

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MARCELO RODRIGUES DA CUNHA

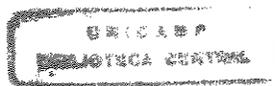
IMPLANTES SUBPERIOSTAIS DE HIDROXIAPATITA EM  
RATOS SUBMETIDOS À INGESTÃO CRÔNICA DE ÁLCOOL

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato (a) *Marcelo Rodrigues da Cunha* e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ANGELO CAMILLI

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE Be  
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP  
C 9142  
 V. Ex  
 TOMBO DO/ 46898  
 PROC. 16.392/01  
 C  D   
 PREÇO RS 11,00  
 DATA 02/11/01  
 N.º CPD \_\_\_\_\_

CM00161237-7

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Cunha, Marcelo Rodrigues da**

**C231i** **Implantes subperiostais de hidroxiapatita em ratos submetidos à ingestão crônica de álcool/Marcelo Rodrigues da Cunha. – Campinas, SP:[s.n.], 2001**  
 88f.:ilus.

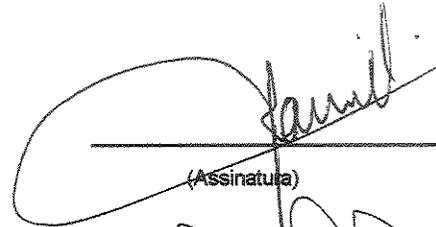
Orientador: José Ângelo Camilli  
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
 Instituto de Biologia.

1. Hidroxiapatita. 2. Perióstio. 3. Alcoolismo. I. Camilli, José Ângelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 31/07/2001

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. José Ângelo Camilli (Orientador)



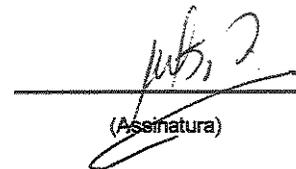
(Assinatura)

Prof. Dra. Selma Candelária Genari



(Assinatura)

Profa. Dra. Maria José Salete Viotto



(Assinatura)

Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete

(Assinatura)

**DEDICO**

À minha mãe Ana, meu pai Mário (*in memoriam*) e a minha madrinha Mércia que sempre estiveram ao meu lado dando apoio, carinho e muito amor na minha luta à conquista da realização profissional.

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**DEDICO**

Aos meus irmãos Rodolfo, Fabiane e Bruno e aos sobrinhos Dudu, Mariana,  
Ingrid e João Vitor pela torcida à minha vitória.

A Elaine que sempre esteve ao meu lado de forma compreensiva e com muito amor

### **DEDICO**

À minha ex-professora e grande amiga Maria José Salete Viotto, que através de sua sabedoria e humildade na busca do conhecimento, fez com que eu tomasse gosto pela pesquisa. Por tudo isso e muito mais, à querida amiga e ex-professora todo o meu respeito e admiração e, pelo convívio carinhoso, a minha eterna dedicatória.

---

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus por ter me orientado durante toda a vida

Ao professor e orientador Dr. José Ângelo Camilli pela orientação, dando credibilidade a esta pesquisa.

Aos professores do Departamento de Anatomia da UNICAMP pela amizade e pela oportunidade de aprender e desenvolver a didática na área de anatomia humana.

Aos professores Valeria Helena Alves Cagnon, Maria José Salete Viotto e Selma Candelária pela colaboração e sugestões durante a pré-banca.

Aos amigos da pós-graduação pela amizade, principalmente ao grande amigo César Alexandre Fabrega Carvalho, que além do companheirismo, também foi importante para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado Cesão pela ajuda e sincera amizade!

A prof. Dra. Iara Maria Silva De Luca pela orientação na morfometria

Ao prof. Dr. Jorge Oishi do Depto. de Estatística da Universidade Federal de São Carlos pela análise dos dados e principalmente pela amizade que vem desde o tempo de graduação.

Ao professor Dr. Celso Bertran e a doutoranda Beth do Instituto de Química da UNICAMP pela confecção da hidroxiapatita usada nesse trabalho.

À Maria Antonia do Depto. de Zoologia da UNICAMP pela amizade e atenção dispensada na montagem dos esquemas dessa tese.

Aos meus ex-professores da graduação Marcelo Martinez e Maíra Stefanini do Depto. De Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos, pela amizade e incentivo à carreira de docência em Anatomia Humana.

Aos amigos Norivaldo Celestino e Marco Aurélio do Depto. de Anatomia da UNICAMP, que foram importante na confecção das lâminas desse trabalho, no entanto, o mais importante foi o incentivo dado pela grande e bonita amizade que desenvolvemos. Nori e Marquinho, meus eternos agradecimentos

À Sra. Marlene Lima pela amizade e pelos cuidados aos animais usados nesta pesquisa

Aos técnicos Carlos, Paulo e Paulo do Departamento de Anatomia pela ajuda e amizade

Às secretárias Silvia Kalaf, Lourdes Pinheiro, Ana e Lílian pela amizade e atenção

À CAPES pelo apoio financeiro dada à esta pesquisa

**SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVO</b> .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. <i>Síntese de hidroxiapatita</i> .....	23
3.2. <i>Animais</i> .....	25
3.3. <i>Procedimento cirúrgico</i> .....	25
3.4. <i>Estudo histológico</i> .....	27
3.5. <i>Estudo morfométrico</i> .....	27
3.6 <i>Estudo estatístico</i> .....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
4.1. <i>Variação da dieta líquida consumida pelos animais</i> .....	32
4.2. <i>Variação da dieta sólida consumida pelos animais</i> .....	34
4.3. <i>Variação da porcentagem do ganho de massa corpórea</i> .....	36
4.4. <i>Observações Macroscópicas</i> .....	38
4.5. <i>Observações Microscópicas</i> .....	40
4.5.1. <i>Implante de hidroxiapatita no fêmur de animais não alcoolizados</i> .....	40
4.5.2. <i>Implante de hidroxiapatita no fêmur de animais alcoolizados</i> .....	44
4.5.3. <i>Implante de hidroxiapatita no parietal de animais não alcoolizados</i> .....	49
4.5.4. <i>Implante de hidroxiapatita no parietal de animais alcoolizados</i> .....	53
4.6. <i>Análise morfométrica</i> .....	58
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	69
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	71
<b>8. ANEXO</b> .....	84

## RESUMO

Defeitos com perda de massa óssea são frequentemente tratados com enxertos ósseos autógenos. Implantes subperiostais de biomateriais, como hidroxiapatita (HA), também têm sido utilizados com a mesma finalidade, substituindo os enxertos ósseos. Contudo, o consumo excessivo de álcool pode prejudicar a osteointegração da HA devido aos seus efeitos deletérios sobre o tecido ósseo. No presente trabalho, foram implantados, subperiostalmente, blocos de hidroxiapatita no fêmur e parietal de 20 ratos não alcoolizados e 20 alcoolizados. Os animais foram sacrificados 2, 4, 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas e as áreas receptoras examinadas histologicamente. Os animais alcoolizados não ficaram desnutridos frente ao alcoolismo experimental uma vez que não perderam peso ao longo do tratamento e mantiveram um consumo de ração e líquido dentro do padrão estabelecido para uma dieta normal. Com duas semanas pós-cirúrgicas, ocorreu formação óssea junto a hidroxiapatita implantada no fêmur de todos animais, porém, em menor volume nos alcoolizados. No parietal, além do menor volume, observou-se atraso no processo de neoformação óssea nos animais alcoolizados, uma vez que apenas 1 dos 5 animais sacrificados com duas semanas pós-cirúrgicas apresentou formação de osso. Na quarta semana pós-cirúrgica, 1 animal alcoolizado não apresentou osso neoformado na área implantada no fêmur, enquanto outros 2 não tiveram formação de osso no parietal. Nos períodos de 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas, houve formação de osso tanto no fêmur como no parietal de todos animais, porém sempre em menor quantidade nos alcoolizados. Com estes resultados, concluiu-se que o alcoolismo experimental diminuiu a capacidade osteogênica das células periostais do fêmur e do parietal. Quanto a osteointegração da HA nos dois grupos estudados, não ocorreu a interposição de tecido fibroso entre a cerâmica e o osso neoformado.

## ABSTRACT

Defects with bone mass lost are normally treated with bone autografts. Subperiosteal implants of biomaterials like hydroxyapatite (HA) have also been utilized for the same goal, substituting the bone grafts. Nevertheless, the excessive alcohol consumption can impair the HA osteointegration due to its deleterious effects on the bone tissue. At the present work, hydroxyapatite blocks have been subperiosteally implanted at the femur and parietal bone of 20 non-alcoholic rats and 20 alcoholic ones. The animals were sacrificed at 2, 4, 8 and 16 weeks postoperatively and the receptor areas histological evaluated. The alcoholic animals did not present malnutrition, once they did not loose weight through the treatment and they kept a standard consumption of ration and liquids for a common diet. At 2 weeks postoperatively, there was bone formation in the implanted hydroxyapatite at the femur of all animals, although in less volume at the alcoholic ones. At the parietal, besides its less volume, we observed a delay in the bone new formation process at the alcoholic animals, once one out of five 2 weeks postoperatively sacrificed animals presented bone formation. At the fourth week post operation, 1 alcoholic animal did not present new-formed bone at the femur implant site, while 2 others did not show bone formation at the parietal bone. At the 8 and 16 weeks post operation period, there was bone formation not only at the femur but also at the parietal of all animals, although always in less quantity at the alcoholic ones. With these results, we concluded that the experimental alcoholism decreased the osteogenic capacity of periosteum cells at the femur and parietal. Concerning the HA osteointegration in both groups studied, there were no fibrous tissue interposition between the ceramic and the new formed bone.

## **1. INTRODUÇÃO**

Defeitos com perda de massa óssea resultantes de fraturas patológicas ou traumáticas, desenvolvimento anormal do esqueleto e ressecção de tumores, frequentemente são reparados com enxertos ósseos autógenos. Implantes de polímeros, metais e cerâmicas, também têm sido aplicados com essa finalidade.

Os enxertos ósseos autógenos são considerados vantajosos uma vez que evitam complicações de rejeição imunológica e fornecem células que podem imediatamente começar o processo regenerativo (ISHAUG-RILEY et al., 1997). No entanto, eles apresentam algumas desvantagens como: morbidade da área doadora, reabsorção pós-operatório, contornos irregulares dos enxertos angulares (MARK et al., 1990) e complicações como dor crônica e lesões vasculares durante o procedimento cirúrgico (YOUNGER e CHAPMAN, 1989). Além disso, a incorporação desse enxerto sofre influências de outros fatores como presença ou ausência do perióstio, orientação do enxerto, viabilidade do enxerto ósseo vascularizado, tipo de fixação, posição do enxerto em relação ao estresse mecânico e origem embrionária (HARDESTY e MARSH, 1990). Outro ponto negativo dessa técnica é a difícil obtenção do enxerto quando solicitado em grande quantidade (BROWN et al., 1976; RISH et al., 1976).

Diante das limitações da utilização dos enxertos ósseos autógenos, alguns materiais biocompatíveis vêm sendo pesquisados para substituí-los na aplicação clínica. Para esse propósito, o material, primeiramente, deve responder a determinados requisitos como estrutura estável, rapidez na incorporação com o tecido ósseo, promover osteocondução e gerar pouca ou nenhuma complicação associada ao seu uso (ROSEN, 1989). Atendendo a essas exigências, o fosfato de cálcio, um biomaterial cerâmico comercializado desde 1970 na forma de hidroxiapatita e tricálcio fosfato (CONSTANTINO et al., 1992), têm recebido considerável atenção no campo da cirurgia plástica, ortopédica e odontológica (ONO et al., 1992).

A hidroxiapatita (  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$  ) pode ser fabricada para uso clínico na forma de blocos ou grânulos e ser porosa ou densa (HONIG et al., 1998). Alguns pesquisadores criticam a implantação do tipo densa, pela impossibilidade de

promover crescimento ósseo para o seu interior (COFIELD,1995), e na forma de blocos, devido à dificuldade de ser modelada e pela fragilidade quando submetida a uma carga mecânica (BURSTEIN et al., 1997). Grânulos porosos são estudados em experimentos e clinicamente por serem bem tolerados pelo tecido ósseo além de facilitar a infiltração de osteoblastos (THOMSON et al., 1998) e proliferação de vasos sanguíneos essenciais para o processo regenerativo (COFIELD,1995). A utilização da hidroxiapatita em forma de grânulos também se deve pela facilidade da adaptação ao contorno dos defeitos ósseos (HONIG e MERTEN, 1993), por ser quimicamente estável, pela fabricação sem limitação de quantidade (ONO et al., 1993) e, finalmente, por não exibir rejeição imunológica com o tecido adjacente (OONISHI, 1991, OKAZAKI et al., 2000).

ROSEN e McFARLAND (1990) estudaram as propriedades biológicas da hidroxiapatita quando implantada em regiões do esqueleto maxilofacial osteotomizados. Nesse estudo foram avaliados 11 pacientes e após 10 meses da operação foi feito estudo das biópsias. Os autores verificaram ausência de infecção, rápido crescimento fibrovascular e de osso neoformado nos espaços entre os blocos da cerâmica, indicando que a hidroxiapatita é uma boa alternativa a ser utilizada nas cirurgias reparadoras do esqueleto facial.

UCHIDA et al. (1990) relataram 60 casos de pacientes com tumores ósseos tratados por ressecção cirúrgica, seguido de implantação de hidroxiapatita nas falhas provocadas pela cirurgia. Após 36 meses da operação, observaram que em nenhum paciente houve recidiva do tumor e também não ocorreram complicações na área receptora. Através de análises radiográficas e histológicas de biópsias, notaram formação óssea ao redor da hidroxiapatita, fechando totalmente a falha óssea. Além disso, houve crescimento ósseo entre os grânulos da cerâmica, tornando este biomaterial uma opção viável nos tratamentos de defeitos provocados pela retirada de tumores ósseos benignos.

Em 1993, ONO et al. implantaram hidroxiapatita em grandes defeitos na calota craniana de 3 pacientes, resultantes, respectivamente, de tumor na hipófise, mal formação congênita e hemorragia crônica subdural. Seis meses após a operação, as

imagens radiográficas revelaram boa integração do biomaterial com o osso e não houve complicações. Os pacientes tiveram um progresso pós-operatório satisfatório.

Experimentalmente, CARIA (1999) avaliou o efeito da hidroxiapatita associado a enxerto periostal no tratamento de falhas ósseas provocadas na pré-maxila de ratos. O autor utilizou 4 grupos de animais. No primeiro, a falha foi recoberta com perióstio da própria pré-maxila; no segundo, a falha foi preenchida com hidroxiapatita e revestida com perióstio da pré-maxila; no terceiro, a falha foi coberta com perióstio do fêmur associado com hidroxiapatita e, no último grupo, a falha foi revestida apenas com enxerto periostal livre retirado do fêmur do mesmo animal. Em seus resultados, evidenciou formação óssea partindo da margem da falha em todos os grupos sendo observado, também, formação de osso maduro ao redor da cerâmica. Desta forma, o enxerto periostal contribuiu para produção de osso e o implante de hidroxiapatita ofereceu suporte para neoformação óssea.

Com a contribuição positiva nos reparos de defeitos ósseos, a hidroxiapatita vem recebendo atenção especial na busca de materiais substitutos para os enxertos autógenos. Entretanto, ainda não estão completamente esclarecidos os efeitos desse biomaterial quando implantado subperiostalmente (HONIG et al, 1998).

DE LANGE et al. (1990) com a finalidade de corrigir defeitos nos processos alveolares de mandíbulas de cachorros, realizaram uma incisão no mucoperióstio bucal dos alvéolos, permitindo o levantamento do perióstio e a colocação da hidroxiapatita abaixo dele. Dois anos pós-cirúrgicos, constataram que não houve sinais de biodegradação da cerâmica, sendo esta envolvida por fibras colágenas e coberta por uma camada de tecido ósseo mineralizado. Esta cerâmica ficou bem fixada nos processos alveolares e clinicamente imóvel.

Em 1993, WIESE e MERTEN ao avaliarem a importância do perióstio para os implantes subperiostais de grânulos de hidroxiapatita na tíbia de cobaias, observaram completa osteointegração do biomaterial que foi recoberto pelo perióstio. Isto demonstrou que o perióstio assumiu a função de "membrana limitante" responsável pela condução da regeneração óssea. Tal resultado sugere

que implantes de hidroxiapatita abaixo do periósteo, constituem-se em proveitoso método a ser explorado pela implantologia (STOBAUGH, 1992).

HONIG e MERTEN (1993) notaram migração de partículas de hidroxiapatita para dentro do seio frontal após implantação subperiosteal deste material no osso frontal de cobaias. Segundo os mesmos, isto provoca o questionamento se o implante permanece localizado e estruturalmente estável ou se a migração pode ser um efeito causado pelo estresse funcional. Apesar desse resultado, não há limite ao uso da implantação subperiosteal de hidroxiapatita.

SASANO et al. (1995) investigando como o periósteo da tíbia e do parietal de ratos respondem ao implante subperiosteal de um material precursor da hidroxiapatita, o fosfato octacálcio, constataram que uma semana após o implante, a osteogênese iniciou na superfície óssea da tíbia, próximo ao material implantado. No parietal, esta resposta somente apareceu depois da terceira semana. Observou-se assim que a osteogênese ocorreu tanto na tíbia como no parietal, sendo no segundo caso, necessário mais tempo para o periósteo responder à presença do biomaterial. PROLO e OKLUND (1991) afirmaram que o periósteo da tíbia é sete vezes mais osteogênico que a do parietal, motivo pelo qual provoca diferenças da reação do osso frente aos implantes de biomateriais.

Quanto às indicações do implante subperiosteal de hidroxiapatita, esta prática direciona-se para as correções de defeitos craniomaxilofaciais, traumatismos (GOLEC e KRAUSER, 1992), deformidades congênitas e também pode ser utilizado na medicina estética (SALYER e HALL, 1989). Porém, apesar da sua aplicabilidade viável, existem algumas contra-indicações que podem comprometer os resultados esperados como o consumo exagerado de tabaco, álcool e outras drogas devido aos seus efeitos deletérios no tecido ósseo (STOBAUGH, 1992).

Com relação ao álcool, primeiramente se deve ressaltar que o seu consumo excessivo figura-se como um dos mais graves problemas de saúde pública mundial (LARANJEIRA e PINSKY, 1998), sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares e o câncer (PRADO, 1996, citado por MARTINEZ, 1997). O álcool é consumido por ser uma droga psicoativa que promove desinibição do

comportamento e por ter propriedades hipnótica e sedativa (PALMER, 1989). O estímulo ao uso abusivo de bebidas alcoólicas também se relaciona com hábitos culturais de cada sociedade. O Brasil, onde a “cachaça” é elemento pertencente à cultura nacional, constitui-se o maior consumidor mundial deste produto destilado, que possui cerca de 50% de teor alcoólico (MACIEIRA et al., 1993).

A taxa de prevalência do alcoolismo situa-se entre 10 a 20% na população acima de 15 anos e o maior índice dá-se aos 25 anos. Em 1996, RIBEIRO E TEIXEIRA estimaram em torno de 13 milhões a população alcoólatra em nosso país. Cabe inferir que o consumo de álcool vem aumentando devido ao crescimento industrial, turismo e desemprego. Além disso, o perfil do consumidor também se modificou com o grupo de homem adulto recebendo adesões cada vez mais frequente do grupo feminino e adolescente (ALMEIDA e COUTINHO, 1990).

