parece ser dose dependente, já que, nestes grupos de 6 semanas, a ingestão diária de etanol foi maior estatisticamente que no período de 4 semanas. Esta

redução de massa corpórea pode estar relacionada aos efeitos indiretos do alcoolismo mencionados anteriormente, que levam a redução e má absorção de nutrientes (Lieber et al., 1991), ocasionando esta diferença de peso corporal especialmente em altas ingestões de concentrações de etanol. Outros trabalhos já mencionaram estes efeitos do alcoolismo sobre a diminuição da massa corporal com a ingestão de álcool (Faustino et al., 2003, Maddalozzo et al., 2009).

A proteína morfogenética rhBMP-2 utilizada nesta pesquisa, é considerada um potente osteoindutor e sua forma recombinante tem sido utilizada em estudos experimentais como método alternativo aos enxertos autólogos na reparação de DOC (Jang et al., 2011; Woo et al., 2011; Lee et al., 2011). Tal efeito reparador é potencializado pelo uso de um material carreador, que neste estudo foi a esponja de colágeno, cuja função é disponibilizar a proteína de forma lenta e constante ao meio, aumentando seu efeito na reparação óssea.

Foi possível observar em nossos resultados que o álcool reduziu a neoformação óssea, quando comparado com os grupos que não o receberam: controle, rhBMP-2 e esponja de colágeno isolados. A rhBMP-2 quando aplicada ao DOC foi responsável pelo aumento da reparação óssea, da densidade radiográfica e da expressão dos fatores de crescimento pelos osteoblastos, como a osteocalcina e sialoproteína óssea, em relação ao controle, sendo que o álcool, quando administrado em conjunto com a rhBMP-2, reverteu o efeito desta, na reparação e na densidade radiográfica, mas não alterou a expressão dos fatores de crescimento citados, contudo, Callaci et al. 2009 observaram uma redução de marcadores dos genes de osteocalcina e fosfatase alcalina, diminuição significativa na expressão de reguladores da ativação osteoblástica, assim como de proteínas morfogenéticas. Desta forma, sugere-se que o álcool contrapõem-se ao efeito neoformador da rhBMP-2, sendo um dos mecanismos propostos na literatura àquele que correlaciona o

atraso do reparo ósseo à inibição de fatores como as citocinas inflamatórias, interleucina-1 (IL-1) e factor de necrose tumoral alfa (TNF α), que são fatores da resposta inflamatória local presentes no reparo tecidual normal.

Atualmente estudos sugerem que o álcool inibe a via WNT, responsável pela inibição do complexo de destruição da beta catenina, substância esta importante para a modulação da atividade inflamatória associada à osteogênese (Chen et al., 2010; Jung et al., 2011; Ronis et al., 2011; Lauing et al., 2012). Apesar de não existirem trabalhos que correlacionem a atuação da rhBMP-2 ao efeito do álcool no tecido ósseo, Gerjevic et al., 2012 demonstraram que o álcool aumenta a produção de TGF-beta e da BMP-2 no tecido hepático. O primeiro consiste-se em um fator de crescimento que aumenta a produção e secreção das proteínas da matriz extracelular e estresse oxidativo, contribuindo para a lesão tecidual, enquanto a segunda, no tecido hepático, está associada a efeito antagônico ao do TGF-beta. Entretanto, o álcool também promoveu inibição do receptor da BMP e inativação de fatores de transcrição relacionados à homeostase do ferro hepático, propiciando deste modo a lesão tecidual. Desta mesma forma, aventa-se a possibilidade da ocorrência deste mesmo mecanismo inibitório na reparação do tecido ósseo, tendo em vista que os grupos que ingeriram álcool apresentaram menor neoformação óssea.

No presente estudo demonstrou-se que o efeito da rhBMP-2 foi potencializado quando associada a esponja de colágeno, aumentando a neoformação óssea observada pela estereologia, tanto para o período de 4 semanas, quanto para o de 6 semanas de reparo ósseo, corroborando os resultados de estudos anteriores que verificaram que a esponja de colágeno contribui para a disponibilização lenta e gradual da proteína ao longo do tempo (Geiger et al., 2003, Freire et al., 2010; Jung et al., 2011; Issa et al., 2008, 2009, 2010, 2012). Mas diferentemente dos outros grupos, esta associação impediu que o álcool afetasse

negativamente a neoformação, aumentando ou mantendo o volume de tecido ósseo neoformado, possivelmente por aumentar o tempo de ação da rhBMP-2 sobre o tecido e sua eficiência na reparação do mesmo.

