

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



INSTITUTO DE BIOLOGIA

EVELISE ALINE SOARES

EFEITOS DO ETANOL E NICOTINA SOBRE A RESISTÊNCIA MECÂNICA DO OSSO E OSTEOGÊNESE AO REDOR DE IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Evelise Aline Soares 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

Campinas, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>So11e</b>	<p>Soares, Evelise Aline Efeitos do etanol e nicotina sobre a resistência mecânica do osso e osteogênese ao redor de implantes de hidroxiapatita / Evelise Aline Soares. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: José Angelo Camilli. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Álcool. 2. Nicotina. 3. Ossos - Crescimento. 4. Implantes ortopédicos. 5. Hidroxiapatita. I. Camilli, José Angelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Effects of ethanol and nicotine on the mechanical resistance of the bone and osteogenesis around hydroxyapatite osteogenesis.

**Palavras-chave em inglês:** Alcohol; Nicotine; Bones - Growth; Orthopedic implants; Hydroxyapatite.

**Área de concentração:** Anatomia.

**Titulação:** Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** José Angelo Camilli, Valéria Helena Alves Cagnon Quitete, Eliane Maria Ingrid Amstalden.

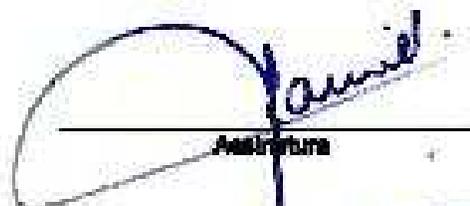
**Data da defesa:** 25/06/2007.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 25 de Junho de 2007.

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. José Angelo Camilli (Orientador)**



Assinatura

**Profª. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden**



Assinatura

**Profª. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quiteto**



Assinatura

**Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos**

Assinatura

**Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia**

Assinatura

## DEDICATÓRIA

### A DEUS

*“Porque tu és minha rocha e a minha fortaleza, pelo que, por amor do teu nome, guia-me e encaminha-me” (Salmo 31:3).*

### AOS MEUS PAIS, VICENTE E PENHA

*“...Se um dia, já homem feito e respeitado, sentires que a terra cede aos teus pés, que tuas obras se desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: Meu pai, minha mãe...” (Rui Barbosa).*

Obrigada pelas oportunidades, amizade, amor incondicional e presença em cada momento de minha vida. Amo vocês.

### A MEU AMOR, THIAGO

*"O amor é uma companhia. Já não sei andar só pelos caminhos. Porque já não posso andar só." (Fernando Pessoa)*

O seu carinho, apoio, incentivo, companheirismo, respeito e fiel presença são fundamentais em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

### **AO MEU ORIENTADOR, PROF. DR. JOSÉ ÂNGELO CAMILLI**

*"A ciência se construiu não pela prudência dos que marcham, mas pela ousadia dos que sonham." (Rubem Alves)*

Agradeço a atenção, ensinamentos, paciência e por tornar meu sonho uma realidade.

### **AOS MESTRES, DR. NEMAN, DRA. ANELENA E LUCIANE RIHEL**

*"O segredo de um sucesso esta em se ter uma oportunidade, não aquela que se conquista, mas aquela, em que de repente alguém chega e lhe abre uma porta" (Aylton Senna).*

*Obrigada pelas lições de vida, respeito, carinho e eterna amizade.*

### **AO CADÁVER**

*"Você nasceu, cresceu, sorriu, chorou, sonhou, por certo amou e foi amado e, com seu abnegado silêncio, nos permitiu o primeiro contato com a natureza física do homem. Ofereceu seu coração para quem nunca soube seus sentimentos. Abriu sua cabeça para quem nunca soube seus mistérios e pensamentos. Deu suas mãos para quem nunca soube o peso que carregaram e seus pés para quem nunca soube os caminhos que percorreram. Vimos seus olhos mas nunca saberemos das visões que tiveram. Você expôs seu corpo ao nosso bisturi e, sem nada exigirem troca, sem nada perguntar, se fez mestre. Seja qual for a sua história, você se tornou parte da nossa. Muito obrigado."*

A minha sogra, *Maria Rosa Gomes da Silva* e sogro *João Donizeth da Silva*, pelo carinho, apoio e amizade.

A meu sobrinho *Fabrcício Gomes da Silva* pela ajuda nas correções ortográficas da dissertação.

A Unifenas, em especial a *Prof. Edson Antonio Vellano, Profa. Marlene Leite Godoy Vieira de Souza, Prof. Rogério Ramos do Prado*, pelo apoio, presteza, confiança e oportunidade de exercer a docência.

Ao amigo *Prof.Dr. José Carlos Marino (in memorian)*, pelo incentivo a realização de minha pós-graduação.

Aos amigos de trabalho no Centro Anatômico da Unifenas, *Prof. Dr. Geraldo José Medeiros Fernandes, Dr. Douglas Bueno, Dr Clemente Pinto Rodrigues, Célio Vilhena e Carlos Roberto Santos*, pela amizade ao longo de minhas jornadas de trabalho.

Ao amigo *Antônio Marcos Santos*, técnico do laboratório de histologia da Unifenas que com muita atenção e carinho me auxiliou na realização dos cortes histológicos de meu estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural pelo acolhimento e minha formação.

Aos Professores, *Dr. Humberto Santo Neto, Dra. Maria Júlia Marques e Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira* pelos conhecimentos, respeito, incentivo, sugestões e considerações no Exame de Qualificação.

A *Profa. Valéria Helena Cagnon Quitete* pelos conhecimentos, respeito, amizade, sugestões ao longo do desenvolvimento da tese e atenção no Exame de Proficiência em Língua Estrangeira.

A *Profa. Evanise Teresa Palomari* pelo apoio, conhecimentos e atenção ao longo das disciplinas coordenadas por ela.

As Sras. *Lilian Alves Senne Panagio, Lourdes Pinheiro e Ana Floriano Rodrigues*, pela atenção que me dispensaram durante o mestrado.

Aos colegas de pós-graduação, que sempre estiveram prontos a me ajudar e esclarecer dúvidas.

Aos técnicos do laboratório de Anatomia, *Paulo Afonso Bernardes, Norivaldo Celestino, Marco Aurélio Ribeiro e Marlene Lima* pela atenção e presteza em todos os momentos.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	01
1.1 REPARO ÓSSEO E IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA .....	02
1.2 EFEITOS DO ÁLCOOL SOBRE O TECIDO ÓSSEO .....	04
1.3 EFEITOS DA NICOTINA SOBRE O TECIDO ÓSSEO .....	06
2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA .....	09
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
3.1 PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO DOS ANIMAIS .....	12
3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	13
3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO .....	14
3.4 TESTE MECÂNICO .....	16
3.5 ESTUDO ESTATÍSTICO .....	16
4 RESULTADOS .....	18
4.1 CONSUMO DA DIETA LIQUIDA .....	19
4.2 CONSUMO DA DIETA SÓLIDA .....	20
4.3 GANHO DE PESO CORPORAL .....	22
4.4 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS DOS ANIMAIS .....	23
4.5 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS .....	24
4.5.1 IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA Densa.....	24
4.5.2 IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA POROSA .....	27
4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	31
4.6.1 IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA Densa .....	31

4.6.2 IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA POROSA .....	32
4.7 TESTE MECÂNICO DOS FÊMURES.....	33
4.8 DOSAGEM DE CÁLCIO SANGÜÍNEO.....	34
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÃO.....	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
8 APÊNDICES .....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

A - Grupo Álcool

BMP - Proteína Morfogenética Óssea

CT - Grupo Controle

dL – Decilitro

FIG - Figura

g – Gramas

HA – Hidroxiapatita

HAD – Hidroxiapatita densa

HAP – Hidroxiapatita porosa

H&E – Hematoxilina & Eosina

mL - Mililitro

mm – Milímetro

N – Grupo Nicotina

N+A – Grupo Nicotina+álcool

OMS - Organização Mundial da Saúde

PTH – Paratormônio

SESSP – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

S/C – Sem e Com

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 01</i> – Média (g), peso inicial e final dos animais dos Grupos CT, A, N e N+A durante os 90 dias de experimento-----	22
<i>Tabela 02</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) Do consumo líquido dos grupos ao longo de 90 dias de experimento -----	71
<i>Tabela 03</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do consumo de dieta sólida dos grupos ao longo dos 90 dias de experimento-----	71
<i>Tabela 04</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) Do Ganho de Peso (gramas) dos grupos ao longo de 12 semanas-----	71
<i>Tabela 05</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do volume ósseo neoformado ao redor do implante de HAD-----	72
<i>Tabela 06</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do consumo volume ósseo neoformado ao redor do implante de HAP-----	72
<i>Tabela 07</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do ensaio mecânico dos fêmures-----	72
<i>Tabela 08</i> – Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do nível de cálcio sérico sanguíneo-----	73

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 01.</i> Colocação do implante de hidroxiapatita (HÁ) na cavidade produzida na tíbia do animal-----	14
<i>Figura 02.</i> Médias (mL) e Desvio padrão do volume de líquido ingerido semanalmente-----	19
<i>Figura 03.</i> Consumo Líquido (mL) dos Grupos CT, N, A e N+A ao longo de 12 semanas de tratamento-----	21
<i>Figura 04.</i> Médias (g) e desvio-padrão do volume sólido ingerido semanalmente-----	21
<i>Figura 05.</i> Consumo Sólido (g) dos Grupos CT, A, N e N+A ao longo de 12 semanas de tratamento -----	22
<i>Figura 06.</i> Média (%) do ganho de massa corporal dos grupos ao longo dos 90 dias de experimento-----	23
<i>Figura 07 e 08.</i> Corte transversal da tíbia de animal do grupo CT (controle)----	25
<i>Figura 09 e 10.</i> Corte transversal da tíbia de animal do grupo N (nicotina)-----	25
<i>Figura 11 e 12.</i> Corte transversal da tíbia de animal do grupo A (Álcool)-----	26
<i>Figura 13 e 14.</i> Corte transversal da tíbia de animal do grupo N + A (nicotina + álcool)-----	26
<i>Figura 15 e 16.</i> Corte transversal da tíbia do animal do grupo controle (CT)--	28
<i>Figura 17 e 18.</i> Corte transversal da tíbia do animal do grupo nicotina (N)-----	28
<i>Figura 19 e 20.</i> Corte transversal da tíbia do animal do grupo álcool (A)-----	30

<i>Figura 21 e 22.</i> Corte transversal da tíbia do animal do grupo nicotina+álcool (N+A)-----	30
<i>Figura 23.</i> Média (%) do volume ósseo relativo formado na tíbia esquerda (HAD) dos animais dos grupos CT, A, N e N+A.-----	31
<i>Figura 24.</i> Média (%) do volume ósseo relativo formado na tíbia direito (HAP) dos animais dos grupos CT, A, N e N+A.-----	32
<i>Figura 25.</i> Média da Força (N) e desvio-padrão para ruptura dos fêmures no ensaio mecânico-----	33
<i>Figura 26.</i> Média do nível de Cálcio sérico e desvio padrão obtido através amostra de sangue dos animais do grupo CT, A, N e N+A-----	34

## RESUMO

### “EFEITOS DO ETANOL E NICOTINA SOBRE A RESISTÊNCIA MECÂNICA DO OSSO E OSTEOGÊNESE AO REDOR DE IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA”

---

O consumo de álcool ou nicotina é prejudicial à integridade do tecido ósseo, conseqüentemente, pode dificultar ou até mesmo impedir a fixação e manutenção dos implantes osseointegráveis. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do etanol e nicotina sobre a resistência mecânica do osso e a neoformação óssea ao redor de implantes de hidroxiapatita, quando consumidos isoladamente e simultaneamente. Foram utilizados 20 ratos divididos em quatro grupos de 05, sendo controle (CT), álcool (A), nicotina (N) e nicotina+álcool (N+A). Após quatro semanas de consumo de álcool e/ou nicotina, corpos cerâmicos densos (HAD) e porosos (HAP) de hidroxiapatita foram implantados em cavidades produzidas cirurgicamente nas tíbias. Após as cirurgias os animais continuaram a consumir álcool e/ou nicotina. Completado noventa dias, os animais foram sacrificados e as tíbias e fêmures isolados para o processamento histológico e ensaio mecânico. Em todos os animais foi encontrado tecido ósseo junto aos corpos cerâmicos de HAD e HAP. O volume de osso formado ao redor dos corpos cerâmicos foi maior no grupo CT em relação aos demais grupos. Os animais do grupo N+A foram aqueles que apresentaram menor volume de osso neoformado. Nos animais do grupo A ocorreu formação de menor volume de osso ao redor dos implantes em relação aos animais do grupo Nicotina. A menor resistência do osso a cargas mecânicas foi encontrada nos animais do grupo N, A e N+A, respectivamente. De acordo com os resultados podemos concluir que o consumo de nicotina ou álcool produziu efeito negativo sobre a resistência mecânica do osso e osteogênese ao redor dos implantes de HAD e HAP. Em adição, o consumo simultâneo das duas substâncias intensificou os efeitos deletérios.

## ABSTRACT

### "EFFECTS OF ETHANOL AND NICOTINE ON THE MECHANICAL RESISTANCE OF THE BONE AND OSTEOGENESIS AROUND HYDROXYAPATITE IMPLANTS "

---

The consumption of alcohol or nicotine is harmful to the integrity and mechanical resistance of the bone. Consequently, it can difficult or even prevent the osseointegration and maintenance of bone implants. The objective of the present work was to evaluate the effects of the ethanol and nicotine on the mechanical resistance of the bone and newly formed bone around hydroxyapatite implants, when consumed separated and simultaneously. A total of 20 adults rats were divided into 4 groups of 5 rats each, being control (CT), alcohol (A), nicotine (N) and nicotine+alcohol (N+A). After four weeks of consumption of alcohol and nicotine, dense (HAD) and porous (HAP) ceramic bodies of hydroxyapatite were implanted in cavities produced surgically in the tibiae. After the implantation the animals continued to consume alcohol and nicotine. Completed ninety days, the animals were sacrificed and the tibiae and femurs were isolated to histological and mechanical studies. In all animals was founded newly formed bone around the ceramic bodies of HAD and HAP. The bone volume formed around of the ceramic bodies was larger in the group CT than that founded in the other groups. The animals of the group N+A presented smaller volume of newly formed bone. In the animals of the group A was founded smaller volume o bone than in the animals of the group N. The resistance of the femur to mechanical loads was smaller in the animals that consumed N+A, A e N respectively. In agreement with the results we can conclude that the nicotine or alcohol consumption produced negative effect on the mechanical resistance of the bone and osteogenesis around the HAD and HAP implants. In addition, the simultaneous consumption of the two substances intensified the harmful effects.