Dados da secretaria de saúde do estado de São Paulo revelaram que cerca de 50% das internações em hospitais psiquiátricos estão relacionados com o uso abusivo de álcool (LARANJEIRA, 1996). Nas enfermarias clínicas e cirúrgicas, também é alta a prevalência de pacientes alcoólatras atendidos principalmente com traumatismos cranianos e sangramentos no aparelho digestório. Dentre outras correlações, o alcoolismo está envolvido em 50% dos acidentes automobilísticos fatais, 50% dos homicídios, 30% dos estupros, 25% dos suicídios e 62% dos casos de violência contra crianças (FORTES E CARDO, 1991).

Quanto a bioquímica do etanol ( $C_2H_5OH$ ), esta substância é solúvel em água, difunde-se pelas membranas biológicas e é distribuída praticamente para todos os líquidos corpóreos, intra e extracelular. Após a digestão, cerca de 80 a 90% do etanol sofre metabolização hepática e 2 a 10% são excretados através da respiração, rins, suor e saliva (FORTES E CARDO, 1991). A metabolização completa do etanol realiza-se entre oito a dez horas e a velocidade de sua remoção varia de acordo com fatores étnicos, idade, patologia hepática, uso de drogas e uso crônico do álcool. A degradação do etanol se faz em 2 etapas: a primeira consiste na sua transformação em acetaldeído e se realiza principalmente no fígado. Na etapa seguinte, o acetaldeído é convertido em acetato e a principal enzima responsável pela sua

---

oxidação é o acetaldeído-desidrogenase, encontrada no citosol e na matriz mitocondrial do hepatócito (CORBET, 1982).

FRIDAY e HOWARD (1991) demonstraram os efeitos do álcool em células ósseas humana *in vitro*. Proliferação celular, síntese protéica e atividade da alcalina fosfatase reduziram após a exposição das células ao etanol. Esses achados suportam os resultados encontrados por GRILLY e ANDERSON (1988) e DIAMONT et al. (1989), que evidenciaram, através de análise histomorfométrica, redução da formação óssea em pacientes alcoólatras com déficit no número de osteoblastos por superfície óssea.

Através de análise histomorfométrica, estudos como de FELSON et al. (1995) têm demonstrado significativa redução da massa óssea compacta e trabecular em pacientes alcoólatras, resultando em quadros de osteoporose. SPENCER et al. (1986) avaliaram, radiograficamente, a coluna vertebral de 96 pacientes alcoólatras e observaram perda de massa óssea em 47% dos casos. A causa seria o descontrole do balanço entre formação e reabsorção óssea, podendo provocar rápida perda da massa óssea, fato este que pode persistir até por 5 anos após abstenção ao consumo de bebidas alcoólicas. Deficiência nutricional de cálcio, alteração da ação e níveis de secreção do hormônio paratireóide, alteração na absorção intestinal de vitamina D e de minerais ósseos como fosfato e magnésio também podem contribuir para a diminuição de massa óssea em alcoólatras (VERBANK et al., 1977).

Para BIKLE (1993), o alcoolismo predispõe o indivíduo a fraturas patológicas devido à diminuição da densidade óssea principalmente nas áreas onde há elevada porcentagem de osso trabecular como na cabeça femoral e extremidade distal do rádio, não se limitando apenas às epífises ósseas. Como alternativa ao tratamento desses tipos de fraturas, podem ser utilizados biomateriais, no entanto, estudos como de ALBREKTSSON et al. (1981), relatam que o estado de saúde do osso é essencial para que haja a sua interação com os implantes de biomateriais, caso contrário, os resultados esperados poderão ser alterados.

PENG et al. (1991), apresentaram em seu estudo sobre histomorfometria óssea em ratos jovens alcoólatras, que a ingestão crônica do álcool afetou a

velocidade de formação do endóstio e do perióstio, prejudicando também as propriedades mecânicas e fisiológicas do tecido ósseo, que segundo FRAYSSINET (1992), são fundamentais para a interação do tecido ósseo com a hidroxiapatita quando implantada.

GOLEC e KRAUSER (1992) relataram que condições anormais do tecido ósseo constituem uma limitação à utilização de implantes subperiosteais de hidroxiapatita juntamente com pinos metálicos na correção de defeitos alveolares da maxila e mandíbula.

KANKARE et al. (1995) trataram fraturas maleolares de pacientes alcoólatras com implantes de materiais biodegradáveis. Nas fraturas de 16 pacientes foram colocados fixadores de poliglicólico e em outros 13 casos, implantaram-se fixadores metálicos. Durante um prazo de 15 meses pós-cirúrgicos, observaram que 8 dos 16 pacientes alcoólatras tratados com poliglicólico tiveram as fraturas redeslocadas e 6 pacientes foram reoperados. Dos pacientes tratados com implantes metálicos, ocorreu redeslocamento da fratura em 1 caso. Também verificaram durante este período, presença de infecção no local da fratura e instabilidade do material implantado em vários casos. Face aos resultados obtidos, os autores não recomendam o uso de fixadores metálicos e de poliglicólico nas correções de fraturas maleolares em pessoas alcoólatras.

Estudando o efeito das bebidas alcoólicas na qualidade e resistência mecânica do PMMA (poli metil metacrilato), um polímero usado na confecção de próteses dentárias, VLISSIDIS e PROMBOMAS (1997) colocaram esse material imerso em álcool puro. Concluíram que o álcool pode agir sobre o PMMA de modo a afetar sua integridade estrutural, reduzindo sua força mecânica. Isto demonstra que variações nas propriedades físico-químicas do biomaterial podem afetar sua capacidade de interação com o tecido ósseo (SHARPE et al., 1997).

## **2. OBJETIVO**

O presente trabalho teve como objetivos:

- Avaliar o processo de neoformação óssea quando blocos de hidroxiapatita são implantados subperiostealmente em ratos alcoolizados e não alcoolizados;
- Avaliar a capacidade osteogênica do periósteo de diferentes ossos frente ao implante de hidroxiapatita, tanto em ratos alcoolizados como não alcoolizados;
- Avaliar o estado nutricional dos animais frente ao alcoolismo experimental

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Síntese de Hidroxiapatita

A hidroxiapatita foi sinterizada pelo Instituto de Química da UNICAMP, através de uma suspensão de hidróxido de cálcio e solução de ácido fosfórico, conforme a reação abaixo:



A hidroxiapatita foi obtida a partir da reação de precipitação de uma solução de 6 ml de ácido fosfórico e 250ml de água, sendo adicionada lentamente uma suspensão contendo 9,26 gramas de hidróxido de cálcio disperso em 250ml de água.

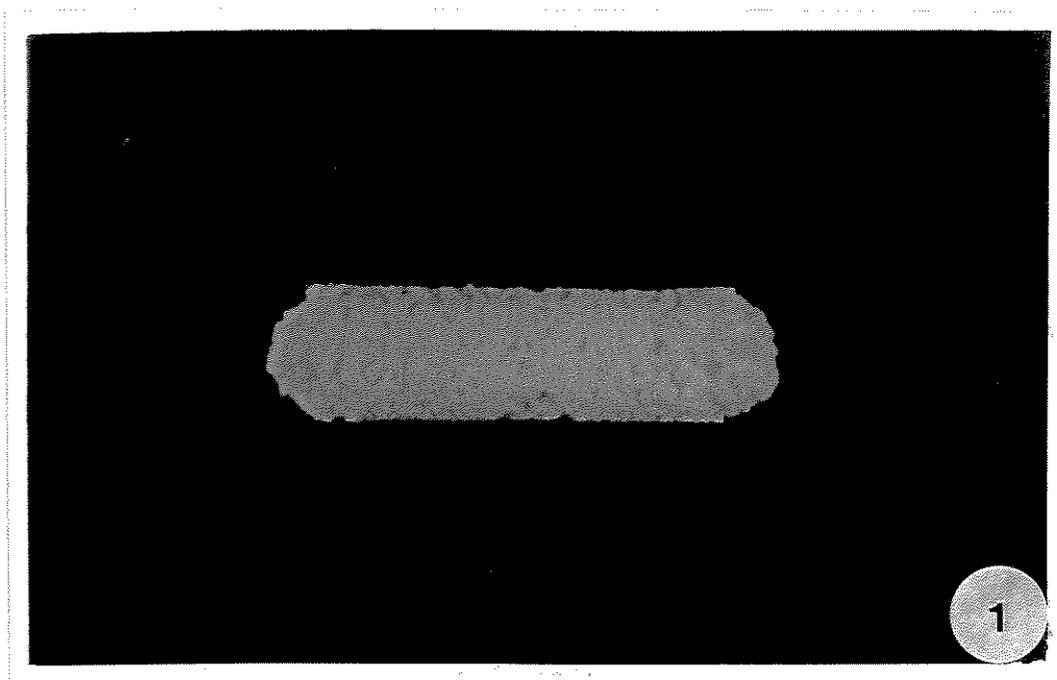
A reação foi feita em béquer e conduzida à velocidade de aproximadamente 7 ml/min sob agitação magnética e mantida a temperatura reacional de 80°C. O pH desta reação foi mantido em torno de 8 através da adição de 12,7 ml de hidróxido de amônia. Em seguida, a suspensão permaneceu sob agitação a 80°C durante uma hora. O precipitado resultante foi filtrado a vácuo, lavado com água destilada e secado na estufa a 60°C. Posteriormente, o material foi triturado, resultando em pó fino.

Para obtenção da hidroxiapatita em forma porosa, misturou-se 50% de massa de hidroxiapatita e de sacarose molhada numa solução de álcool polivinílico 0,2% massa/volume saturada com sacarose. Após esta etapa, a mistura foi secada na estufa a 60°C durante uma hora e sinterizada a 1000°C por cinco horas. O material foi desagregado e separado granulometricamente em peneira de 0,053 mm com 25% em massa de sacarose molhada com solução de polivinílico. Em seguida, foi prensado em cilindro de vidro, ganhando a forma de bastão (figura 1). Este, por sua vez, foi extrudado e colocado durante uma hora em estufa a 60°C e sinterizado por cinco horas a temperatura de 1000°C (KAWACHI et al, 1997).

A partir destes bastões, obtiveram-se os blocos de hidroxiapatita porosa que foram, posteriormente, implantados subperiostealmente no fêmur e crânio dos animais.

A análise dos diâmetros dos poros da hidroxiapatita foi realizada com ajuda do aparelho Poresizer da Micromeritica, modelo 9320, através da técnica de

porosimetria de mercúrio. Os resultados revelaram microporos na ordem de 0,4 micrômetros e na faixa de 100 micrômetros.



**Figura 1:** Hidroxiapatita porosa em forma de bastão (7,5 X)

### **3.2 Animais**

Foram utilizados 40 ratos albinos (*Rattus norvegicus*) Wistar, adultos, machos, com dez semanas de idade e aproximadamente 250 gramas de massa corporal, fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, sendo um não alcoolizado e outro alcoolizado com 20 animais cada.

O grupo não alcoolizado recebeu água *ad libitum* e ração (Nuvilab CR-1 Autoclavável). O grupo alcoolizado recebeu a mesma dieta sólida e como dieta líquida, recebeu inicialmente doses crescentes de etanol diluído a 5% e 15% em água, com duração de uma semana cada. Após esta etapa de adaptação ao etanol, os mesmos passaram a receber etanol diluído a 25% *Gay Lussac*, iniciando assim o tempo de experimentação. Após 4 semanas, os animais dos grupos não alcoolizado e alcoolizado foram submetidos à cirurgia para implantação subperiosteal de blocos de hidroxiapatita porosa nos ossos fêmur e parietal esquerdos.

Durante todo o experimento, foram realizadas observações diárias dos animais a fim de detectar qualquer modificação no comportamento bem como alterações nos aspectos das fezes, urina e pêlos. Periodicamente foi realizado o controle da quantidade de ração e líquido ingerido por animal e do ganho de massa corporal, com o intuito de avaliar o estado nutricional dos mesmos frente ao alcoolismo experimental.

Para análise do consumo diário de líquido e ração, bem como para a variação da porcentagem do ganho de massa corpórea, usou-se os valores obtidos tanto no período experimental pré como no pós-cirúrgico.

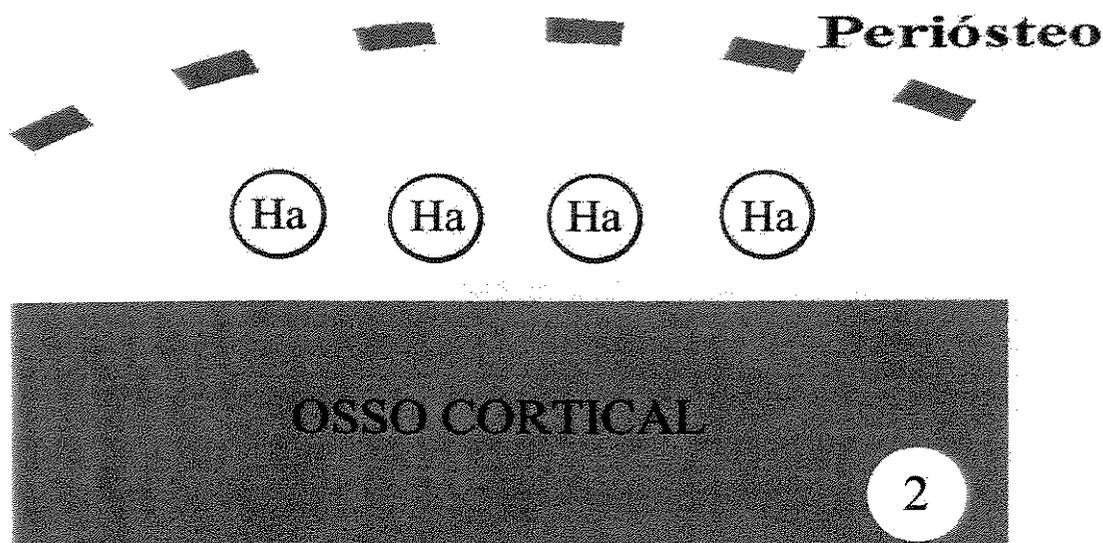
### **3.3 Procedimento Cirúrgico**

Inicialmente, os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (Francotar) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) na proporção 1:1 e na dose de 0.10 ml/100 gramas de massa corporal por via intramuscular.

Os animais foram colocados em decúbito ventral e foi feita a tricotomia e incisão longitudinal mediana na pele da calota craniana. Esta pele foi afastada

lateralmente e o periósteo do osso parietal esquerdo ficou exposto. Em seguida, o periósteo foi seccionado transversalmente e separado da superfície óssea com um levantador de periósteo. Tal procedimento produziu um túnel subperiostal por onde foram colocados aproximadamente 5 mg de hidroxiapatita porosa em forma de blocos (figura 2). O periósteo e a pele foram reposicionados e suturados com fio de seda 8.0 e de algodão 4.0, respectivamente.

Após o procedimento anterior, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para a tricotomia da região ântero-medial da coxa esquerda. Com auxílio do bisturi, foi feita a incisão na face medial da pele, expondo o músculo quadríceps femoral. Este músculo teve seu terço distal seccionado longitudinalmente e rebatido ântero-lateralmente. Com a extremidade distal da diáfise do fêmur esquerdo exposta, realizou-se um corte transversal no periósteo. Em seguida, o periósteo foi afastado do osso cortical com o levantador de periósteo. Tal técnica permitiu a implantação subperiostal de aproximadamente 5 mg de blocos de hidroxiapatita porosa (figura 2). O periósteo, a musculatura e a pele foram reposicionados e suturados com fios de seda e de algodão.



**Figura 2:** Representação esquemática do implante subperiostal da hidroxiapatita (Ha) nos ossos fêmur e parietal esquerdo dos animais.

Durante a cirurgia, atentou-se em raspar firmemente a superfície cortical com a extremidade do afastador de periósteo na tentativa de preservar e levantar a sua camada interna osteogênica.

Subsequentemente a cirurgia, os animais receberam água com dipirona por 24 horas e, em seguida, aqueles do grupo alcoolizado voltaram a receber água com etanol diluído a 25%. Os dois grupos (alcoolizado e não alcoolizado) foram subdivididos em 4 subgrupos de 5 animais cada um, sendo os subgrupos sacrificados respectivamente 2, 4, 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas. O sacrifício dos animais foi feito através de dose excessiva da solução Ketamina e Cloridrato de Xylazina (0.30/100g), seguida de pneumotórax. Desta maneira, obteve-se 4 subgrupos alcoolizados e 4 subgrupos não alcoolizados, totalizando, respectivamente para os subgrupos, 42, 56, 84 e 140 dias de tratamento contando o período experimental pré e pós-cirúrgico.

Os ossos fêmur e parietal esquerdos foram retirados, tomando-se cuidado na preservação do periósteo da área receptora durante a dissecação.

### ***3.4 Estudo Histológico***

Os ossos fêmur e parietal esquerdos foram fixados em formol tamponado a 10% por 48 horas. Em seguida, foram descalcificados em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 45 dias. Após descalcificação, os ossos foram reduzidos mantendo apenas a área receptora da cerâmica. As amostras foram lavadas em água corrente "over night", desidratadas em álcool etílico, diafanizadas em xilol e, finalmente, incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais semi-seriados com 6 micrômetros de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina.

### ***3.5 Estudo Morfométrico***

A análise quantitativa foi baseada no método de estereologia, o qual permite determinar parâmetros tridimensionais de um órgão, tecido ou estrutura morfológica por meio de contagem de pontos em imagens bidimensionais (MANDARIM de LACERDA, 1999). A quantificação do osso neoformado através da estereologia foi

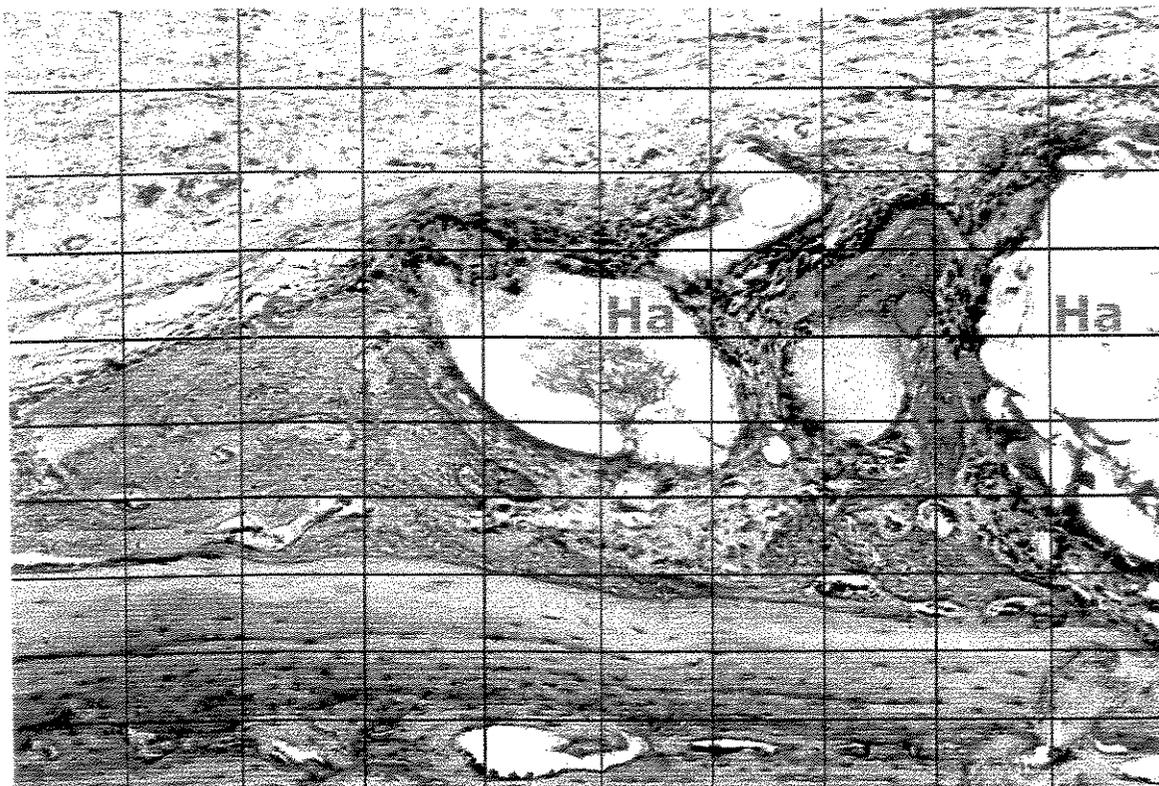
realizada de acordo com o princípio de DELESSE, obedecendo-se a fórmula  $V_V = P_P/P_T$  (%), onde:

$V_V$  = densidade de volume ou volume relativo;

$P_P$  = quantidade de pontos (intersecção de linhas) sobre o osso neoformado;

$P_T$  = número total de pontos do sistema.