Os resultados citados anteriormente foram congruentes com os achados histológicos, em que a rhBMP-2 demonstrou acelerar o processo de reparo, principalmente associada a esponja de colágeno, levando ao completo reparo e fechamento do defeito cirúrgico, com restituição do periósteo, aumentado as espessuras das trabéculas ósseas e diminuição os espaços medulares ao longo do tempo, inclusive nos animais tratados com álcool. Foi observado ainda que os grupos controles e os grupos em que foram aplicadas as esponjas, não tiveram seus defeitos ósseos reparados ao longo do tempo.

Sabe-se que as fibras colágenas são constituintes orgânicos do tecido ósseo e lhe confere resistência à tração, elasticidade e sustentação. Estas fazem parte de uma família de proteínas que, na reparação do tecido ósseo, são depositadas na matriz extracelular, sendo este composto por aproximadamente 90% de colágeno tipo I, principal produto dos osteoblastos (Vargas et al., 1997; Aranha, 2009). Nosso trabalho avaliou por densitometria óptica, as fibras colágenas do tipo I e tipo III observadas na matriz de tecido ósseo neoformado, e encontrou um aumento das fibras colágenas do tipo I para os grupos tratados com rhBMP-2 associada a esponja de colágeno no período de 6 semanas, sob ou não efeito do etanol, podendo decorrer da maior neoformação óssea, encontradas nestes grupos e da presença de colágeno tipo I sintético advindo do carreador utilizado.

De acordo com os resultados histológicos, radiográficos e imunoistoquímicos podemos constatar através deste estudo que a aplicação da rhBMP-2 associada a esponja de colágeno pode ser um método alternativo para acelerar o processo de reparação óssea,

inclusive na vigência de exposição ao álcool, visto que os resultados mostraram aumento da neoformação óssea avaliada pela estereologia, densidade radiográfica e imunoistoquímica com aumento da expressão dos fatores de crescimento ósseo, abrindo espaço para novos estudos que demonstrem a aplicabilidade clínica de tais demonstrações.

Conclusão

8-CONCLUSÃO

A partir dos dados coletados podemos concluir que:

O etanol:

- a) Leva a perda da massa corporal, sendo dose dependente;
- b) Afeta a reparação óssea, mesmo com aplicação da rhBMP-2;

A rhBMP-2:

- c) A rhBMP-2 aumenta a densidade radiográfica, a neoformação óssea em termos histológicos e a expressão dos fatores de crescimento ósseo, osteocalcina e sialoproteína óssea.
- d) Os efeitos na neoformação óssea são potencializados com a associação da esponja de colágeno como carreador, sendo também capaz de aumentar o colágeno tipo I mesmo sob o efeito do álcool.

O álcool altera o metabolismo ósseo e a aplicação da rhBMP-2 associado a esponja de colágeno demonstrou ser capaz de aumentar e acelerar a reparação tecidual, deste modo, este pode ser um método alternativo para melhorar a reparação óssea nestas condições, para tanto, outros estudos devem ser feitos buscando compreender melhor seus efeitos biológicos.

Referências

9-REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, L. M.; COUTINHO, E. S. F. Prevalência de consumo de bebidas alcoólicas e de alcoolismo em uma região metropolitana do Brasil. *Rev. saúde pública*, v. 27, n. 1, p. 23-29, 1993.
- ARANHA, M. Avaliação quantitativa das fibras colágenas tipo I e tipo III, do tecido uretral de ratas submetidas à simulação de trabalho de parto e ooforectomia: estudo estereológico. 2009. 62f. Tese (Mestre em cirurgia) – *Universidade Federal do Paraná*, Curitiba. 2009.
- BALZAN, S. M. P. et al. Osteoporose e álcool. *J. bras. med*, v. 80, n. 4, p. 60-64, 2001.
- BESSHO, K. et al. Purification of bone morphogenetics protein derived from bovine matrix. *Biochem. biophys. res. commun*, v. 165, p. 595-601, 1989.
- BOYNE, P. J. et al. Human recombinant BMP-2 in osseous reconstruction of simulated cleft palate defects. *Br. j. oral maxillofac. surg*, v. 36, p. 84-90, 1998.
- BROULÍK, P. D. et al. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol. res*, v. 59, n. 4, p. 599-604, 2010.
- CALLACI, J. J. et al. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif. tissue int*, v. 84, n. 6, p. 474-484, 2009.
- CARRAGEE, E. J. et al. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine j*, v. 11, n. 6, p. 471-491, 2011.
- CARDIM, M. S. et al. Epidemiologia descritiva do alcoolismo em grupos populacionais do Brasil. *cad. saúde pública*, v. 2, p. 191-211, 1986.