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 REPARO ÓSSEO E IMPLANTE DE HIDROXIAPATITA

Os ossos são estruturas rígidas e representam os principais elementos de sustentação do corpo. Trata-se de um tecido mineralizado que exhibe, além de suas propriedades mecânicas, capacidade de regeneração espontânea. Assim sendo, os defeitos ósseos podem ser reparados pela produção de tecido novo com a mesma organização estrutural do tecido original. No entanto, esta capacidade regenerativa é limitada, de modo que o reparo de lesões com grande perda de massa óssea provocadas por traumas, infecções ou ressecções de neoplasias representam um desafio para as cirurgias reconstrutivas nas áreas médica e odontológica (SAKAKURA et al., 2001).

Atualmente, enxertos ósseos com materiais autógenos têm sido o material de primeira escolha na reconstrução dos defeitos ósseos, pois, são fontes de células osteogênicas, osteocondutores e não promovem reações de imunogenicidade. As áreas doadoras freqüentemente utilizadas são: crista ilíaca, mandíbula, túber da maxila, costelas, tíbias e fíbulas (CITARD e FRIEDMAN, 1994; TRIPLETT e SCHOW, 1996; LEKHOLM et al. 1999). Apesar das vantagens oferecidas por esses enxertos, o procedimento para a sua obtenção acarreta tempo operatório maior, dobra os locais cirúrgicos e nem sempre oferece quantidade de osso suficiente para o reparo. Além disso, quando se trata de auto-enxerto, aumenta a morbidade e quando a área doadora é o osso ílio pode deixar seqüelas no contorno anatômico secundária à perda óssea, além de lesão do nervo cutâneo lateral da coxa e

herniações na região inguinal (FORREST et al., 1992; BROECKE et al., 1998; HILL et al., 1999).

Devido às limitações para obtenção do enxerto de osso autógeno, busca-se um substituto seguro para eles. Desta necessidade, surgiram os implantes de biomateriais que visam manter as mesmas características físicas, químicas e mecânicas do enxerto ósseo quando colocados na área receptora (BERTRAN et al., 2000) e entre estes materiais destaca-se a hidroxiapatita sintética.

A hidroxiapatita sintética é uma biocerâmica amplamente estudada, pois apresenta composição química similar ao osso humano, não é tóxica e possui forte estabilidade química. Quando utilizada *in vivo* não apresenta reações inflamatórias e antigênicas sendo, portanto, biocompatível (ASHBY et al., 1996; FORTUNATO et al., 1997; PERRY et al., 1998; OHBAYASHI et al., 2000; ONO et al., 2000, LEGEROS, 2002). Ela apresenta fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , sendo o principal componente mineral dos tecidos mineralizados do corpo humano. Para o uso clínico a hidroxiapatita pode ser produzida em pó ou blocos densos ou porosos, com diferentes granulações e associada a diversos materiais como o colágeno, matriz óssea desmineralizada e proteínas osteoindutoras (DAMIEN et al., 1990, VIDIGAL e GOISMAN, 2003).

Segundo Stobaugh (1992), o consumo excessivo de álcool e/ou cigarro pode comprometer a neoformação óssea, assim como a osseointegração do implante de HA, uma vez que tais substâncias podem levar à citólise de osteócitos, diminuição da concentração da proteína morfogenética óssea (BMP) e da fosfatase alcalina,

podendo também diminuir a densidade mineral óssea (LORENZ e LORENZ, 1983; DIAMONT, 1989; FRIDAY e HOWARD, 1991).

## 1.2 EFEITOS DO ÁLCOOL SOBRE O TECIDO ÓSSEO

O alcoolismo é uma doença crônica, geralmente progressiva, provocada pela ingestão excessiva de álcool etílico. A Organização Mundial da Saúde (OMS) define como alcoolismo a ingestão diária de álcool superior a 50 g na mulher e 70 g no homem (SESSP, 2005; KUMAR, JAFFIN e BERMAN, 2002). As repercussões dos transtornos decorrentes do consumo de bebidas alcoólicas são bem conhecidas e descritas na literatura, havendo conseqüências negativas de ordens psíquica, orgânica e socioeconômica (KAPLAN, 1997; SINBOGA et al., 2007; KUMAR, JAFFIN e BERMAN, 2002). Aproximadamente 15% da população brasileira é alcoolista e dados obtidos em outros países giram em torno de 12% a 13% (CRUZ, 2005).

O etanol, principal componente das bebidas alcoólicas, age como elemento tóxico a órgãos vitais, atuando nocivamente mesmo nos tecidos mais resistentes do organismo, como o osso. Friday e Howard (1991) estudaram os efeitos do etanol em células ósseas humanas “in vitro” e encontraram redução da proliferação celular, menor síntese protéica e pouca atividade da fosfatase alcalina. Estudos de Klein et al. (1996), evidenciaram que pacientes alcoolistas estão mais sujeitos as fraturas, osteopenia e alterações na regeneração óssea, que se mostra reduzida e aberrante.

Pesquisas realizadas com animais também evidenciaram a nocividade do etanol sobre tecido ósseo. Peng et al. (1991), submeteram ratos jovens à ingestão

crônica de etanol e concluíram, através de estudos histomorfométricos, que o álcool afetou a velocidade de formação de osso a partir do endóstio e perióstio, além do comprometimento das propriedades mecânicas do osso. Sampson (2002), constatou que ratos tratados com etanol apresentavam baixa densidade óssea e diminuição na regeneração óssea e Chen et al. (2001) em estudo com hamsters tratados com etanol por 5 meses observou alterações nas mitocôndrias das células ósseas.

Estudos realizados por Sinboga et al. (2007), demonstraram através de densitometria óssea e histomorfometria de ossos de ratos submetidos ao alcoolismo experimental, apresentavam os conteúdos minerais, densidade e osteogênese reduzidas.

Estudos têm demonstrado também a associação entre redução dos níveis de cálcio e a ingestão de álcool, sendo explicada pela inibição aguda mediada pelo etanol do efluxo de cálcio do osso para o plasma (HEMMINGSEN e KRAMP, 1980; MONEY et al. 1989). A hipocalcemia associada ao consumo de álcool pode ser explicada pelos seguintes mecanismos: 1) Diminuição da resposta óssea ao PTH (hormônio paratireóideano) e/ou um hipoparatiroidismo transitório; 2) Hipomagnesemia; pancreatite aguda e anormalidades no metabolismo do cálcio como a diminuição da absorção intestinal ou aumento de sua excreção renal (LAITINEN et al., 1991; SAVILLE, 1975).

Segundo Albrektsson et al. (1993), o etanol interfere negativamente no processo de osseointegração de biomateriais, inviabilizando, às vezes, sua utilização e influenciando no prognóstico da reparação óssea. Estudo realizado por Camilli et al. (2004), demonstrou que o consumo de etanol não impediu a osseointegração de

hidroxiapatita implantado subperiostealmente em ratos, no entanto, provocou atraso no processo de neoformação óssea e diminuição no volume do osso formado na área receptora.

### **1.3 EFEITOS DA NICOTINA SOBRE O TECIDO ÓSSEO**

Estatísticas apontam que, no mundo há cerca de 1,1 bilhões de fumantes para uma população de 6 bilhões de pessoas. O cigarro é constituído por tabaco, nicotina, alcatrão e outras 4,7 mil substâncias, entre estas, metais pesados como o Chumbo, Cádmio e alguns elementos radioativos (LEITE, 2001).

A nicotina é um componente tóxico do cigarro, podendo gerar inúmeras doenças e retardar o processo de cicatrização, pois induz diminuição do número de neutrófilos e macrófagos. Também provoca aumento de agregação plaquetária, o que reduz a microperfusão sangüínea, estimulando a formação de micro-coágulos resultando em trombos, que associados a vasoconstrição geram isquemia tecidual (SILVERSTAIN, 1992 e SAKAKURA et al., 2001).

Sweet e Butler (1979) e Jones e Triplett (1992), observaram que pacientes tabagistas apresentavam cicatrização deficiente em relação aos não tabagistas. Fumantes com doenças periodontais apresentavam poucos sangramentos gengivais, provavelmente devido à influência da nicotina sobre a vascularização local e seu poder trombogênico (BERGTROM, ELISSON e PREBER, 1991).

O tabagismo influencia de forma negativa a implantologia. O paciente tabagista apresenta maior possibilidade de insucesso na fixação de implantes, uma

vez que a nicotina leva a redução mineral da matriz óssea. Desta forma, quanto maior o consumo de cigarro maior a perda óssea peri-implantar (LINDIQUINST, CARLSSON e JEMT, 1997). Segundo Peacock et al. (1993) o reparo ósseo e a osseointegração de implantes podem ser dificultadas pela ação da nicotina, pois ela estimula a proliferação e adesão do fibroblasto junto ao implante, além de induzir decréscimo da atividade das células osteogênicas. Por outro lado, Kumar, Jaffin e Berman (2002) depois de acompanhar por 18 meses, 461 pacientes fumantes e não fumantes, obtiveram 98,1% e 98,4% de sucesso respectivamente, utilizando implantes de titânio com superfície modificada. Eles concluíram que a superfície do implante pode ter papel crítico para osseointegração e que aparentemente o fumo não interferiu de modo significativo no processo. Sakakura, Marcantonio e Rezende (2001), concluíram que o tabagismo não contra indica a terapia com implantes osseointegrados, mas, em função dos fracassos observados em pacientes, é importante um planejamento criterioso, manutenção rigorosa e em determinadas fases do tratamento a suspensão do hábito de fumar.

Estudos experimentais demonstraram a nocividade da nicotina sobre tecido ósseo. Broulik e Jarab (1993) constataram redução significativa da densidade óssea de fêmures de ratos tratados com nicotina via água de bebedouro. Silcox et al. (1995), demonstraram que ratos tratados com nicotina apresentavam perda de massa óssea quando comparados com os não tratados. Nociti e Neto (2002) e Nociti et al. (2002) estudaram a densidade e volume ósseo ao redor de implantes colocados nas tíbias de ratos e concluíram que a exposição dos animais à fumaça do

---

cigarro não afetou seriamente a densidade da cortical óssea, no entanto, prejudicou o volume do osso formado ao redor do implante na região de osso esponjoso.

## **2 OBJETIVO E JUSTIFICATIVA**

Pelo exposto, o consumo de álcool ou de nicotina é prejudicial à integridade do tecido ósseo, conseqüentemente, pode dificultar e até mesmo impedir a fixação e manutenção dos implantes osseointegráveis. Desta forma, e considerando o grande número de indivíduos alcoolistas e tabagistas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar experimentalmente os efeitos do etanol e da nicotina concomitantemente sobre a resistência mecânica do osso e neoformação óssea ao redor de implantes de hidroxiapatita densa e porosa, quando consumidos isolados e simultaneamente.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 PROCEDIMENTO DE TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Um total de 20 ratos machos (*Rattus norvegicus*) com 45 dias foram utilizados, procedentes do Centro de Bioterismo da Unicamp e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia em dez gaiolas com dois animais cada. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (CT), alcoolista (A), nicotina (N) e nicotina alcoolista (N+A), cada grupo contendo 05 animais. O grupo CT recebeu água, ao grupo A foi oferecido etanol diluído a 10%, no grupo N foi administrado diariamente por via subcutânea 0,125 mg/100g de peso corpóreo/diariamente de nicotina (Sigma, St. Louis, USA) e o grupo N+A recebeu etanol e nicotina seguindo o tratamentos dos grupos A e N. Antecedendo o início do experimento, os animais dos grupos N e N+A foram submetidos a um período de adaptação, durante qual inicialmente foi administradas diariamente injeções de 0,0625 mg/100g da droga por duas semanas e em seguida as dosagens foram aumentadas para 0,125 mg/100g ao longo de mais 90 dias, seguindo o protocolo proposto por Favaro e Cagnon (2006) e Riesenfeld e Oliva (1988). Os animais dos grupos CT e A foram submetidos ao mesmo estresse que os animais dos grupos N e N+A, sendo administrado via subcutânea injeções de solução salina. A administração da droga foi realizada mantendo-se regularidade de horários. Todos os animais receberam a mesma dieta sólida e água *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Semanalmente eles, foram pesados e mensurados o consumo sólido e líquido,

sendo realizada a troca da água e nova diluição do etanol. A partir destes dados foi calculada a ingestão calórica média dos animais nos diferentes grupos de estudo.

### **3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO**

Após quatro semanas de tratamento todos os animais foram submetidos à cirurgia para implantação da hidroxiapatita nas tíbias direita e esquerda. Corpos cerâmicos densos e porosos de hidroxiapatita com 2 mm de diâmetro e 3 mm de comprimento foram produzidos pelo Instituto de Química da Unicamp. A cerâmica preparada na forma porosa apresentava poros com dimensões variando de 4 a 100 micrômetros.

Os animais foram anestesiados através de injeções intramusculares de solução 1:1 de Ketamina (Francotar) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) na dose de 0.10 ml/100g. Após a tricotomia e a incisão longitudinal na pele, o periósteo da face medial da epífise proximal da tíbia foi descolado com o afastador de periósteo expondo a cortical do osso. Com auxílio de uma broca odontológica (2 mm) acoplada a um minimotor de baixa rotação e sob irrigação de solução fisiológica, uma cavidade foi produzida bilateralmente na tíbia esquerda foi implantada Hidroxiapatita Densa (HAD) e na direita Hidroxiapatita Porosa (HAP) (Fig. 01). Após a colocação dos implantes, o periósteo foi reposicionado através da sutura de suas bordas com fio de seda 8.0 e a pele foi suturada com fio de algodão 4.0.

Subseqüente a cirurgia, os animais receberam água com Dipirona por 24 horas, e em seguida, os animais voltaram ao tratamento com nicotina e/ou etanol. Ao

completar 90 dias de experimentação todos os animais foram sacrificados utilizando dose excessiva de solução anestésica de Ketamina e Cloridrato de Xylazina (0.30/100g), seguida de pneumotórax. Imediatamente após o sacrifício, foi realizada coleta de sangue através de punção em ventrículo esquerdo para exame de dosagem de cálcio sérico. O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em pesquisa Animal e aprovado sob o Parecer 658-3.



**FIGURA 01.** Colocação do implante de hidroxiapatita (HA) na cavidade produzida na tíbia do animal.

### 3.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E MORFOMÉTRICO

As tíbias, depois de coletadas, foram fixadas em formol tamponado a 10% por 48 horas e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio

durante 15 dias. Em seguida, as amostras foram reduzidas e processadas através de técnicas histológicas de rotina. Cortes transversais semi-seriados com 6 micrômetros de espessura, e corado com H&E foram obtidos do local de implantação.

A análise quantitativa da espessura do osso formado ao redor do implante de hidroxiapatita baseou-se 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 à fórmula  $V_V = P_P/P_T$  (%), onde:

$V_V$  = densidade de volume ou volume relativo;

$P_P$  = quantidade de pontos sobre o osso neoformado;

$P_T$  = número total de pontos do sistema.