Através de um retículo quadrilátero acoplado na ocular do microscópio de luz Carl Zeiss e contendo sistema de 100 pontos, calculou-se a densidade do volume ósseo neoformado nos locais do implante de hidroxiapatita em cada animal (figura 3). Foram utilizados 4 cortes histológicos de mesma espessura para cada área receptora (fêmur e parietal esquerdo) do animal. Esta análise foi feita com a objetiva do microscópio de luz padronizada em aumento de 10 vezes para todos os cortes histológicos. Cabe ressaltar que para esta análise, primeiramente os cortes foram selecionados aleatoriamente e somente após a contagem dos pontos sobre o osso neoformado é que foi identificado a qual grupo (não alcoolizado ou alcoolizado) pertencia o corte. Desta maneira, tentou-se buscar uma margem mais segura da análise efetuada.



**Figura 3.** Representação esquemática do sistema de 100 pontos do retículo quadrilátero usado para avaliar o volume do osso formado. A, B e C mostram os pontos (intersecção de linhas) sobre o osso formado (\*). Ha representa os blocos de hidroxiapatita implantados subperiostealmente.

### **3.6 Estudo Estatístico**

A partir dos valores obtidos do consumo diário de líquido e ração por animal tanto dos subgrupos não alcoolizados como dos alcoolizados, foram calculados as médias e os desvios-padrões para cada um deles. Obteve-se também o percentual do ganho de massa corporal para cada rato e depois a média para os subgrupos não alcoolizados e alcoolizados. De posse desses valores, aplicou-se o teste T de Student para a comparação entre as situações (não alcoolizado x alcoolizado). Cabe ressaltar que somente para análise estatística, o grupo não alcoolizado foi chamado de controle enquanto o grupo alcoolizado de tratado.

A técnica utilizada na análise dos dados morfométricos foi Anova (Análise de Variância) para o caso de medidas repetidas, que testou simultaneamente se havia diferença na quantidade de osso formado entre os grupos (controle x tratado), entre os períodos pós-cirúrgicos (2 x 4 x 8 x 16 semanas), ou seja, entre os subgrupos, e também entre os tipos de ossos usados como áreas receptoras (fêmur x parietal). O nome medida repetida foi porque no caso do tipo de ossos (fêmur e parietal), os animais foram os mesmos.

Em relação ao estudo comparativo do volume ósseo formado no fêmur e no parietal entre os períodos (semanas), tanto para o grupo não alcoolizado como alcoolizado, realizou-se uma análise para detectar quais semanas são diferentes das outras. Para isto, aplicou-se a Análise de Comparações Múltiplas (teste de Tukey) para localizar tais diferenças.

## **4. RESULTADOS**

#### **4.1 VARIAÇÃO DA DIETA LÍQUIDA CONSUMIDA DIARIAMENTE PELOS SUBGRUPOS NÃO ALCOOLIZADOS E ALCOOLIZADOS.**

Os animais dos subgrupos não alcoolizados com 42, 56, 84 e 140 dias de tratamento ingeriram, em média, 39,07; 39,30; 38,44 e 39,53 ml de líquido, respectivamente. Os animais dos subgrupos alcoolizados ingeriram, respectivamente, 15,02; 17,46; 17,70 e 17,52 ml de etanol diluído a 25% em água. Com a análise estatística, observou-se que os animais dos subgrupos não alcoolizados consumiram maior quantidade de líquido em relação aos seus respectivos subgrupos alcoolizados (tabela 1). Dentro dos grupos, o consumo de líquido foi constante ao longo do experimento (gráfico 1).

**Tabela 1:** Médias (ml) e desvios-padrão do consumo diário de líquido pelos subgrupos não alcoolizados e alcoolizados durante os períodos estudados.

Tempo de experimentação	Média $\pm$ desvio padrão		Análise Estatística
	Não alcoolizado	Alcoolizado	
42 dias (subgrupo 1)	39,07 $\pm$ 1,08	15,02 $\pm$ 2,95	( $p < 0,05$ )
56 dias (subgrupo 2)	39,30 $\pm$ 2,4	17,46 $\pm$ 2,64	( $p < 0,05$ )
84 dias (subgrupo 3)	38,44 $\pm$ 1,74	17,70 $\pm$ 1,61	( $p < 0,05$ )
140 dias (subgrupo 4)	39,53 $\pm$ 1,12	17,52 $\pm$ 2,22	( $p < 0,05$ )

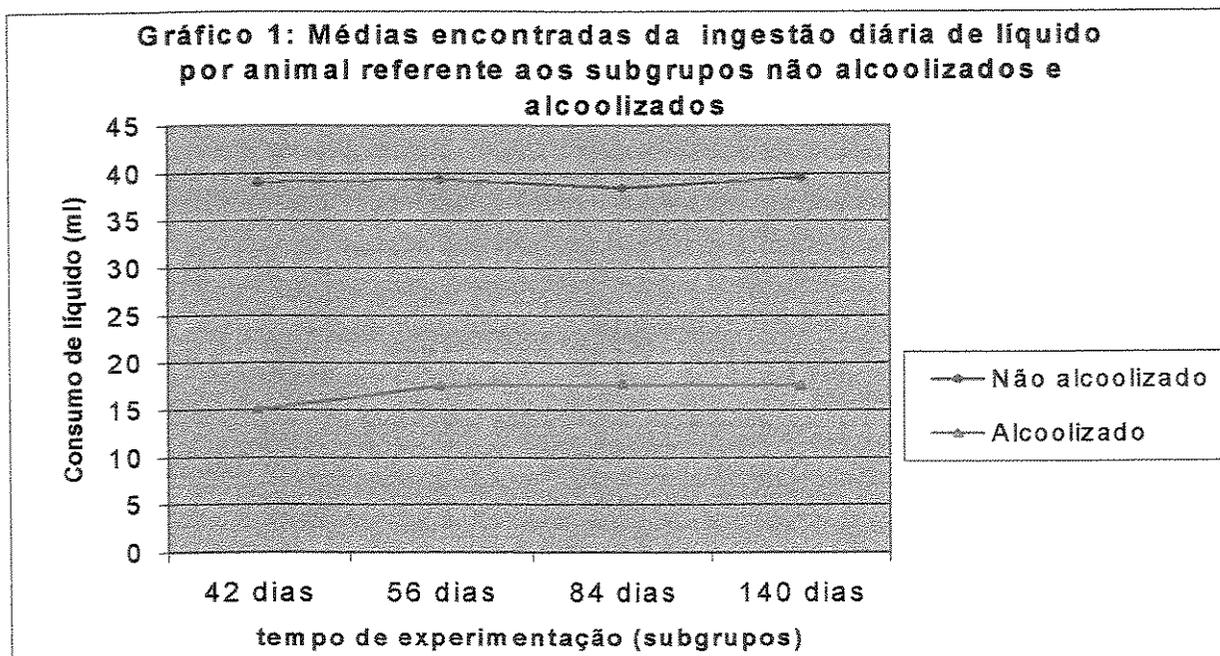
Subgrupo 1: animais sacrificados duas semanas pós-cirúrgicas;  $p = 4,14E-09$

Subgrupo 2: animais sacrificados quatro semanas pós-cirúrgicas;  $p = 7,76E-11$

Subgrupo 3: animais sacrificados oito semanas pós-cirúrgicas;  $p = 2,048E-19$

Subgrupo 4: animais sacrificados dezesseis semanas pós-cirúrgicas;  $p = 1,83E-32$

Diferença estatisticamente significativa -  $p < 0,05$



#### **4.2 VARIAÇÃO DA DIETA SÓLIDA CONSUMIDA DIARIAMENTE PELOS SUBGRUPOS NÃO ALCOOLIZADOS E ALCOOLIZADOS.**

Os animais dos subgrupos não alcoolizados e alcoolizados com 42, 56, 84 e 140 dias de tratamento consumiram, em média, 22,94; 22,47; 22,17 e 22,18 gramas de ração, respectivamente. Os animais dos subgrupos alcoolizados consumiram respectivamente 13,29; 13,79; 15,29 e 14,66 gramas. A análise estatística demonstrou que os animais dos subgrupos não alcoolizados consumiram maior quantidade de ração em relação aos seus respectivos subgrupos alcoolizados (tabela 2). Dentro dos grupos, o consumo de ração foi constante ao longo do experimento (gráfico 2).

**Tabela 2:** Médias (gr) e desvios-padrão do consumo diário de ração pelos subgrupos não alcoolizados e alcoolizados durante os períodos estudados.

<i>Tempo de experimentação</i>	<i>Média ± desvio padrão</i>		<i>Análise Estatística</i>
	Não alcoolizado	Alcoolizado	
42 dias (subgrupo 1)	22,94 ± 1,45	13,29 ± 1,87	(p < 0,05)
56 dias (subgrupo 2)	22,47 ± 2,02	13,79 ± 2,62	( p < 0,05)
84 dias (subgrupo 3)	22,17 ± 0,82	15,29 ± 1,30	( p < 0,05)
140 dias (subgrupo 4)	22,18 ± 1,92	14,66 ± 1,67	( p < 0,05)

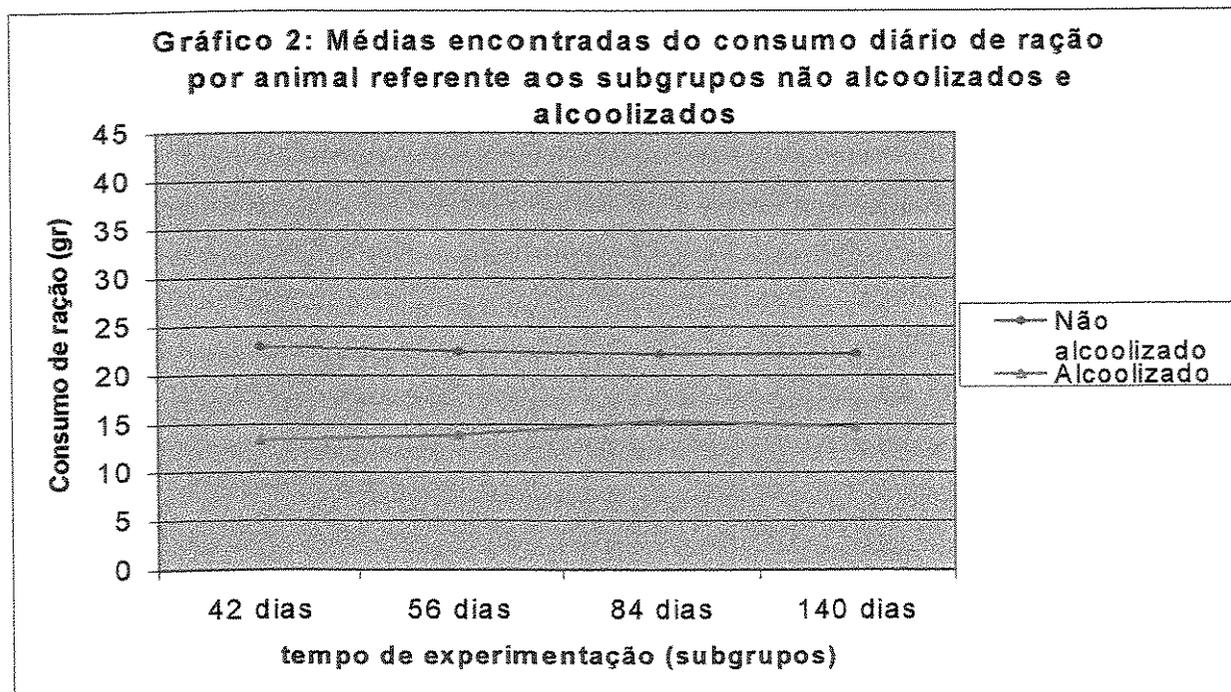
Subgrupo 1: animais sacrificados duas semanas pós-cirúrgicas; p= 1,65E -06

Subgrupo 2: animais sacrificados quatro semanas pós-cirúrgicas; p= 3,33E -06

Subgrupo 3: animais sacrificados oito semanas pós-cirúrgicas; p= 2,72E -13

Subgrupo 4: animais sacrificados dezesseis semanas pós-cirúrgicas; p =9,628E -16

Diferença estatisticamente significativa - p < 0,05



### **4.3 VARIAÇÃO DA PORCENTAGEM DO GANHO DE MASSA CORPORAL DOS SUBGRUPOS NÃO ALCOOLIZADOS E ALCOOLIZADOS.**

Os animais dos subgrupos não alcoolizados com 42, 56, 84 e 140 dias de tratamento ganharam respectivamente 39,36; 48,59; 60,07 e 85,05 % de massa corporal ao longo do tratamento, enquanto os animais dos subgrupos alcoolizados ganharam 15,34; 27,81; 39,37 e 46,81 %, respectivamente (tabela 3). Com a análise estatística, verificou-se que os animais alcoolizados não perderam peso ao longo do experimento, pelo contrário, ganharam massa corporal, porém a porcentagem do ganho foi menor quando comparada a dos animais não alcoolizados (gráfico 3).

**Tabela 3:** Médias e desvios-padrão encontradas para a variação da porcentagem do ganho de massa corporal dos subgrupos não alcoolizados e alcoolizados durante os períodos de tratamento estudados.

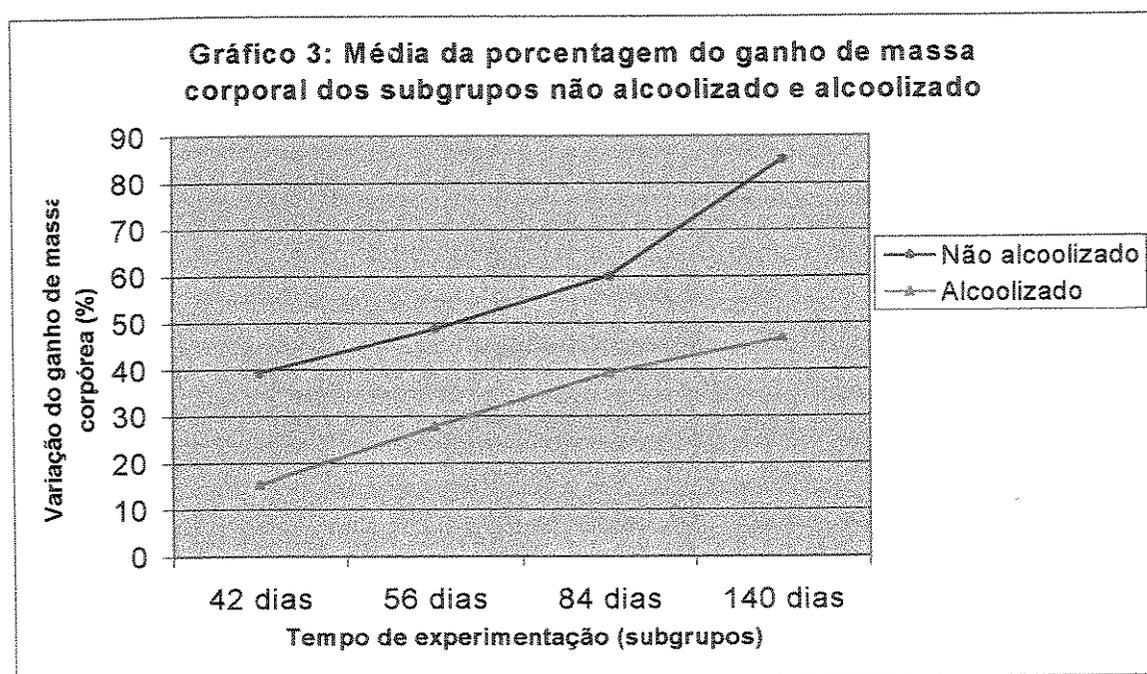
Tempo de experimentação	Média $\pm$ desvio-padrão		Análise Estatística
	Não alcoolizados	Alcoolizado	
42 dias (subgrupo 1)	39,36 $\pm$ 4,97	15,34 $\pm$ 5,71	( $p < 0,05$ )
56 dias (subgrupo 2)	48,59 $\pm$ 4,05	27,81 $\pm$ 3,07	( $p < 0,05$ )
84 dias (subgrupo 3)	60,07 $\pm$ 7,08	39,37 $\pm$ 4,65	( $p < 0,05$ )
140 dias (subgrupo 4)	85,05 $\pm$ 3,18	46,81 $\pm$ 15,47	( $p < 0,05$ )

Subgrupo 1: animais sacrificados duas semanas pós-cirúrgicas;  $p=0,00002$

Subgrupo 2: animais sacrificados quatro semanas pós-cirúrgicas;  $p= 0,0000$

Subgrupo 3: animais sacrificados oito semanas pós-cirúrgicas;  $p= 0,00014$

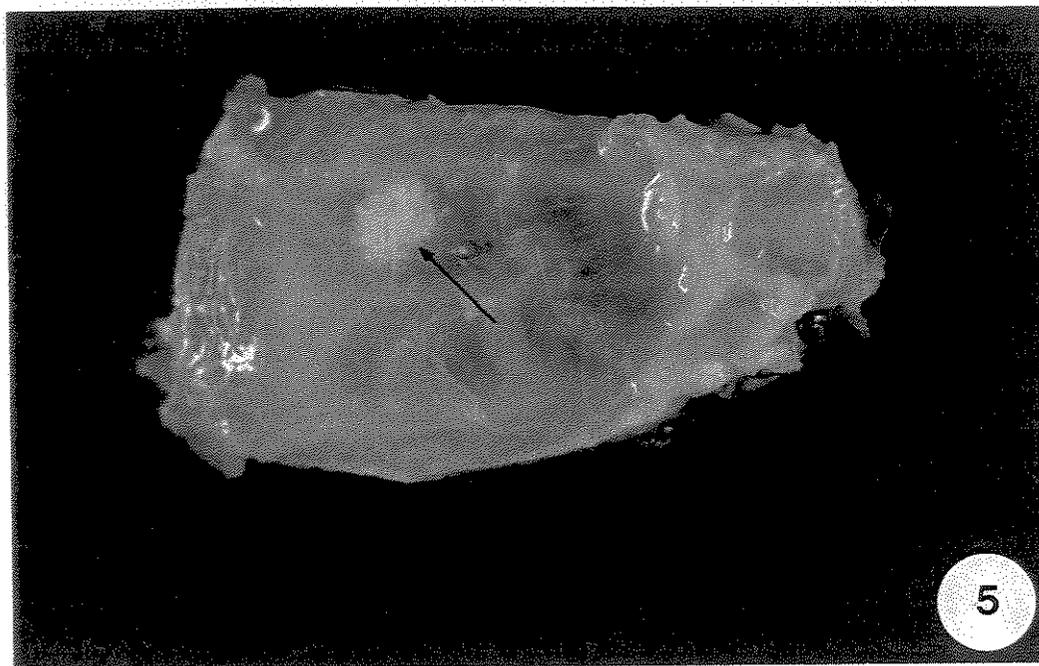
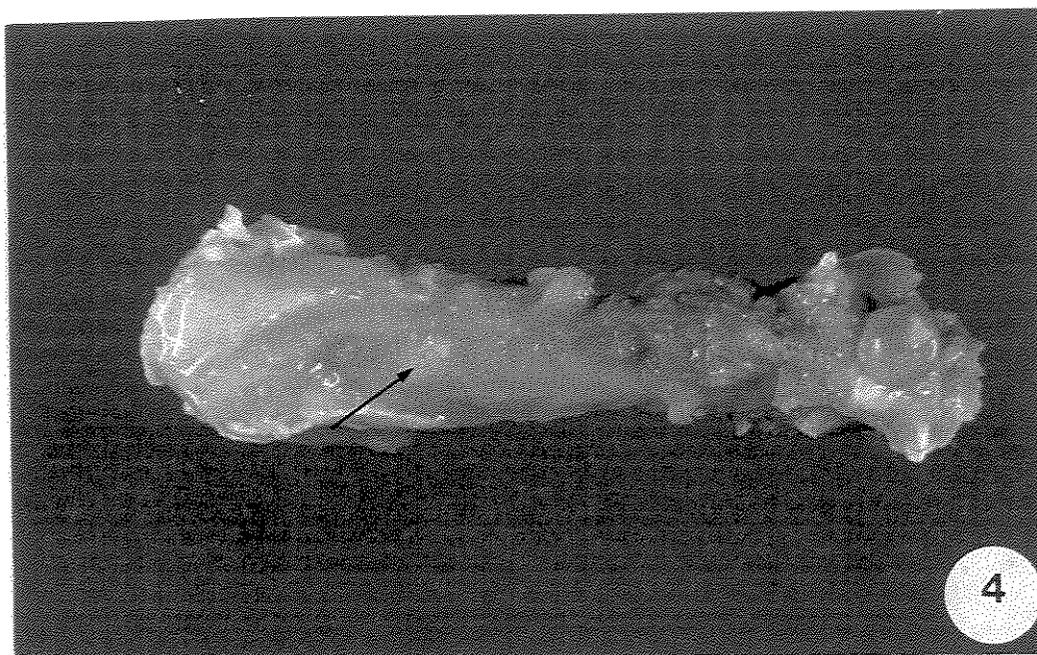
Subgrupo 4: animais sacrificados dezesseis semanas pós-cirúrgicas;  $p= 0,00015$   
 diferença estatisticamente significativa -  $p < 0,05$



#### **4.4 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS**

Em relação ao estado de saúde dos animais alcoolizados, não ocorreram alterações quanto ao comportamento e também no aspecto da urina e fezes. Na região onde foi colocada a hidroxiapatita, não ocorreram ulcerações ou quaisquer outras complicações no processo de cicatrização da pele.