CHEN, J. R. et al. Inhibition of NADPH oxidases prevents chronic ethanol-induced bone loss in female rats. *J. pharmacol. exp. ther.*, v. 336, n. 3, p. 734-742, 2011.

CHEN, J. R. et al. A Role for Ethanol-Induced Oxidative Stress in Controlling Lineage Commitment of Mesenchymal Stromal Cells Through Inhibition of Wnt/b-Catenin Signaling. *J. bone miner. res.*, v. 25, n. 5, p. 1117–1127, 2010.

DAWSON, E. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 on an absorbable collagen sponge with an osteoconductive bulking agent in posterolateral arthrodesis with instrumentation. *J. bone jt. sur. ser. a, am.*, v. 91, p. 1604-1613, 2009.

DYER, S. A. et al. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol*, v. 16, n. 4, p. 337-341, 1998.

DÍEZ-RUIZ, A. et al. Bone mineral density, bone turnover markers and cytokines in alcohol-induced cirrhosis. *Alcohol alcohol*, v. 45, n. 5, p. 427-430, 2010.

ELMALI, N. et al. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol. clin. exp. res.*, v. 26, n. 4, p. 509-513, 2002.

FAUSTINO, S. E. S. et al. Efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcóolica sobre a glândula submandibular de ratos. Estudo morfométrico. *J. appl. oral sci.*, v. 11, n. 1, p. 21-26, 2003.

FARIA, P. E. et al. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin. oral implants res.*, v. 19, n. 4, p. 393-401, 2008.

FREIRE, M. O. et al. Antibody-mediated osseous regeneration: a novel strategy for bioengineering bone by immobilized anti–bone morphogenetic protein-2 antibodies. *J. tissue eng.*, v. 17, n. 23, p. 2911-2918, 2010.

FREITAS, N. M. et al. Proteínas ósseas morfogenéticas (BMPS). *Periodontia*, v. 13, n. 7, p. 5-8, 2003.

FUJIMURA, K. et al. Experimental studies on bone inducing activity of composites of atelopeptide type collagen as a carrier for ectopic osteoinduction by rhBMP-2. *Biochem. biophys. res. commun.*, v. 208, p. 316-322, 1995.

GALI, J. Osteoporose. *Acta ortop. bras.*, v. 9, n. 2, p. 3- 12, 2001.

GEIGER, M. et al. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv. drug deliv. rev.*, v. 55, p. 1613-1629, 2003.

GERJEVIC, L. N. Alcohol activates TGF-Beta but inhibits BMP receptor-mediated smad signaling and smad4 binding to hepcidin promoter in the liver. *Int. j. hepatol.* v. 2012, doi 10.155/2012/459278. 2012.

GONZALEZ-CALVIN, J. L. et al. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol alcohol*, v. 28, n. 5, p. 571-579, 1993.

HART, K. L.; BOWLES, D. Reconstruction of Alveolar Defects Using Titanium-Reinforced Porous Polyethylene as a Containment Device for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J. oral maxillofac. surg.*, v. 70, n. 4, p. 811-20, 2012.

HUSSEIN, K. A. et al. Difference in Soft Tissue Response Between Immediate and Delayed Delivery Suggests a New Mechanism for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2 Action in Large Segmental Bone Defects. *Tissue eng part a*, v. 18, n. 5-6, p. 665-675, 2012.

ISSA, J. P. M. et al. Evaluation of rhBMP-2 and natural latex as potential osteogenic proteins in critical size defects by histomorphometric methods. *Anat. rec. part a discov. mol. cell. evol. biol.*, v. 293, p. 794-801, 2010.

ISSA, J. P. M. et al. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on bone formation in the acute distraction osteogenesis. *Clin. oral implants res.* v. 20, p. 1286-1292, 2009.

ISSA, J. P. M. et al. Bone repair in rat mandible by rhBMP-2 associated with two carriers. *Micron (oxf., 1993)*, v. 39, p. 373-379, 2008.

ISSA, J. P. M. et al. Bone repair investigation using rhbmp-2 and angiogenic protein extracted from latex. *Microsc. res. tech.*, v. 75, p. 145–152, 2012.

JAIME, A. P. G.; ANBINDER, A. L.; LIMA, A. P.; PRADO, F. A.; BALDUCCI I.; ROCHA, R. F. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. *Ciênc. odontol. bras*, v. 8, n. 2, p. 70-79, 2005.