Através de um retículo quadrilátero acoplado na ocular do microscópio de luz, contendo sistema de 100 pontos, foi calculada a densidade do volume ósseo neoformado nos locais do implante de hidroxiapatita em cada animal. Foram utilizados 4 cortes histológicos de mesma espessura para cada área receptora. Esta análise foi feita com a objetiva do microscópio luz Olympus CBB padronizada em aumento de 10 vezes (Carls Zeiss) para todos os cortes histológicos. Os cortes histológicos foram selecionados aleatoriamente e somente após a contagem dos pontos sobre a área receptora foi feita à identificação os animais.

---

### 3.4 TESTE MECÂNICO

Para a realização do teste mecânico, o fêmur direito dos animais foram coletados, limpos e acondicionados em gaze embebida em solução fisiológica (0.9%) e armazenado em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o dia anterior ao ensaio.

Os fêmures foram submetidos a teste mecânico de resistência no Laboratório de Propriedades Mecânicas da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp. O ensaio mecânico foi realizado em um módulo de flexão de três pontos, MTS TestStar II, utilizando um célula de carga de 100 Kgf, a uma velocidade de 1.3 mm/min. A distância entre as duas extremidades ósseas foi de 50 mm e para se obter o valor da resistência, uma carga foi aplicada no terço médio do osso (diáfise) por meio de uma ponta, acoplada em uma máquina de ensaio universal, seguindo protocolo proposto por Ferreira (2002). A resistência mecânica foi obtida com a ruptura dos fêmures após uma célula de carga registrada pelo Módulo de Flexão MTS em Newton (N).

### 3.5 ESTUDO ESTATÍSTICO

A partir dos valores obtidos sobre consumo semanal de líquido e ração por animal, foram calculadas as médias e o desvio-padrão para cada um deles. Foi obtido também o percentual do ganho de massa corporal para cada rato e depois a

---

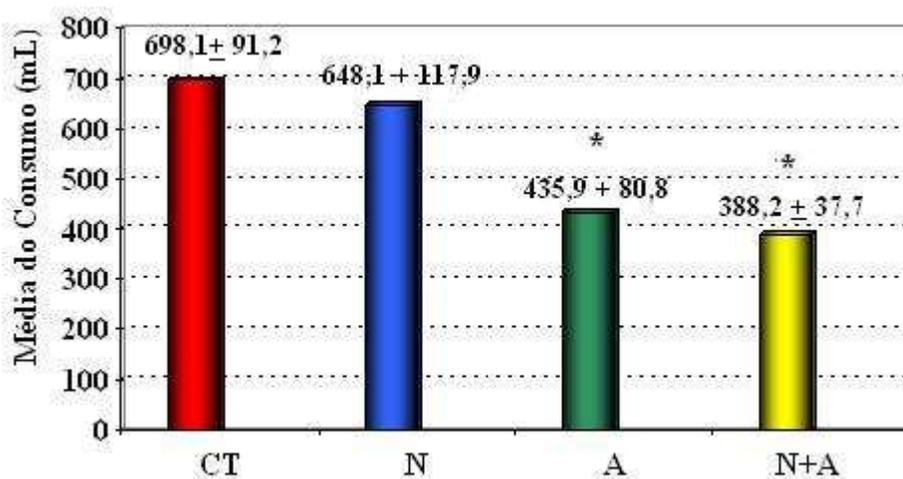
média para cada grupo. De posse desses valores, foi aplicado o teste Tukey-Kramer, programa Instat for Windows, para a comparação entre o grupo controle e os demais.

As médias e desvio-padrão referente ao volume de neoformação óssea foram calculadas e comparadas estatisticamente, do mesmo modo que a dosagem de Cálcio sérico e os valores do ensaio mecânico. Para a comparação estatística entre os grupos foi novamente utilizado a Análise de Comparações Múltiplas através do teste Tukey-Kramer, verificando as diferenças significativas entre os grupos para  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1 CONSUMO DA DIETA LIQUIDA

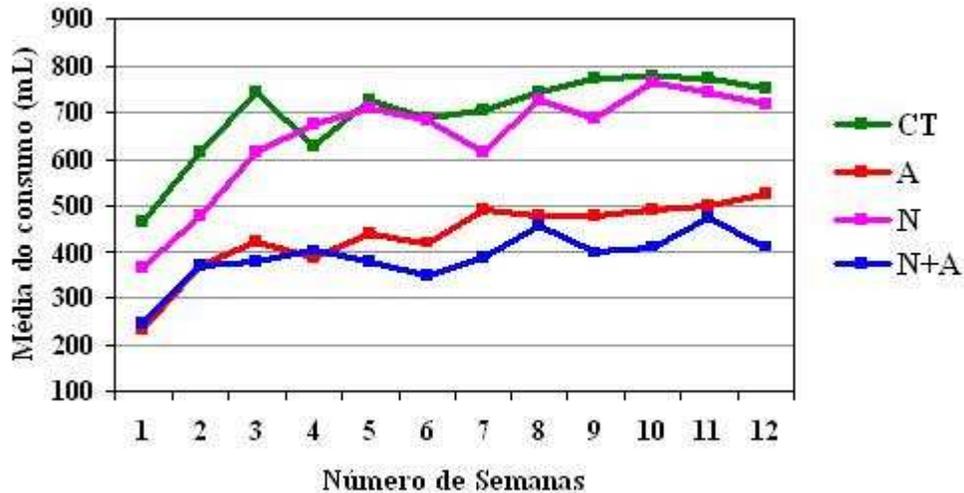
Segue abaixo na Fig 02, a média do consumo líquido dos respectivos grupos, assim como os resultados da análise estatística quanto às diferenças entre os grupos tratados com Álcool (A), Nicotina (N) e Nicotina+álcool (N+A) em relação ao grupo Controle (CT).



**FIG 02.** Médias (mL) e Desvio padrão do volume de líquido ingerido semanalmente e comparação estatística entre o grupo CT e os demais. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo CT.

As médias estatísticas do consumo líquido dos animais do grupo N e CT são estatisticamente iguais, já o consumo do grupo A e N+A apresentam diferenças estatísticas significantes quando comparadas com o grupo CT, o que apresentou maior consumo líquido.

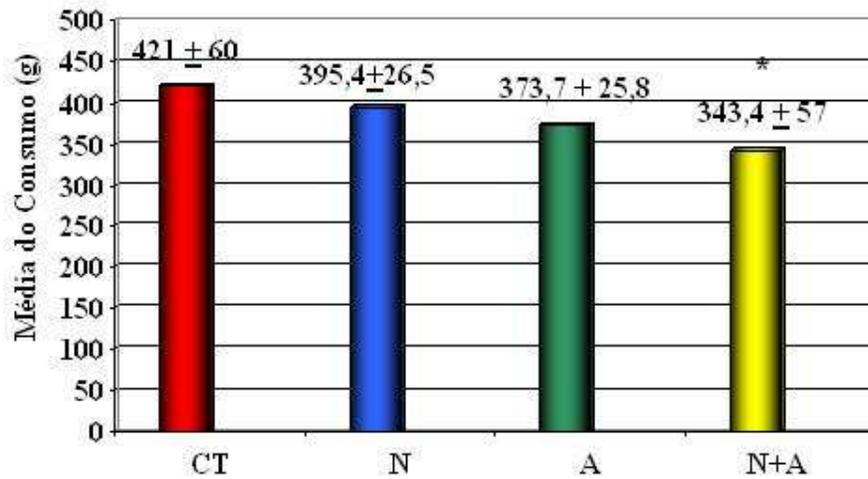
A Fig 03 demonstra que o consumo líquido ao longo das 12 semanas de tratamento foi crescente.



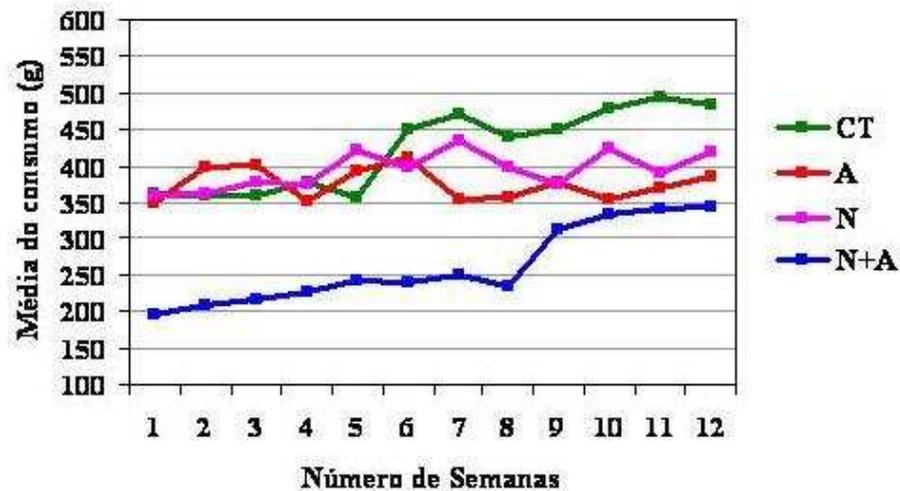
**FIG 03.** Consumo Líquido (mL) dos Grupos CT, N, A e N+A ao longo de 12 semanas de tratamento.

#### 4.2 CONSUMO DA DIETA SÓLIDA

As figuras abaixo demonstram os valores da média de consumo sólido (ração) dos respectivos grupos, assim como os resultados da análise estatística quanto às diferenças entre os grupos tratados com Álcool (A), Nicotina (N) e Nicotina+álcool (N+A) em relação ao grupo controle (CT).



**FIG 04.** Médias (g) e desvio-padrão do volume sólido ingerido semanalmente e comparação estatística entre o grupo CT e os demais. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo CT.



**FIG 05.** Consumo Sólido (g) dos Grupos CT, A, N e N+A ao longo de 12 semanas de tratamento.

As médias de consumo de dieta sólida dos grupos N e A não apresentam diferenças estatísticas quando comparada com a média do grupo CT, já o grupo N+A apresenta uma média inferior à do grupo CT e estatisticamente significativa.

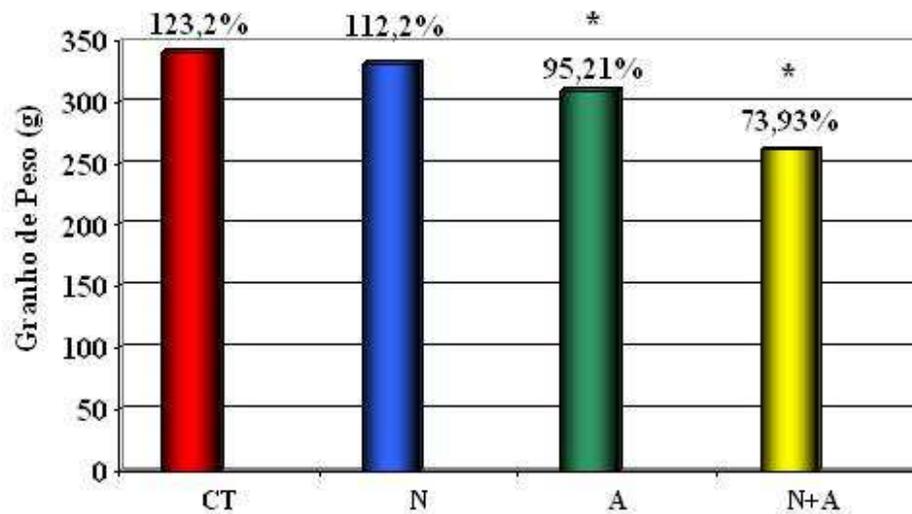
Os animais CT, A, N e N+A consumiram, em média, 46.6; 29.06; 43.2 e 25.87 gramas de ração e 28.06; 24.91; 26.36 e 22.89 mL de água diariamente. A figura 04 demonstra que o consumo sólido ao longo das 12 semanas de tratamento foi uniforme.

### 4.3 – GANHO DE PESO CORPORAL

Os animais não perderam peso no decorrer das 12 semanas de experimento. Em relação ao peso inicial os animais dos grupos CT, N, A e N+A apresentaram um ganho de peso em porcentagem de 123,2%, 112,2%, 95,5% e 74% respectivamente.

**Tabela 01** – Média do peso inicial e final dos animais dos Grupos CT, N, A e N+A.

<b>Grupos</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio-padrão</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>
Grupo CT	341	23.5	198,3	442,6
Grupo A	309,5	17.23	196,4	309,6
Grupo N	331,2	21.4	193,3	410,2
Grupo N+A	262	14.0	196,4	341,6



**FIG 06.** Média (%) do ganho de massa corporal dos grupos ao longo dos 90 dias de experimento e comparação entre estatística entre o grupo CT e os demais. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo CT.

A média de ganho de peso ao longo das 12 semanas de tratamento do grupo CT não difere estatisticamente do grupo N, porém o grupo controle apresenta média superior e diferente dos grupos A e N+A que apresentaram ganho menor de peso.

#### 4.4 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS DOS ANIMAIS

Em relação ao estado de saúde dos animais dos quatro grupos não ocorreram alterações quanto ao aspecto de urina, fezes e pêlos dos animais ao longo do experimento. Na região onde foi implantada a hidroxiapatita não foi observado ulcerações ou complicações no processo de cicatrização na pele dos animais. Os

animais apresentaram rápida recuperação pós-cirúrgica, não comprometendo a deambulação dos animais por mais de 24 horas.

Não foi evidenciado a formação de calo ósseo no sítio de implantação durante ou após o período de tratamento. Também não foi observado processo inflamatório e/ou infeccioso no local de implantação da hidroxiapatita. Aparentemente a hidroxiapatita manteve-se no interior da cavidade óssea, sem a ocorrência de migração de grânulos para outros locais fora da área de implantação.

## **4.5 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS**

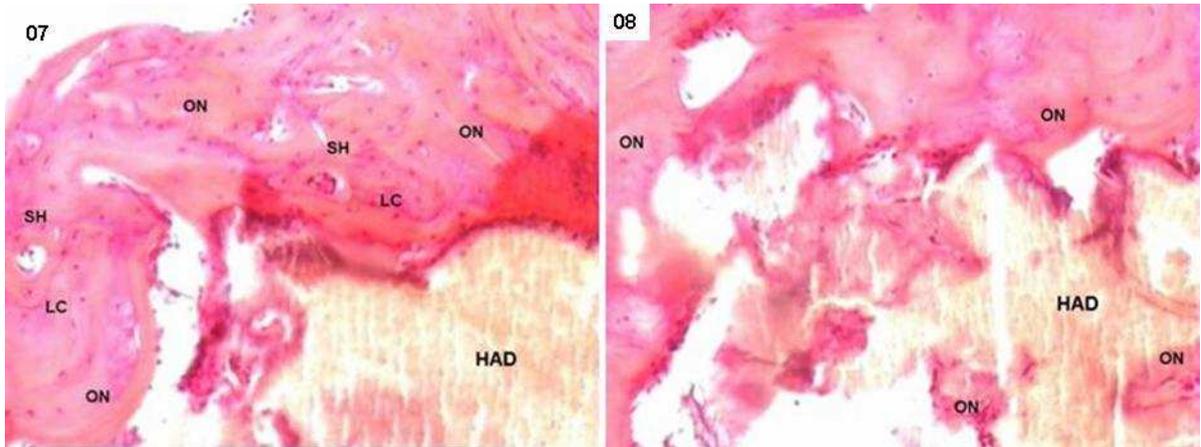
### **4.5.1 IMPLANTE DE HAD**

Em todos os animais do grupo CT foi encontrado osso formado ao redor do implante de Hidroxiapatita Densa. No local de implantação o tecido ósseo apresentava aspecto imaturo em algumas regiões e maturo em outras, podendo ser observado a presença Sistema de Havers com linhas cementantes evidentes. O osso formado era contínuo com a camada cortical da tíbia (Fig 07 e 08).

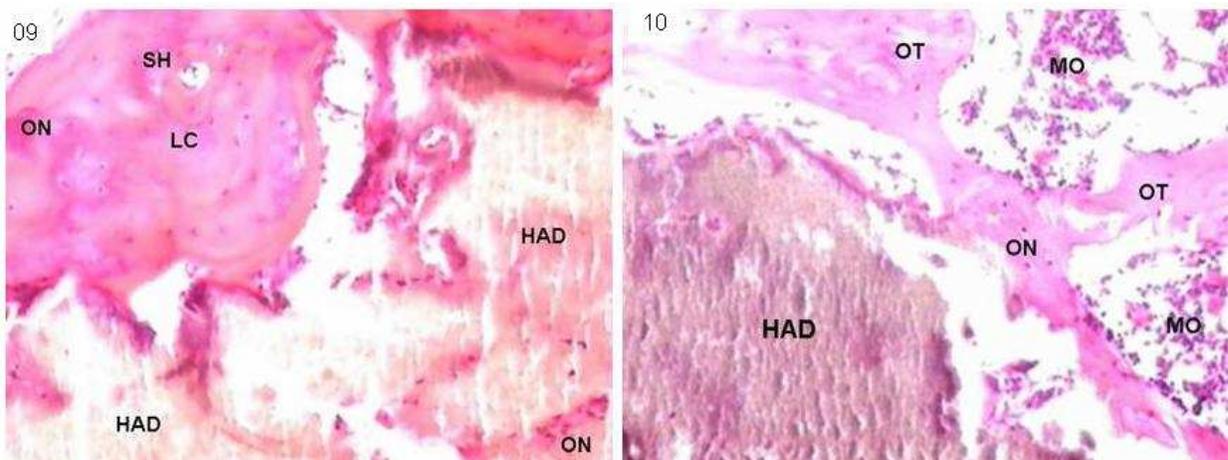
Em nenhum dos casos foi encontrado tecido conjuntivo fibroso na interface implante/osso. O osso formado estava em contato direto com os blocos de HAD. Várias fissuras foram encontradas ao longo da superfície dos blocos da cerâmica, as quais estavam preenchidas com tecido ósseo (Fig 08). O perióstio junto ao sítio de implantação apresentava aspecto histológico normal com pouca atividade osteogênica na sua camada interna.

Os aspectos histológicos do sítio de implantação nos animais do grupo N (Nicotina) são semelhantes ao grupo CT (controle), porém a quantidade de osso

formado ao redor do implante é menor em relação ao grupo CT. O tecido ósseo apresentou aspecto maturo em toda a extensão. Medula óssea foi encontrada em abundância nos espaços formados entre as trabéculas ósseas (figs. 09 e 10).

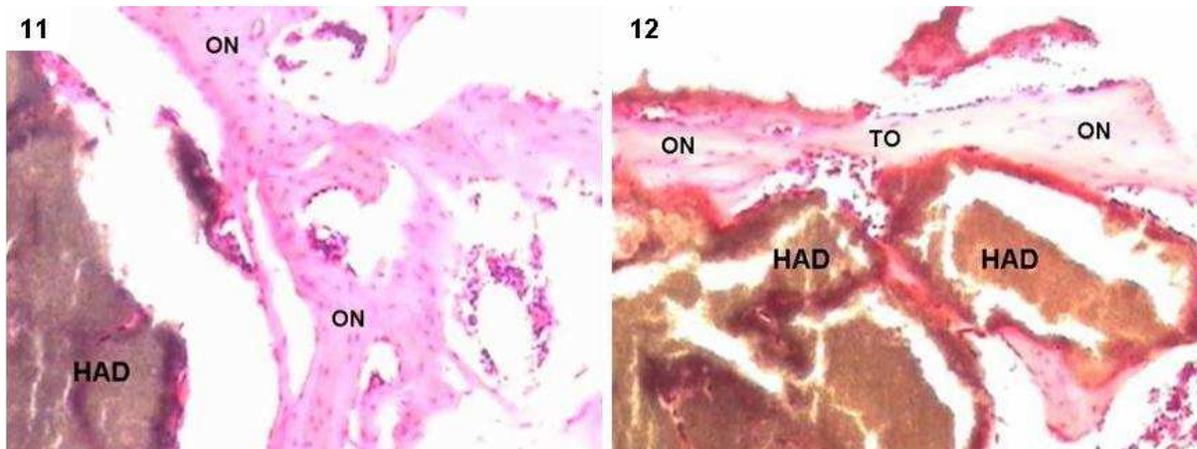


**FIG 07 e 08.** Corte transversal da tíbia de animal do grupo CT (controle). Notar osso neoformado (ON) ao redor implante de HAD com formação de Sistemas de Havers – Ósteons (SH) e linhas cementantes (LC) de conexão. Observar o osso neoformado (ON) no interior do bloco de HAD. (115x – H.E.).

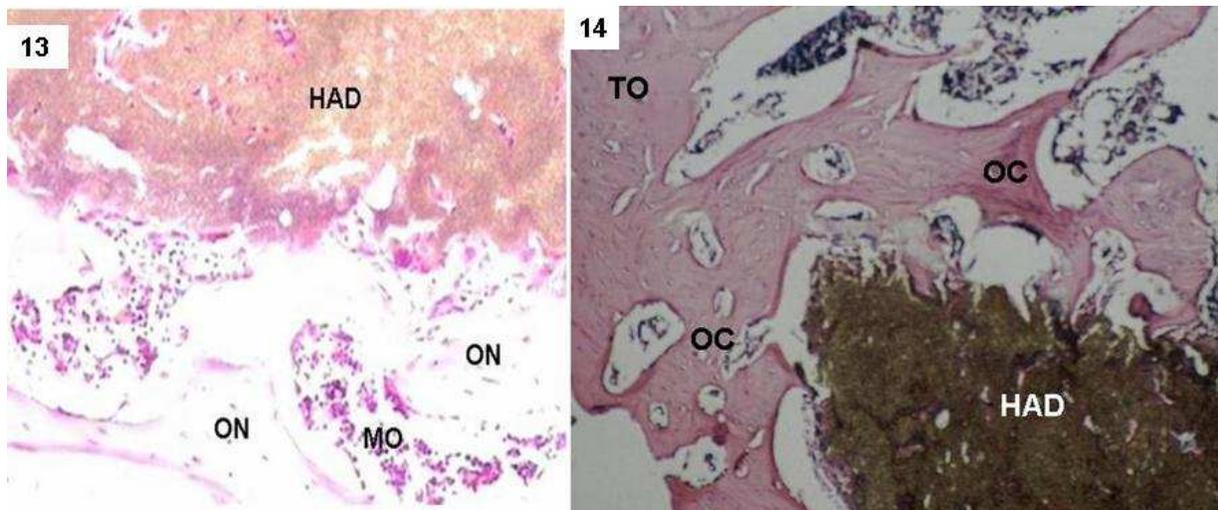


**FIG 09 e 10.** Corte transversal da tíbia de animal do grupo N (nicotina). Notar osso formado ao redor implante de HAD com formação de Sistemas de Havers (Ósteons) (SH) e com linhas cementantes (LC) de conexão. Observar medula óssea (MO) entre as trabéculas ósseas. (115x – H.E.).

Nos animais dos grupos A e N+A as características morfológicas são semelhantes às aquelas encontradas nos animais dos grupos CT (Controle) e N (Nicotina). Contudo menor volume de osso foi observado, podendo ser evidenciado pela menor espessura das trabéculas ósseas (figs. 11, 12, 13 e 14).



**FIG 11 e 12.** Corte transversal da tíbia do grupo A (Álcool). Notar trabéculas ósseas (TC) delgadas ao redor implante de HAD e osso neoformado (ON). (115x – H.E.).



**FIG 13 e 14.** Corte transversal da tíbia de animal do grupo N+A (nicotina+álcool). Notar trabéculas ósseas delgadas ao redor do implante de HAD representado por uma delgada camada. Osso neoformado (ON) apresenta-se em uma delgada camada ao redor do implante, algumas regiões com interposição de tecido conjuntivo (TC). (115x – H.E.).

#### 4.5.2 IMPLANTE DE HAP

A falha produzida na epífise proximal das tíbias dos animais do grupo controle (CT) estava reparada e o osso neoformado exibiu aspecto semelhante ao do tecido ósseo de outras áreas da tíbia.

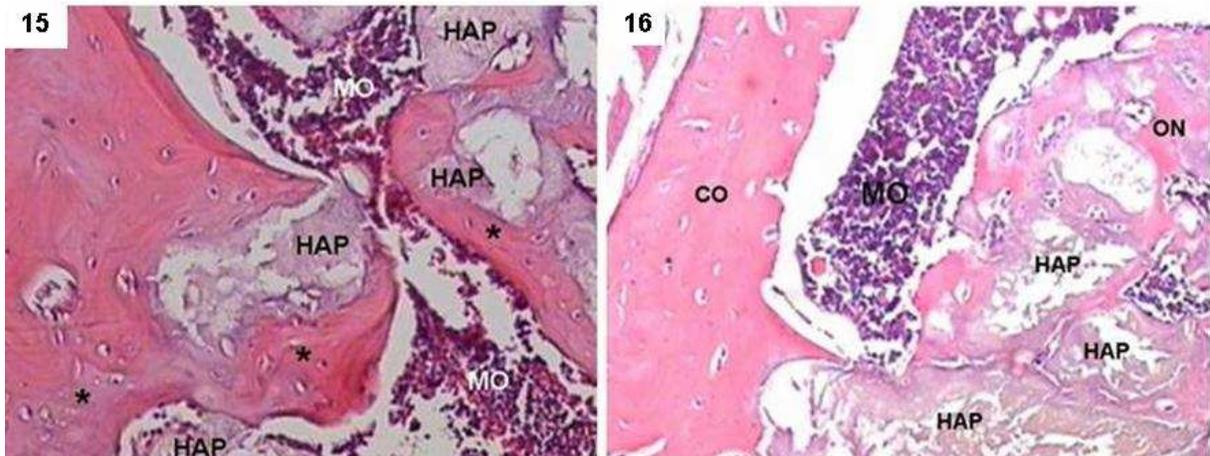
O tecido ósseo revestiu os grânulos da HAP ocupando os poros da cerâmica sendo contínuo com o osso cortical. A medula óssea do canal medular interpôs os espaços entre o osso de reparação ao redor do implante. Não foi observado tecido fibroso entre a cerâmica e o osso neoformado.

O osso mostrou-se maturo e o perióstio apresentou atividade osteogênica reduzida.

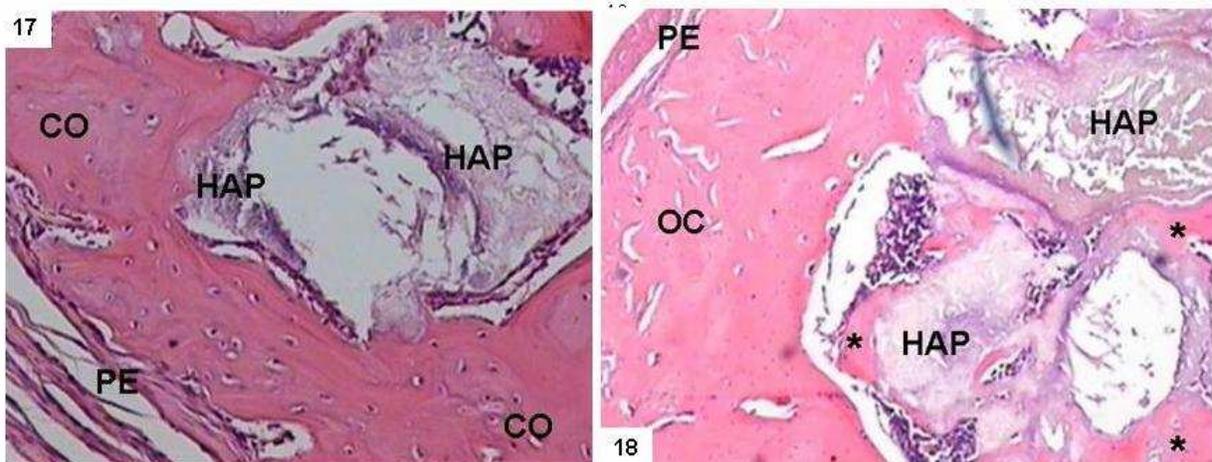
Histologicamente notou-se semelhança entre os animais do grupo N (nicotina) e CT (controle). O osso neoformado é representado por uma camada espessa contendo áreas de osso maturo e poucas regiões de osso imaturo.

O osso neoformado estava em contato direto com os grânulos da HAP, sendo poucas regiões marcadas pela presença de tecido fibroso de interposição.

O perióstio recobriu o local da fratura estando mais espesso que no grupo CT e com maior atividade osteoprogenitora.



**FIG 15 e 16.** Corte transversal da tíbia do animal do controle (CT). Notar a cortical óssea (CO) continua com o osso neoformado (\*) ao redor da HAP. Entre os grânulos da HAP observa-se medula óssea (MO) e revestindo o osso externamente foi encontrado o perióstio (PE). (115x – H.E.).



**FIG 17 e 18.** Corte transversal da tíbia do animal do grupo nicotina (N). Notar a cortical óssea (CO) em contato com osso neoformado de aspecto maduro (\*), pequenas áreas com tecido fibroso (TC) na interfase osso/implante. Perióstio espesso com atividade mais intensa (PE). (115x – H.E.).

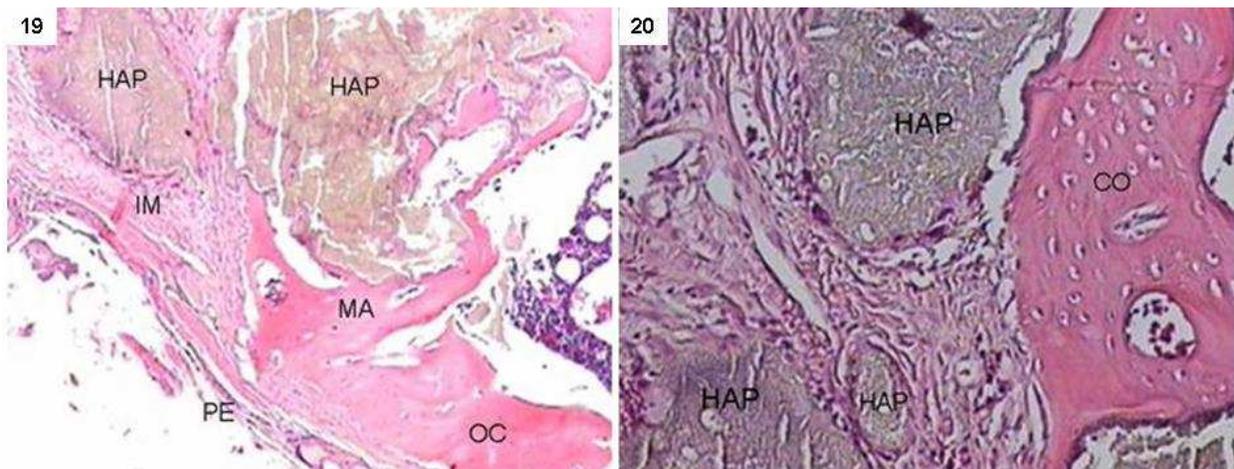
Os animais do grupo A (álcool) histologicamente apresentavam osso formado ao redor do implante, porém a reparação óssea caracterizava-se por uma grande quantidade de osso imaturo que facilmente se distinguiu das demais áreas da tíbia.

A camada de osso neoformado era bem espessa em relação aos grupos CT e N, entretanto preencheram os poros da cerâmica. O perióstio demonstrava atividade proliferativa através de sua camada interna aumentada e com grande quantidade de células osteoprogenitoras.

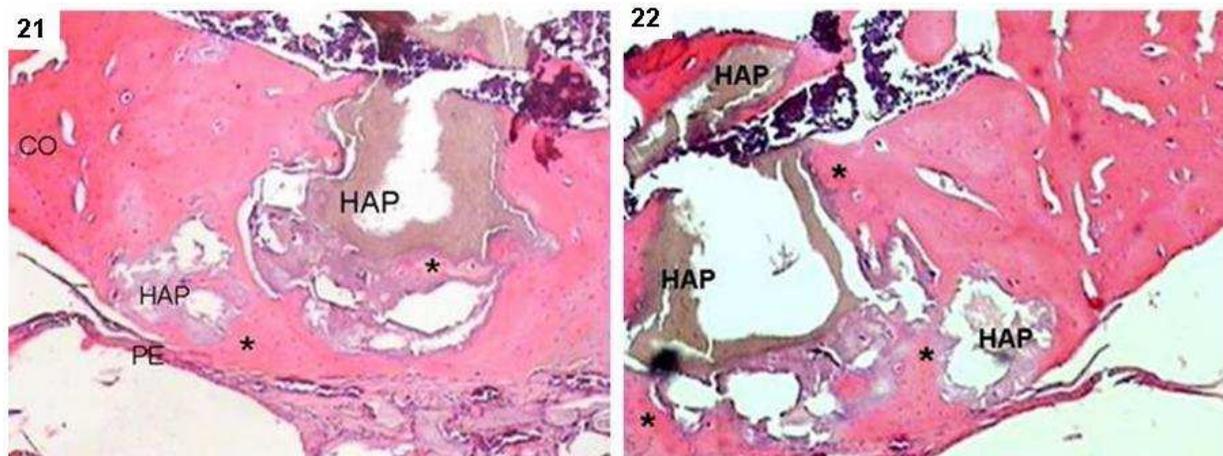
Nos animais do grupo N+A (Nicotina+álcool) observou-se ao redor dos grânulos de HAP formação óssea com pequena espessura e o tecido ósseo apresentava aspecto imaturo em grande parte dos animais.

Notou-se diferença marcante entre a cortical óssea e a área de neoformação. Na interfase osso/implante pode-se verificar a presença de tecido fibroso que em alguns locais separa o osso de reparação dos grânulos da HAP.

O perióstio recobria o sítio de implantação, o que era demonstrado por uma camada espessa e com atividade osteoprogenitora intensa em relação aos demais grupos.



**FIG 19 e 20.** Corte transversal da tíbia do animal do grupo álcool (A). Notar a diferença entre a cortical óssea (OC) e o osso neoformado onde em algumas regiões têm aspecto maturo (MA) e outras imaturo (IM) ao redor do implante de HAP. O perióstio apresenta-se espesso (PE). (115x – H.E.).

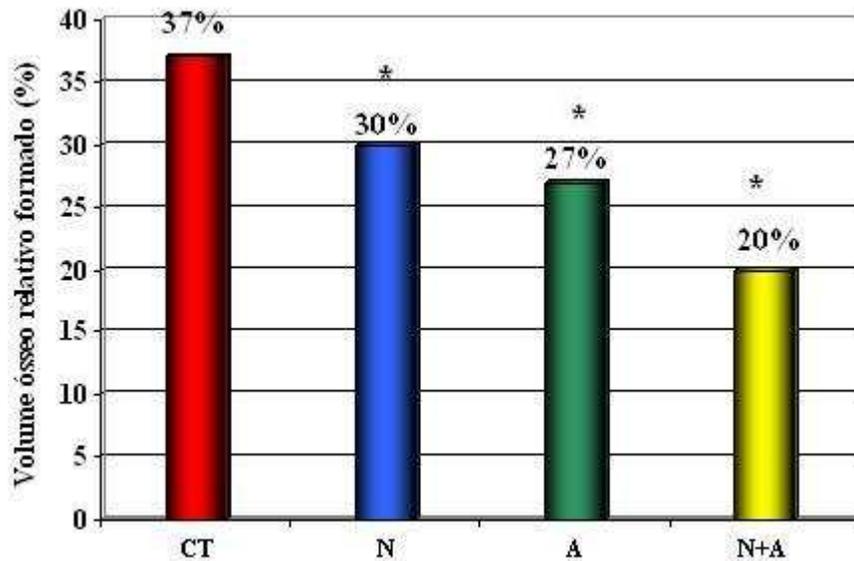


**FIG 21 e 22.** Corte transversal da tíbia do animal do grupo nicotina + álcool (N+A). Notar a diferença entre a cortical óssea (CO) e o osso neoformado (\*) ao redor do implante de HAP. (115x – H.E.).

## 4.6 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

### 4.6.1 IMPLANTES DE HAD

A Fig. 23 sumariza as médias (%) dos valores e o desvio padrão encontrados para o volume relativo de osso formado ao redor do implante nos grupos CT, N, A e N+A, respectivamente.



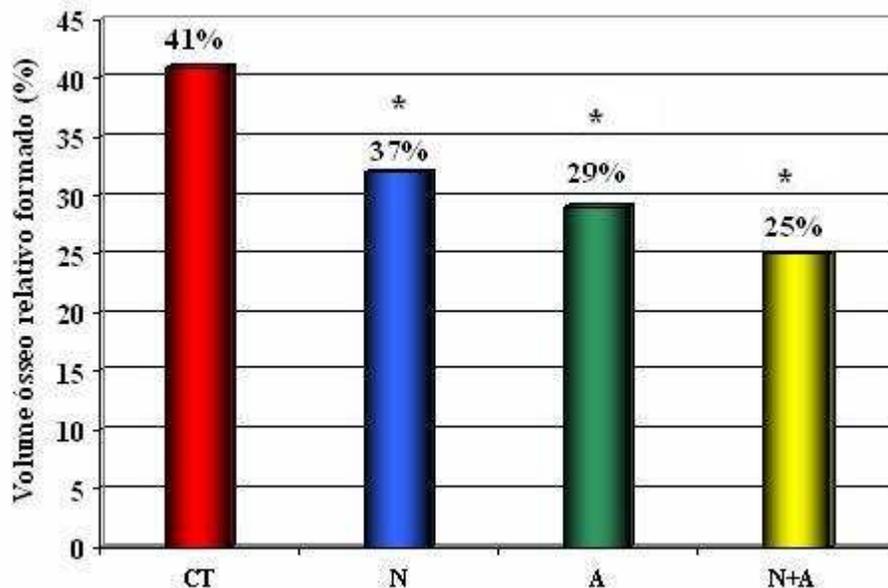
**FIG 23.** Média (%) do volume ósseo relativo formado na tíbia esquerda (HAD) dos animais dos grupos CT, N, A e N+A e comparação estatística do grupo CT com relação aos demais grupos. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo CT.

O volume de osso encontrado ao redor do implante de HAD foi significativamente maior no grupo CT em relação aos grupos tratados com N, A e

N+A. O menor volume de osso foi encontrado no grupo N+A, seguidos pelos grupos N e A em ordem decrescente de valores.

#### 4.6.2 - IMPLANTES DE HAP

A Fig. 24 representa as médias (%) dos valores encontrados para o volume relativo de osso formado ao redor do implante nos grupos CT, N, A e N+A, respectivamente.



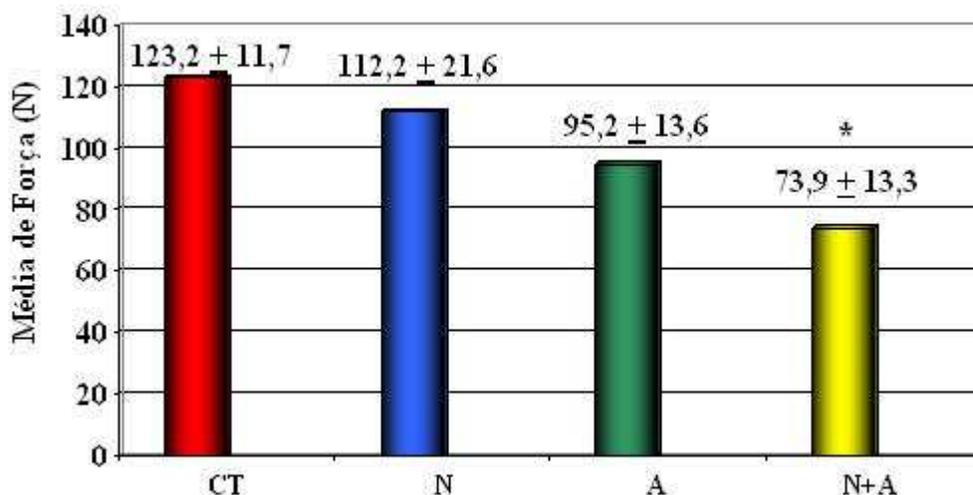
**FIG 24.** Média (%) do volume ósseo relativo formado na tíbia direita (HAP) dos animais dos grupos CT, N, A e N+A e comparação estatística entre o grupo CT e os demais. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo CT.

O volume de osso encontrado ao redor do implante de HAP foi significativamente maior no grupo CT em relação aos grupos tratados com N, A e N+A. O menor volume de osso foi encontrado no grupo N+A, seguidos pelos grupos

N e A em ordem decrescente de valores. Quando comparamos os volumes de osso formado junto aos implantes de HAD e HAP, é evidente o maior volume de osso na HAP devido ao crescimento de osso para o interior dos seus poros.

#### 4.7 TESTE MECÂNICO DOS FÊMURES

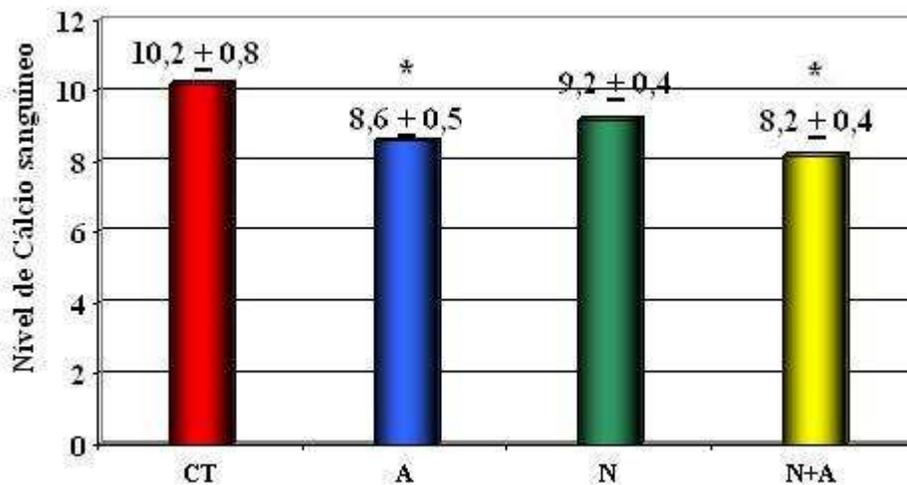
A análise estatística do teste mecânico demonstra que o grupo CT apresentou maior resistência, porém não difere estatisticamente do grupo A e N, estes apresentam resultado melhor que o grupo N+A.



**FIG 25.** Média da Força (N) e desvio-padrão para ruptura dos fêmures no ensaio mecânico e comparação estatística entre o grupo CT e os demais. \*p<0,05 comparado ao grupo CT.

#### 4.8 DOSAGEM DE CÁLCIO SANGÜÍNEO

A dosagem de Cálcio sanguíneo do grupo CT apresentou-se superior e estatisticamente diferente quando comparada com os grupos A e N+A, já o grupo N apresentou dosagem de cálcio inferior ao CT, porém uma diferença não significativa estatisticamente.



**FIG 26.** Média do nível de Cálcio sérico e desvio padrão obtido através da amostra de sangue dos animais do grupo CT, N, A e N+A e comparação estatística do grupo CT com relação aos demais grupos. Diferença estatística (\*) =  $p < 0,05$ .

## **5 DISCUSSÃO**

---

Segundo Lorez e Lorez (1983) os animais de laboratório favorecem os estudos de diversas doenças humanas, destacando-se as causadas pelo etanol e/ou nicotina. O uso de animais de laboratório supera as limitações dos estudos clínicos. Os conhecimentos referentes ao processo de cicatrização óssea são em grande parte provenientes de estudos experimentais, o que tem ajudado a compreender a reparação óssea.

Pesquisas relacionadas ao alcoolismo experimental e seus efeitos vem sendo feitas principalmente com ratos, pois possuem afinidade para o consumo voluntário dessa substância (KAMER et al., 2006; CAMILLI et al., 2004). Além disso, são animais de fácil acesso e apropriados para administração de drogas, como exemplo a nicotina (IWANIEC et al., 2002 e RIESENFELD, 1985). Por estas razões e pela facilidade na realização da técnica cirúrgica para implantação da cerâmica de hidroxiapatita, o rato foi escolhido como modelo no presente trabalho.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para avaliar os efeitos da nicotina ou do álcool sobre o tecido ósseo. Parâmetros como concentração da substância, vias de administração da droga e tempo de experimentação apresentam variações. Iwaniec et al. (2000) estudaram os efeitos da nicotina no tecido ósseo utilizando doses de 3 e 4,5 mg/kg/dia administradas por via subcutânea por um período de 3 meses. Okamoto et al. (1994) e Pinto et al. (2002) administraram pela mesma via, 3 mg/Kg/dia de nicotina por 30 dias de experimento.

Riesenfeld et al. (1985) pesquisaram os efeitos da nicotina e do etanol sobre a formação óssea do esqueleto fetal de ratas prenhas. Para isto associou em seu

experimento o etanol (20%) oferecido como dieta líquida e nicotina administrada por via intramuscular na dosagem de 4,2 mg/kg/dia por 6 semanas. Em nosso estudo os ratos receberam diariamente injeções subcutâneas de 0,0625 mg/100g de nicotina durante 2 semanas e 0,125 mg/100g ao longo de mais 90 dias, seguindo o protocolo proposto por Favaro e Cagnon (2006) e Riesenfeld e Oliva (1988).

Diez et al. (1997) submeteram ratos à dieta líquida com etanol na diluição de 30 % por 6 semanas, tendo como objetivo avaliar o metabolismo mineral. Após análise histobioquímica ou histoquímica do tecido ósseo observaram que os ratos tratados com álcool apresentavam redução acentuada no metabolismo mineral quando comparados com animais controle. Sampson et al. (1998) utilizaram à mesma concentração em um período mais curto (4 semanas), e concluíram através de análise bioquímica óssea que vários componentes e hormônios se apresentaram alterados perante os efeitos do etanol. Nyquist et al. (1999) submeteram ratos à dieta líquida com etanol diluído a 15% por 5 semanas e concluíram que o processo de reparação das fraturas é inibido ou lentificado nos ratos que receberam esta concentração de etanol. Camilli et al. (2004) usaram etanol a 20% por 4 semanas até a implantação subperiosteal de HAP na tíbia e crânio de ratos, mantendo o tratamento até completar 140 dias de experimentação. Concluíram que a velocidade da osteogênese e o volume neoformado dos ratos tratados com álcool eram inferiores aos dos não tratados.

As concentrações do etanol utilizadas pelos autores citados anteriormente foram suficientes para ocasionar alterações ósseas, no processo de osteogênese. Em nosso trabalho utilizamos etanol diluído a 10% por 90 dias, optou-se por esta

dosagem, pois é suficiente para ocasionar alterações biológicas no animal e quando associado à nicotina não causaria overdose ou levaria ao óbito. Sharpe e Sampson (2002) utilizaram etanol (10%) combinado com a administração subcutânea de nicotina (0.7 mg/kg) e constataram que a associação das drogas nestas dosagens são suficiente para agredir os tecidos e não causar reações orgânicas desfavoráveis ao experimento com ratos.

Existem questionamentos se as alterações ósseas nos animais alcoolizados são decorrentes do efeito do etanol ou consequência da deficiência nutricional do animal (HOLBROOK e CONNOR, 1993). Diante desse fato, tornou-se obrigatório e essencial observar o estado de saúde dos animais durante o tratamento com o etanol e nicotina.

Weisbroth et al (1977), relatou que variações na quantidade da ingestão sólida e líquida podem provocar modificações nas respostas biológicas em experimentação animal. Por tanto, no presente trabalho, foi realizado cuidadoso acompanhamento do estado de saúde dos animais e o controle da ingestão de ração e água ao longo de todo experimento. Os resultados demonstraram que os ratos do grupo N+A consumiram menor quantidade de ração e água em relação aos demais grupos (CT, A e N). Os animais do grupo A, tratado com etanol ingeriram menos ração e água quando comparado aos ratos tratados com nicotina (grupo N).

Svendsen e Hau (1984), referem-se que para manter o estado nutricional adequado e evitar a desnutrição e a desidratação, os ratos devem apresentar consumo médio diário de 25g de ração e de 15 a 80 mL de água. Em nosso experimento, todos os animais apresentaram ingestão sólida e líquida dentro dos

limites ideais não caracterizando a desnutrição protéica ou desidratação. Os animais do grupo N+A apresentaram menor consumo, ingeriram em média, 25,87 mL de líquido e 26,3g de ração por dia. Martinez (1997) constatou em seu estudo com ratas alcoolizadas, menor consumo líquido e ração quando comparadas a ratas não alcoolizadas, mesmo com valores reduzidos não foi caracterizado desnutrição nos animais.

Sampson et al. (1996) referem-se que, a variação de peso corpóreo de cada animal deve ser observada, uma vez que a perda de massa corporal caracteriza a desnutrição protéica. De acordo com Palencia et al. (1994) a ingesta sólida inferior a 25 g/dia e as perdas de peso acentuadas ao longo do experimento caracterizam a desnutrição em roedores. Conforme os dados obtidos com o monitoramento do peso de nossos animais podemos verificar todos os ratos dos quatro grupos apresentaram ganho de peso ao longo dos 90 dias do experimento. Os animais dos grupos CT ganharam em média de 244,5g (132.2%) de massa corporal, os do grupo A cerca de 187 (95.21%), os ratos do grupo N 217g (112.2%) e os animais do grupo N+A aumentaram seu peso em 145,3g (74%). Assim sendo, as diferenças encontradas na neoformação óssea ao redor dos implantes de HAD e HAP entre os grupos, devem-se aos efeitos nocivos da nicotina e/ou do etanol e não decorrentes a um quadro de desnutrição.

Assim, como o etanol, a nicotina é prejudicial à osseointegração dos implantes de biomateriais. Miller (1987) e Ress (1984) afirmaram que a nicotina está associada à rejeição de enxertos ósseos realizados em pacientes tabagistas. Kamer et al. (2006) observaram perdas ósseas periimplantares em ratos tratados com nicotina.

---

Em nosso estudo não foi observado sinais de rejeição dos implantes, como presença de resposta inflamatória crônica ou a formação de camada de tecido fibroso na interface osso neoformado/implante. Nos quatro grupos, o osso formado ao redor dos fragmentos de HA estava em contato direto com a cerâmica. A alteração mais importante que encontramos se refere ao volume de osso encontrado ao redor dos implantes de HAD e HAP quando comparamos os grupos.

Na tíbia direita onde foram implantados blocos de HAP, a análise do volume de osso neoformado demonstrou que os ratos do grupo CT apresentavam maior volume (41%), superior aos animais do grupos N (37%), A (29%) e N+A (25%). Na tíbia esquerda com blocos de HAD, os resultados foram semelhantes. O grupo com maior formação óssea periíimplantar foi o CT (37%), sendo o volume maior que nos demais grupos, N (30%), grupo A (27%) e grupo N+A (20%). Em ambas as tíbias, com os respectivos implantes, destaca-se o reduzido volume de osso formado ao redor da HA nos animais tratados com N, A e N+A. Destaca-se a maior nocividade do etanol em relação à nicotina, uma vez que o volume de osso nos animais tratados com etanol foi inferior. Nossos resultados também demonstraram efeito mais acentuado do álcool e da nicotina sobre o volume de osso formado ao redor do implante quando consumidos concomitantemente.

A osteogênese depende da migração, proliferação e diferenciação das células osteogênica em osteoblastos (Marks e Popoff, 1988), no entanto este processo pode ser alterado pelos efeitos biológicos do álcool (Friday e Howard, 1991) e da nicotina (Skott et al., 2006). A redução no volume ósseo neoformado periíimplantar nos

animais do grupo N, grupo A e N+A, estão associados aos efeitos biológicos do álcool e da nicotina sobre o processo de reparação óssea.

De acordo com Chakkalakal et al. (2002) o consumo crônico de etanol causa inibição das funções osteoblásticas, conduz a perda óssea sistemática, induz a fragilidade óssea, aumentando o risco de fraturas e dificulta o processo de reparação óssea após lesões ocasionais ou cirúrgicas.

Klein et al. (1996) referem-se que o consumo habitual de álcool (1 a 2 doses/dia) pode ocasionar alterações bioquímicas e histológicas no esqueleto de pacientes alcoólatras. Os autores analisaram biópsias nos pacientes alcoólatras e verificaram os efeitos do etanol no tecido ósseo. Os resultados demonstraram que o álcool afeta drasticamente as funções osteoblásticas, desta forma, processos como a mineralização e remodelagem óssea são prejudicados, pois são dependentes das funções osteoblásticas.

Klein, Fausti e Como (1991) em estudos semelhantes, analisaram a morfologia do tecido ósseo de pacientes alcoólatras. Seus resultados demonstraram que o álcool leva a diminuição acentuada do número de osteoblastos. Os autores atribuíram esta diminuição aos efeitos nocivos do etanol, uma vez que esta substância diminui a síntese de DNA, reduz a biossíntese de poliaminas e acelera a apoptose osteoblástica. Estes dados permitem melhor compreensão do baixo volume ósseo formado ao redor dos implantes de HAP e HAD nos ratos tratados com etanol e nicotina+etanol (N+A) em nosso experimento.

O consumo de cigarro tem recebido grande atenção por estar relacionado a uma maior incidência de perdas de implantes osseointegráveis (SENNERBY e

ROSS, 1998). Além disso, outros autores têm associado o uso de tabaco com as dificuldades na incorporação dos enxertos ósseos (KAN et al., 1999).

Nociti et al. (2002) observaram redução da formação óssea ao redor de implantes de titânio colocados em tíbias de coelhos tratados com nicotina, no entanto, mesmo com valores numéricos inferiores não foi constatado diferenças estatísticas em relação ao grupo controle. Estudos realizados por Hollinger et al. (1999) verificaram os efeitos da nicotina sobre a cicatrização de regiões que receberam enxerto ósseo autógeno na calvária de ratos e concluíram que a nicotina prejudicou o reparo ósseo das áreas doadoras da calota craniana.

Ramp et al. (1991) pesquisaram o efeito da nicotina em culturas de células ósseas humanas e concluíram que a nicotina inibe a síntese de colágeno e dificulta a atividade da fosfatase alcalina. Liu et al. (2001) em estudos semelhantes detectaram inibição da diferenciação osteogênica e da proliferação de células osteoprogenitoras humanas perante a exposição à nicotina.

Pereira et al. (2006) estudaram *in vitro*, a ação da nicotina (0,05 a 1mg/mL) na proliferação e diferenciação osteoblástica de células obtidas de ossos alveolares humanas. Na presença de concentrações inferiores a 0,3 mg/mL, observou-se um efeito de estimulação na proliferação celular, na atividade da fosfatase alcalina e na formação de matriz óssea mineralizada, no entanto, exposições a concentrações superiores a 0,3mg/mL geraram efeitos negativos da substância neste parâmetros celulares. Os autores concluíram que a nicotina pode prejudicar o processo de cicatrização do osso alveolar.

---

Além dos efeitos citados anteriormente a nicotina promove diminuição do suprimento sangüíneo, devido à liberação de catecolaminas que levam a vasoconstrição e redução da perfusão tecidual (REUS et al., 1984). O processo de cicatrização depende de uma perfusão e vascularização adequada, independente de qual tecido foi lesionado. A nicotina também dificulta o transporte de oxigênio pela hemoglobina (Klaassen, 1996), deste modo pode causar redução da oxigenação tecidual, fator que pode prejudicar e muito a reparação.

Este conjunto de fenômenos e os possíveis efeitos diretos da nicotina e álcool sobre o tecido ósseo e na osseointegração, em associados ou isoladamente, fornecem indícios da relação entre a administração destas drogas e a diminuição do volume ósseo ao redor dos implantes de HAD e HAP observado nos animais dos grupos N, A e N+A no presente estudo.

Keiver, Duggal e Simpson (2005), em estudos realizados com ratos demonstraram que o etanol diminui os níveis de cálcio ionizado no sangue do animal, o que pode prejudicar o processo de mineralização óssea. Baran et al. (1980) aferem-se que o etanol interfere nos níveis de hormônios essenciais para a remodelagem óssea. O etanol também interfere no processo de cicatrização óssea e pode limitar ou inviabilizar os implantes osseointegráveis (ALBREKKSSON et al., 1981).

Devido ao papel fundamental do cálcio na constituição do esqueleto e a facilidade para a verificação dos seus níveis sangüíneos, muitos laboratórios utilizam técnicas já padronizadas para dosagem de cálcio (ARIOLI e CORRÊA, 1999). No intuito de verificar os níveis de cálcio sangüíneo nos animais de nosso estudo, foi

realizado exame laboratorial para identificar possíveis efeitos negativos da administração da nicotina e/ou álcool.

O cálcio é um macroelemento mineral encontrado em abundância no organismo (Shane, 1999), 99% do Ca está no esqueleto, se apresentando na forma de hidroxapatita e somente 1% encontra-se no fluido extracelular e tecidos moles (THOME e BILEZIKIAN, 1993). Fisiologicamente o principal determinante da calcemia resulta de dois movimentos: duas entradas (absorção intestinal de cálcio e reabsorção óssea), e duas saídas (depósito de cálcio nos osso e perdas pela urina). Os principais fatores de regulação do metabolismo do cálcio são os paratormônios (PTH) e a vitamina D (PORTO, 2001).

A vitamina D assegura que o organismo absorva cálcio pelo intestino, auxiliando na manutenção do metabolismo e saúde dos ossos, no entanto quando os valores de vitamina D no organismo estão baixos ocorre uma redução da absorção de cálcio nos intestinos, como consequência pode ser observada diminuição da massa óssea e aumento à propensão a fraturas (TORTORA, 2000; SMELTZER e BARE, 2002; TORTORA e GRABOWSKY, 2002; LEVINE, 1999).

Alguns hábitos do indivíduo podem facilitar alterações na homeostasia de cálcio, entre estes encontramos o alcoolismo e o tabagismo (ARIOLI e CORRÊA, 1999, PORTO, 2001; PEARCE e BROWN, 1996).

Estudos realizados por Fung et al. (1999) demonstraram que ratas tratadas com nicotina (3 a 4,5 mg/Kg/dia) administradas através de bomba osmótica, após três meses de exposição exibiam deficiência de vitamina D no organismo. Yuhara et al. (1999) submeteram cobaias à exposição de nicotina e observaram decréscimo na

atividade dos osteoclastos, aumento na deposição do íon de cálcio e da produção da fosfatase alcalina em células osteogênicas.

Riesenfeld (1985) após tratar ratas prenhas com álcool (20%) e nicotina (4,2 mg/Kg/dia) identificou hipocalcemia, descalcificação do esqueleto dos neonatos e associou estas manifestações como decorrentes da toxicidade das substâncias. Baran et al. (1980) pesquisaram os efeitos do etanol no metabolismo mineral ósseo, para tal ofereceram como dieta líquida etanol 20% sendo este oferecido a ratos por um período de 90 dias. Após o sacrifício dos animais e análise bioquímica e histológica do tecido ósseo concluíram que as concentrações do PHT (hormônios paratireoideanos) fundamentais para o metabolismo e remodelagem óssea estavam baixo dos limites ideais e os animais apresentavam dificuldades no processo de reparação do esqueleto.

O consumo crônico do álcool e o hábito tabagista, podem induzir a uma diminuição da calcemia (KRAWITT, 1975; PENG et al. 1974 e 1972; NOCITI et al., 2002). Os mecanismos exatos pelos qual o álcool diminui o Ca sanguíneo não são totalmente conhecidos, porém acredita-se que este fenômeno ocorra devido o déficit de absorção intestinal, as limitações no metabolismo da vitamina D, alterações nos níveis de testosterona, insulina e cortisol ocasionados pelo etilismo. Torna-se importante destacar que o consumo agudo do etanol pode acarretar diminuições dos níveis de cálcio no sangue, tanto em humanos como em cobaias (BARAN, BRYANT e ROBSON, 1982; HEMMINGSEN e KRAMP, 1980; PERRY et al., 1998; PETROIANU et al., 1991).

O nível de cálcio ideal deve estar situado de 8,8 a 11mg/dL de sangue em ratos (Diez et al., 1997), no entanto calcemia dos animais do grupo A e N+A encontram-se abaixo do valor de referência, 8,6 e 8,2 mg/dL respectivamente. Estes valores indicam que os ratos tratados com etanol isoladamente ou associado à nicotina apresentaram alterações na homeostasia de cálcio, achados compatíveis aos dos autores citados anteriormente. A nicotina administrada em nosso estudo não foi suficiente para alterar a calcemia dos animais do grupo N. Os valores obtidos do grupo N (9,2 mg/dL) são estatisticamente iguais ao do grupo CT (10,2 mg/dL), embora apresente uma tendência numérica inferior. Os achados demonstram que o etanol e sua associação à nicotina perturbou o metabolismo de cálcio nos animais.

O álcool e a nicotina alteram a histologia do tecido ósseo, principalmente agride os osteoblastos, e bioquimicamente, age negativamente sobre os paratormônios e composição mineral óssea, entre outros danos gerais ao organismo (BIKLE, 1993; SAMPSON, 1997; HOGAN et al, 2001). Além disso, o consumo destas substâncias pode resultar em efeitos adversos no osso, tais como a diminuição da densidade óssea (HOGAN et al, 2001), deixando o esqueleto propenso a fraturas (BARAN et al., 1980; SKOTT et al., 2006).

As alterações causadas por estas substâncias sobre o tecido ósseo dos animais do grupo A e N+A em nosso estudo podem ser evidenciadas pela redução no volume ósseo, diminuição da calcemia e também através dos achados do teste de resistência mecânica dos fêmures.

Em nosso estudo o teste mecânico mediu em Newton (N) a força necessária para romper o fêmur dos animais dos quatro grupos. Os resultados demonstraram

uma tendência numérica de redução da força de ruptura, sendo esta maior para romper os fêmures dos ratos do grupo CT (123,2 N), em seguida, grupo N (112,2 N), grupo A (95,21 N) e grupo N+A (73,93 N), respectivamente. Deste modo, os animais do grupo CT e N apresentam ossos mais resistentes a fraturas induzidas.

A análise estatística dos valores obtidos com o ensaio mecânico demonstrou que o grupo CT apresenta maior resistência, não diferindo estatisticamente do grupo N e do grupo A. Os animais do grupo N+A apresentaram menor resistência ao teste mecânico, pois os fêmures romperam com menor carga de força quando comparado aos demais grupos.

Sylversen et al. (1999) estudaram os efeitos da nicotina sobre as propriedades mecânicas e densidade óssea de ratas. Para tal submeteram os animais a vapor de nicotina por 20 horas diárias durante 5 dias por semana ao longo de 2 meses. Concluíram que embora exista uma tendência numérica de redução dos parâmetros avaliados, os animais expostos à nicotina não apresentaram alterações significantes nas propriedades mecânicas, tais como dureza e deflexão ou força de ruptura sobre os fêmures dos animais. Também não foi identificadas alterações na densidade óssea mineral. Em nosso estudo a nicotina administrada isoladamente nos animais do grupo N também não ocasionou alteração significativa na resistência dos fêmures perante o teste mecânico.

Pesquisa realizada por Skott et al. (2006) teve como objetivo avaliar a influência da nicotina e do extrato de tabaco (com e sem nicotina) sobre a força mecânica de fêmures de ratos. A nicotina foi administrada via subcutânea, já o extrato de tabaco (s/c) por via oral. Os fêmures foram submetidos à fratura na epífise

distal. Após 21 dias ocorreu reparação espontânea do local da lesão e os fêmures foram testados. O resultado do teste mecânico não evidenciou diferenças entre os grupos tratados e o controle. Os autores concluíram que a nicotina, extrato de tabaco (s/c) não influenciou os resultados teste mecânico dos fêmures.

Zhang, Wang e Chen (2006) estudaram os efeitos da diminuição de cálcio e resistência do esqueleto de coelhos perante pressão mecânica. Os autores concluíram que a diminuição do cálcio intracelular interfere na resposta mecânica do tecido ósseo, uma vez que a mensagem de cálcio é indispensável para a resposta celular perante pressão. Estes dados auxiliam na compreensão dos achados no presente estudo, pois os níveis de cálcio nos animais apresentaram-se inferior ao ideal e a resistência óssea perante o teste mecânico dos animais do grupo N+A também foi inferior.

Hogan et al. (1997) estudaram a ação do etanol (35%) sobre o osso de ratos jovens através de técnicas histomorfométrica e avaliação das propriedades mecânicas. Concluíram que a área de osso cortical apresentava-se baixa, os componentes minerais estão reduzidos e as propriedades mecânicas estavam significativamente alteradas. Os animais tratados com etanol apresentaram o desenvolvimento ósseo inferior e maior facilidade de fratura durante o teste de força.

## **6 CONCLUSÃO**

- O consumo de álcool ou nicotina produziu efeitos negativos quanto à resistência mecânica óssea e a osteogênese ao redor dos implantes de Hidroxiapatita densa e porosa, sendo que o consumo simultâneo das duas substâncias intensificam os efeitos deletérios.

- A osseointegração dos implantes de HAD e HAP pode ser esperada mesmo em animais submetidos ao consumo de etanol e administração simultânea de nicotina, no entanto com menor volume o que pode comprometer a estabilidade e manutenção do implante.

## **7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ALBREKKSSON, T., BRANEMARK, P.I, HANSSON, H.A., LINDSTROM, I.  
Osseointegrated titanium implants. **Acta Orthop. Scand.**, v.52, p.155-170, 1981.

ALBREKTSSON, T.O long-term maintenance of the osseointegrated response. **Aust Prosthodont J.**, v.7, p.14-24, 1993.

ARIOLI, E.L.; CORRÊA, P.H.S. Hipocalcemia. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.3, n.6, Dec, 1999.

ASHBY, E.R., RUDKIN, G.H., ISHIDA, K., MILLER, T.A. Evaluation of a novel osteogenic factor, bone cell stimulation substance in a rabbit cranial defect model. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.98, n.3, p.420, 1996.

BARAN, D. T., BRYANT, C., ROBSON, D. Alcohol-induced alterations in calcium metabolism in the pregnant rat. **Am J Clin Nutr.**, v.36, p.41-45, 1982.

BARAN, D.T., STEVEN, L.T., TEITELBAUM, M.AB., PAKER, G., CRUVANT, E.M., AVIOLI, L.V. Effects of alcohol ingestion on bone and mineral metabolism in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 208 (endocrinol. Metab), p. E507-E510, 1980.

BERGTROM, J., ELISSON, S., PREBER, H. Cigarette smoking and periodontal bone loss. **J Periodontol**, v.62, n.12, p.809, Dec 1991.

---

BERTRAN, C.A., KAWACHI, E.Y., REIS, R.R., ALVES, O. Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Quim. Nova**, v.23, n.4, p.123-129, jun/ago, 2000.

BIKLE, D. D. Alcohol-induced bone disease In: Simopoulos, A. P., GALLI, C. (Eds.), Osteoporosis: Nutritional Aspects Basel Karger: World **Rev Nutr Diet**. v.73, p. 53–79, 1993.

BROECKE, D.G.A., Neurotmesis of the lateral femoral cutaneous nerve when coring for iliac crest bone grafts. **Plast. Reconstr. Surg.**, v.102, n.4, p.1163, Sept. 1998.

BROULINK, P.D., JARAB, J. The effect of chronic nicotine administration on bone mineral content in mice. **Horm Metab Res.**, v. 25, n.4, p. 219-221, Apr., 1993.

CAMILLI, J.A., CUNHA, M.R., BERTRAN, C.A. KAWACHI, E.Y. Sberperiosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. **Archives of Oral Biology**, v.44, p.747-753, 2004.

CHAKKALAKAL, D.A., NOVAK, J.R., FRITZ, E.D., MOLLNER, T.J., MCVICKER, D.L., GARVIN, K.L., MCGUIRE, M.H., DONOHUE, T.M.. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. **Alcohol**, v.36, n.3, p.201-214, 2005.

---

CHEN, H. et al. Effects of ethanol on the ultrastructure of the hamster femur. **Histol Histopathol.**, v.16, n.3, p.763-770, jun. 2001.

CITARDI, M.J., FRIEDMAN, C.D. Nonvascularized autogenous bone grafts for craniofacial skeletal augmentation and replacement. **Otolaryng. Clin. N. Am.**, v.27, n.5, p.891, Oct. 1994.

CRUZ, L.A. **Alcoolismo**. Disponível em: <<http://www.alcoolismo.br>>. Acesso em 18 de jun. 2005.

DAMIEN, C.J., PARSONS, J.R., BENEDICT, J.J. e WEISMAN, D.S. Investigation of a hydroxyapatite and calcium sulfate composite supplemented with an osteoinductive factor. **J Biomed Mater Res.**, v.24, n.6, p.639-654, jun 1990.

DIAMONT, T., SSTIEL, 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., BOSH, J., PRUG, J., NOGUES, X., AUBIA, J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. **Calcifiel Tissue Inter.**, v.61, n.2, p.168-171, 1997.

---

FAVARO, W.J., CAGNON, V.H. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. **Tissue Cell**, v.38, n.5, p.311-23, Oct, 2006.

FERREIRA, B.M.P. **Obtenção, caracterização, estudo "in vitro" e "in vivo" de blendas pe Poli(L-ácido)/Poli(hidroxi butirato-cohidroxivalerato)**. Campinas, 2002, 150p. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Engenharia e Materiais, Universidade Estadual de Campinas.

FORREST, C. et al. The free vascularized iliac tissue transfer: donor site complication associated with eighty-two cases. **British J. Plast. Surg.**, v.45, p. 89, 1992.

FORTUNATO, G., MARINI, E., VALDINUCCI, F., BONUCCI, E. Long-term of hydroxyapatite-fibrin glue implantation in plastic and reconstructive craniofacial surgery. **J. Cranio Maxill. Surg.**, v.25, p.124-128, 1997.

FRIDAY, K.E., HOWARD, G.A. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. **Metabolism.**, v.40, n.6, p.562-565, Jun. 1991.

FUNG, Y.K., IWANIEC, U., CULLEN, D.M. Long term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. **Pharmacol Toxicol**, v.185, p.181-187, 1999.

HEMMINGSEN R, KRAMP P. Effects of acute ethanol intoxication, chronic ethanol intoxication and ethanol withdrawal on magnesium and calcium metabolism in the rat. **Psychopharmacol**, v. 67, p.255-259, 1980.

HILL, N.M., HORNE, J.G., DEVANE, P.A. Donor site morbidity in the iliac crest bone graft. **Aust. N. Z. J. Surg.**, v.69, n.10, p.726, Oct. 1999.

HOGAN, H. A., ARGUETA, F., MOE, L., NGUYEN, L. P., SAMPSON, H. W. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.25, p.746–754, 2001.

HOGAN, H.A., SAMPSON, H.W., CASHIER, E. LEDOUX, N. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.21, n.5, p.809-816, Aug, 1997.

HOLBROOK, T.L.;CONNOR, E.B. A prospective study of alcohol consumption and bone mineral density. **BMJ**, v.306, n.5, p.1506-09, 1993.

HOLLINGER, J.O., SCHMITT, J.M., HWANG, K., SOLEY-MANI, P., BUCK, D. Impacts of nicotine on bone healing. **J. Biomed Mat Res.**, v.46, n.3, p.438-439, 1999.

IWANIEC, U.T. Effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in growing female rats. **Calcif Tissue Int.**, v.67, p.68-74, 2000.

IWANIEC, U.T. Effects of nicotine on bone mass, turnover, and strength in adult female rats. **Calcif Tissue**, v.68, p.358-364, 2001.

IWANIEC, U.T., HAYNATZKI, G.R., FUNG, Y.K., AKHTER, M.P., HAVEN, M.C., CULLEN, D.M. Effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in aged ovariectomized rats. **J. Musculoskelet Neuronal Interact.**, v.2, n.5, p.469-478, 2002.

JONES, J.K., TRIPLETT, R.G. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.50, n.3, p.237, mar, 1992.

KAMER, A.R, EL-GHORAB, N., MARZEC, N., MARGARONE, J.E., DZIAK, R. Nicotine induced proliferation and cytokine release in osteoblastic cells. **Int. J. Mol. Med.**, v.17, n.1, p.121-127, Jan, 2006.

KAN, J.Y., RUNGCHARASSENG, K., LOZADA, J.L., GOODACRE, C.J. Effects of smoking of implants success in grafted maxillary sinuses. **J Prosther Dent.**, v.82, n.3, p.307-311, Sp 1999.

---

KAPLAN, H.I. Transtornos relacionados a substâncias. In: KAPLAN, H.I., SADOCK, B.J., GREBB, J.A. eds. **Compêndio de Psiquiatria-Ciências do comportamento e Psiquiatria Clínica**. 7ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997; p.381-395.

KEIVER, K., DUGGAL, S., SIMPSON, M.E. Ethanol administration results in a prolonged decrease in blood ionized calcium levels in the rat. **Alcohol**, v.37, n.3, p.173-178, 2005.

KLAASSEN, C.D. Agentes tóxicos ambientais não-metálicos. In: GOODMAN, I.S. **Goodman & Gilman as Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 1996.

KLEIN, R.F. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.20, n.3, p.572-578, 1996.

KLEIN, R.F., FAUSTI, K.A., CARLOS, A.S. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.20, n.3, p.572-578, may, 1996.

KUMAR, A., JAFFIN, R.A., BERMAN, C. The effect of smoking on achieving osseointegration of surface-modified implants – A Clinical Report. **Int J Oral Maxillofacial Implants.**, v.17, n.6, p.816-819, 2002.

---

LAITINEN K, LAMBERG-ALLARDT C, TUNNINEN R, KARONEN S-L, TAHTELA R, YLIKAHRI R, VALIMAKI M. Transient hypoparathyroidism during alcohol intoxication. **N Eng J Med.**, v.324, p.721-727, 1991.

LEGEROS, R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Rel. Res.**, v. 395, p.81-98, 2002.

LEITE, A. O tabagismo e a boca. **Res. da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas.**, v.55, n.1, p 07-14, jan/fev, 2001.

LEKHOLM, U. et al. Oral implants in combination with bone grafts. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.28, n.3, p.181-89, June 1999.

LEVINE, M.A. **Parathyroid hormone resistance syndrome.** In: FAVUS, M.J. editor. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. 4ed, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.230-235.

LINDIQUINST, L.W., CARLSSON, G.E., JEMT, T. Association between marginal bone loss around osseintegrated mandibular implants and smoking habits: A 10-year follow-up study. **J. Dent. Res.**, v.76, n.10, p.1667-1674, 1997.

---

LIU, X.D., ZHU, Y.K, UMINO, T., SPURZEM, J.R., ROMBERGER, D.L., WANG, H. et al. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. **J Lab Clin Med.**, v.137, n.3, p.208-219, mar., 2001.

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

MANDARIN de LACERDA, C.A. What's 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., POPOFF, S.N. Bone cell biology: the regulation of development, struture, and function in the skeleton. **Am. J. Anat.**, v.183, n.1, p. 2-44, 1988.

MARTINEZ, M. Estudo histológico e ultra-estrutural da camada epitelial do endométrio de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Botucatu, 1997. 90p. Tese (doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

MILLER, P.D. Root covage with the free gingival graf. Factores associateed with incomplete covberage. **J of Period.**, v.58, p.674-81, 1987.

---

MONEY SR, PETRONIANU A, KIMURA K, JAFFE BM. Acute hypocalcemic effects of ethanol in dogs. **Alcoholism: Clin and Exp Res.**, v.13, p.453-56, 1989.

NOCITI, F.H.Jr., NETO, J.B.C. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation – A histometric study in rats. **Int J Oral Maxillofacial Implants.**, v.17, n.3, p.347-352, 2002.

NOCITI, F.H.Jr., NETO, J.B.C., CARVALHO, M.D., SALLUM, E.A. e SALLUM, A.W. Intermittent cigarette smoke around titanium implants in rats. **J. Periodontol.**, v.73, n.9, p.982-986, september, 2002.

NYQUIST, F., HALVOSENV, V., MADSEN, J.E., NORDSLETTEN, L., OBRANT, K.J. Ethanol and its effects on fracture healing and bone masses in the male rats. **Acta Orthop Scand**, v.70, n.2, p.212-216, 1999.

OHBAYASHI, Y., MIYANORU, M., NAGAHATA, S. A long-term study of implanted artificial hydroxyapatite particles surrounding the carotid artery in adult dog. **Biomaterial**, v.21, p. 501-09, March 2000.

OKAMOTO, M., KITA, T., OKUDA, H., TANAKA, T., NAKASHIMA, T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. **Pharmacol Toxicol.**, v.75, p.2-6, 1994.

ONO, I., TATESHITA, T., NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. **Biomaterial**, v.21, n.2, p.143-46, January 2000.

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.

PEACOCK, M.E. et al. The effects of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblast. **J Periodontol**. v.27, p.658-664, 1993.

PEARCE, S.H.S., BROWN, E.M. Disorders of calcium ion sensing. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.81, p.2030-2035, 1996.

PENG, T., COOPER, C.W., MUNSON, P.L. The hypocalcemic effects of ethyl/alcohol in rats and dogs. **Endocrinology**, v.91, p.586-93, 1972.

PENG, T., GITELMAN, H.S. ethanol induced hypocalcemia, hypomagnesemia, and inhibition of the serum calcium raising effects of parathyroid hormone in rats. **Endocrinology**, v.94, p.608-11, 1974.

---

PENG, T.C. et al. Bone histomorphometry and mechanical properties in alcoholic rat model. **Cells and materials**, suppl. 1. p.175-180, 1991.

PEREIRA, M.L.L., CARVALHO, J.F.C., FERNANDES, M.H.R., PERES, F. Efeito da nicotina no processo de formação óssea alveolar: estudo em culturas celulares de osso alveolar humano. **Rev Portuguesa de Estomatologia e Cirurgia Maxilofacial**, v.47, n.2, p.79-91, 2006.

PERRY, R C. Bone Repair Techniques, Bone Graft, and Bone Graft substitutes. **Clin. Orthop. Rel. R.**, v.360, p.71, 1999.

PETROIANU, A., BARQUETE, J., ALMEIDA PLENTZ, E. G., CARVALHO BASTOS, C. M., MAIA, D. J. Acute effects of alcohol ingestion on the human serum concentrations of calcium and magnesium. **J Int Med Res.**, v.19, p.410–413, 1991.

PINTO, J.R., BOSCO, A.F., OKAMOTO, T.O., GUERRA, J.B., PIZA, I.G. Effects of nicotine on healing of extraction sockets in rats: A histological study. **Braz Dent J.**, v.13, p.3-9, 2002.

PORTO, C.C. **Semiologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

---

RAIKIN, S.M., LANDSMAN, J.C. ALEXANDER, V.A. effects of nicotine on the rate and strength of long born fracture healing. **Clin Orthop.**, v.353, p.231-37, 1998.

RAMP, W.K, LENZ, L.G., GALVIN, R.J.S. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v.197, n.1, p.36-43, May 1991.

RESS, T.D., LIVERETT, D.M., GUY, C.L. The effects of cigarette smoking on skin flap survival in the lift patient. **Plastic and Recons Surgery**, v.73, p.911-15, 1984.

REUS, W.F., ROBSON, M.C., ZACHARY, L., HEGGERS, J.P. Acute effects of tabacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. **Br J Plast Surg.**, v.32, n.2, p.213-215, Apr 1984.

RIESENFELD, A. Growth-depressing effects of alcohol and nicotine in two strain of rats. **Acta Anat.**, v.122, p.18-24, 1985.

RIESENFELD, A., OLIVA, H. Effects of nicotine on the fertility, cytology and life span of male rats. **Acta Anat (Basel)**; v.131, n.2, p.171-6, 1988.

SAKAKURA, C.E., MARCANTONIO Jr, E., REZENDE, M.L.R. de. O efeito do tabagismo na implantodontia. **B.C.I.**, Curitiba, v.8, n.32, p.276-280, out/dez. 2001.

SAMPSON, H. W. Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 21, 400–403, 1997.

SAMPSON, H.W. Effects of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.22, n.9, p.2029-34, dec. 2002.

SAMPSON, H.W., HEBET, V.A., BOOL, H.L., CHAMPNEY, T.H. Effects alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology and hormone levels of a rat animal model. **Alcohol Clin Exp.**, v.22, n.8, p.1746-53, 1998.

SAMPSON, H.W., PERKS, W., CHAMPNEY, T.H., DEFFE, B. Alcohol consumption inhibits bone growth and development in young actively growing rats. **Alcohol Clin. Exp. Res**, v.20, n.8, p.1375-1384, 1996.

SAVILLE, P.D. Alcohol-related skeletal disorders. **Ann NY Acad Sci USA**, v.252, p.287-91, 1975.

SENNERBY, L. ROOS, J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: a review of the literature. **Int J Prosthodont**, v.11, n.5, p.408-420, Sp-Oct 1998.

---

SESSP – Secretaria de Estado da Saúde de SP – Vigilância epidemiológica.

**Alcoolismo.** Disponível em: <[http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dic\\_pr09 .htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/dic_pr09.htm)>.

Acesso em: 18 jun., 2005.

SHANE, E. **Hypocalcemia pathogenesis, diferencial diagnosis, and management.** In: FAVUS, M.J. editor. Primer on the metabolic bone disease and disorders of mineral metabolism. 4ed, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p.23-26.

SHARPE, A.L.; SAMPSON, H.H. Repeated nicotine injections decrease operant ethanol self-administration. **Alcohol** , v.28, p.1-7, 2002.

SILCOX, D.H. et al. The effects of nicotine on spinal fusion. **Spine.** v.20, p. 1549-53, 1995.

SILVERSTAIN, P. Smoking and wound healing. **Am. J. Med.** Suppl 1A, p.22-24, 1992 – 1993.

SKOTT, M., ANDREASSEN, T.T., ULRICH-VINTHER, M., CHEN, X. KEYLER, D.E., LESAGE, M.G., PENTEL, P.R., BECHTOLD, J.E., SOBALLE, T. Tabacco extract but not nicotine impairs the mechanical strength of fracture healing in rats. **J. Orthop. Res.**, v.27, n.7, p.1472-79, 2006.

SMELTZER, S.C. e. BARE, B.G. **Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SVENDSEN, P., HAU, J. Handbook of laboratory animal science. V.1, **CRC Press**, Boca Raton, London, 1984.

STOBAUGH, R.H. Status of the hydroxyapatite coats unilateral subperiosteal implant usin direct bone impressões. **Dental Clinics of North America**., v.36, n.1, p.67-76, 1992.

SWEET, J.B., BUTLER, D.P. The relationship of smoking to localized ostitis. **J. Oral Surg**, v.37, p. 732-35, 1979.

SYLVERSEN, U., NORDSLETTEN, L., FALCH, J.A., MADSEN, J.E., NILSEN, O.G., WALDUM, H.L. Effect of lifelong nicotine inhalation on bone mass and mechanical propertis in female rats femurs. **Calcif Tissue Int.**, v.63, n3, p 246-249, 1999.

THOME, J.F.; BILEZIKIAN, J.P. Hypocalcemia emergencies. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v.22, p.363-375, 1993.

TORTORA, G.J. **Corpo Humano: Fundamentos de Anatomia e Fisiologia**. 4 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2000.

TORTORA, G.J. e CRABOWSKI, S.R. **Princípios de Anatomia e Fisiologia**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

TRIPLETT, R.G., SCHOW, S.R. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. **J. Oral Maxil. Surg.**, v.54, n.4, p.486, April 1996.

UCHIDA, A., ARAKIN, N., SHINTO, Y, YOSHIKAWA, H, KURISAKI, E. ONO, K. The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone-tumor surgery. **J. of Bone and Joint Surgery British**, v.72, n.2, p.298-302, 1990.

VIDIGAL Jr., G.M.; GOISMAN, M. Osseointegração × biointegração: uma análise crítica. **Rev. Bras. Odontol.**, v.4, p.54-56, 2003.

WEISBROTH, S.H., PAGANELLI, R.G., SALVIA, M. Evaluation of a disposable system during shipment of laboratory rats and mice. **Lab. Anim.Sci.**, v.27, p.186-194, 1977.

YUHARA, S., KASAGI, S., INOUE, A., OTSUKA, E., HIRISE, S., HAGIWARA, H. Effets of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. **Eur J Pharmacol**, v.383, n.3, p.387-393, Nov. 1999.

ZHANG, M. WANG, J.J., CHEN, Y.J. Effects of mechanical pressure on intracellular calcium release channel and cytoskeletal structure in rabbit mandibular condylar chondrocytes. **Life Sci.**, v.18, n.78, p.2480-84, Dec, 2006.



**Tabela 02.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do consumo líquido dos grupos ao longo de 90 dias de experimento.

Grupos	Diferença	q	Valor de p	Significância
CT x A	-262,17	10,140	p<0,001	*
CT x N	-50,000	1,934	p>0,05	ns
CT x N+A	-309,92	11,987	p<0,001	**

OBS - Para q maior que 3.780 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representa diferença não significativa.

**Tabela 03.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do consumo de dieta sólida dos grupos ao longo dos 90 dias de experimento.

Grupos	Diferença	q	Valor de p	Significância
CT x A	-47.337	3.789	p>0,05	ns
CT x N	-25.580	2.048	p>0,05	ns
CT x N+A	-77.563	6.209	p<0,001	*

OBS - Para q maior que 3.780 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representa diferença não significativa.

**Tabela 04.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do Ganho de Peso (gramas) dos grupos ao longo de 12 semanas.

Grupos	Diferença	q	Valor de p	Significância
CT x A	-31.502	5.899	p<0,01	*
CT x N	-9.818	1.838	p>0,05	ns
CT x N+A	-78.502	14.773	p<0,001	**

OBS - Para q maior que 3.829 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representa diferença não significativa.

**Tabela 05.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do volume ósseo neoformado ao redor do implante de HAD.

Grupos	Diferença	q	Valor de p	Significância
CT x A	12.800	23.977	p<0.001	**
CT x N	9.800	18.357	p<0.001	*
CT x N+A	16.800	31.469	p<0.001	**

OBS - Para q maior que 4.046 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representa diferença não significante.

**Tabela 06.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do consumo volume ósseo neoformado ao redor do implante de HAP.

Grupos	Diferença	q	Valor de p	Significância
CT x A	10.000	10.206	p<0.001	**
CT x N	4.800	4.833	p<0.05	*
CT x N+A	16.400	16.738	p<0.001	**

OBS - Para q maior que 4.046 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representam diferença não significante.

**Tabela 07.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do ensaio mecânico dos fêmures.

Grupos	Diferença	q	Valor de p	Significância
CT x A	10.200	1.483	p>0.05	Ns
CT x N	13.950	1.483	p>0.05	Ns
CT x N+A	18.300	1.483	p>0.05	*

OBS - Para q maior que 4.046 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representa diferença não significante.

**Tabela 08.** Análise de Comparações Múltiplas (Teste de Tukey-Kramer) do nível de cálcio sérico sangüíneo.

<b>Grupos</b>	<b>Diferença</b>	<b>q</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Significância</b>
CT x A	1.600	6.047	p<0.01	*
CT x N	1.000	3.780	p>0.05	ns
CT x N+A	2.000	7.559	p<0.001	**

OBS - Para q maior que 4.046 o valor de p menor que 0,05. Quanto maior o número de \* maior a significância estatística e ns representa diferença não significante.

## DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Mestrado** intitulada **“EFEITOS DO ETANOL E NICOTINA SOBRE A RESISTÊNCIA MECÂNICA DO OSSO E OSTEOGÊNESE AO REDOR DE IMPLANTES DE HIDROXIAPATITA”**:

não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 658-3).

tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

Aluna: Evelise Aline Soares

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Camilli

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido     Indeferido

Nome: **Profa. Dra. RENATA MARIA A. GUARALDO**

Função: **Presidente**

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/IB - UNICAMP**