Correspondente ao sítio de implantação, tanto no grupo não alcoolizado como no alcoolizado, não ficou evidente a formação de calo ósseo. A hidroxiapatita implantada pôde ser facilmente identificada, sem alterações patológicas locais visíveis (figura 4 e 5). Também em nenhum animal foi notado migração de grânulos de hidroxiapatita para locais distantes da área receptora.



**Figura 4 e 5:** Fêmur e calota craniana do animal alcoolizado após 4 semanas pós-cirúrgicas. Notar o implante de hidróxiapatita subperiostealmente (seta) sem alterações patológicas (3,5 X).

## **4.5 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS**

### **4.5.1 IMPLANTES SUBPERIOSTAIS DE HIDROXIAPATITA NO FÊMUR DOS ANIMAIS NÃO ALCOOLIZADOS.**

Na segunda semana pós-cirúrgica, observou-se que todos os animais tiveram formação de tecido ósseo no local do implante da cerâmica. O osso neoformado encontrava-se próximo aos blocos de hidroxiapatita. O aspecto do osso formado era imaturo com lacunas arredondadas alojando osteócitos volumosos. Além disso, os osteócitos dispunham-se próximos uns aos outros e em várias direções, sem orientação definida (figura 6). Notou-se também espessamento do perióstio junto a área receptora quando comparado com regiões vizinhas, onde o perióstio permaneceu intacto. Eram pouco definidas as camadas externa e interna do perióstio, estando esta última em intensa atividade osteogênica. Vasos sanguíneos situavam-se no local do implante.

Em todos os animais estudados quatro semanas após a cirurgia, verificou-se que vários blocos de hidroxiapatita, adjacentes a cortical do fêmur, estavam completamente envolvidos pelo osso formado, sem interposição de tecido conjuntivo. Os blocos distantes da cortical ficaram circundados por células periostais. O osso neoformado era de aspecto maturo em sua maior parte devido a textura densa, porém também encontramos osso imaturo em algumas regiões. Tornou-se difícil a localização exata da linha cimentante que separava osso neoformado da cortical. Na área receptora, as camadas do perióstio estavam definidas, sendo a interna espessada devido a proliferação celular (figura 7).

Nos cinco animais sacrificados oito semanas após a cirurgia, ocorreu formação de osso subperiostal em grande proporção. O osso formado preencheu quase todos os espaços entre os blocos da cerâmica, independente dos blocos estarem próximos ou distantes da superfície cortical. O osso formado tinha características de maturo em alguns locais e imaturo em outros (figura 8). Não ficou

preciso o limite entre osso formado e superfície da diáfise femoral. Vasos sanguíneos periostais situavam-se na área do implante da cerâmica e o perióstio ficou pouco espessado devido a baixa atividade celular.

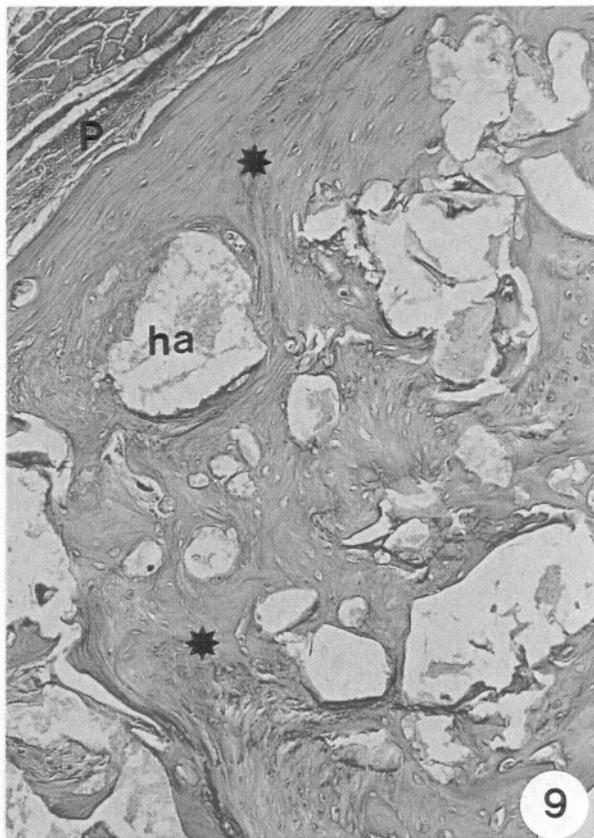
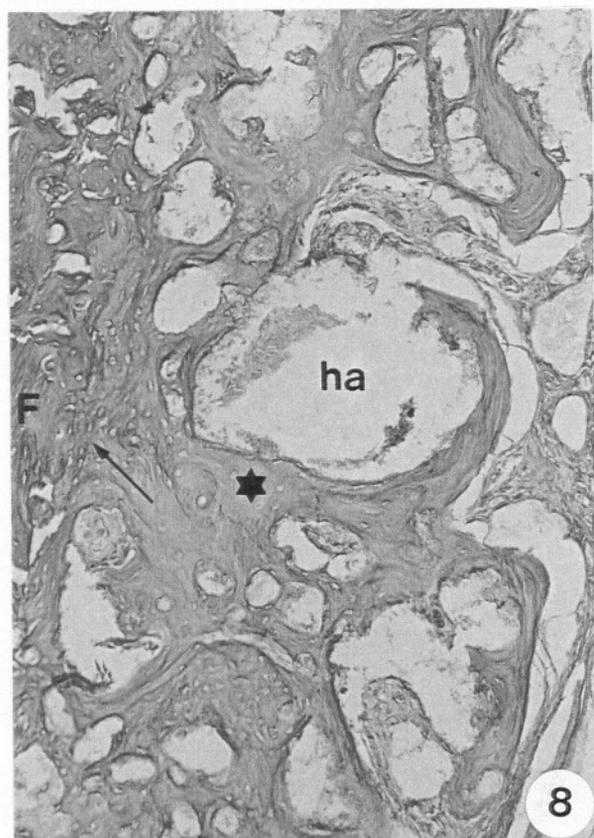
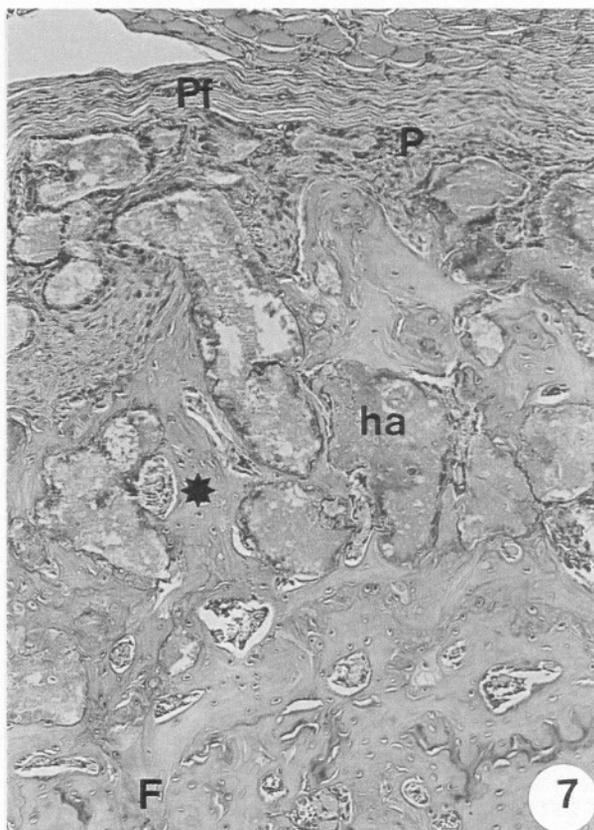
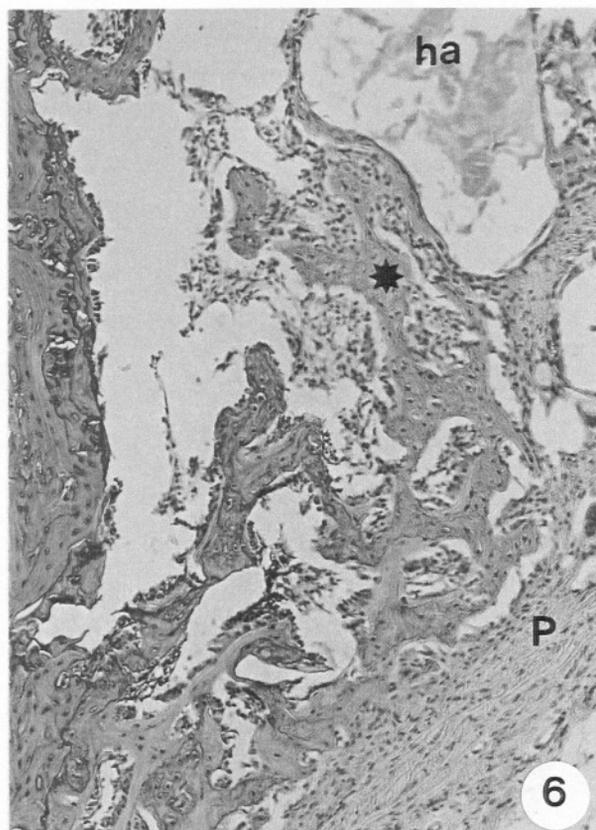
Na décima sexta semana pós-cirúrgica, notamos abundante quantidade de osso formado no local do implante em todos animais. O osso formado envolveu totalmente quase todos os blocos da cerâmica e estava em contato direto com eles, sem interposição de tecido conjuntivo. Quanto ao aspecto do tecido ósseo neoformado, verificou-se que maior parte era maturo devido a presença de osteócitos achatados e dispostos organizadamente, entretanto, havia regiões com características de imaturo (figura 9). Na área receptora, notou-se espessamento da diáfise do fêmur e o perióstio apresentou-se com baixa proliferação celular, semelhante assim, a áreas distantes do implante. Vasos sanguíneos periostais localizavam-se na área receptora.

**Figura 6:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal não alcoolizado com 2 semanas pós-cirúrgicas. Observar osso neoformado (\*) de aspecto imaturo próximo aos blocos de hidroxiapatita (ha). Perióstio (P). (115x – H.E.)

**Figura 7:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal não alcoolizado com 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar a neoformação óssea (\*) em continuidade com a superfície da diáfise do fêmur (F) e envolvendo completamente alguns blocos de hidroxiapatita (ha). Perióstio (P) ficou espesso e suas células envolveram os blocos situados distante da cortical. Camada fibrosa do perióstio (Pf). (115x – H.E.)

**Figura 8:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal não alcoolizado com 8 semanas pós-cirúrgicas. Notar osso neoformado (\*) preenchendo os espaços entre os blocos de hidroxiapatita (ha) e o limite (seta) entre osso formado e superfície da diáfise do fêmur (F). (115x – H.E.)

**Figura 9:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal não alcoolizado com 16 semanas pós-cirúrgicas. Verificar espessa camada de osso neoformado (\*) envolvendo a maioria dos blocos da hidroxiapatita (ha). Perióstio (P). (115x – H.E.)



#### 4.5.2 IMPLANTES SUBPERIOSTAIS DE HIDROXIAPATITA NO FÊMUR DOS ANIMAIS ALCOOLIZADOS

Nos cinco animais sacrificados duas semanas pós-cirúrgicas, notou-se formação de tecido ósseo no local do implante. A maioria dos blocos da cerâmica ficou envolvida por células periostais enquanto poucos blocos estavam totalmente incorporados pelo osso neoformado. O osso jovem estava cimentado com a superfície da diáfise do fêmur, sendo visível o limite entre eles. Entre osso formado e superfície da diáfise femoral, formaram-se cavidades contendo células da medula óssea. O perióstio no local do implante ficou preservado e se tornou espesso devido a atividade proliferativa das células da camada interna (figura 10). Vasos sanguíneos periostais apareceram na área receptora.

Com quatro semanas após a cirurgia, ocorreu formação óssea no local do implante em quatro dos cinco animais estudados. O osso neoformado estava em contato direto com os blocos da cerâmica, principalmente naqueles situados próximos a cortical (figura 11). Em alguns locais, o tecido ósseo neoformado tinha características de osso maturo enquanto em outros, de imaturo. Os espaços entre os blocos localizados mais distantes da cortical foram ocupados por tecido conjuntivo, sem evidência de osteogênese. Ainda nesses casos, notamos células da medula óssea contidas em cavidades situadas na região da linha cimentante, que por sua vez, separava osso neoformado da superfície cortical. No único animal com ausência de formação óssea na área receptora, observou-se abundante quantidade de células periostais envolvendo os blocos da cerâmica e ocupando os espaços entre eles. Além disso, o perióstio era espessado em consequência da atividade proliferativa das células da camada interna (figura 12). Vasos sanguíneos e algumas células gigantes multinucleadas apareceram na área receptora em todos animais.

Na oitava semana pós-cirúrgica, notou-se formação de osso no local do implante em todos animais. Alguns blocos de hidroxiapatita foram totalmente envolvidos pelo osso formado enquanto outros blocos estavam circundados por células periostais, sem contato com o osso. Ficou nítida a linha cimentante que

separa osso neoformado da superfície cortical do fêmur. O osso formado era de aspecto maturo. Observou-se também células periostais entre os grânulos de alguns blocos bem como o espessamento do perióstio junto a área receptora (figura 13). Em toda extensão do local do implante, a parede da cortical ficou mais espessa quando comparada com regiões vizinhas, nas quais a camada cortical permaneceu uniforme. Vasos sanguíneos e raras células gigantes multinucleadas foram encontrados no local do implante.

Em todos animais com dezesseis semanas pós-cirúrgicas, verificou-se que os blocos de hidroxiapatita adjacentes a superfície cortical ficaram envolvidos pela camada de osso neoformado e em contato direto com a cerâmica, sem interposição de tecido fibroso. Por outro lado, alguns blocos situados distantes da cortical foram circundados por tecido conjuntivo, sem contato com o osso neoformado. Ficou evidente a linha divisória entre osso formado e superfície cortical do fêmur (figura 14). Na área receptora, a parede da diáfise ficou espessada e o perióstio delgado. Vasos sanguíneos e ausência de células gigantes multinucleadas foram observados no local do implante.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

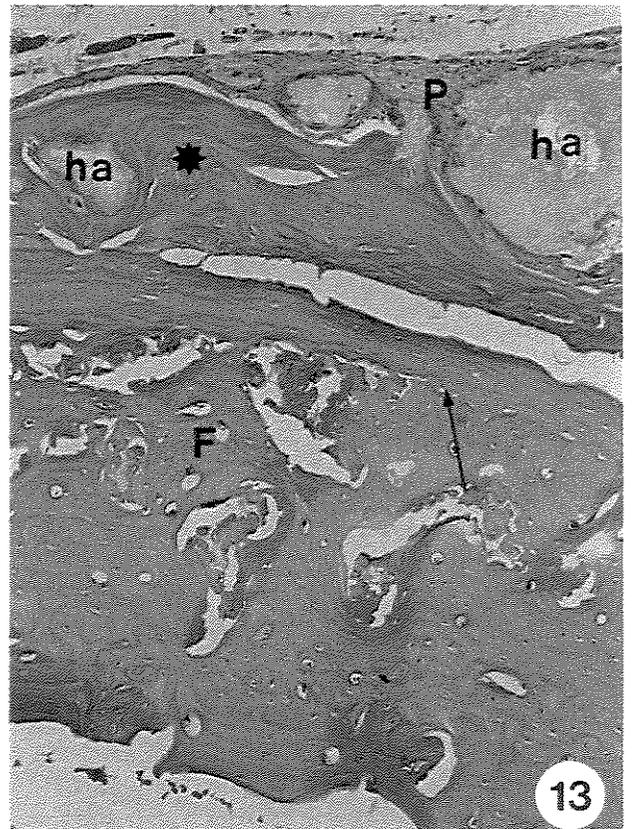
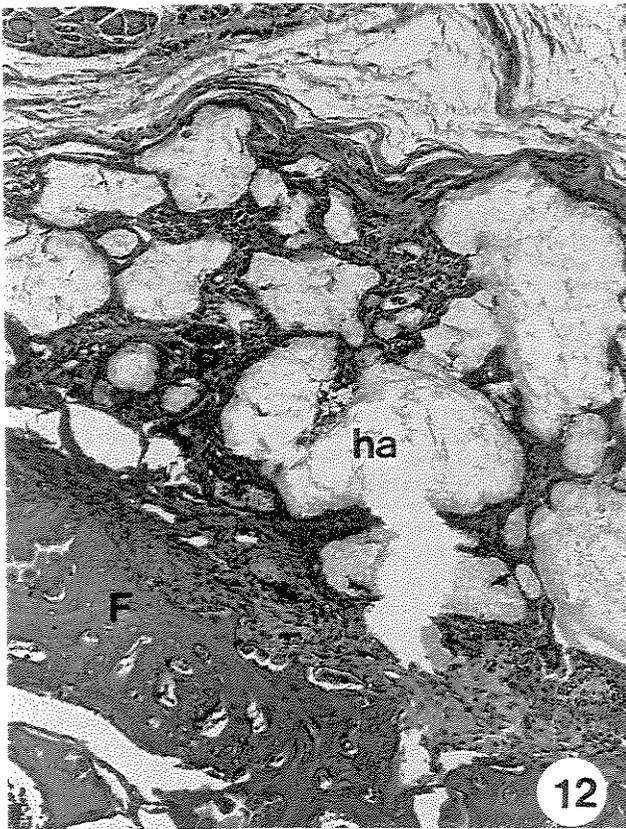
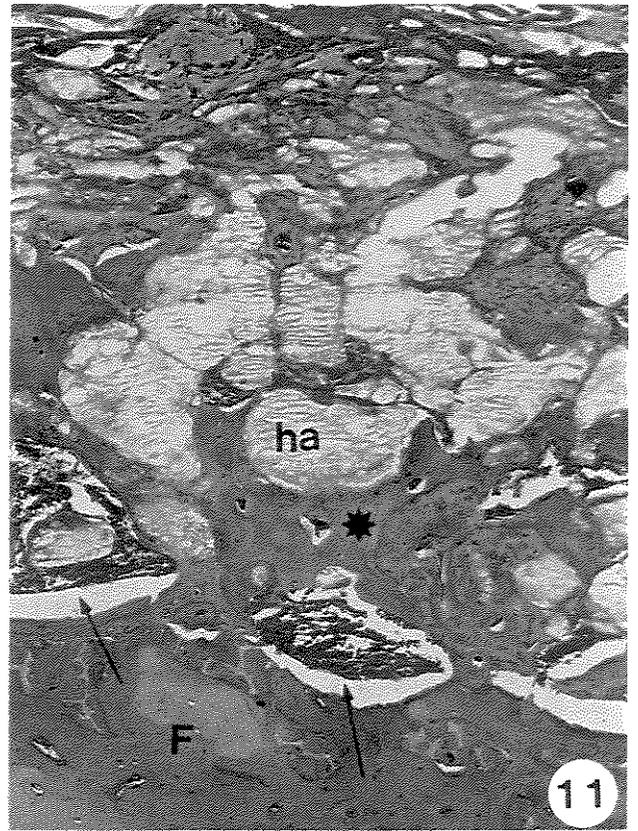
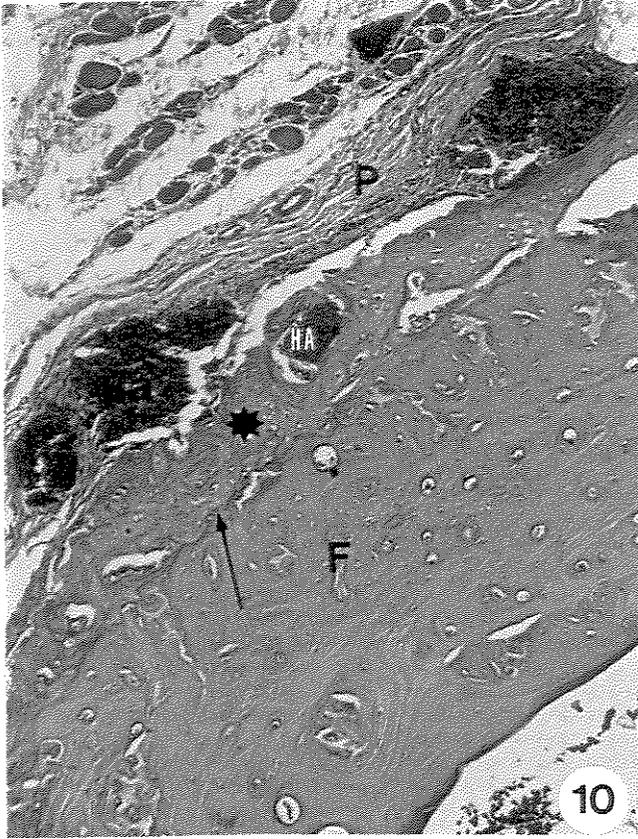
**Figura 10:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal alcoolizado com 2 semanas pós-cirúrgicas. Observar osso neoformado (\*) de aspecto imaturo envolvendo alguns blocos de hidroxiapatita (ha), porém a maior parte da cerâmica ficou envolvida por células periostais (P). Notar também a linha cimentante (seta) entre osso novo (\*) e superfície da diáfise do fêmur (F) bem como o espessamento do perióstio (P). (115x – H.E.)

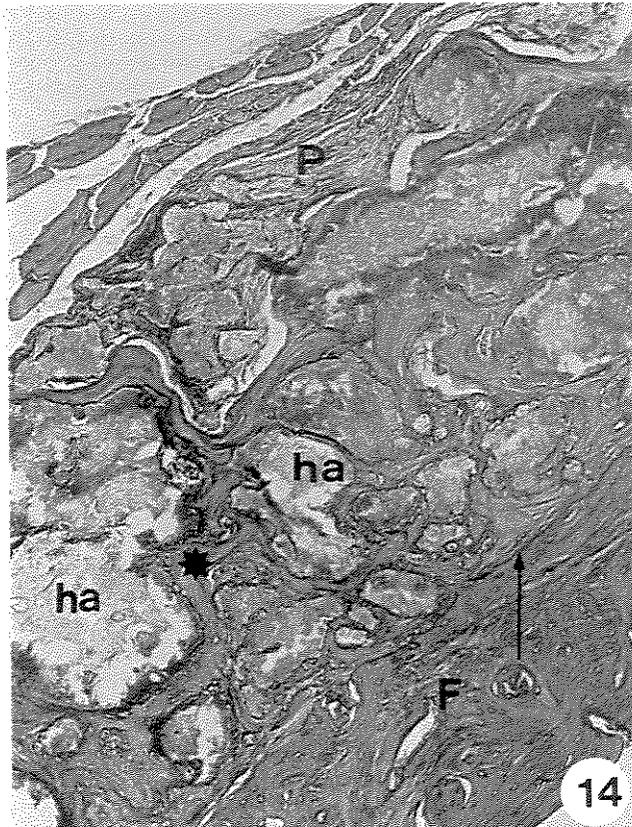
**Figura 11:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal alcoolizado com 4 semanas pós-cirúrgicas. Notar osso neoformado (\*) em contato com alguns blocos de hidroxiapatita (ha). Entre osso neoformado e diáfise femoral (F), observar cavidades (setas) contendo células da medula óssea. (115x – H.E.)

**Figura 12:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal alcoolizado com 4 semanas pós-cirúrgicas. Notar proliferação de células do perióstio (P) preenchendo os espaços entre os blocos de hidroxiapatita (ha) e ausência da neoformação óssea. Diáfise do fêmur (F). (115x – H.E.)

**Figura 13.** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal alcoolizado 8 semanas pós-cirúrgicas. Observar bloco de hidroxiapatita (ha) envolvido pelo osso neoformado (\*) e outro bloco envolvido por células periostais (P). Ficou evidente o limite (seta) entre osso formado (\*) e superfície da diáfise do fêmur (F). (115x – H.E.)

**Figura 14:** Corte transversal da área receptora do fêmur de animal alcoolizado com 16 semanas pós-cirúrgicas. Notar trabeculado ósseo formado (\*) entre os blocos da hidroxiapatita (ha). Observar também blocos distantes da superfície cortical estando envolvidos por células periostais (P) e a linha cimentante (seta) entre osso formado (\*) e superfície da diáfise do fêmur (F). (115x – H.E.)





### 4.5.3 IMPLANTES SUBPERIOSTAIS DE HIDROXIAPATITA NO PARIETAL DOS ANIMAIS NÃO ALCOOLIZADOS

Com duas semanas pós-cirúrgicas, observou-se formação de osso no local do implante de todos animais. Parte do osso, de aspecto imaturo, estava em contato direto com alguns blocos da hidroxiapatita, enquanto outra parte encontrava-se próximo a cerâmica, havendo nesse último caso, células periostais interpostas entre osso e implante. Junto a superfície externa do osso neoformado, localizava-se osteoblastos achatados. O osso formado estava cimentado com a cortical do parietal, sendo nítido o limite entre eles. Em todos animais, o perióstio na área receptora era espesso devido a intensa atividade proliferativa das células da camada interna. Verificou-se também vasos sanguíneos neoformados próximos aos blocos implantados (figura 15).

Quatro semanas pós-cirúrgicas, ocorreu formação de osso subperiostalente no local do implante em todos animais. Os blocos da cerâmica situados próximos à cortical do parietal foram envolvidos pelo osso formado enquanto os blocos mais distantes ficaram circundados por células periostais. Era nítida a linha demarcante entre osso formado e superfície cortical. O osso formado apresentava aspecto imaturo em algumas partes e maturo em outras (figura 16). O perióstio na área receptora ficou espesso comparado com áreas vizinhas onde permaneceu intacto.

Após oito semanas da cirurgia, todos animais apresentaram osso formado no local do implante. Alguns blocos da cerâmica estavam totalmente envolvidos por osso neoformado, sem interposição de tecido conjuntivo. Outros blocos não estavam em contato direto com o osso neoformado. A maior parte do osso formado era maturo, porém havia determinadas regiões com características de osso imaturo (figura 17). A camada interna do perióstio apresentou-se ligeiramente desenvolvida no local do implante. Vasos sanguíneos periostais foram observados no local do implante.

Na décima sexta semana pós-cirúrgica, verificou-se abundante quantidade de osso formado no local do implante dos cinco animais estudados. O osso formado de

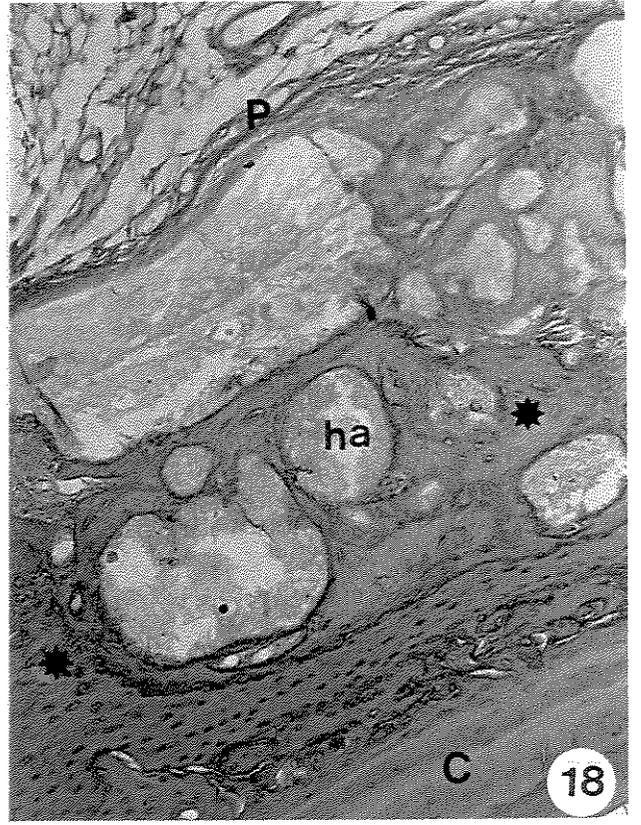
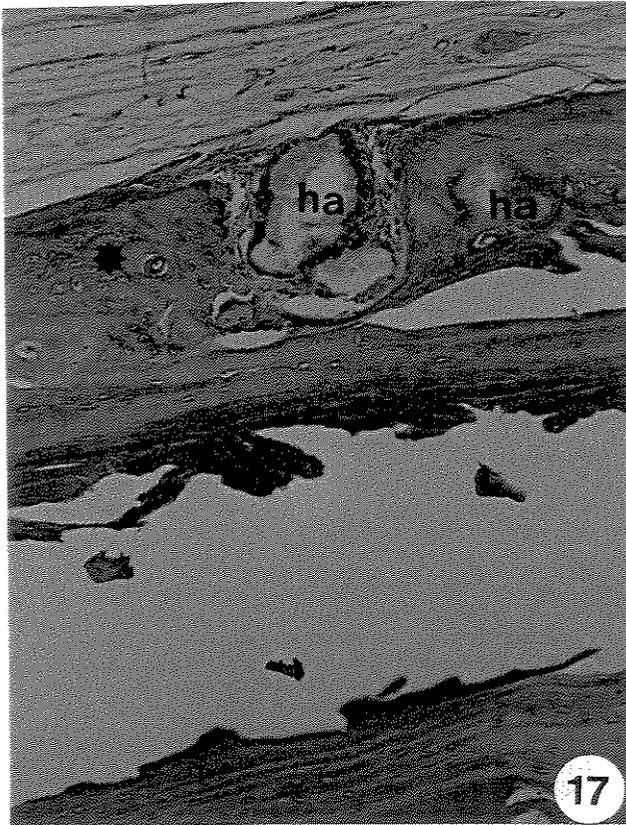
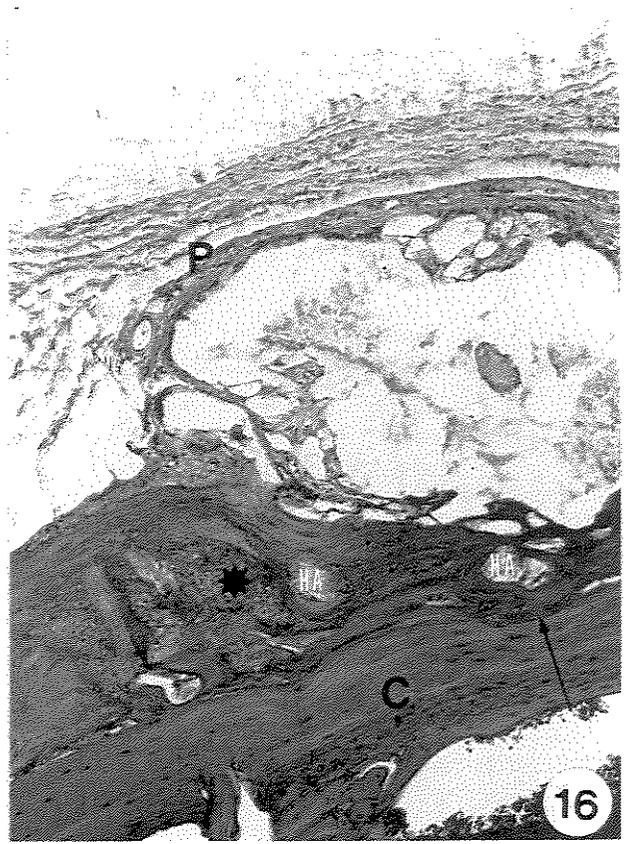
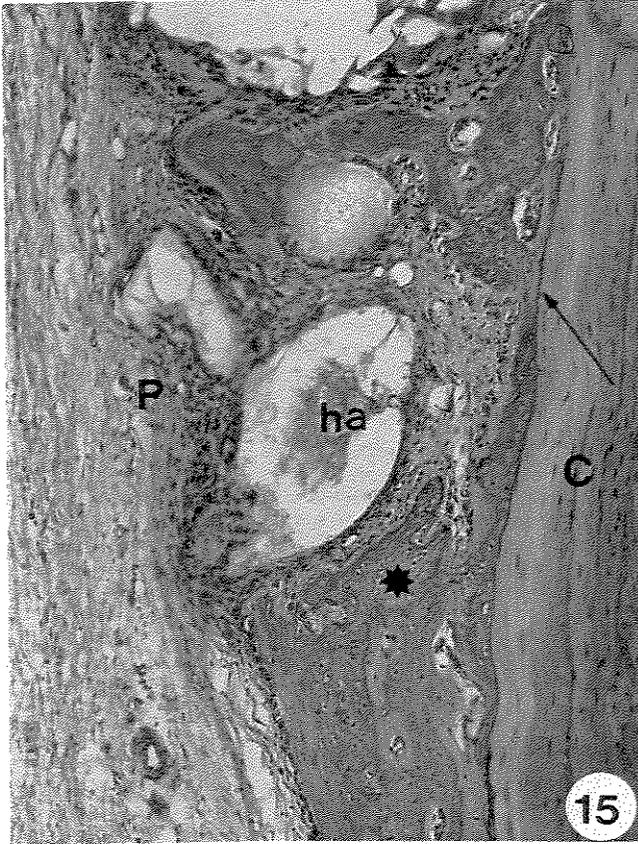
aspecto maturo envolveu completamente a maioria dos blocos da cerâmica, principalmente aqueles situados próximos a cortical do parietal. Alguns blocos distantes da cortical ficaram envolvidos por células periostais (figura 18). Na área receptora, a parede da cortical ficou espessada e o periósteo delgado. Alguns vasos sanguíneos foram observados no sítio de implantação, porém não foi encontrado células gigantes multinucleadas.

**Figura 15:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal não alcoolizado com 2 semanas pós-cirúrgicas. Observar osso neoformado com aspecto imaturo (\*) próximo aos blocos de hidroxiapatita (ha) e a linha cimentante (seta) que separa osso formado da superfície cortical do parietal (C). Perióstio (P). (115x – H.E.)

**Figura 16:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal não alcoolizado com 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar bloco de hidroxiapatita (ha) completamente envolvido pelo osso formado (\*). Notar também o limite (seta) entre osso formado e superfície cortical do parietal (C). Perióstio (P). (115x – H.E.)

**Figura 17:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal não alcoolizado com 8 semanas pós-cirúrgicas. Verificar osso neoformado (\*) em contato direto com a hidroxiapatita (ha) e blocos sem contato com o osso formado. (115x – H.E.)

**Figura 18:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal não alcoolizado com 16 semanas pós-cirúrgicas. Notar osso neoformado (\*) envolvendo vários blocos de hidroxiapatita (ha). Perióstio (P). Camada cortical (C). (115x – H.E.)



#### 4.5.4 IMPLANTES SUBPERIOSTAIS DE HIDROXIAPATITA NO PARIETAL DOS ANIMAIS ALCOOLIZADOS

Dos cinco animais sacrificados duas semanas pós-cirúrgicas, notou-se osso neoformado na área do implante em apenas um deles. A quantidade de osso formado neste animal foi pequena e estava em contato direto com alguns blocos da cerâmica. Ainda neste caso, os espaços entre a maioria dos blocos da hidroxiapatita estavam ocupados por células periostais. Osteoblastos achatados revestiam a superfície do osso neoformado e era nítida a linha divisória entre osso formado e superfície cortical (figura 19). Nos outros quatro animais com ausência da formação óssea, notou-se células periostais revestindo a superfície dos blocos da cerâmica e invadindo o interior deles através das fissuras existentes (figura 20). Comum aos cinco animais, o perióstio na área receptora era espesso devido a atividade proliferativa das células da camada interna (figuras 19 e 20). Células gigantes multinucleadas e vasos sanguíneos localizavam-se próximos a cerâmica.

Após quatro semanas, observou-se formação óssea no local do implante em três dos cinco animais estudados. O osso formado envolveu os blocos da cerâmica situados próximos a superfície cortical do parietal, enquanto os blocos mais distantes foram rodeados por células periostais. Notou-se também o limite preciso entre osso formado e superfície cortical do parietal (figura 21). O osso formado era de aspecto imaturo em algumas regiões e maturo em outras. Nos animais em que não houve formação óssea, verificou-se células periostais ocupando os espaços entre os blocos da cerâmica (figura 22). Comum aos cinco animais, notou-se vasos sanguíneos e células gigantes multinucleadas na área receptora.

Oito semanas após a cirurgia, houve formação de osso no local do implante de todos animais estudados. Alguns blocos da hidroxiapatita estavam em contato direto com osso neoformado, porém a maior parte da cerâmica estava rodeada por células periostais, sem contato com o osso. Era nítida a linha demarcante entre osso formado e superfície cortical do parietal. As células da camada interna do perióstio

ainda apresentavam-se em atividade proliferativa (figura 23). Vasos sanguíneos e algumas células gigantes multinucleadas apareceram na área receptora.

Em todos os animais sacrificados dezesseis semanas pós-cirúrgicas, houve formação óssea no local do implante. O osso formado de aspecto maturo envolveu totalmente alguns blocos de hidroxiapatita enquanto outros blocos estavam revestidos por células periostais, sem contato direto com o osso (figura 24). Também notou-se osso neoformado no interior dos blocos, ou seja, entre os grânulos da cerâmica. A camada interna do periósteeo estava em atividade proliferativa celular.

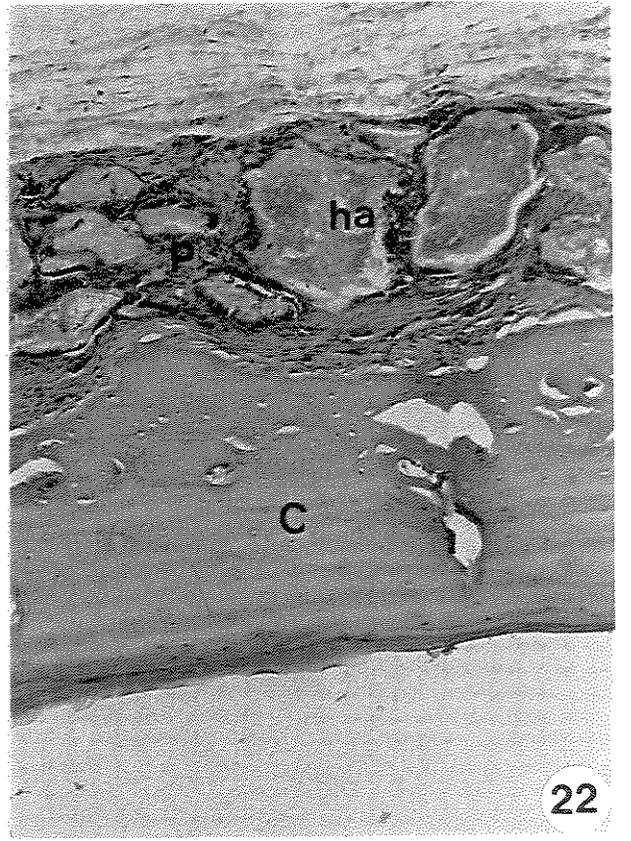
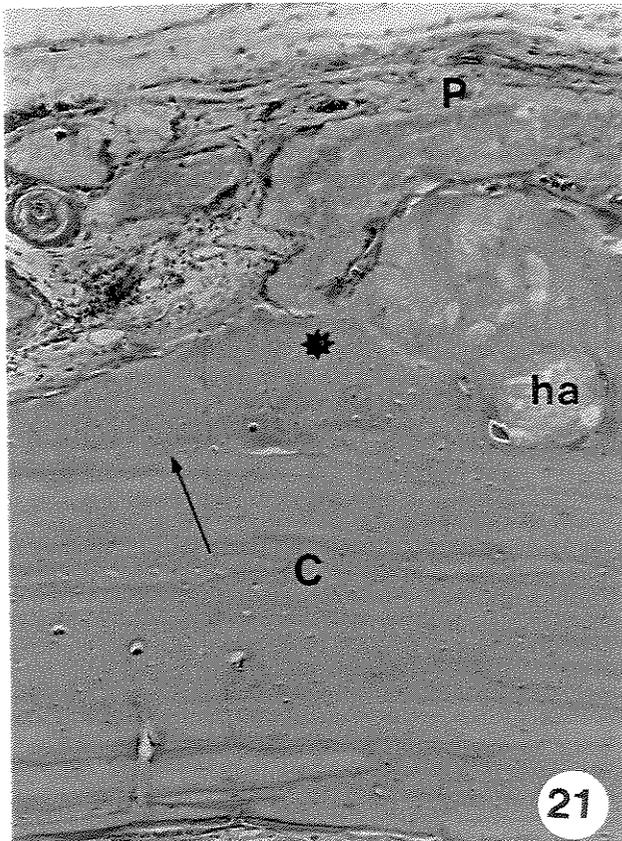
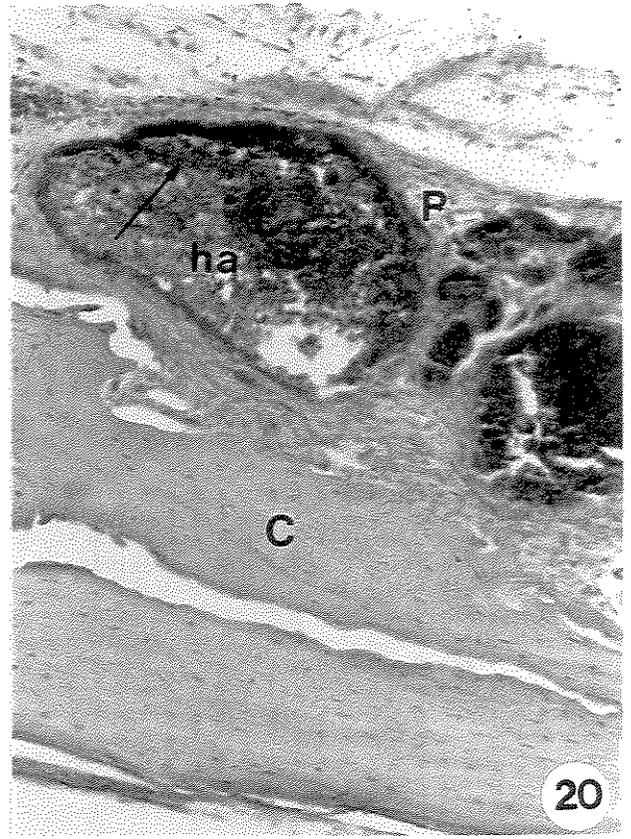
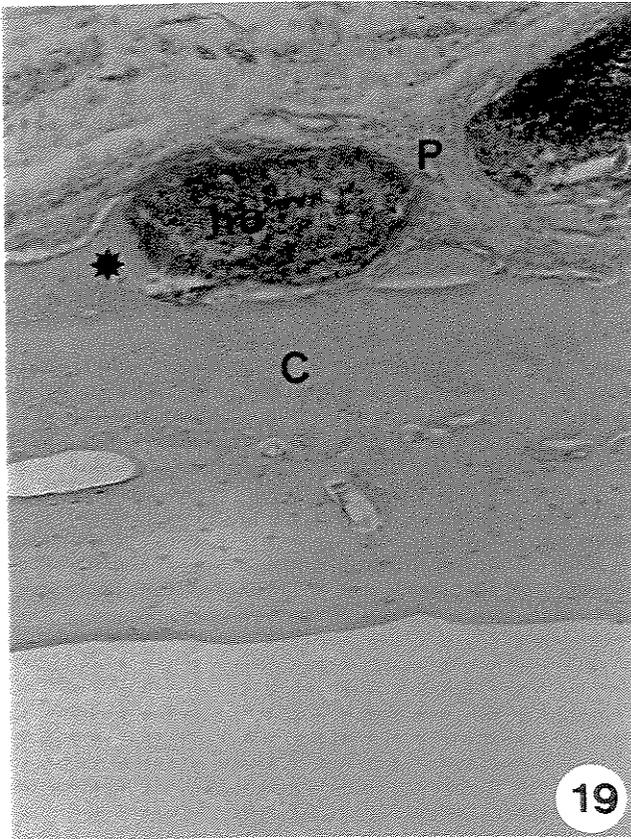
**Figura 19:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal alcoolizado com 2 semanas pós-cirúrgicas. Notar osso formado (\*) em contato com o bloco de hidroxiapatita (ha). Camada cortical (C). Perióstio (P). (115x – H.E.)

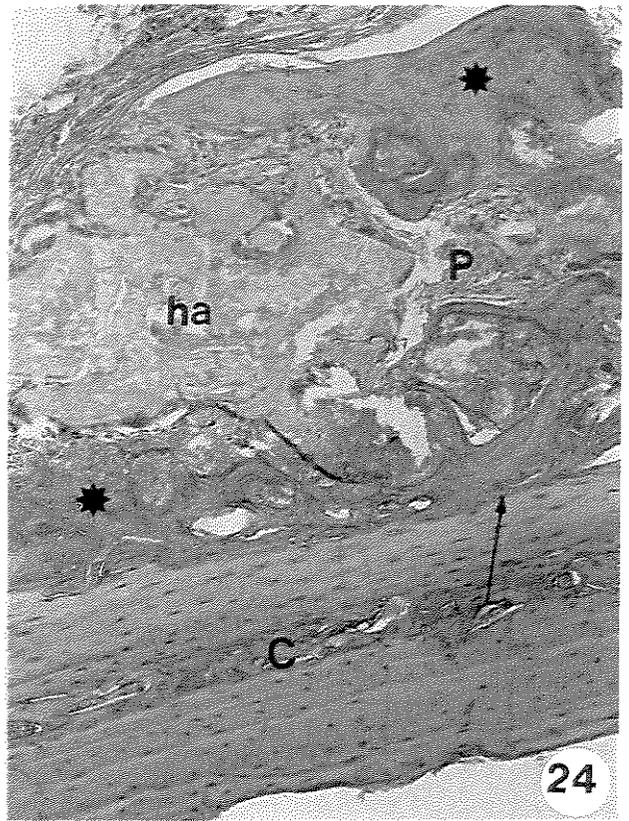
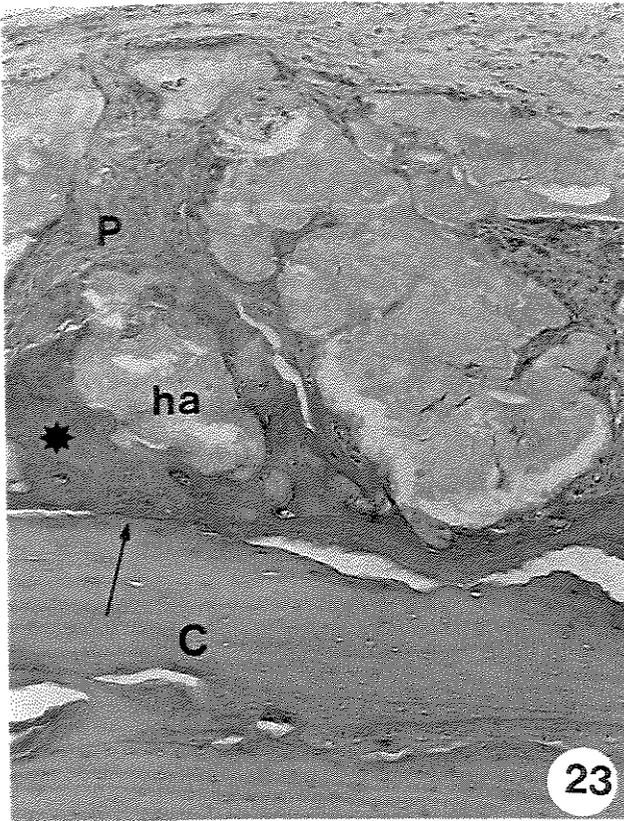
**Figura 20:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal alcoolizado com 2 semanas pós-cirúrgicas. Notar ausência de neoformação óssea entre os blocos de hidroxiapatita (ha). Observar também células periostais envolvendo os blocos da cerâmica e penetrando entre os grânulos (seta). Camada cortical (C). Perióstio (P). (115x – H.E.)

**Figura 21:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal alcoolizado com 4 semanas pós-cirúrgicas. Observar osso formado (\*) envolvendo alguns blocos de hidroxiapatita (ha), enquanto outros ficaram envolvidos somente por células do perióstio (P). Notar também linha divisória (seta) separando osso formado da superfície da cortical (C). (115x – H.E.)

**Figura 22:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal alcoolizado com 4 semanas pós-cirúrgicas. Notar ausência de neoformação óssea e os blocos de hidroxiapatita envolvidos por células do perióstio (P). Camada cortical (C). (115x – H.E.)

**Figura 23 e 24:** Corte transversal da área receptora do parietal de animal alcoolizado com 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas. Observar blocos de hidroxiapatita (ha) em contato direto com o osso formado e blocos sem contato com ele. Notar também o limite (seta) entre osso formado e a superfície da cortical do parietal (C). (115x – H.E.)





#### 4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

O gráfico 4 sumariza as médias dos valores encontrados para o volume relativo de osso formado no fêmur e parietal dos animais dos subgrupos não alcoolizados e alcoolizados. Desta maneira, observou que o volume de osso formado no fêmur dos subgrupos não alcoolizados sacrificados 2, 4, 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas, foi 10,90%; 19,03%; 31,59%; e 39,65%, respectivamente, enquanto no fêmur dos subgrupos alcoolizados, os valores foram 6,03%; 10,61%; 19,73% e 23,02%. Em relação à quantidade de volume ósseo formado no parietal dos subgrupos não alcoolizados após 2, 4, 8 e 16 semanas da cirurgia, os valores encontrados foram: 6,35%; 9,43%; 15,41% e 16,26%, respectivamente, enquanto que nos subgrupos alcoolizados, foram: 0,80%; 5,28%; 9,26% e 9,09%, respectivamente.

Notou-se também que quantidade semelhante de osso formado no fêmur do subgrupo não alcoolizado após 2 semanas da cirurgia (10,90%) ocorreu no fêmur do subgrupo alcoolizado 4 semanas depois da cirurgia (10,61%). A quantidade de osso formado no fêmur do subgrupo não alcoolizado 4 semanas pós-cirúrgicas foi 19,03%, semelhante assim à encontrada no fêmur do subgrupo alcoolizado após 8 semanas da cirurgia que foi 19,73%.

Em relação a área receptora do parietal, observou que o volume de osso formado no subgrupo alcoolizado 4 semanas pós-cirúrgicas foi 5,28%, semelhante ao encontrado no subgrupo não alcoolizado 2 semanas pós-cirúrgicas que foi de 6,35%. Ainda neste osso, verificou-se semelhança entre o volume médio de osso formado no subgrupo não alcoolizado 4 semanas pós-cirúrgicas (9,43%) com o volume ósseo formado no subgrupo alcoolizado 8 semanas pós-cirúrgicas (9,26%).

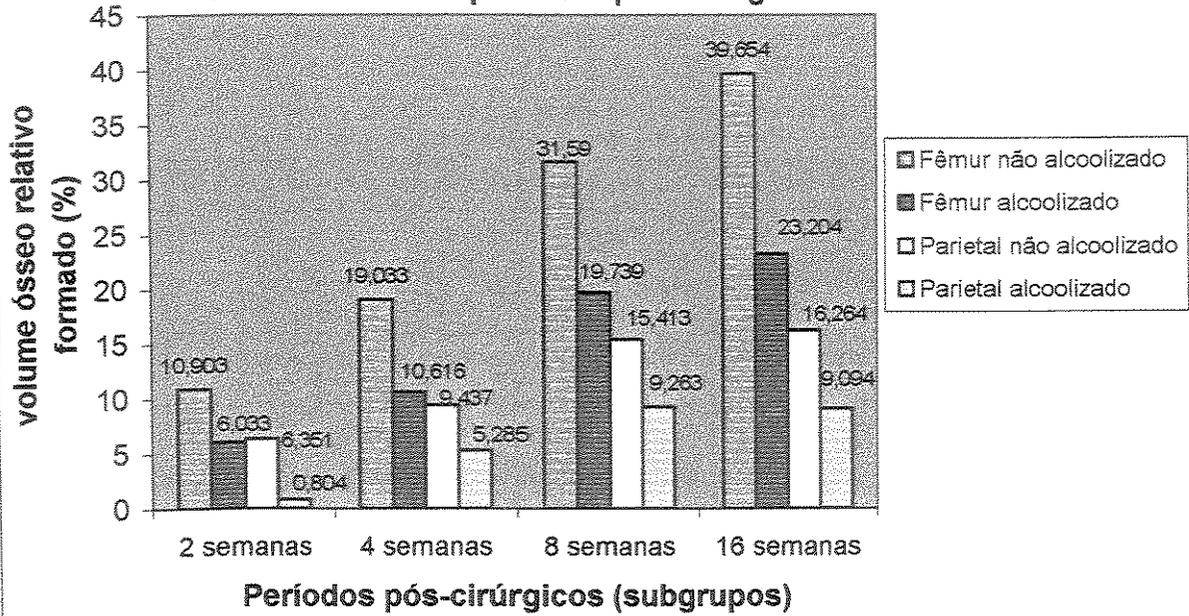
Ao comparar o volume de osso formado na área receptora do fêmur entre subgrupos não alcoolizados e alcoolizados, verificou que os valores encontrados para os não alcoolizados foram superiores aos correspondentes subgrupos alcoolizados (gráfico 5 - Anexo). Em relação ao osso parietal, também verificou que

os volumes de osso formado nos subgrupos não alcoolizados foi estatisticamente maiores em relação aos valores encontrados nos respectivos subgrupos alcoolizados (tabela 4 e gráfico 6- Anexo).

Quando comparado simultaneamente o volume de osso formado no fêmur entre os subgrupos não alcoolizados (2 x 4 x 8 x 16 semanas pós-cirúrgicas), verificou-se que os valores encontrados entre 2 e 4 semanas foram significativamente iguais entre si, o mesmo ocorrendo entre 8 e 16 semanas, havendo diferença significativa nas demais correlações (tabela 5-Anexo). Resultado semelhante ocorreu em relação ao volume de osso formado no fêmur entre os subgrupos alcoolizados. No parietal dos subgrupos alcoolizados e não alcoolizados, a resposta também foi a mesma.

Em relação a análise comparativa do volume de osso formado entre os tipos de ossos (Fêmur x Parietal), observou-se que o valor encontrado para o fêmur dos subgrupos não alcoolizados foi superior ao encontrado no parietal dos subgrupos não alcoolizados correspondentes. Resultado semelhante ocorreu quando comparado o volume de osso formado no fêmur dos subgrupos alcoolizados com o encontrado no parietal dos subgrupos alcoolizados correspondentes (tabela 4 e gráfico 7- Anexo).

**Gráfico 4: Média do volume ósseo relativo formado no fêmur e no parietal dos animais dos subgrupos não alcoolizados e alcoolizados nos períodos pós-cirúrgicos estudados**



## **5. DISCUSSÃO**

Pesquisas envolvendo animais de laboratório constituem um importante fator para o avanço da área biomédica. Assim sendo, questões referentes a algumas doenças humanas podem ser favoravelmente estudadas em animais de laboratório, inclusive aquelas decorrentes do uso abusivo do álcool, tais como alterações patológicas do fígado, pâncreas, músculo e tecido ósseo (LORENZ e LORENZ, 1983).

Atualmente, é evidente na literatura que o rato é frequentemente utilizado como modelo experimental nas pesquisas sobre efeitos do alcoolismo no tecido ósseo (COMPSTON, 1992; ARNAU et al., 2000; HOGAN et al., 2000; NISHIGUCHI et al., 2000; TURNER, 2000; ZHANG et al., 2000; TURNER et al., 2001). Isso é devido a sua afinidade ao consumo voluntário do álcool. Por essa razão e também pelo fato de ter tamanho apropriado à técnica cirúrgica para colocação de blocos de hidroxiapatita subperiostealmente, o rato foi escolhido como modelo no presente trabalho.