JANG, J. W. et al. Osteoinductive activity of biphasic calcium phosphate with different rhBMP-2 doses in rats. *Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. endod.*, v. 113, n. 4, p. 480-487, 2012.

JUNG M. K. et al. Alcohol exposure and mechanism of tissue injury and repair. *Alcohol clin. Exp. res.*, v. 35, n. 3, p. 392-399, 2011.

JUNG, J. H. et al. Bone formation of *Escherichia coli* expressed rhbmp-2 on absorbable collagen block in rat calvarial defects. *Oral surg. oral med. oral pathol. oral radiol. endod.* v. 111, p. 298-305, 2011.

KANG, J. D. Commentary: Another complication associated with rhBMP-2?. *Spine J*, v. 11, n. 6, p. 517-519, 2011.

KOO, S. et al. Effects of alcohol consumption on osseointegration of titanium implants in rabbits. *Implant dent*, v. 13, n. 3, p. 232-7, 2004.

LAUING, K. L. et al. Acute alcohol exposure impairs fracture healing and deregulates b-catenin signaling in the fracture callus. *Alcohol clin. Exp. res*, 2012, Jun 12. doi: 10.1111.

LEE, K. B. et al. Use of autogenous bone graft compared with rhBMP in high-risk patients. *J. spinal disord. tech*, 2012. In print.

LIBERMAN, D. N. et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in wistar rats. *Arch. oral biol*, v. 56, p. 109-113, 2011.

LIEBER, C. S. Alcohol, liver, and nutrition. *J. am. coll. nutr*, v. 10, n. 6, p. 602-632, 1991.

MADDALOZZO, G. F. et al. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos. int*, v. 20, n. 9, p. 1529-1538, 2009.

MARQUES, M. Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio. 2008. 45 f. Tese (Mestrado em odontologia) - *Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Unesp*. 2008.

MAUREL, D. B. et al. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos. int*, v. 23, p. 1-16, 2012.

MAUREL, D. B. et al. Osteocyte Apoptosis and Lipid Infiltration as Mechanisms of Alcohol-Induced Bone Loss. *Alcohol alcohol*, v. 47, n. 4, p. 413-422, 2012.

MOOM, K. H. et al. Comparative study of the osteogenic potentials of rhBMP-2 in collagen sponge or mixed with porcine collagen gel in a rat spinal fusion model. *J. tissue eng. regen. med*, v. 6, n. 4-11, p. 653-658, 2009.

NISHIGUCHI, S. et al. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *J. bone miner. metab*, v. 18, n. 6, p. 317-320, 2000.

NYQUIST, F. et al. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol alcohol*, v. 37, n. 1, p. 21-24, 2002.

OLIVEIRA, G. K. et al. Células- troncos mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães . *Arq. bras. med. vet. zootec*, v. 62, n. 1, p. 72-79, 2010.

OLIVEIRA, E. L.; LUIS, M. A. V. Distúrbios relacionados ao álcool em um setor de urgências psiquiátricas. Ribeirão Preto-SP, Brasil (1988 – 1990). *Cad. saúde pública*, v. 12, n. 2, p. 171-179, 1996.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. SERIE DE INFORMES TÉCNICOS: Comité de Expertos de la OMS en Farmacodependencia. Ginebra (Suiza): Organización Mundial de la Salud, 1970.

OLIVEIRA, A. M.; COELHO, E. B. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J. pharm. pharmacol*, v. 60, p. 331-341, 2008.

PEREIRA, L. M. M; et al. Morfologia e Estereologia do Miocárdio em Ratos Hipertensos. Correlação com o Tempo de Inibição da Síntese do Óxido Nítrico. *Arq. bras. cardiol*, v. 70, n. 6, 1998.

PRYOR, M. E; SUSIN, C. WISESJO, U. M. Validity of radiographic evaluations of bone formation in rat calvaria osteotomy defect model. *J. clin. periodontal*, v. 33, n. 6, p. 455-460, 2006.

SARBAN, S. et al. Can rhBMP-2 containing collagen sponges enhance bone repair in ovariectomized rats: a preliminary study. *Clin. orthop. relat. res*, v. 467, n. 12, p. 3113-3120, 2009.

SHIMOJI, S. et al. Bone perforation and placement of collagen sponge facilitate bone augmentation. *J. periodontol*, n. 80, v. 3, p. 505-511, 2009.

SILVA, A. R. S. et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. *Rev. odonto. ciênc*, v. 22, n. 55, p. 77-81, 2007.