Nos experimentos sobre os efeitos do consumo do álcool no tecido ósseo de ratos, encontramos diferentes metodologias quanto a concentração do álcool e o tempo de tratamento para o desenvolvimento do alcoolismo experimental. LORENZ e LORENZ (1983) usaram concentração de álcool a 20% diluído em água durante 2 semanas; DIEZ et al. (1997) trabalharam com diluição de 35% e tempo de 6 semanas; SAMPSON et al. (1998) usaram 35% e período de 4 semanas, e, mais recentemente, NYQUIST et al. (1999), submeteram os animais ao consumo de álcool a 15% durante 5 semanas. Em nosso trabalho, os animais ingeriram álcool diluído a 25% durante 4 semanas. Após este período, os mesmos foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação da hidroxiapatita e continuaram recebendo a mesma dosagem de álcool até completar o período da experimentação. Baseados nos trabalhos citados acima os quais demonstraram alterações no tecido ósseo frente as diferentes metodologias usadas para tornar os animais alcoolizados, pode-se considerar nossos ratos também como alcoolizados e com todos os efeitos agressivos do álcool no tecido ósseo. SONNENREICH (1971) considera indivíduo alcoólatra aquele que consome diariamente bebida alcoólica e, como a única dieta

líquida disponível aos animais do grupo experimental foi o álcool diluído, acredita-se que esse outro aspecto também os caracterizam como alcoolizados.

Há forte questionamento se as alterações ósseas nos animais alcoolizados são realmente por causa do efeito direto do álcool ou seriam consequência da deficiência nutricional (HOLBROOK E CONNOR, 1993). Diante desse fato, torna-se obrigatório e essencial o monitoramento do estado de saúde de cada animal durante os experimentos sobre alcoolismo. Segundo WEISBROTH et al. (1977), a variação da quantidade de ração e água consumida pode modificar respostas biológicas em muitos desses experimentos sobre alcoolismo.

Nesse trabalho, tomou-se o devido cuidado em acompanhar periodicamente o estado de saúde dos animais através do controle da quantidade de ração e líquido consumidos ao longo do experimento. Os resultados demonstraram que os ratos não alcoolizados consumiram maior quantidade de ração e líquido que os alcoolizados. No entanto, quando considera somente os animais alcoolizados, nota-se que as dietas líquida e sólida consumidas por eles estavam dentro dos padrões estabelecidos para uma dieta normal. De acordo com os estudos de SVENDSEN E HAU (1984), ratos normais devem consumir de 8 a 25 gramas por dia de ração e ingerir de 5 a 80 ml de água diariamente. Nesse experimento, os animais alcoolizados consumiram, em média, 14,25 gramas de ração e 16,92 ml de líquido por dia. MARTINEZ (1997) também notou que as ratas alcoolizadas consumiram menor quantidade de líquido e ração comparadas com às ratas não alcoolizadas, porém não foi caracterizado quadro de desnutrição.

Outra preocupação quanto ao estado nutricional dos animais, foi acompanhar a variação do peso corpóreo de cada um deles, pois a desnutrição protéica em roedores é caracterizada principalmente pela perda de massa corpórea (CAMPANA et al., 1975; PALENCIA et al., 1994; SAMPSON et al., 1996). Os resultados estatísticos demonstraram que os ratos não alcoolizados ganharam mais massa corpórea comparados aos animais alcoolizados. No entanto, ao considerar somente os animais alcoolizados, notou-se que os mesmos tiveram aumento de massa corpórea ao longo do experimento, apesar do ganho ser menor.

Mediante aos resultados positivos em relação a variação do peso corpóreo e da quantidade de ração e água ingerida diariamente pelos animais alcoolizados, constatou que os mesmos não apresentaram características de desnutrição protéica. Assim sendo, as diferenças encontradas quanto ao tempo de formação e o volume de osso nos sítios de implantação da hidroxiapatita entre os grupos não alcoolizado e alcoolizado, devem-se ao efeito do álcool e não em consequência de um quadro de desnutrição.

Além das graves alterações que o alcoolismo provoca diretamente no tecido ósseo, estudos como de ALBREKTSSON et al. (1981) têm sugerido que o álcool também pode interferir no processo de osteointegração dos implantes de biomateriais, inviabilizando, às vezes, sua utilização. Entre esses biomateriais, encontra-se a hidroxiapatita, uma cerâmica usada em cirurgias reparadoras de defeitos ósseos (ROSEN e McFARLAND, 1990; UCHIDA et al., 1990). Seu uso se justifica por tratar-se de um material biocompatível e com capacidade osteocondutiva (JARCHO, 1981; LEGEROS, 1988), além de ser semelhante ao composto inorgânico (cálcio e fósforo) do osso humano. A hidroxiapatita por nós utilizada demonstrou boa biocompatibilidade, pois não foram observados sinais de rejeição.

Nossos resultados histológicos mostraram que após duas semanas da cirurgia, ocorreu formação de osso nos sítios de implantação (fêmur e parietal) de todos animais não alcoolizados, sendo que o volume de osso aumentou consideravelmente ao longo do experimento. Nos animais alcoolizados sacrificados neste mesmo período, notou-se que todos tiveram osso neoformado no fêmur enquanto apenas um deles apresentou osso formado no parietal. Ao longo do experimento, o osso neoformado nesses animais alcoolizados aumentou lentamente. Ainda nesse período, notou que nos locais de implantação, a quantidade de osso formado no fêmur e no parietal dos animais não alcoolizados foi maior comparada com a encontrada nos animais alcoolizados. No período de 4 semanas pós-cirúrgicas, todos os animais não alcoolizados apresentaram osso neoformado nas áreas receptoras do implante. Nos animais alcoolizados, 3 dos 5 sacrificados, tiveram osso neoformado no parietal e 4 deles apresentaram formação de osso no

fêmur. A análise quantitativa nesse período mostrou que o volume de osso formado nos locais de implantação no fêmur e no parietal dos animais não alcoolizados foi superior ao encontrado nos animais alcoolizados. Com 8 e 16 semanas pós-cirúrgicas, todos animais alcoolizados e não alcoolizados apresentaram osso formado nos sítios de implantação. Para esses períodos, os valores estatísticos também mostraram maior quantidade de osso formado nos animais não alcoolizados.

Diante aos resultados negativos quanto a quantidade e o tempo de formação de osso tanto no fêmur como no parietal dos animais alcoolizados, acredita-se que o consumo de álcool interferiu na capacidade osteogênica das células periostais junto aos blocos de hidroxiapatita. Desta maneira, pode-se inferir que a neoformação óssea pode ser esperada ao redor da hidroxiapatita mesmo quando implantada em ossos de ratos alcoolizados, no entanto, de forma mais lenta e em menor volume. Isto para a implantologia é importante pois o prognóstico para pacientes alcoólatras que receberem implantes de biomateriais deverá ser analisado cautelosamente.

NAGASE et al. (1989) após implantarem subperiostealmente hidroxiapatita na mandíbula de cachorros, notaram rápida formação de osso nas 12 primeiras semanas pós-cirúrgicas. KAMAKURA et al. (1996) implantaram subperiostealmente octacalcio fosfato no parietal de ratos não alcoolizados e verificaram osso formado nas duas primeiras semanas pós-cirúrgicas. Também foi notado que o volume ósseo foi crescendo consideravelmente até preencher a maioria dos espaços entre os blocos da cerâmica no período de 16 semanas pós-cirúrgicas. Em nosso experimento aconteceu resultado semelhante nas duas áreas receptoras, quando considera-se os animais não alcoolizados.

IYAMA et al. (1997) implantaram hidroxiapatita em falha óssea produzida cirurgicamente na tíbia de ratos diabéticos e notaram atraso considerável do processo de neoformação óssea ao longo do experimento. Isto demonstra que o estado de saúde normal do tecido ósseo é importante na resposta aos implantes de biomateriais. Desta maneira, podemos explicar a deficiência do processo de formação óssea ocorrido nos sítios de implantação dos nossos animais alcoolizados,

uma vez que o alcoolismo altera a integridade óssea. Segundo VANEEDEN e RIPAMONTI (1994), os sinais moleculares do processo de neoformação óssea frente ao implante de hidroxiapatita ainda são desconhecidos. A osteogênese envolve migração, proliferação e diferenciação das células osteogênicas em osteoblastos (MARKS e POPOFF, 1988). Invasão vascular, diferenciação osteoblástica e deposição osteóide resultam na construção e remodelação de matriz extracelular do osso. Entretanto, todas essas fases da osteogênese são retardadas quando a morfologia do tecido ósseo fica alterada frente aos efeitos do álcool (FRIDAY e HOWARD, 1991).

Entre outros fatores importantes para a neoformação óssea, está a proteína morfogenética do osso (BMP) e a enzima fosfatase alcalina. ONO et al. (1992) estudaram a indução de formação óssea pela BMP combinada com hidroxiapatita. Para isto, os autores implantaram, subperiostealmente, hidroxiapatita juntamente com BMP no parietal de coelhos. Observaram formação óssea e elevada atividade da alcalina fosfatase após 3 semanas da cirurgia. Esses achados demonstraram que a BMP tem importante função na indução de formação óssea. Paralelamente a esses estudos, encontram-se aqueles relatando que o alcoolismo não altera apenas a histologia óssea, mas também provoca mudanças bioquímicas como a queda da concentração de BMP (DIAMONT et al., 1989; PENG et al., 1991) e da fosfatase alcalina (FRIDAY e HOWARD, 1991), o que poderia contribuir para justificar os resultados negativos da formação óssea ocorrida nos animais alcoolizados em nosso experimento.

Outras pesquisas chamam atenção para o papel fundamental do suprimento sanguíneo adequado no processo de regeneração óssea, pois a probabilidade de migração dos osteoblastos para produzir matriz óssea é fortemente dependente da sua nutrição e suprimento de oxigênio (LEMPERLE et al., 1998). TAKATO et al. (1986) relataram que a capacidade osteogênica do perióstio depende do suprimento sanguíneo e BURSTEIN et al. (1989) mostraram que o suprimento vascular foi de grande importância para a ativação celular e, conseqüentemente, para a formação de osso pelo perióstio em seu experimento. Pelo exposto é

evidente que o suprimento sanguíneo no local do implante é essencial para o crescimento ósseo. Assim sendo, pode-se inferir que possíveis alterações da vascularização do perióstio provocadas pelo álcool, podem ter comprometido o processo de osteogênese nos locais do implante em nosso experimento.

Em relação a quantidade de osso formado no fêmur e parietal, notou-se que o volume de osso encontrado no fêmur foi estatisticamente superior ao achado no parietal em todos os períodos estudados. Esta resposta ocorreu tanto nos animais alcoolizados como nos não alcoolizados e deve-se possivelmente pela diferença da capacidade osteogênica dos ossos fêmur e parietal. PROLO e OKLUND (1991) observaram diferenças das propriedades osteogênicas do perióstio do crânio e da tíbia, sendo este último 7 vezes mais osteogênico que o primeiro. Estudando a tíbia de cabras, VANDELWILDENBERG et al. (1984) demonstraram que o perióstio deste osso é mais osteogênico em relação ao perióstio da costela. SASANO et al. (1995) implantaram subperiostealmente octacálcio fosfato no parietal e tíbia de ratos e notaram formação de osso novo próximo ao material implantado na tíbia uma semana pós-cirúrgica. No parietal, a formação óssea aconteceu após a terceira semana da implantação, expondo assim, a superioridade osteogênica do perióstio da tíbia. Conforme observado anteriormente, existe variação da capacidade osteogênica entre os ossos, sendo menor no crânio. Isso pode explicar o menor volume de osso formado no parietal, comparado com o achado no fêmur em nosso experimento. Além disso, devemos considerar que o estímulo mecânico recebido no fêmur pode ter contribuído para a formação de maior quantidade de osso formado, comparado com a área receptora do parietal que não está sujeita aos mesmos estímulos.

Quanto à disposição do osso formado junto a cerâmica implantada, notou-se que os blocos localizados próximos a superfície cortical foram os primeiros a serem envolvidos pelo osso neoformado, o que também foi observado nos experimentos de DONOHUE e MASCRETS (1990) e KAMAKURA et al. (1996). Os blocos situados distantes da cortical demoraram mais tempo para serem envolvidos pelo osso. Isto pode ser explicado pelo crescimento aposicional do osso em função das células

periostais remanescentes na superfície irregular da camada cortical, após a elevação do periósteo para colocação da hidroxiapatita. BROWNLOW et al. (2000) notaram que células periostais ainda permaneceram na superfície cortical após a elevação do periósteo da tíbia e úmero de coelhos.

Os implantes de hidroxiapatita podem ser usados na forma densa ou porosa. Segundo WILLIAMS (1987), o tamanho dos poros da cerâmica é fator relevante no processo de osteointegração. HULBERT et al. (1970) demonstraram que poros cerâmicos menores de 10 micrômetros impedem a proliferação de células ósseas para o seu interior, poros com 15 a 50 micrômetros permitem a proliferação de tecido fibroso e poros de 50 a 150 micrômetros resulta na formação de osteóide e poros maiores que 150 micrômetros facilitam o crescimento de osso mineralizado. Segundo HENCH (1991), os poros tem que ter entre 100 a 150 micrômetros de tamanho para permitir o suprimento sanguíneo necessário para o crescimento do tecido. A hidroxiapatita usada em nosso trabalho tinha poros com 4 e 100 micrômetros, e mesmo sendo de tamanho menor em relação a cerâmica porosa usada por outros autores, ocorreu a invasão de células periostais e depósitos de osso no interior dos blocos da cerâmica. Podemos atribuir este resultado a ação do líquido tissular que provocou a degranulação dos blocos e, como resultado, houve aumento dos poros no interior da cerâmica, permitindo assim, o crescimento ósseo. Resultados semelhantes foram descritos por ANDRADE (1997), que também trabalhou com hidroxiapatita de porosidade semelhante à utilizada nessa pesquisa.

Os resultados desse trabalho demonstraram que a osteointegração da hidroxiapatita porosa pode ser esperada mesmo quando implantada subperiostealmente em animais alcoolizados, apesar do atraso considerável no processo de neoformação óssea e do menor volume de osso formado. Porém, não podemos inferir sobre a capacidade da área receptora e do osso formado junto a hidroxiapatita para suportar cargas mecânicas. Assim sendo, outros trabalhos são necessários, pois esse aspecto torna-se relevante em algumas situações, principalmente na área de implantologia.

## **6. CONCLUSÕES**

Os animais alcoolizados não apresentaram características de desnutrição protéica ao longo do experimento e, desta forma, as diferenças encontradas em relação ao grupo não alcoolizado devem-se ao efeito do etanol.

O tempo de experimentação e a concentração de etanol por nós utilizada (25%), foram suficientes para provocar alterações no processo de neoformação óssea nos locais de implantação.

Ao longo de todo experimento, a quantidade de osso formado nas áreas receptoras dos animais não alcoolizados foi maior à encontrada nas respectivas áreas dos animais alcoolizados.

A osteointegração da cerâmica pode ser esperada quando implantada em animais alcoolizados, apesar do atraso no processo de formação óssea.

O volume ósseo formado no fêmur foi superior ao encontrado no parietal, o que demonstra a superioridade osteogênica do perióstio do fêmur.

Tanto nos animais alcoolizados como naqueles não alcoolizados, o osso neoformado apresentou contato direto com a hidroxiapatita, sem a interposição de tecido fibroso.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALBREKTSSON, T., BRANEMARK, P.I., HANSSON, H.A., LINDSTROM, J. Osseointegrated titanium implants. **Acta Orthop. Scand**, v. 52, p. 155-170, 1981.
- ALMEIDA, L.M., COUTINHO, E.S.F. O alcoolismo e o hospital geral. **J. Bras. Psiquiatria**, v. 39, n. 1, p. 27-31, 1990.
- ANDRADE, J.C.T. Osteointegração de corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita em cavidades produzidas no fêmur de rato. Campinas, 1997, 70p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- ARNAU, D., DIEZ, A, MARINOSO, M.L., SERRANO, S., PENA, M.J., PUIG, J., NOGUES, X., MELLIBOVSKY, L., AUBIA, J., CARBONELL, J. Long-term effects of acute alcohol intoxication on bone in Sprague-Dawley rats. **J. Bone Miner Res**, v. 15, S540-S540, Suppl. 1, Sep. 2000.
- BIKLE, D.D. Alcohol induced bone disease. **World Ver. Nutr. Diet**, Basel, Karger, v. 73, p. 53-79, 1993.
- BROWN, M.D., MAILININ, T.I., DAVID, P.B. A roentgenographic evaluation of frozen allografts versus autografts in anterior cervical spine fusions. **Clin. Orthop**, v. 119, p. 231-236, 1976.
- BROWNLOW, H.C., REED, A., JOYNES, C., SIMPSON, A.H.R.W. Anatomical effects of periosteal elevation. **Journal Orthopaedic Research**, v. 18, n. 3, p. 500-502, 2000.

- BURSTEIN, F.D., CANALIS, R.F., CANALIS, E.M., ARIYAN, S. Scanning electron microscopy and gel electrophoresis of vascularized periosteal autografts. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 3, p. 500-509, 1989.
- BURSTEIN, F.D., COHEN, S.R., HUDGINS, R., BOYDSTON, W. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 100, n. 4, p. 869-874, 1997.
- CAMPANA, A.O., BURINI, R.C., OUTA, A.Y., CAMARGO, J.L.V. Experimental protein deficiency in adult rats. **Rev. Bras. Pesq. Med. e Biol**, v. 8, n. 3, p. 221-226, 1975.
- CARIA, P.H.F. Enxerto periosteal e hidroxiapatita no tratamento de falha óssea produzida na pré-maxila de ratos. Campinas, 1999. 82 p. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- COFIELD, R.H., APUDGUIRRO, R.R.J. O uso da hidroxiapatita associado a estimulação ultra sônica pulsada de baixa intensidade na correção de falha óssea – estudo experimental em coelhos. 1995. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo.
- COMPSTON, J.E. Risk factors for osteoporosis. **Clinical Endocrinology**, v. 36, p. 223-224, 1992.
- CONSTANTINO, P.D., FRIEDMAN, C.D., JONES, K., CHOW, C.C., SISSON, G.A. Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 90, n. 2, p. 174-185, 1992.
- CORBETT, C.E. Farmacodinâmica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

- 
- DE LANGE, G.L., DE PUTTER, C., DE WITS, F.L.J.A. Histological and ultrastructural appearance of the hydroxyapatite bone interface. **J. Biomedical Materials Research**, v. 24, p. 829-845, 1990.
- DIAMONT, T., STIEL, D., LUNZER, M., WILKINSON, M., POSEN, S. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. **Am. J. Med**, v. 86, p. 282-288, 1989.
- DIEZ, A., SERRANO, S., CUCURULL, J., MARINOSO, L.L., BOSCH, J., PUIG, J., NOGUES, X., AUBIA, J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. **Calcifiel Tissue International**, v. 61, n. 2, p. 168-171, 1997.
- DONOHUE, W.B., MASCRETS, C. Effect of hydroxyapatite on bone formation around exposed heads of titanium implants in rabbits. **J. Oral Maxillofac Surg**, v. 48, p. 1196-1200, 1990.
- FELSON, D.T., ZHANG, Y.Q., HANNAN, M.T., KANNEL, W.B., KIEL, D.P. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. **Am. J. Epidemiol**, v. 5, n. 142, p. 485-492, 1995.
- FORTES, J.R.A., CARDO, W.N. Alcoolismo. Diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier, 1991.
- FRAYSSINET, P. New observation on middle term hydroxyapatite coated titanium alloy hip prostheses. **Biomaterials**, v. 13, n. 10, p. 668-673, 1992.
- FRIDAY, K.E., HOWARD, G.A. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. **Metabolism**, v.40, n. 6, p. 562-565, 1991.

- GOLEC, T.S., KRAUSER, J.T. Long term retrospective studies on hydroxyapatite coated endosteal and subperiosteal implants. **Dental Clinics of North America**, v. 36, n. 1, 1992.
- GRILLY, R.G., ANDERSON. Bone histomorphometry bone mass, and related parameters in alcoholic males. **Calcif. Tissue Int**, v. 43, p. 269-276, 1988.
- HARDESTY, R.A., MARSH, J.L. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology orientation and embryonic origin. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 85, n. 1, p. 5-14 , 1990.
- HENCH, L.L. Bioceramics: From concept to clinic. **J. Am. Ceram. Soc**, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- HOGAN, H.A., SAMPSONS, H.W., NGUYEN, L.P., GROVES, J.A. Alcohol consumption in adult rats influences the post-yield behavior of cortical bone. **J. Bone Miner Res**, v. 15: S489-S489, Suppl. 1, Sep. 2000.
- HOLBROOK, T.L., CONNOR, E.B. A prospective study of alcohol consumption and bone mineral density. **BMJ**, v. 306, n. 5, p. 1506-1509, 1993.
- HONIG, J.F., MERTEN, H.A. Subperiosteal versus epiperiosteal forehead augmentation with hydroxyapatite for aesthetic facial contouring: Experimental animal investigation and clinical application. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 17, p. 93-98, 1993.
- HONIG, J.F., MERTEN, H.A, WILTFANG, J. Significance of the periosteum in onlay craniofacial augmentation. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 9, n. 3, p. 260-266, 1998.

- HULBERT, S.F., YOUNG, F.A., MATHEWS, R.S., KLAWITTER, J.J., TALBERT, C.D., STELLING, F.H. Potential ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. **J. Biomed. Mater. Res**, v. 4, p. 433-456, 1970.
- ISHAUG-RILEY, S.L., CRANE, G.M., GURLEK, A. Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (D L – lactic – co – glycolic acid foam? Implanted into the rat mesentery. Student Research award in the Doctor? Degree Candidate Category, Society for Biomaterials 23rd Annual Meeting, New Orleans, L.A., April, 30 – May, 4, 1997.
- IYAMA, S., TAKESHITA, F., AYUKAWA, Y., KIDO, M.A, SUETSUGU, T., TANAKA, T. A study of the regional distribution of bone formed around hydroxyapatite implants in the tibiae of streptozotocin induced diabetic rats using multiple fluorescent labeling and confocal laser scanning microscopy. **J. Periodontol**, v. 68, p. 1169-1175, 1997.
- JARCHO, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. **Clin. Orthop. Rel. Res**, v. 157, p. 259-277, 1981.
- KAMAKURA, S., SASANO, Y., NAKAMURA, M., SUZUKI, O., OHKI, H., KAGAYAMA, M., MOTEGI, H. Initiation of alveolar ridge augmentation in the rat mandible by subperiosteal implantation of octacalcium phosphate. **Arch. Oral Biol**, v. 41, n. 11, p. 1029-1038, 1996.
- KANKARE, J., HIRVENSALO, E., ROKKANEN, P., Malleolar fractures in alcoholics treated with biodegradable internal fixation. 6/16 reoperations in a randomized study. **Acta Orthop Scand**, v. 66, n. 6, p. 524-528, 1995.
- KAWACHI, R.Y., BERTRAN, C.A., KUBOTA, L.T. Fosfato de cálcio: porosidade, cristalinidade, potencial de interface e comportamento in vivo. Campinas, 1997,

---

93p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

LARANJEIRA, R. Bases para uma política do tratamento dos problemas relacionados ao álcool e outras drogas no estado de São Paulo. **J. Bras. Psiquiatria**, v. 45, n. 4, p. 191-199, 1996.

LARANJEIRA, R., PINSKY, I. O alcoolismo. São Paulo: Contexto, 1998.

LEGEROS, R.Z. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. **Adv. Dent. Res**, v. 2, p.164-180, 1988.

LEMPERLE, S.M., CALHOUM, C.J., CURRAN, R., HOLMES, R.E. Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft tissue interposition: A comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 101, n. 3, p. 660-672, 1998.

LORENZ, R., LORENZ, J.J Electron microscopic observation on osteocytes of chronically alcoholized rats. **Arch. Orthop. Trauma Surg**, v. 102, p. 118-122, 1983.

MACIEIRA, M.S., GOMES, M.P.Z., GARCIA, M.L.T. Programa de atendimento ao alcoolista do hospital universitário Cassiano Antônio Moraes da Universidade Federal do Espírito Santo. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 42, n.2, p. 97-109, 1993.

MANDARIM de LACERDA, C.A. Whats is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The exemple of the stereology. **Braz. J. Morphol**, v. 16, n. 2, p.131-139, 1999.

- MARKS, S.C.Jr., POPOFF, S.N. Bone cell biology: The regulation of development, structure, and function in the skeleton. **Am. J. Anat**, v. 183, n. 1, p. 1-44, 1988.
- MARK, D.E., HOLLINGER, J.O., HASTINGS, C. Jr., CHEN, G., MARDEN, L.J., REDDI, A.H. Repair of calvarial nonunions by osteogenin, a bone inductive protein. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 86, n. 4, p. 623-630, 1990.
- MARTINEZ, M. Estudo histológico e ultra-estrutural da camada epitelial do endométrio de ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Botucatu, 1997. 90p. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.
- NAGASE, M., CHEN, R., ASADA, Y., NAKAJIMA, T. Radiographic and microscopic evaluation of subperiosteally implanted blocks of hydroxylapatite gelatin mixture in rabbits. **J. Oral Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 1, p. 40-45, 1989.
- NISHIGUCHI, S., SHIOMI, S., TAMORI, A., HABU, D., TAKEDA, T., TANAKA, T., OCHI, H. 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., HALVORSENV,V., MADSEN, J.E., NORDSLETTEN, L., OBRANT, K.J. Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. **Acta Orthop Scand**, v. 70, n. 2, p. 212-216, 1999.
- OKAZAKI, A., KOSHINO, T., SAITO, T., TAKAGI, T. Osseous tissue reaction around hydroxyapatite block implanted into proximal metaphysis of tibia with collagen-induced arthritis. **Biomaterials**, v. 21, p. 483-487, 2000.

- 
- ONO, I., OHURA, T., MURATA, M. A study on bone induction in hydroxyapatite combined with bone morphogenetic protein. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 90, n. 5, p. 870-879, 1992.
- ONO, I., GUNJI, H., KANEKO, F. Treatment of extensive cranial bone defects using computer designed hydroxyapatite ceramics and periosteal flaps. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 92, n. 5, p. 819-830, 1993.
- OONISH, H. Orthopaedic applications of hydroxyapatite. **Biomaterials**, v. 12, n. 2, p. 171-178, 1991.
- PALMER, T.N. The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. **Sci. Prog. Oxf**, v. 73, p. 1-15, 1989.
- PALENCIA, G., TEIXEIRA, f., OTIZ, A., PEREZ,R., RIOS, C., SOTELO, J. Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: a study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of larger human groups. **J. Stud. Alcohol**, v. 55, n. 1, p. 113-120, 1994.
- PENG, T.C., KUSY, R.P., HIRSCH, P.F., LIU, C.C., LESTER, G.E. Bone histomorphometry and mechanical properties in an alcoholic rat model. **Cells and Materials**, suppl. 1, p. 175-180, 1991.
- PRADO, J.C. Alcoolismo, problema sério de saúde pública. **Jornal da Cidade: Bauru**, 1996.
- PROLO, D.J., OKLUND, S. The use of bone grafts and alloplastic materials in cranioplasty. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 268, p. 271-278, 1991.

- RIBEIRO, M.S., TEIXEIRA, L.S. A validade dos perfis do MMPI em abusadores e dependentes do álcool: Resultados preliminares. **J. Bras. Psiquiatria**, v. 45, n. 8, p. 461-464, 1996.
- RISH, B.L., McFADDEN, J.T., PENIX, J.O. Anterior cervical fusion using homologous bone grafts. A comparative study. **Surg. Neurol**, v. 5, n. 119, p. 119-121, 1976.
- ROSEN, H.M. Porous, block hydroxyapatite as na interpositional bone graft substitute in orthognathic surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 83, n. 6, p.985-990, 1989.
- ROSEN, H.M., McFARLAND, M.M. The biologic behavior of hydroxyapatite implanted into the maxillofacial skeleton. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.85, nº5, p.718-723, 1990.
- SALYER, K.E., HALL, C.D. Porous hydroxyapatite as na onlay bone graft substitute for maxillofacial surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 84, n. 2, p. 236-244, 1989.
- SAMPSON, H.W., PERKS, W., CHAMPNEY, T.H., DEFFE, B. Alcohol consumption inhibits bone growth and developmente in yong actively growing rats. **Alcohol Clin. Exp. Res.** v. 20, n. 8, p. 1375-1384, 1996.
- SAMPSON, H.W., HEBET, V.A., BOOE, H.L., CHAMPNEY, T.H. Effectof alcohol consumption on adult and aged bone: Composition, morphology and hormone levels of a rat animal model. **Alcohol Clin. Exp. Res**, v. 22, n. 8, p. 1746-1753, 1998.
- SASANO, Y., KAMAKURA, S., NAKAMURA, M., SUZUKI, O., MIZOGUCHI, I., AKITA, H. Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP)

- stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. **The Anatomical Record**, v. 242, p. 40-46, 1995.
- SHARPE, J.R., SAMMONS, R.L., MARQUIS, P.M. Effect of pH protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramic. **Biomaterials**, v. 18, p. 471-476, 1997.
- SONNENREICH, J.C. Contribuição ao estudo da etiologia do alcoolismo. São Paulo, Ed. Revista de Tribunais, 168, 1971.
- SPENCER, H., RUBIO, N., RUBIO, E., INDREIKA, M., SEITAM, A. Chronic alcoholism. **The American Journal of Medicine**, v. 80, p. 393-397, 1986.
- STOBAUGH, R.K. Status of the hydroxyapatite coated unilateral subperiosteal implant using direct bone impressions. **Dental Clinics of North America**, v. 36, n. 1, p. 67-76, 1992.
- SVENDSEN, P., HAU, J. Handbook of laboratory animal science, v.1, CRC Press, Boca Raton, London, 1984.
- TAKATO, T., HARA, K., NAKATSUKA, T., VEDA, K., OUTAKE, T. Vascularized periosteal grafts: An experimental study using two different forms of tibial periosteum in rabbits. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 78, p. 489-497, 1986.
- THOMSON, R.C., YASZEMSKI, M.J., POWERS, J.M., MIKOS, A.G. Hydroxyapatite fibers reinforced poly ( $\alpha$  - hydroxy ester) foams for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 19, p. 1935-1943, 1998.

- TURNER, R.T. Skeletal response to alcohol. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 24, n. 11, p. 1693-1701, 2000.
- TURNER, R.T., KIDDER, L.S., KENNEDY, A., EVANS, G.L., SIBONGA, J.D. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 16, n. 3, p. 589-594, 2001.
- UCHIDA, A., ARAKIN, N., SHINTO, Y., YOSHIKAWA, H., KURISAKI, E., ONO, K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone-tumor surgery. **Journal of Bone and Joint Surgery British**, v. 72, n. 2, p. 298-302, 1990.
- VANDELWILDENBERG, F.A., GORIS, R.J., TUTEIN-NOLTHENIUS-PUYLAERT, M.B. Free revascularized periosteum transplantation: An experimental study. **Br. J. Plast. Surg**, v. 37, n. 2, p. 226-235, 1984 .
- VANEEDEN, S.P., RIPAMONTI, U. Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum – implications for reconstructive craniofacial surgery. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 93, n. 5, p. 959-966, 1994.
- VERBANCK, M., VERBANCK, J., BRAUMAN, J., MULLIER, J.P. Bone histology and 25Oh vitamin D plasma levels in alcoholic without cirrhosis. **Calcif. Tissue. Res**, v. 22, p. 538-541, 1977.
- VLISSIDIS, D., PROMBOMAS, A. Effect of alcoholic drinks on surface quality and mechanical strength of denture base materials. **J. Biomed. Mater. Res**, v. 38, p. 257-261, 1997.

- 
- WEISBROTH, S.H., PAGANELLI, R.G., SALVIA, M. Evaluation of a disposable water system during shipment of laboratory rats and mice. **Lab. Anim. Sci**, v. 27, p. 186-194, 1977.
- WIESE, K.G., MERTEN, H.A. The role of the periosteum in osteointegration of hydroxyapatite granules. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**, v. 22, p. 306-308, 1993.
- WILLIAMS, D.F. Tissue biomaterial interactions. **J. Mater. Sci**, v. 22, p. 3421-3433, 1987.
- YOUNGER, E.M., CHAPMAN, M.N. Morbidity at bone graft donor sites. **J. Orthop. Trauma**, v. 3, p. 192-195, 1989.
- ZHANG, M., KIDDER, L.S., PATTERSON-BUCKENDAHL, P., KENNEDY, A.M., EVANS, G.L., MARAN, A., SIBONGA, J.D., TURNER, R.T. Moderate alcohol suppresses bone turnover in adult female rats. **J. Bone Miner. Res**, v. 15: S304-S304 Suppl. 1, sep. 2000.

## **8. ANEXO**

**Tabela 4:** Nível de significância encontrada pela análise de variância nas comparações efetuadas entre grupos, semanas e tipos de ossos.

<i>Comparações</i>	<i>Valor do P (significância)</i>
Entre grupos (Não alcoolizado vs Alcoolizado)	0.00000004935
Entre os subgrupos (2 vs 4 vs 8 vs 16 semanas)	0.000000000284
Entre os tipos de ossos (fêmur vs parietal)	0.000000000001268

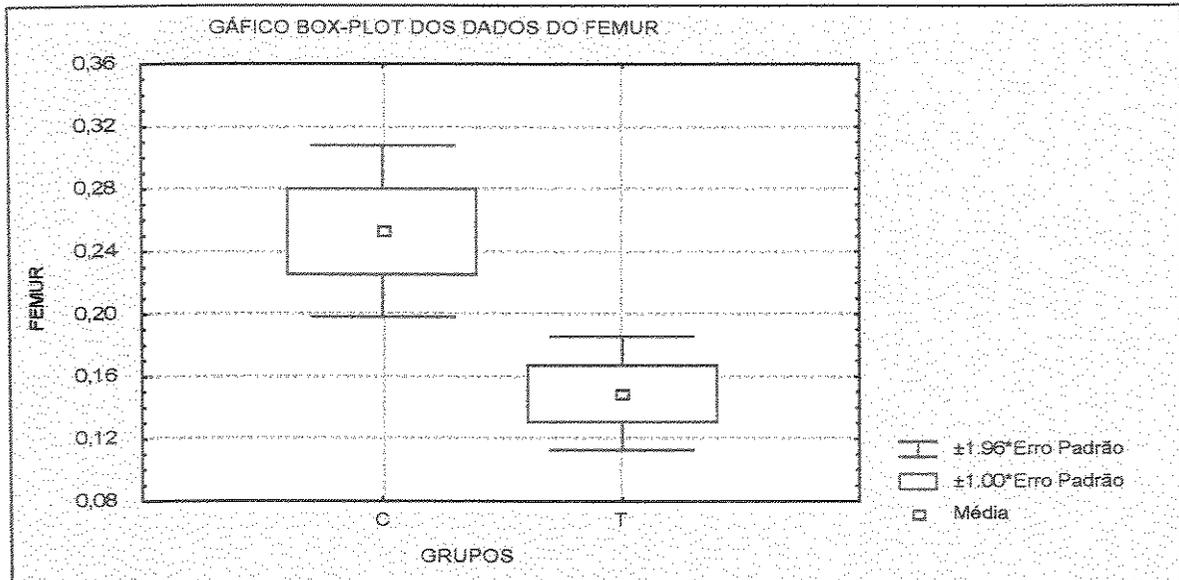
**Tabela 5:** Comparação entre o volume ósseo formado no fêmur entre os períodos (2 vs 4 vs 8 vs 16 semanas) tanto para o grupo não alcoolizado como alcoolizado.

<i>Tukey HSD test; variable FEMUR</i>			
Probabilities for Post Hoc Tests			
	4 SEMANAS	8 SEMANAS	16 SEMANAS
2 SEMANAS	IGUAL (p =0,26133)	NÃO IGUAL (p=0,000235)	NÃO IGUAL (p=0,000159)
4 SEMANAS		NÃO IGUAL (p=0,017076)	NÃO IGUAL (p=0,000295)
8 SEMANAS			IGUAL (p=0,350549)

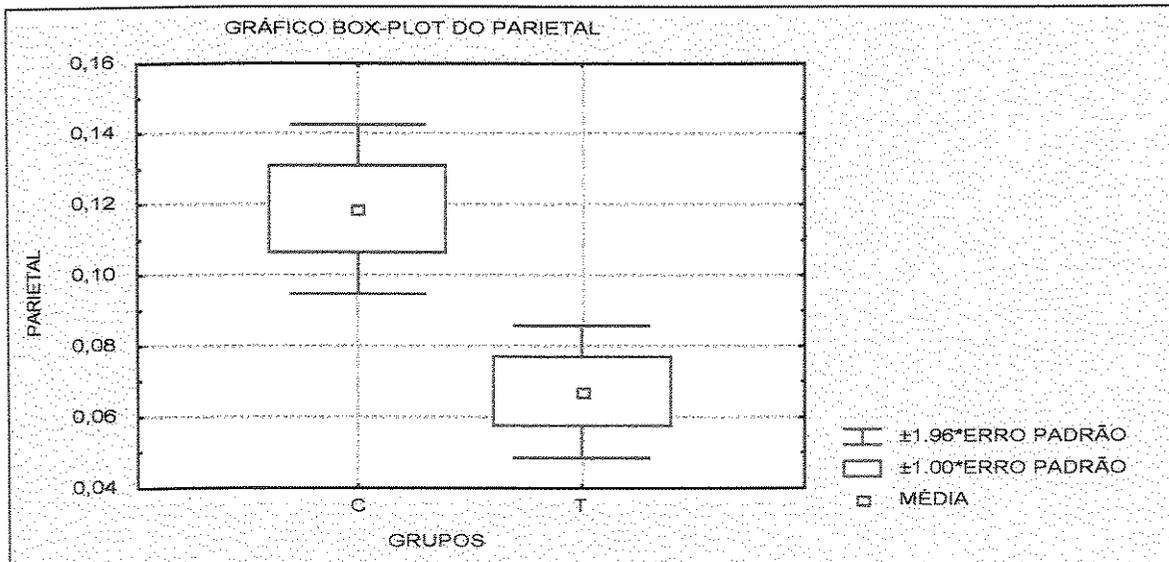
**Tabela 6:** Comparação entre o volume ósseo formado no parietal entre os períodos (2 vs 4 vs 8 vs 16 semanas) tanto para o grupo não alcoolizado como alcoolizado.

<i>Tukey HSD test; variable PARIETAL</i>			
Probabilities for Post Hoc Tests			
	4 SEMANAS	8 SEMANAS	16 SEMANAS
2 SEMANAS	IGUAL (p = 0,48144)	NÃO IGUAL (p= 0,000728)	NÃO IGUAL (p= 0,000478)
4 SEMANAS		NÃO IGUAL (p= 0,026453)	NÃO IGUAL (p= 0,016137)
8 SEMANAS			IGUAL (p= 0,99696)

**Gráfico 5:** Comparação do volume ósseo formado no fêmur entre grupo não alcoolizado (Controle-C) e alcoolizado ( Tratado-T).



**Gráfico 6:** Comparação do volume ósseo formado no parietal entre grupo não alcoolizado (Controle-C) e alcoolizado (Tratado-T).



**Gráfico 7:** Comparação do volume ósseo formado entre os tipos de ossos (Fêmur vs Parietal), correspondendo tanto para o grupo não alcoolizados como para o alcoolizado.