RAI, D.V. et al. Acute and chronic dose of alcohol affect the load carrying capacity of long bone in rats. *J. biomech*, v. 41, n. 1, p. 20–24, 2008.

RAUCH, F. et al. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, 4 e 7 during distraction osteogenesis in rabbits. *Bone*, v. 27, p. 453-459, 2000.

REDDI, A. H. Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine growth factor rev*, v. 8, p. 11-20, 1997.

ROSA, A. P. et al. Effects of the combination of low-level laser irradiation and recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone repair. *Lasers med. sci*, v. 27, n. 5, p. 971-977, 2012.

RONIS, M. J. et al. Effects of Nutrition and Alcohol Consumption on Bone Loss. *Curr Osteoporos. rep*, v. 9, n. 2, p. 53-59, 2011.

SEMENOFF SEGUNDO, A. et al. Efeito da ingestão crônica de álcool na progressão de periodontite induzida em ratos da linhagem Fischer-344. *RGO (Porto Alegre)*, v. 57, n. 1, p. 87-91, 2009.

SOUZA, D. M. et al. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Braz. oral res*. v. 23, n. 3, p. 326-332, 2009.

SPAGNOLI, D. The application of recombinant human bone morphogenetic protein on absorbable collagen sponge (rhBMP2/ACS) to reconstruction of maxillofacial bone effect. Bone morphogenetic proteins: *From local systemic therapeutic*, p. 43-70. 2008.

SPECTOR, J. A. et al. Expression of bone morphogenetic proteins during membranous bone healing. *Plast. reconstr. surg*, v. 107, p. 124, 2001.

SUK, M. Use of recombinants human BMP-2 in orthopedic trauma. Bone morphogenetic proteins: *From local systemic therapeutic*, p. 25-42. 2008.

SWEENY, L. et al. Use of Recombinant Bone Morphogenetic Protein 2 in Free Flap Reconstruction for Osteonecrosis of the Mandible. *J. oral maxillofac. surg*, v. 70, v. 8, p. 1991- 1996, 2012.

TIRAPELLI, C. R. et al. Chronic ethanol consumption enhances phenylephrine-induced contraction in the isolated rat aorta. *J. pharmacol. exp. ther*, v. 316, p. 233–241, 2006a.

TIRAPELLI, C. R. et al. Ethanol consumption enhances endothelin-1-induced contraction in the isolated rat carotid. *J. pharmacol. exp. ther*, v. 318, n. 2, p. 819–827, 2006b.

TIRAPELLI, C. R. et al. Effect of ethanol consumption on blood pressure and rat mesenteric arterial bed, aorta and carotid responsiveness. *J. pharmacol. exp. ther*, v. 59, p. 985–993, 2007.

TIRAPELLI, L. F. et al. Ultrastructural alterations of the parotid glands of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Rev. chil. anat*, v. 19, n. 2, p. 175-182, 2001.

TIRAPELLI, C. R. et al. Ethanol consumption increases blood pressure and alters the responsiveness of the mesenteric vasculature in rats. *J. pharm. pharmacol*, v. 60, p. 331-341, 2008.

TURNER R. T. et al. Effects of alcohol on skeletal response to growth hormone in hypophysectomized rats. *Bone*, v. 43, n. 3, p. 806-812, 2010.

VARGAS, D. M. et al. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev. ass. med. brasil*, v. 43, n. 4, p. 367-370, 1997.

WOO E. J. Adverse Events Reported After the Use of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J. oral maxillofac. surg*, v. 70 n. 4, p. 765-767, 2012.

YANG, H. S. et al. Comparison between heparin-conjugated fibrin and collagen sponge as bone morphogenetic protein-2 carriers for bone regeneration. *Exp. mol. med*, v. 44, n. 5, p. 350-355, 2012.

Anexo

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.1011.53.9), intitulado "Avaliação da Reparação Óssea em Difeitos Críticos após a Aplicação da Proteína rhBMP-2 Pura e/ou Combinada em Animais Normais e sob Efeito do Alcoolismo Crônico", de autoria de **Bruna Gabriela dos Santos Kotake**, e de **João Paulo Madergan Issa** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/10/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.1011.53.9), entitled: "Avaliação da Reparação Óssea em Difeitos Críticos após a Aplicação da Proteína rhBMP-2 Pura e/ou Combinada em Animais Normais e sob Efeito do Alcoolismo Crônico", by **Bruna Gabriela dos Santos Kotake** and **João Paulo Madergan Issa**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, October 07, 2010.

Ribeirão Preto, 8 de outubro de 2010.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro