UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ROGÉRIO LEONE BUCHAIM

**Ação da matriz óssea bovina desmineralizada na neoformação
óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Avaliação
histológica e histométrica**

BAURU
2011

ROGÉRIO LEONE BUCHAIM

Ação da matriz óssea bovina desmineralizada na neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental: Avaliação histológica e histométrica

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Livre-Docente em Anatomia.

BAURU

2011

Buchaim, Rogério Leone
B851a Ação da matriz óssea bovina desmineralizada na
 neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo
 experimental: avaliação histológica e histométrica /
 Rogério Leone Buchaim. – Bauru, 2011.
 56 p. : il. ; 31 cm.

Tese. (Livre-Docência) – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEa)
FOA/UNESP
Protocolo nº: 62/04
Data: 12 de Janeiro de 2005

DEDICATÓRIA

Dedico a minha esposa Daniela, presente em todos os momentos de minha vida acadêmica, incentivando e cooperando em todos os passos, superando as ausências por um único motivo: AMOR.

Aos meus pais Angelo e Olinda, que distantes do seu filho, torcem, rezam, vibram.

DEUS, acima de tudo, eu sempre serei grato por toda minha vida, pela felicidade na profissão que exerço, no local que trabalho e aos amigos que me acompanham.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários da Disciplina de Anatomia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), em especial aos Professores Antonio de Castro Rodrigues e Jesus Carlos Andreo, grandes incentivadores de minha Livre-Docência, que em todos os momentos justificam o significado da palavra amizade: *Um relacionamento humano que envolve o conhecimento mútuo e a afeição, além de lealdade.*

Aos pós-graduandos Daniel Dias, Geraldo Júnior e Letícia Daré pela grandiosa ajuda na análise morfométrica da pesquisa.

A aluna de graduação em Odontologia da Universidade de Marília Jéssica Oliveira, pelo auxílio na tradução.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA/UNESP), em especial ao Professor Titular José Américo de Oliveira, a quem devo grande parte de minha carreira universitária, amando a profissão que exerce, transmitindo seus conhecimentos, trabalhando incansavelmente pela universidade pública, pelos alunos e colegas, sempre com muita dignidade e honestidade.

Ao amigo José Ari Gualberto Junqueira, que com sua competência transforma a difícil arte de preparação e conservação de peças anatômicas numa simples forma de transmitir seu amor pela profissão.

Aos professores, diretores e funcionários da Universidade de Marília, que de 1989 a 2010, sempre confiaram no meu trabalho.

Ao Professor Titular Horácio Faig Leite, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC/UNESP), pelo exemplo de honestidade e eterno defensor da Anatomia.

Aos professores, diretores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Bauru, pela excelente acolhida e recepção.

RESUMO

O etanol inibe a proliferação de células osteoblásticas, gerando baixa massa óssea e aumento na prevalência de fraturas na população alcoólatra. A quantidade de defeitos ósseos criados cirurgicamente, e pelos vários tipos de acidentes, tem aumentado atualmente e existe uma preocupação muito grande na descoberta de substâncias que acelerem a neoformação óssea que preencham essas cavidades. Baseado no exposto anteriormente resolveu-se realizar este trabalho com o objetivo de observar se a matriz óssea bovina desmineralizada (Gen-ox[®]) altera a neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental, usando para isso análise histológica e histométrica. Para isso foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), separados em 2 grupos de 20 animais cada, assim distribuídos: Grupo E1, que recebeu álcool etílico a 25%, diluído em água de torneira, e cavidade cirúrgica preenchida somente por coágulo sanguíneo, e Grupo E2, que recebeu álcool etílico a 25%, diluído em água de torneira, e cavidade cirúrgica preenchida por Gen-ox[®]. Após um período de 3 semanas de adaptação gradativa ao álcool, os animais receberam dieta alcoólica de 25% por um período de 90 dias. Decorrido esse período, a tíbia esquerda de todos os animais foi submetida a uma cirurgia onde se produziu uma cavidade cirúrgica experimental, que no Grupo E1 ficou preenchida por coágulo sanguíneo, e no Grupo E2 preenchida por Gen-ox[®]. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados em períodos de 10, 20, 40 e 60 dias contados a partir do dia da cirurgia experimental, para retirada de parte da tíbia, onde a cavidade cirúrgica foi realizada. Os blocos retirados foram processados histologicamente e submetidos à coloração por Tricrômico de Masson, para estudo histomorfológico e histométrico da área total do defeito, quantidade de tecido conjuntivo presente e quantidade de tecido ósseo neoformado. Os resultados mostraram que a reorganização da medula óssea e reparação total da cavidade cirúrgica no Grupo E1 ocorreram num menor espaço de tempo do que no Grupo E2. Observou-se também que no período final do experimento os animais do Grupo E2 apresentaram áreas de tecido conjuntivo e trabéculas ósseas espessas ao redor das partículas do material implantado. Baseado nesses resultados pode-se concluir que a utilização do Gen-ox[®] retardou o processo de reparação óssea por um período de

60 dias, em ratos alcoolizados experimentalmente, muito embora possa ser utilizado como material de preenchimento, pois demonstra atividade osteocondutiva, com a formação de tecido ósseo ao redor das partículas do enxerto.

Palavras-chave: rato, tíbia, álcool, hidroxiapatita, osso desmineralizado.

ABSTRACT

Ethanol inhibits the proliferation of osteoblastic cells, leading to low bone mass and increased prevalence of fractures in the alcoholic population. The amount of bone defects surgically created, and various types of accidents has increased and there is currently a great concern in the discovery of substances that accelerate new bone formation to fill those cavities. Based on the foregoing it was decided to undertake this work in order to see whether demineralized bovine bone (Gen-ox[®]) alters bone formation in rats subjected to experimental alcoholism, using it for histological and histometric analysis. For this we used 40 male rats (*Rattus norvegicus*) separated in two groups of 20 animals each one, distributed as follows: Group E1, which received 25% ethanol, diluted in tap water, and the surgical cavity filled only by a blood clot, and Group E2, which received 25% ethanol, diluted in tap water, and the surgical cavity filled with Gen-ox[®]. After a period of three weeks of gradual adaptation to alcohol, the animals received 25% alcohol diet for a period of 90 days. After this period, the left tibia of all animals underwent a surgery where it produced an experimental surgical cavity, which in Group E1 was filled by blood clot, and in Group E2 filled with Gen-ox[®]. Five animals from each group were sacrificed on days 10, 20, 40 and 60 days from the day of experimental surgery to remove part of the tibia, where the sinus surgery was done. The blocks were removed and processed histologically stained by Masson trichrome, for histomorphological and histometric study of the total area of the defect, amount of connective tissue and amount of new bone. The results showed that the reorganization of the bone marrow and full repair of the surgical cavity in Group E1 had occurred in a shorter time than in Group E2. It was also noted that in the final period, the animals in Group E2

showed areas of connective tissue and thick bone trabeculae around the particles of the implant. Based on these results we can conclude that the use of Gen-ox[®] delayed the process of bone repair for a period of 60 days in rats experimentally intoxicated, although it can be used as filling material, because it shows osteoconductive activity, with the bone tissue formation around the graft particles.

Keywords: rat, tibia, alcohol, hydroxyapatite, demineralized bone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Incisão.....	32
Figura 2 - Preparação da cavidade cirúrgica (seta) na tíbia (T).....	32
Figura 3 - Cavidade (seta) na tíbia preenchida com Gen-ox [®] (Biomaterial-B).....	32
Figura 4 - Sutura.....	32
Figura 5 - Cavidade cirúrgica na tíbia e mensurações realizadas.....	33
Figura 6 - 10 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.....	35
Figura 7 - 10 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.....	35
Figura 8 - 20 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.....	36
Figura 9 - 20 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.....	36
Figura 10 - 40 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson....	36
Figura 11 - 40 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson....	36
Figura 12 - 60 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson....	37
Figura 13 - 60 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson....	37

- GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Valores médios da área de tecido ósseo do Grupo E1, em mm^2 , nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa.....38
- Gráfico 2 - Valores médios da área de tecido ósseo do Grupo E2 (mm^2), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.....38
- Gráfico 3 - Valores médios da área de tecido ósseo (mm^2), comparando-se os Grupos E1 e E2 nos diferentes períodos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período.....38
- Gráfico 4 - Valores médios da área de tecido conjuntivo do Grupo E1 (mm^2), nos diferentes períodos. Letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.....39
- Gráfico 5 - Valores médios da área de tecido conjuntivo do Grupo E2 (mm^2), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.....39
- Gráfico 6 - Valores médios da área de tecido conjuntivo (mm^2), comparando-se os Grupos E1 e E2 nos diferentes períodos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período.....40
- Gráfico 7 - Valores médios da área total analisada no local do defeito do Grupo E1, (mm^2), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que

não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.....40

Gráfico 8 - Valores médios da área total analisada no local do defeito do Grupo E2, (mm^2), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.....41

Gráfico 9 - Valores médios da área total da cavidade cirúrgica (mm^2), comparando-se os Grupos E1 e E2 nos diferentes períodos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período.....41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 EFEITOS DO ÁLCOOL EM GERAL.....	15
2.2 EFEITOS DO ÁLCOOL NO TECIDO ÓSSEO.....	17
2.3 ESTUDO DOS BIOMATERIAIS.....	22
3 PROPOSIÇÃO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 CIRURGIA EXPERIMENTAL.....	31
4.2 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	32
5 RESULTADOS.....	34
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	35
5.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....	37
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O álcool provoca desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, atuando de forma negativa na reparação óssea (MADDALOZZO et al., 2009; BROULIK et al., 2010). Esse desequilíbrio pode ser agravado se o alcoolismo estiver associado a outros fatores, como o tabagismo (PEREIRA et al., 2008), menopausa (ICHCHOU et al., 2010), inatividade física (FITZGERALD; CARPENTER, 2010) e ingestão deficiente de cálcio (LEITE; PADRÃO; MOREIRA, 2007). Estudos em ratos demonstraram que o consumo moderado do etanol (3% de ingestão calórica), provoca uma diminuição no processo de “turnover” ósseo, comprovando que mesmo com a presença do álcool em nível moderado, ele exerce um efeito adverso sobre o osso medular (TURNER et al., 2001).

O etanol inibe a proliferação de células osteoblásticas, gerando baixa massa óssea e aumento a prevalência de fraturas na população alcoólatra (GARCIA-SANCHEZ et al., 1995). A ingestão aguda de álcool provoca um efeito inibitório sobre a paratireóide e também sobre células osteoblásticas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças ósseas (GARCIA-SANCHEZ et al., 1995; KLEIN; CARLOS, 1995; GONG; WEZEMAN, 2004; IWANIEC et al., 2008).

Nas mulheres alcoólatras, sem cirrose hepática, o consumo crônico do álcool promove uma redução da densidade mineral óssea, principalmente no fêmur, vértebras e osso do quadril, sendo um dos principais fatores associados ao desenvolvimento da osteoporose (KIM et al., 2003; BODY et al., 2008; DÍEZ-RUIZ et al., 2010).

Em animais que foram submetidos a diferentes concentrações de alcoolização (6%, 15% e 25%), os resultados demonstraram que a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica e pode-se concluir que as 03 dietas alcoólicas influenciaram na neoformação óssea em todas as suas fases, retardando o processo de reparação óssea (CURI et al., 2008; BUCHAIM et al., 2009).

Visando a reconstrução total ou parcial de massas ósseas perdidas e a restauração ou aumento dos tecidos biológicos, principalmente nas áreas médica e odontológica, é crescente o interesse no desenvolvimento de biomateriais que

possuam propriedades biológicas e físico-químicas adequadas, incorporando os avanços científico-tecnológicos de cada época (BUCHAIM et al., 2007).

É comum o surgimento de tecido fibroso onde deveria existir tecido ósseo na reparação de defeitos em pacientes que ingerem álcool. Por isso as pesquisas estão evoluindo no sentido de possibilitar a colocação de biomateriais no interior de cavidades após exodontias, remoções de cistos e outras patologias onde possa ocorrer um defeito ósseo após um acidente ou um procedimento cirúrgico (MARZOLA et al., 1996; PINHEIRO et al., 2003).

As técnicas de enxertos ósseos autógenos são muito utilizadas, porém, apesar de suas grandes vantagens biológicas, apresentam inconvenientes como a necessidade de hospitalização, intervenções em outra área do organismo, morbidade da área doadora e susceptibilidade à infecções (GOODMAN, 2010).

O enxerto xenogênico vem apresentando resultados promissores. Ele é embasado na abundância da matriz, baixo custo do osso bovino e no processo mecânico e químico adequado de preparação (BIGHAM et al., 2008). O osso bovino inorgânico (desproteínizado) liofilizado segue o mesmo processo de preparo da matriz orgânica, porém, não sofre o processo de descalcificação, onde são preservados todos os componentes minerais do osso e eliminado toda a parte orgânica (BMPs, colágeno, proteínas), ou seja, é preservada a parte inorgânica (SANADA et al., 2003; GERBI et al., 2005; MARIN et al., 2007).

O papel de carreador dos fatores de indução óssea potencialmente pode ser desempenhado pelo osso bovino cortical ou medular, macro ou microgranular, desproteínizado, como já foi demonstrado em estudos clínicos (MARZOLA et al., 1996; YUKNA et al., 1998). Além de fornecer uma estrutura de suporte e osteocondução, podem prover também um alto conteúdo de cálcio e fósforo, essenciais para a neoformação do tecido ósseo (DAMIEN et al., 1995; SCIADINI; DAWSON; JOHNSON, 1997; RESTREPO et al., 2002).

Assim, pensou-se em observar se osso bovino obtido de cortical particulada e desmineralizada alteraria a neoformação óssea em ratos alcoolizados experimentalmente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

A ingestão de bebidas alcoólicas é um hábito freqüente e generalizado em muitos países, seja no Oriente ou no Ocidente. O uso de substâncias, como o álcool, capazes de modificar o humor e o comportamento, tem sido considerado "normal" e até apropriado, sob certas circunstâncias, tais como: supressão da tensão, eliminação da dor, aumento do apetite e da produção de leite (GRUNSPUM, 1984; MENELLA; BEAUCHAMP, 1991).

O etanol é a droga ativa mais largamente consumida, sendo o alcoolismo considerado um problema maior do que a farmacodependência na América Latina, onde as bebidas alcoólicas já eram consumidas antes da chegada dos europeus (NEGRETE, 1976). Atualmente, o alcoolismo é considerado o maior problema de saúde pública, com conseqüências irreversíveis sobre o organismo sadio adulto, na maioria dos casos só ocorrendo, em média, após 10 anos de consumo (DANTAS, 1983).

O álcool é uma substância que não atua em um único tipo de tecido, a sua ação é geral, e, portanto poder-se-ia dizer que ele é multifatorial, atingindo vários órgãos ao mesmo tempo, alguns de forma direta e outros de forma indireta. Por isso, pensou-se em fazer uma divisão na revisão da literatura mostrando inicialmente a ação desta droga em todos os sistemas, para em seguida mostra o seu efeito no sistema esquelético.

2.1 Efeitos do álcool em geral

Fish e Nelson (1942) já realizaram estudos sobre a distribuição do álcool em tecidos de ratos, por meio de injeção intraperitoneal desta substância, onde verificaram maiores concentrações no baço, cérebro, coração e rim. E, ao contrário desses resultados, encontraram menores concentrações nos tecidos, muscular e ósseo.

Owens e Marshall (1955) concluíram em seus experimentos em ratos, que a velocidade de declínio da concentração de álcool no sangue é constante, independente da quantidade existente.

Ratcliffe (1972), para observar os efeitos do álcool sobre o crescimento, administrou doses crescentes de etanol de 2,5% a 25% em ratos durante sete semanas. Ele verificou que o etanol promove uma ação depressiva sobre o hipotálamo, provocando uma redução na secreção do hormônio do crescimento, produzida pela porção anterior da glândula hipófise. O autor concluiu que o uso prolongado do etanol induziu a um retardo harmonioso no crescimento dos animais.

Willis et al. (1983) relataram que as funções do trato reprodutivo masculino são sensíveis ao uso do etanol, produzindo uma diminuição dos níveis de testosterona, redução no tamanho testicular e peso dos órgãos sexuais, decréscimo na espermatogênese, aumento de células germinativas imaturas dentro dos túbulos seminíferos e aumento da frequência de inatividade dos túbulos seminíferos.

Segundo Palmer (1989), o álcool é metabolizado predominantemente no fígado, podendo enfraquecer e impedir a capacidade do mesmo em metabolizar nutrientes, esteróides, vitaminas e outros compostos. Nesse estudo realizado no Reino Unido, onde o alcoolismo afetava de 1 a 1,5 milhões de pessoas, o pesquisador concluiu que o principal efeito do consumo excessivo de álcool seria sobre o Sistema Nervoso Central e no comportamento social.

Alterações hematopoiéticas, deficiências vitamínicas: vitaminas B-1, B-2, B-6, E, vitamina C, foram também encontradas em estudos realizados por Fortes (1991) em um grupo de alcoólatras. Ele descreveu que principalmente a deficiência das vitaminas, E, C, zinco e fósforo alteram o comportamento da medula óssea. No mesmo ano, St. Clair observou que o alcoolismo seria a causa mais comum de trombocitopenia, devido a vacuolização de células precursoras da medula óssea. O autor concluiu que o efeito depressivo do álcool sobre a medula óssea pode levar a anemias e diminuição na produção de todos os tipos de células sanguíneas e fatores de coagulação.

O alcoolismo pode ocasionar vários problemas físicos e mentais, em indivíduos de qualquer idade. Alguns dos problemas mais importantes, principalmente em idosos alcoólicos são: enfraquecimento do sistema imune, aumento da incidência da hipertensão arterial, arritmia cardíaca, infarto do

miocárdio, de derrames, câncer esofágico, cirrose e outras doenças hepáticas (SMITH, 1995).

Ainda no ano de 1995, os pesquisadores Lin, Lee e Leitcher estudaram os efeitos de diabetes maternos e ingestão de álcool, separadamente e em combinação, sobre o crescimento fetal e seu desenvolvimento em ratas grávidas onde concluíram que a administração de álcool materno potencializava os efeitos de diabetes maternos, aumentava a incidência de malformações fetais e o retardo do desenvolvimento esquelético.

De acordo com Weinstein et al. (1996), o consumo de tabaco e álcool tem uma importante função no desenvolvimento de doenças periodontais, diminuindo a eficiência das defesas do hospedeiro. Os fumantes e alcoólatras possuem respostas menos favoráveis na terapia periodontal, sendo então esses dois fatores altamente correlacionados com as doenças periodontais e câncer oral.

Estudos realizados em ratos submetidos à dieta alcoólica por longo tempo, no período de crescimento, mostraram que, independente do sexo, ocorria uma diminuição no peso e comprimento, além de apresentarem prejuízos irreversíveis no esqueleto (SAMPSON, 1998; SAMPSON et al., 1998; WEZEMAN et al., 1999).

A constante associação pelos pacientes de álcool com a nicotina provoca efeitos deletérios na atividade osteoblástica, importante para a integração dos implantes dentários, muito utilizados recentemente para reposição de dentes ausentes (PEREIRA et al., 2008).

2.2 Efeitos do álcool no tecido ósseo

Atualmente é grande a preocupação das áreas, médica e odontológica, quanto à perda óssea associada ao alcoolismo, devida em muitos casos ao surgimento de tecido fibroso onde deveria formar tecido ósseo. Assim, a área de biomateriais para utilização em clínica médica-odontológica foi uma das que apresentou extraordinário desenvolvimento na última década e está em crescente desenvolvimento.

Segundo Soubhia (1984), ratos tratados com aguardente de cana apresentaram alterações no processo de reparo alveolar. A autora utilizou um grupo controle, que recebeu água como dieta e um grupo experimental, que recebeu aguardente de cana 50º Gl. O grupo experimental teve uma adaptação gradativa ao álcool, sendo 30% por 10 dias, 60% por 10 dias e aguardente de cana pura a partir do 21º dia por 60 dias. Após esse prazo foi realizada a extração do incisivo superior direito. Foi concluído que os animais do grupo experimental apresentaram um retardo na cronologia do processo de reparo alveolar em todos os tempos pós-operatórios e que as trabéculas ósseas estavam preenchidas por tecido ósseo neoformado imaturo após 21 dias.

Bikle et al. (1985), analisaram doenças ósseas em oito homens brancos, com idade variando entre 49 e 61 anos, que abusaram do consumo álcool por mais de dez anos. Apesar das diversas alterações nutricionais, os autores sugeriram que as doenças ósseas ocorreram em decorrência da inibição da remodelação óssea por meio do mecanismo independente do hormônio calcitropic.

O fator subnutrição, com deficiência vitamínica, é constante no indivíduo alcoólatra. Muller em 1991 estudou a influência da subnutrição no processo de consolidação de fraturas em tíbia de ratos com restrição alimentar e verificou que no grupo subnutrido os animais apresentaram menor peso corporal, com características histológicas hepáticas de deficiência protéica. Além disso, o calo de fratura desses animais foi menor, com osteóide rarefeito em colágeno.

Bikle (1993), estudando a relação entre doenças ósseas e o uso abusivo do álcool, descreveu que a doença óssea predominante é a osteoporose, principalmente em homens de meia idade, associada ao uso do cigarro.

Um ano depois, Parra-Cabrera et al. (1994), analisando os fatores que levam a osteoporose, verificou que o mecanismo de perda óssea envolve predominantemente a atividade de células osteodestrutivas sobre o reparo ósseo e mulheres perimenopausas constituem o grupo de maior risco. O álcool e a cafeína também contribuem para uma progressiva desmineralização óssea, além de fenômenos relacionados com hormônios, hereditariedade e origem étnica.

Estudos comparativos entre homens brancos e negros, envolvendo os efeitos do consumo excessivo de álcool sobre a massa óssea, demonstraram que em indivíduos brancos, idade e duração do álcool tiveram efeitos significantes

independentes sobre a densidade mineral óssea, enquanto que em consumidores negros, somente a idade foi um fator que afetou a massa óssea (ODVINA, 1995).

No mesmo ano, pesquisas envolvendo a associação do consumo do álcool e a densidade mineral óssea em idosos mostrou que mulheres pós-menopausa com ingestão de 206,99 ml/semana tiveram um aumento na densidade óssea (7,7%), efeito relacionado com o aumento dos níveis hormonais de estrógeno através do álcool (FELSON et al., 1995).

Ainda em 1995, foi demonstrado que o etanol inibe a proliferação de células osteoblásticas, gerando baixa massa óssea e aumento na prevalência de fraturas na população alcoólatra. A ingestão aguda de álcool provoca um efeito inibitório sobre a paratireóide e também sobre células osteoblásticas, contribuindo para o desenvolvimento de doenças ósseas (KLEIN e CARLOS, 1995; GARCIA-SANCHEZ et al., 1995).

No ano seguinte, Lau e Cooper (1996), observaram que a menor densidade mineral óssea produzida por inatividade física, baixa ingestão de cálcio, fumo e consumo excessivo de álcool levaram a incidência de fraturas osteoporóticas de quadril em aproximadamente 10 por 1000 em mulheres e homens com 70 anos de idade.

Segundo Clark e Sowers (1996), mulheres dependentes de álcool apresentam baixa densidade mineral óssea: 6,8% mais baixa na cabeça do fêmur, e 6,9% mais baixa nas vértebras lombares, onde essas diferenças tiveram interferências também pelo consumo de cigarros.

Indivíduos que apresentam consumo excessivo de álcool e redução na massa óssea confirmaram o efeito inibitório direto do etanol sobre a proliferação dos osteoblastos, sem toxicidade celular, o que leva a um aumento na prevalência de fraturas e incidência de osteoporose (KLEIN; FAUSTI; CARLOS, 1996).

Para melhor compreender os efeitos do consumo de álcool sobre o processo de remodelação óssea "in vivo", um estudo foi realizado em ratos adultos com dieta líquida contendo 35% de etanol por 6 semanas, observando a atividade osteoblástica. Foi concluído que os animais, que receberam o etanol como dieta líquida, apresentaram uma significativa diminuição na quantidade e atividade dos osteoblastos na superfície óssea, confirmando que o alcoolismo crônico está associado com o aumento do risco de fraturas e incidência de osteoporose (DYER; BUCKENDAHL; SAMPSON, 1998).

No ano seguinte, Sampson e Spears (1999) também investigaram os efeitos deletérios do consumo crônico do álcool sobre os ratos jovens, por meio de um estudo histomorfométrico. Verificaram que a formação óssea nos ratos alcoólatras estava diminuída, efeito associado à redução da atividade osteoblástica, e que a osteopenia não era completamente reversível com a retirada da dieta alcoólica.

Segundo Dai et al. (2000), o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, provocada pelo álcool, atua de forma negativa na reparação óssea. Esse desequilíbrio pode ser agravado se o alcoolismo estiver associado ao fumo.

Nishiguchi et al. (2000) relataram uma perda de densidade mineral óssea de L2 a L4 da coluna vertebral, em ratos machos e fêmeas após dieta líquida alcoólica, sem determinar se a perda óssea foi de osso cortical ou osso medular vertebral.

Em 2001, Turner et al. notaram que em ratos adultos, com consumo moderado do etanol (3% de ingestão calórica), ocorreu uma diminuição no processo de “turnover” ósseo, suportando a sugestão que mesmo a presença do álcool em nível moderado tem um efeito adverso sobre o osso medular.

O uso abusivo do álcool inibe o crescimento ósseo, diminui sua formação e aumenta o risco de fraturas, interferindo no processo de cicatrização (ELMALI et al., 2002; BUCHAIM et al., 2002).

O álcool, quando consumido por muito tempo, durante o período de crescimento em ratos e ratas prejudica a osteogênese, reduzindo a massa óssea. Realizou-se uma avaliação dos efeitos do consumo do álcool sobre a densidade e o peso vertebral, durante o período de crescimento de ratos, por meio de dieta líquida alcoólica a 36% de ingestão calórica. Foi concluído que o consumo crônico do álcool, durante o período de crescimento esquelético, pode apresentar uma contribuição significativa no desenvolvimento de anormalidades sobre as vértebras, acompanhada de osteopenia (WEZEMAN et al., 2003).

Kim et al. (2003), realizaram uma pesquisa em mulheres alcoólatras para avaliar os efeitos do consumo crônico do álcool sobre a densidade mineral óssea, as quais não apresentavam cirrose hepática. Eles concluíram que houve uma redução da densidade óssea, principalmente no fêmur e osso do quadril, associado a osteoporose. Além disso, verificaram também que a osteocalcina, um marcador da formação óssea apresentou-se pouco diminuída.

Recentemente, um estudo foi realizado para observar os efeitos do álcool sobre o gene de expressão, síntese protéica e mineralização, em células tronco mesenquimais derivadas da medula, induzidas pela diferenciação osteogênica *in vitro*. Coletivamente os dados sugeriram que, o álcool altera a diferenciação osteogênica sobre as culturas de células ósseas humanas mesenquimais derivadas da medula durante sua formação, reduzindo conseqüentemente a neoformação óssea (GONG e WEZEMAN, 2004)

Segundo Willians et al. (2005), a osteoporose está associada consideravelmente com morbidade e mortalidade em mulheres pós-menopausa, onde o consumo moderado do álcool apresenta efeitos negativos sobre a densidade mineral óssea, aumentando a incidência de fraturas.

Na prevenção da osteoporose é vital a ingestão nutricional de cálcio durante a adolescência, período crítico no desenvolvimento do esqueleto. Os bons hábitos alimentares, em adolescentes do sexo feminino, aumentam a densidade mineral óssea, diminuindo o risco em desenvolver a doença (LEITE; PADRÃO; MOREIRA, 2007).

Diversos fatores são considerados de risco para a osteoporose, como, por exemplo, idade avançada, história familiar de fratura de quadril, IMC baixo (<20), uso de corticóide (> 3 meses), o tabagismo e o consumo excessivo de álcool (BODY et al., 2008).

Avaliando histometricamente o osso alveolar de ratos lactentes submetidos aos efeitos do etanol a 20%, Curi et al. (2008) notaram uma redução significativa no peso corporal, trabeculado ósseo alveolar mais delicado e menor número de osteoblastos e osteócitos, na reparação da exodontia do primeiro molar superior.

No mesmo ano, Iwaniec et al. (2008) investigaram os efeitos do álcool a 35% no tecido ósseo de ratos que receberam uma dose de Paratormônio semelhante a dose terapêutica humana, utilizado em pacientes com osteoporose para aumentar a massa óssea. Concluíram que o consumo de álcool inibe a formação óssea periostal e no tecido ósseo esponjoso da tíbia, prejudicando os efeitos benéficos do Paratormônio no tratamento da osteoporose.

Buchaim et al. (2009) analisaram os efeitos de 3 dietas alcoólicas na reparação óssea de tíbia de ratos (6%, 15% e 25%). O sangue coletado através de punção intra-cardíaca e analisado por cromatografia em camada gasosa e detecção

por ionização por chama encontraram 0,313 g/l +/- 0,04 de etanol nos animais a 6%, 0,429 g/l +/- 0,03 a 15% e 0,540 g/l +/- 0,05 a 25%. As três dietas alcoólicas influenciaram a neoformação óssea em todas as suas fases, retardando o processo de reparação óssea, sendo menor a neoformação nos animais submetidos a 25%.

O consumo de álcool a 35% durante 3 meses em ratos machos ocasionou uma contração muscular menor e mais lenta, menor densidade óssea, menor volume de osso esponjoso na tíbia e vértebras lombares, além de aumentar a adiposidade da medula óssea (MADALLOZZO et al., 2009).

Na utilização de doses de etanol em ratos, comparáveis a um litro de vinho ou 2,5 litros de cerveja para homens adultos, Broulik et al. (2010) comprovaram nos resultados que o etanol gera nos animais redução da densidade mineral óssea em 10% e redução da resistência mecânica do fêmur em 12%, além de redução na espessura da cortical. Esses dados apóiam a hipótese do álcool ser um fator de risco para a osteoporose.

A cirrose hepática é também um fator de risco para a osteoporose. Nos estudos de Díez-Ruiz et al. (2010) sobre a densidade mineral óssea, marcadores de turnover ósseo e citocinas em 33 pacientes com cirrose hepática induzida por álcool, observaram a relação entre a ativação da imunidade celular e a osteoporose, e que a perda da densidade mineral óssea pode estar relacionada com o aumento da reabsorção óssea.

Fitz-Gerald e Carpenter (2010) defendem a utilização do teste de densidade mineral óssea mesmo em atletas ciclistas e triatletas, para avaliar possível potencial para osteoporose futura. A interação genética, atividade e comportamento, alcoolismo, funções mentais e psicológicas, contribuem para a redução na densidade mineral óssea e conseqüente risco aumentado de fratura.

2.3 Estudo dos Biomateriais

Visando a reconstrução total ou parcial de massas ósseas perdidas e a restauração ou aumento dos tecidos biológicos, principalmente nas áreas médica e odontológica, é crescente o interesse no desenvolvimento de biomateriais que

possuam propriedades biológicas e físico-químicas adequadas, incorporando os avanços científico-tecnológicos de cada época.

As técnicas de enxertos ósseos autógenos são muito utilizadas, porém, apesar de suas grandes vantagens biológicas, apresenta inconvenientes como a necessidade de hospitalização, intervenções em outra área do organismo, morbidade da área doadora, susceptibilidade à infecções e, ainda, possibilidade de reabsorção progressiva e constante da área (SANDERS; COX, 1976; BAKER et al., 1979; FRAME, 1987).

O osso é um dos poucos tecidos humanos que regenera totalmente sua forma e função após injúrias, onde no osso regenerado as propriedades do tecido original são restauradas, enquanto que em outros tecidos ocorre a reparação por meio da formação de cicatriz (SCHENK; HERRMANN, 1994).

Devido à possibilidade de transmissão de doenças e risco de reações imunológicas decorrentes de alguns materiais, a ciência está buscando materiais que substituam o osso perdido, ou ainda técnicas que possibilitam a formação de osso a partir de um substrato pré-existente (uso de membranas) ou substâncias que induzam a neoformação óssea (BALHSI; MAGID, 1995).

A hidroxiapatita, até então utilizada isoladamente como condutora da formação óssea, passou a ser adicionada à matriz óssea desmineralizada, na tentativa de tornar mais rápido o processo de neoformação óssea. Essa associação, segundo Damien et al. (1995), aumentou a formação óssea, mas apontou que mais estudos se faziam necessários.

Quanto ao mecanismo de ação, os biomateriais podem ser classificados em osteocondutores, osteogênicos, osteopromotores e osteoindutores.

O material osteocondutor é aquele que orienta a proliferação celular, podendo ser englobado pelo tecido ósseo neoformado, fazendo parte do novo tecido.

Os biomateriais capazes de atuar separando tecidos com características distintas, como fibroblastos e osteoblastos, são chamados de osteopromotores.

Já a osteoindução é definida pela capacidade do material em induzir células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos.

A principal diferença entre um material osteoindutor e um osteocondutor é que o primeiro é biologicamente ativo e o segundo é totalmente inerte, servindo apenas como material de preenchimento (TAGA, 1996).

É preocupação da área médica e odontológica a perda óssea associada ao alcoolismo, com o surgimento de tecido fibroso onde deveria existir tecido ósseo. Por isso desde algum tempo pesquisas estão evoluindo no sentido de possibilitar a colocação de materiais no interior de cavidades ósseas após exodontias, remoções de cistos, apicoplastias ou ainda de outras patologias onde possa vir a ocorrer uma loja óssea após um acidente ou um procedimento cirúrgico (MARZOLA et al., 1996; MARZOLA, 2002).

O tratamento de lesões ósseas com matriz óssea liofilizada humana em partículas é uma alternativa de tratamento utilizada principalmente na área odontológica. No entanto, devido ao seu alto custo e à dificuldade de obtenção de osso humano viável em quantidade, associado à proibição em vários países da comercialização de produtos de órgãos ou tecidos humanos, foi lançado no mercado produtos originados de osso bovino, com as mesmas finalidades (SONIS et al., 1985; TAGA et al., 1997).

Sciadini; Dawson; Johnson (1997) relataram a eficácia da proteína óssea bovina associada a um carreador de coral natural quando comparado ao enxerto ósseo autógeno em defeitos críticos no osso rádio de cães. Utilizando análise radiográfica, histológica e testes biomecânicos observaram maior quantidade de osso neoformado e melhor resistência mecânica no enxerto bovino, além da vantagem do carreador de origem não-humana, que evita o risco de transmissão de doenças ou antigenicidade.

A reconstrução em pacientes edêntulos, com volume e densidade óssea adequada para futura colocação de implantes dentais, tem se tornado uma opção de tratamento viável. Entretanto, existe uma dificuldade para alcançar a região posterior da maxila onde a cortical óssea é delgada devido a severas reabsorções ósseas. Um estudo foi realizado em cirurgias para expansão do seio maxilar em oito pacientes, para avaliar histologicamente e clinicamente diferentes materiais de enxerto: osso desproteinizado granulado bovino (DBBG), osso desmineralizado congelado em pó (DFBP) e hidroxiapatita porosa (PHA). Os resultados indicaram que o osso desmineralizado congelado em pó reabsorveu mais cedo que o osso desproteinizado bovino e a hidroxiapatita (KARABUDA et al., 2001).

O enxerto xenogênico (obtido de outra espécie), vem apresentando resultados promissores. Alicerçado na abundância, baixo custo do osso bovino e no processo mecânico e químico adequado, diversas empresas vêm produzindo

biomateriais com osso bovino para substituição do tecido ósseo, como o Gen-ox[®], utilizado nessa pesquisa, produzido pela Baumer S.A.

O osso bovino liofilizado apresenta-se de fácil manuseio, são materiais reabsorvíveis, biocompatíveis favorecem um preenchimento adequado de toda a loja óssea e é eficaz no reparo de lesões ósseas (RESTREPO et al., 2002).

A matriz óssea bovina inorgânica teve resultados favoráveis quando associada ao P-15, um peptídeo de adesão celular, quando comparada ao osso humano liofilizado. Yukna et al. (1998) obteve esses resultados acompanhando enxertos em defeitos periodontais durante seis meses.

O osso bovino inorgânico (desproteínizado) liofilizado segue o mesmo processo de preparo da matriz orgânica, porém, não sofre o processo de descalcificação, onde são preservados todos os componentes minerais do osso e eliminado toda a parte orgânica (BMPs, colágeno, proteínas, etc.), ou seja, é preservada a parte inorgânica. A desproteínização é obtida através de tratamento térmico a temperaturas superiores a 300 °C, mas, quanto mais alta a temperatura, menor a possibilidade de bioabsorção do material. Por outro lado, o tratamento do osso bovino com solventes orgânicos, álcalis e ácido com concentrações e temperaturas controladas levam à remoção de células, detritos celulares e várias proteínas não colágenas, bem como a porção mineral (SANADA et al., 2003).

Um estudo realizado em ratos *Wistar albinus* teve como objetivo avaliar histologicamente a influência da radiação laser não cirúrgica sobre o reparo ósseo. Os animais foram divididos em 3 grupos, sendo o grupo I (cavidade vazia e não irradiado), grupo II (implante de Gen-ox[®] e não irradiado) e grupo III (Gen-ox[®] e irradiado a cada 48 horas). Observou-se que nos animais irradiados houve um reparo ósseo mais avançado, apresentando uma maior neoformação óssea, bem como uma maior proliferação de fibras colágenas no interior do defeito já a partir de 15 dias após a cirurgia, também considerando a capacidade osteocondutiva do Gen-ox[®] (PINHEIRO et al., 2003).

Segundo Braz et al. (2003), a combinação de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita não causam reações adversas, favorecendo a reparação óssea em defeitos ósseos produzidos em crânios de ratos. Para esse estudo foram utilizados 20 ratos divididos em 2 grupos: grupo I, onde o defeito foi preenchido pela associação dos dois materiais e grupo II, utilizado como controle, onde nada foi

empregado. Aos 60 dias de pós-operatório, o grupo I apresentou uma maior quantidade de osteoblastos e presença de osso, do que o grupo II.

Uma pesquisa realizada na última década avaliou a capacidade, em promover a reparação de lesões ósseas de tamanho crítico em calvária de ratos, de um material de enxerto ósseo orgânico em bloco (Gen-ox[®]), preparado a partir de osso medular bovino. Os resultados obtidos mostraram que na maioria dos 25 casos tratados, o material foi reabsorvido lentamente e serviu como material de preenchimento e mantenedor de espaço, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular e a neoformação óssea a partir das margens da lesão, comprovando sua capacidade osteocondutora (MARTINS et al., 2004).

O Gen-ox[®] também foi utilizado associado à laserterapia e membranas de cortical óssea bovina Gen-derm[®]. Na pesquisa realizada por Gerbi et al. (2005) defeitos ósseos cirúrgicos foram criados em 42 animais, divididos em cinco grupos: Grupo I (controle, 6 animais), Grupo II (Gen-ox[®], 9 animais), Grupo III (Gen-ox[®] Laser, 9 animais), Grupo IV (Gen-ox[®] Gen-derm[®], 9 animais) e Grupo V (Gen-ox[®] Gen-derm[®] Laser, 9 animais). Os animais do grupo irradiado receberam 16 J/cm² por sessão dividida em quatro pontos ao redor do defeito (4 J/cm²), sendo a primeira irradiação imediatamente após a cirurgia e repetiu sete vezes a cada 48 h. Os animais foram eutanasiados com 15, 21 e 30 dias. Os resultados demonstraram evidência histológica de uma maior quantidade das fibras de colágeno nas fases iniciais da cicatrização óssea (15 dias) e aumento na quantidade de trabéculas ósseas bem organizadas no final do período experimental (30 dias) em animais irradiados em comparação com os não irradiados.

Estudos comparam também a efetividade dos enxertos xenogênicos em relação ao osso cortical autógeno. Bigham et al. (2008) fizeram essa avaliação de forma radiológica, histopatológica e biomecânica em 20 coelhos e concluíram que ocorre um reparo semelhante nos dois grupos, sem diferença estatística significativa.

A tendência das pesquisas no momento é de novas técnicas baseadas nas células mesenquimais indiferenciadas e células osteoprogenitoras, geralmente associadas a matrizes carreadoras tridimensionais, principalmente de colágeno. O futuro vai definir as indicações e resultados destes produtos (GOODMAN, 2010).

3 PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Baseado no exposto anteriormente resolveu-se realizar este trabalho com o objetivo de observar se a matriz óssea bovina desmineralizada (Gen-ox[®]) altera a neoformação óssea em ratos submetidos ao alcoolismo experimental, nos períodos de 10, 20, 40 e 60 dias, usando para isso análise histológica e histométrica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus norvegicus*), adultos (com 03 meses de idade), da linhagem Wistar, com peso médio de 290 gramas, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Araçatuba- SP.

A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA), de acordo com o protocolo n. 62/04, da UNESP de Araçatuba (SP).

No Biotério, os animais foram criados individualmente em gaiolas de aço inoxidável, com comedouros e bebedouros individuais, para melhor controle dos consumos sólido e líquido.

A sala do Biotério onde os animais ficaram possuía iluminação artificial comandada por “timer”, que controlou o ciclo claro/escuro de 12 horas, exaustor e ar condicionado, que mantinha a temperatura média de 21°C, confirmada por um termômetro de temperatura ambiente.

Os animais foram distribuídos em 02 grupos, de 20 ratos cada, sendo:

- 1) Grupo E1, que recebeu álcool etílico a 25%, diluído em água de torneira, e cavidade cirúrgica preenchida somente por coágulo sanguíneo.
- 2) Grupo E2, que recebeu álcool etílico a 25%, diluído em água de torneira, e cavidade cirúrgica preenchida por osso bovino desmineralizado cortical.

Os animais de todos os grupos receberam sempre a mesma dieta sólida (ração Nuvilab CR1; NUVITAL, Colombo, PR, Brasil) “*ad libitum*” durante todo o experimento.

O modelo de alcoolismo utilizado foi o semivoluntário em que a administração de álcool diluído era o único alimento líquido disponível ao animal.

Os grupos experimentais foram submetidos, inicialmente, a adaptação gradativa ao álcool, para que estes animais fossem considerados alcoólatras crônicos e, também, evitando a sua morte (TIRAPELLI; TAMEGA; PETRONI, 2000).

Essa adaptação constituiu-se no fornecimento através da dieta líquida de álcool etílico diluído, na primeira semana de 8 %, na segunda semana de 16 % e, por fim, na terceira semana de 25 %.

Após esse período de adaptação, os animais continuaram a receber dieta alcoólica, na concentração final, por um período de 90 dias.

O álcool utilizado para diluição foi o etílico absoluto (Álcool Etílico Absoluto; Labsynth, Diadema, SP, Brasil).

Após o período de alcoolização de 90 dias os animais foram submetidos à cirurgia experimental. Os animais continuaram sendo alcoolizados após a realização da cirurgia até o período corresponde ao do sacrifício.

4.1 Cirurgia experimental

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

Realizou-se a tricotomia na região ventral do membro posterior e desinfecção do campo operatório com solução tópica de iodo a 10%.

A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma incisão linear de 20 mm. de extensão, no sentido crânio-caudal, no membro pélvico esquerdo, seccionando-se a pele e as fáscias musculares, para exposição e divulsão do tecido muscular que envolve a tíbia (Fig.1).

Estendeu-se a incisão até o periósteo, permitindo seu deslocamento, afastando-o no sentido ântero-posterior, obtendo-se assim uma ampla área de trabalho sobre a tíbia.

Com uma broca esférica de aço nº 6, montada em micromotor de baixa rotação, preparou-se uma cavidade de aproximadamente 04 mm. de diâmetro e, em profundidade, atingindo a medula óssea. Esse procedimento foi realizado com abundante irrigação de solução de Cloreto de Sódio a 0,9% (Fig.2).

Em todos os animais do Grupo E1 a cavidade ficou preenchida por coágulo sanguíneo e, em todos os animais do Grupo E2, preenchida por osso bovino desmineralizado cortical inorgânico (Gen-ox[®]; Genius, Baumer S.A., Mogi Mirim, SP, Brasil) associado ao soro fisiológico (Fig. 3). Os atos operatórios foram realizados sempre por um único operador submetendo os animais às mesmas condições. Os tecidos foram reposicionados e as suturas realizadas (Fig. 4).

Fig.1 - Incisão.

Fig. 2 - Preparação da cavidade cirúrgica (seta) na tíbia (T).

Fig. 3 - Cavidade (seta) na tíbia preenchida com Gen-ox® (Biomaterial-B).

Fig. 4 - Sutura.

4.2 Sacrifício dos animais e processamento do material

Por injeção de dose excessiva do anestésico citado anteriormente, cinco ratos de cada grupo foram sacrificados em períodos de 10, 20, 40 e 60 dias contados a partir do dia da cirurgia.

As tíbias foram retiradas e fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e, descalcificadas em solução de citrato de sódio e ácido fórmico, em partes iguais, durante 45 dias. Em seguida, as peças passaram pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina.

Obtidos os blocos, foram realizados cortes longitudinais com espessura de seis μm , resultando em cortes semi-seriados que foram submetidos à coloração pelo tricrômico de Masson, para estudo histomorfológico e histométrico.

As lâminas foram observadas no microscópio Olympus BX50 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) e as fotografias realizadas com a câmera digital acoplada (Olympus DP 71, Tokyo, Japan).

A análise quantitativa foi realizada no computador (Processador Pentium Core 2 Duo; Intel Corporation, Santa Clara, CA, USA) utilizando o programa Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics; Bethesda, MD, USA). Para a morfometria foi analisada a região cortical onde ela foi rompida e a região medular adjacente até a cortical contralateral íntegra. Nessa região foi mensurada a área da cavidade cirúrgica, quantidade de tecido conjuntivo presente e quantidade de tecido ósseo neoformado (fig. 5).

Fig. 5 – Cavidade cirúrgica na tíbia e mensurações realizadas.

Os dados coletados foram submetidos ao teste estatístico one-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Para a comparação entre os grupos, os dados foram submetidos ao teste estatístico *t* de Student. Para todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos foram aplicados através do programa GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc, EUA).

5 RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Análise Histológica

A análise histológica será descrita na sequência dos períodos do experimento.

10 Dias: No Grupo E1 a cavidade cirúrgica, em todos os espécimes, encontra-se parcialmente ocupada por trabéculas ósseas delgadas, permanecendo grande quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Nas regiões mais superficiais evidencia-se tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Fig. 6).

No grupo E2 o material de implante ocupa boa parte da cavidade cirúrgica com tecido conjuntivo neoformado nas suas adjacências. Na área cirúrgica superficial encontra-se formação de tecido ósseo (Fig. 7).

Fig. 6 - 10 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X Tricrômico de Masson.

Fig. 7 - 10 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.

20 Dias: No Grupo E1 ocorre reparação óssea parcial da cavidade cirúrgica com áreas de tecido conjuntivo ainda presentes (Fig. 8).

No Grupo E2 ocorre neoformação óssea inicial ao redor das partículas do material implantado e reorganização da cortical rompida (Fig. 9).

Fig. 8 - 20 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X Tricrômico de Masson.

Fig. 9 - 20 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.

40 Dias: No Grupo E1 a cavidade cirúrgica encontra-se reparada com reorganização da medula óssea, sendo incompleta a neoformação da cortical (Fig. 10).

No Grupo E2, na maioria dos espécimes, o material implantado possui tecido conjuntivo com fibras colágenas ao seu redor, com reparação óssea parcial no local (Fig. 11).

Fig. 10 - 40 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X Tricrômico de Masson.

Fig. 11 - 40 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.

60 Dias: No Grupo E1 ocorreu reorganização da medula óssea e reparação total da cortical rompida na cirurgia (Fig 12).

No Grupo E2 não ocorreu reparação óssea total da cavidade cirúrgica, permanecendo áreas de tecido conjuntivo. São observadas trabéculas ósseas espessas ao redor das partículas do material implantado (Fig 13).

Fig. 12 - 60 dias - Grupo E1. Cavidade cirúrgica. 25 X Tricrômico de Masson.

Fig. 13 - 60 dias - Grupo E2. Cavidade cirúrgica. 25 X. Tricrômico de Masson.

5.2 Análise Histométrica

A análise histométrica será descrita na sequência da mensuração das áreas.

Área de Tecido Ósseo: No grupo E1, onde a cavidade cirúrgica foi preenchida somente por coágulo sanguíneo, não apresentou diferença significativa entre os períodos analisados (Gráfico 1).

No grupo E2, onde a cavidade cirúrgica foi preenchida por osso bovino desmineralizado, não apresentou diferença significativa quando comparado os períodos de 10 dias para o de 20 dias, e de 20 dias para 40 dias. Todos os demais períodos comparados entre si apresentaram diferença significativa (Gráfico 2).

Na comparação entre os dois grupos, nos diferentes períodos, ocorreu diferença estatisticamente significativa somente no período de 10 e 20 dias (Gráfico 3).

Gráfico 1 – Valores médios da área de tecido ósseo do Grupo E1 (mm²), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 2 – Valores médios da área de tecido ósseo do Grupo E2 (mm²), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 3 – Valores médios da área de tecido ósseo (mm²), comparando-se os Grupos E1 e E2 nos diferentes períodos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período.

Área de Tecido Conjuntivo: No grupo E1 todos os grupos apresentaram diferença significativa entre si nos diferentes períodos analisados (Gráfico 4).

No grupo E2 apenas o período de 10 dias para 60 dias apresentou diferença significativa entre si (Gráfico 5).

Na comparação entre os dois grupos, nos diferentes períodos, ocorreu diferença estatisticamente significativa nos períodos de 20, 40 e 60 dias (Gráfico 6).

Gráfico 4 – Valores médios da área de tecido conjuntivo do Grupo E1 (mm²), nos diferentes períodos. Letras minúsculas diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 5 – Valores médios da área de tecido conjuntivo do Grupo E2 (mm²), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

Gráfico 6 – Valores médios da área de tecido conjuntivo (mm^2), comparando-se os Grupos E1 e E2 nos diferentes períodos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período.

Área Total da Cavidade Cirúrgica: Em relação à área total analisada no local da cavidade cirúrgica nos diferentes períodos em E1, não houve diferença significativa entre os períodos de 10 dias para 20 dias e de 40 dias para 60 dias (Gráfico 7).

Já em relação à área de E2 houve diferença significativa de 10 dias para 40 e 60 dias e de 20 dias para 60 dias (Gráfico 8).

Na comparação entre os dois grupos, nos diferentes períodos, ocorreu diferença estatisticamente significativa nos períodos de 40 e 60 dias (Gráfico 9).

Gráfico 7 – Valores médios da área total analisada na cavidade cirúrgica do Grupo E1 (mm^2), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

Área total da cavidade cirúrgica do Grupo E2

Gráfico 8 – Valores médios da área total analisada na cavidade cirúrgica do Grupo E2 (mm²), nos diferentes períodos. Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa.

Área total da cavidade cirúrgica entre os Grupos E1 e E2

Gráfico 9 – Valores médios da área total da cavidade cirúrgica (mm²), comparando-se os Grupos E1 e E2 nos diferentes períodos. Letras iguais indicam que não houve diferença estatisticamente significativa. As letras diferentes indicam que houve diferença estatisticamente significativa. Os asteriscos (*) indicam que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo período.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Como na literatura consultada sobre a neoformação óssea não foram encontrados trabalhos utilizando a associação do Gen-ox[®] (Cortical óssea bovina desmineralizada) ao alcoolismo experimental, os dados dessa pesquisa serão comparados com os dados de outras pesquisas em que esses materiais foram utilizados individualmente, e também comparados com os efeitos do álcool sobre o tecido ósseo.

Neste trabalho foram obtidos alguns dados que apesar de não estarem relacionados diretamente com os objetivos, merecem uma atenção.

A dieta alcoólica utilizada no presente trabalho (25%) está de acordo com trabalhos anteriores, onde os grupos experimentais foram submetidos a uma adaptação gradativa, tornando esses animais alcoólatras crônicos (WILLIS et al., 1983; TIRAPELLI et al., 2000).

O álcool provoca um retardo no crescimento, uma diminuição no peso dos animais e ganho de peso inversamente proporcional à dosagem alcoólica (SAMPSON, 1998; BUCHAIM et al., 2009).

Embora o alcoolismo tenha sido um dos maiores problemas médicos e sociais no século passado (BIKLE, 1993), a apreciação de que o abuso do álcool possa ocasionar doenças ósseas é mais recente. No tecido ósseo, comparativamente com os outros tecidos, a concentração de álcool é baixa, mas as alterações ocorrem de acordo com o tempo de uso da droga.

O desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, provocado pelo álcool, atuando de forma negativa no processo de reparação óssea, pode ser agravado se o alcoolismo estiver associado ao fumo (DAI et al., 2000), levando a perda de densidade mineral óssea (NISHIGUSHI et al., 2000), aumento do risco de fraturas e incidência de osteoporose (DYER et al., 1998).

Assim, a Medicina, na área da ortopedia, e a Odontologia, nas áreas da periodontia, cirurgia e implantodontia, mostram-se preocupadas quanto à perda óssea associada ao alcoolismo e buscam materiais capazes de acelerar a neoformação óssea, visando à reconstrução total ou parcial desse tecido.

Quando se utiliza um material de enxerto, a resposta esperada e desejada é a reparação do defeito com maior rapidez e qualidade. Mas, os efeitos do álcool dificultam os possíveis benefícios dos biomateriais, que são amplamente utilizados com essa finalidade. Não se obteve o efeito desejado neste experimento, pois a reparação total do defeito ocorreu num período mais curto de tempo na cavidade somente preenchida por coágulo sanguíneo, do que a que apresentava o material implantar. Isso também aconteceu com Iwaniec et al. (2008), que ao utilizar o Paratormônio para aumentar a massa óssea em ratos, que ingeriam álcool a 35%, concluíram que o álcool prejudica os efeitos benéficos do Paratormônio, inibindo a formação óssea periosteal e do tecido esponjoso da tíbia.

Nos grupos E1 e E2, no período de 60 dias, os espécimes apresentaram reparação óssea total da cortical da tíbia que foi rompida na confecção da cavidade cirúrgica. Apesar de ter sido realizada somente a quantificação da área total do defeito, na observação histológica evidenciou-se que a cortical neoformada apresentava espessura menor que a original, como ocorreu no experimento de Broulik et al. (2010), que analisou os efeitos do álcool sobre o conteúdo mineral ósseo e resistência óssea.

Para a morfometria foi analisada a região cortical onde ela foi rompida e a região medular adjacente até a cortical contralateral íntegra.

Na quantificação da área de tecido ósseo do grupo E1 não ocorreu diferença estatisticamente significativa em nenhum dos períodos analisados. No período de 10 dias o osso neoformado se concentra em maior quantidade na região medular. Em relação aos outros períodos analisados, ocorreu a reorganização da região medular e a quantidade de tecido ósseo medida se deve mais a nova cortical formada.

A quantificação da área de tecido ósseo do grupo E2 não apresentou diferença significativa quando comparado os períodos de 10 dias para o de 20 dias, e de 20 dias para 40 dias. Todos os demais períodos comparados entre si apresentaram diferença significativa. É importante relatar que todo biomaterial colocado em uma cavidade gera uma resposta inflamatória inicial no tecido receptor, diferentemente da cavidade com ausência do material implantado, preenchida apenas por coágulo (TAGA et al., 1997; BUCHAIM et al., 2007). Isso pode ser observado nas cavidades vazias, 40 dias após a cirurgia, onde a cavidade se apresenta reparada.

Quando se compara o grupo E1 com o grupo E2 na medida de área de tecido ósseo, ocorreu diferença estatisticamente significativa somente no período de 10 e 20 dias. A diferença numérica entre os dois grupos no período de 60 dias, com pequena vantagem para o E2, ocorre devido à presença de tecido ósseo neoformado na cortical rompida e na região medular envolvendo as partículas do enxerto. No grupo E1 encontramos osso somente na nova cortical.

Na análise morfométrica da área de tecido conjuntivo do grupo E1, todos os grupos apresentaram diferença significativa entre si nos diferentes períodos analisados. Esse resultado se deve principalmente pela rapidez do processo de reparação da cavidade cirúrgica sem material implantar, como discutido anteriormente, principalmente nos ratos (SAMPSON et al., 1998).

No grupo E2 apenas o período de 10 dias para 60 dias apresentou diferença significativa entre si. A reparação da cavidade é mais lenta e no período final de 60 dias ainda se encontra relativa quantidade de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. Gerbi et al., em 2005, também observou uma grande quantidade de fibras colágenas nas fases iniciais de cicatrização óssea utilizando o Gen-ox[®].

Na comparação entre os dois grupos, na área de tecido conjuntivo, nos diferentes períodos, ocorreu diferença estatisticamente significativa nos períodos de 20, 40 e 60 dias. Apesar da cavidade cirúrgica, aos 60 dias no Grupo E2, apresentar ainda áreas de tecido conjuntivo, a neoformação óssea envolvendo as partículas de Gen-ox[®] demonstra reparação satisfatória do defeito com enxerto de material xenogênico, concordando com os resultados obtidos por Bigham et al. (2008).

Na literatura consultada foi encontrado um experimento realizado por Pinheiro et al. (2003), onde o mesmo utilizou ratos da linhagem *Wistar* submetidos a implante de osso bovino (Gen-ox[®]), mesmo material usado no presente estudo, porém, associado à radiação laser, onde foi observado que nos animais irradiados houve um reparo ósseo mais avançado, apresentando uma maior neoformação óssea, considerando a capacidade osteocondutiva do Gen-ox[®]. Além disso, ocorreu uma maior proliferação de fibras colágenas para o interior do defeito já a partir de 15 dias de reparação no grupo onde os animais foram irradiados.

Em relação à área total analisada no local do defeito ósseo nos diferentes períodos em E1, não houve diferença significativa entre os períodos de 10 dias para 20 dias e de 40 dias para 60 dias. Já em relação à área de E2 houve diferença

significante de 10 dias para 40 e 60 dias e de 20 dias para 60 dias. Em números absolutos nota-se redução maior da área total no Grupo E1, nos períodos de 40 e 60 dias, devido à maior velocidade do processo de reparação total do defeito cirúrgico preenchido somente por coágulo sanguíneo.

O Gen-ox[®] foi encontrado na cavidade cirúrgica de todos os animais do grupo E2 no período de 60 dias. Além da presença de suas partículas na cavidade, se evidenciou trabéculas ósseas bem organizadas circundando o material e a presença também de vasos sanguíneos. Isso concorda com Martins et al. (2004), que concluíram em seu experimento que o material foi reabsorvido lentamente e serviu como material de preenchimento e mantenedor de espaço, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular e a neoformação óssea a partir das margens da lesão, comprovando sua capacidade osteocondutora.

Essa reabsorção lenta do osso bovino desproteínizado também foi relatada por Karabuda et al. (2001) quando se compara com o osso humano desmineralizado congelado em pó.

Como afirmou Taga, em 1996, o material osteocondutor é aquele que orienta a proliferação celular, podendo ser englobado pelo tecido ósseo neoformado, fazendo parte do novo tecido. O Gen-ox[®] apresentou essas características, sendo um material de enxerto possível de utilização na clínica médica e odontológica, não na expectativa de acelerar o processo de formação de um novo tecido ósseo, mas criar condições para uma neoformação, principalmente em pacientes que ingerem de forma contínua o álcool, que reduz a atividade dos osteoblastos, dificultando esse reparo.

7 CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Baseado nesses resultados pode-se concluir que a utilização do Gen-ox[®] retardou o processo de neoformação óssea, em ratos alcoolizados experimentalmente.

Apesar de não ser objetivo do trabalho, notou-se que o Gen-ox[®] pode ser utilizado como material de preenchimento, pois demonstra atividade osteocondutiva, com a formação de tecido ósseo ao redor das partículas do enxerto.

8 REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- BAKER, R.D. Long-term of alveolar ridge augmentation. **J Oral Surg**, v. 37, n. 7, p. 486-9, Jul. 1979.
- BALHSI, T. J.; MAGID, M. J. Mandibular rehabilitation: A case study using inferior cadaver graft. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.10, n. 5, p. 589-94, Sep-Oct. 1995.
- BIGHAM, A. S. et al. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. **J Orthop Traumatol**, v. 9, n. 2, p. 73-80, Jun. 2008.
- BIKLE, D. D. et al. Bone disease in alcohol abuse. **Ann Intern Med**, v.103, n.1, p. 42-48, Jul. 1985.
- BIKLE, D. D. Alcohol-induced bone disease. **World Rev Nutr Diet**, v. 73, p. 53-79, 1993.
- BODY, J. J. et al. Absolute risk fracture prediction by risk factors validation and survey of osteoporosis in a Brussels cohort followed during 10 years. **Rev Med Brux**, v. 29, n. 4, p. 289-93, Sep. 2008.
- BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 1, p.1-9, Jan/Fev. 2003.
- BROULIK, P. D. et al. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. **Physiol Res**, v. 59, p. 599-604, 2010.
- BUCHAIM, R. L. et al. Gen-Phos implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. **Rev FOB**, v. 10, n. 1, p. 17-22, 2002.
- BUCHAIM, R.L. et al. Biocompatibility of anionic collagen matrices and its influence on the orientation of cellular growth. **Cienc Odontol Bras**, v. 10, n. 3, p. 12-20, Jul/Set. 2007.

BUCHAIM, R. L. et al. Effects of three alcoholic diets on the bone repair in the tibia of rats. **Cienc Odontol Bras**, v. 12, n. 2, p.17-23, Abr/Jun. 2009.

CLARK, K.; SOWERS, M. R. Alcohol dependence, smoking status, reproductive characteristics, and bone mineral density in premenopausal women. **Res Nurs Health**, v. 19, n. 5, p. 399-408, Oct. 1996.

CURI, V. et al. Histometric study of alveolar bone in rats submitted to ethanol during lactation. **Int J Morphol**, v. 26, n. 4, p. 945-50, 2008.

DAI, J. et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. **J Clin Invest**, v. 106, n. 7, p. 887-95, 2000.

DAMIEN, C. J. et al. Effect of demineralized bone matrix on bone growth within a porous HA material: a histologic and histometric study. **J Biomater Appl**, v. 9, n. 3, p. 275-88, Jan. 1995.

DANTAS, R. O. Alcoolismo em trabalhadores da Zona Urbana e Rural. Uma experiência em Brasil. **Bol Sanit Panam**, v. 94, p. 76-81, 1983.

DÍEZ-RUIZ, A. et al. Bone mineral density, bone turnover markers and cytokines in alcohol-induced cirrhosis. **Alcohol Alcohol**, v. 45, n. 5, p. 427-30, Sep-Oct. 2010.

DYER, S.A.; BUCKENDAHL, P.; SAMPSON, H. W. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. **Alcohol**, v. 16, n. 4, p. 337-41, Nov.1998.

ELMALI, N. et al. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, p. 500-13, 2002.

FELSON, D. T. et al. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. **Am J Epidemiol**, v. 142, n. 5, p. 485-91, 1995.

FISH, V. B.; NELSON, V. E. The distribution of alcohol in the tissues of the rat. **Proc Iowa Acad Sci**, v. 49, p. 263-267, 1942.

FITZ-GERALD, L.; CARPENTER, C. Bone mineral density results influencing health-related behaviors in male athletes at risk for osteoporosis. **J Clin Densitom**, v. 13, n. 3, p. 256-62, Jul-Sep. 2010.

FORTES, J. R. A.; CARDO, W. N. Alcoolismo: Distúrbios e Carências. In : _____. **Alcoolismo : diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 1991, cap.12, p. 129-139.

FRAME, J. M. Hydroxiapatite as biomaterial for alveolar ridge augmentation. **Int J Oral Maxillof Surg**, v. 16, n. 6. p. 642-55, Dec. 1987.

GARCIA-SANCHEZ, A. et al. Effect of acute alcohol ingestion on mineral metabolism and osteoblastic function. **Alcohol Alcohol**, v. 30, n. 4, p. 449-453, Jul. 1995.

GERBI, M. E. et al. Assessment of bone repair associated with the use of organic bovine bone and membrane irradiated at 830 nm. **Photomed Laser Surg**, v. 23, n. 4, p. 382-8, Aug. 2005.

GONG, Z.; WEZEMAN, F. H. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 28, n. 3, p. 468-79, Mar. 2004.

GOODMAN, S. B. Allograft alternatives: bone substitutes and beyond. **Orthopedics**, v. 33, n. 9, p. 661, Sep. 2010.

GRÜNSPUM, H. Introdução à psiquiatria. In : ____ Marcondes M. **Clínica Médica - propedeutica e fisiopatologia**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1984.

ICHCHOU, L. et al. Relationship between spine osteoarthritis, bone mineral density and bone turn over markers in post menopausal women. **BMC Womens Health**, v. 8, p.10-25, Aug. 2010.

IWANIEC, U. T. et al. Effects of low-dose parathyroid hormone on bone mass, turnover, and ectopic osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. **Bone**, v. 42, n. 4, p. 695-701, Apr. 2008.

KARABUDA, C. et al. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. **J. Periodontol**, v. 72, n. 10, p. 1436-42, Oct. 2001.

KIM, M. J. et al. Effect of chronic alcohol ingestion on bone mineral density in without liver cirrosis. **Korean J Intern Med**, v. 18, n. 3, p.174-180, Sep. 2003.

KLEIN, R. F.; CARLOS, A. S. Inhibition of osteoblastic cell proliferation and ornithine decarboxylase activity by ethanol . **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3406-3411, 1995.

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, 1996.

LAU, E. M. C.; COOPER, C. The epidemiology of osteoporosis. **Clin Orthop Rel Res**, v. 323, p. 65-74, 1996.

LEITE, M.; PADRÃO, P.; MOREIRA, P. Nutritional intake and bone mineral density in female adolescents. **Acta Med Port**, v. 20, n. 4, p. 299-306, Jul-Aug. 2007.

LIN, Y.; LEE, M.; LEITCHER, J. Interactive effects of alcohol and diabetes during pregnancy on the rat fetus. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 15, n. 3., p. 147-153, 1995.

MADDALOZZO, G. F. et al. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. **Osteoporos Int**, v. 20, n. 9, p. 1529-38, Sep. 2009.

MARIN, C. et al. Histological evaluation of inorganic bovine bone graft in maxillary sinus: A case report. **Rev Cir Traumatol Buco-Maxilo-fac**, v. 7, n. 1, p. 37-42, Jan/Mar. 2007.

MARTINS, L. V. et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **J Appl Oral Sci**, v. 12, n. 1, p. 1-13, Jan/Mar. 2004.

MARZOLA, C. et al. Implantes de BioHapatita + Osseobond + Membrana Reabsorvível Dentoflex + Aglutinante Dentoflex - Apresentação de casos clínico-cirúrgicos. **Rev Bras Ciênc Estomatol**, v. 1, n. 2, p. 51- 63, Jul. 1996.

MARZOLA, C. Os implantes de materiais aloplásticos e as cirurgias pré-protéticas. In : _____. **Cirurgia Pré- Protética**. 3º ed. São Paulo : Ed. Pancast, 2002, p. 143-158.

MENELLA, J. A.; BEAUCHAMP, K. The transfer of alcohol to human milk. **New England J Med**, v. 325, p. 981-5, 1991.

MULLER, S. S. **Efeito da subnutrição na consolidação da fratura da tíbia no rato**. 1991. Tese (Mestrado em Bases gerais da Cirurgia e Cirurgia experimental) – Faculdade de Medicina, Univerdidade Estadual Paulista, Botucatu.

NEGRETE, J. C. El alcohol y las drogas como problemas de salud en América Latina. **Bol Of Sanit Panam**, v. 81, p. 158-75, 1976.

NISHIGUCHI, S. et al. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon x – ray absorptiometry. **J. Bone Miner Metab**, v. 18, n. 6, p. 317-20, 2000.

ODVINA, C.V. Effect of heavy alcohol intake in the absence of liver disease on bone mass in black and white men. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 80, n. 8, p. 2499-503, 1995.

OWENS, A. H.; MARSHALL, E. K. The metabolism of ethyl alchool in the rat. **Proc Soc Exper Biol & Med**, p. 360-70, Jul. 1955.

PALMER, T. N. The biochemistry of alcohol and alcohol abuse. **Sci Prog**, v. 73, p. 1-15, 1989.

PARRA-CABRERA, M. S. et al. Risk factors in osteoporosis: Clinical and epidemiologic evidenc. **Gac Med Mex**, v. 130, n. 4, p. 231-40, Jul-Aug. 1994.

PEREIRA, M. L. et al. Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. **Clin Oral Implants Res**, v. 19, n. 6, p. 582-9, Jun. 2008.

PINHEIRO, A. L. B. et al. Effect of low level laser therapy on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone. **Braz Dent J**, v. 14, n. 3, 2003.

RATCLIFFE, F. The effect of chronic ethanol administration on the growth of rats. **Arch Int Pharmacodyn**, v. 197, p. 19-30, 1972.

RESTREPO, L. D. L. et al. Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado Osseobond e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado: estudo

microscópico em tíbia de ratos (Wistar albinus). In : _____. **Cirurgia pré-protética**. 3ª ed. São Paulo : Ed. Pancast, 2002. p.171-180.

SAMPSON, H. W. et al. Effect of alcohol consumption on adult age bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, n. 8, p. 1375-1384, Nov. 1998.

SAMPSON, H. W. Effect of alcohol consumption on adult an aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. **Alcohol Clin Exp Res.**, v. 22, n. 9, p. 2029-34, Dec. 1998.

SAMPSON, H. W.; SPEARS, H. Osteopenia due to chronic alcohol consumption by young actively growing rats in not completely reversible. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, n. 2, p.589-94, Feb. 1999.

SANADA, J. T. et al. Análise histological, radiográfica e do perfil de imunoglobulinas após implantação de enxerto de osso esponjoso bovino desmineralizado em bloco em músculo de ratos. **J Appl Oral Sci**, v. 11. n. 3, p. 209-215, 2003.

SANDERS, B.; COX, R. Inferior border rib grafting for augmentation of the atrophic edentulous mandible. **J Oral Surg**, v. 34, n. 10, p. 897-900, Oct. 1976.

SCHENK, R. K; HERMANN, R. W. Histologic studies on the Incorporation of uncemented implants. In:____. **Morscher E, Berlim, Germany, Springer-Verlag**, p. 52-58, 1994.

SCIADINI, M. F.; DAWSON, J. M.; JOHNSON, K. D. Evaluation of bovine-derived bone protein with a natural coral carrier as a bone-graft substitute in a canine segmental defect model. **J Orthop Res**, v. 15, n. 6, p. 844-57, Nov. 1997.

SMITH, J. W. Medical manifestations of alchoolism in the elderly. **Int J Addict**, v. 30, n. 13-14, p. 1749-98, 1995.

SONIS, S. T. et al. Healing of spontaneous periodontal defects in dogs treated with xenogeneio desmineralized bone. **J. Periodontol**, v. 56, n. 8, p. 470-9, 1985.

SOUBHIA, A. M. P. **Processo de reparo alveolar em ratos tratados com aguardente de cana – estudo histológico**. 1984. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 1984.

ST CLAIR, H. R. Hematologic. In: ___. **Recognizing alcoholism and its effect - A mini-guide**. p. 41-2, 1991.

TAGA, E. M. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. **Rev Bras Cir Implant**, v. 3, p. 29-68, 1996.

TAGA, R. et al. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de Osseobond. **Rev Bras Implant**, n. 1, ano 3, p. 13-20, Jan/Fev 1997.

TIRAPELLI, L. F.; TAMEGA, O. J.; PETRONI, S. Ultrastructural alterations of choroid plexuses of lateral ventricles of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 58, n. 1, p. 25-31, 2000.

TURNER, R.T. et al. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. **J Bone Miner Res**, v. 16, n. 3, p. 589-594, Mar. 2001.

WEINSTEIN, R. L. et al. Alcohol and smoking. The risk factors for the oral cavity. **Minerva Stomatol**, v. 45, n. 9, p. 405-413, Sep. 1996.

WEZEMAN, F. H. et al. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, n. 9, p. 1534-42, Sep. 1999.

WEZEMAN, F. H. et al. Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. **Alcohol**, v. 31, n. 1-2, p. 87-92, Aug-Oct. 2003.

WILLIAMS, F. M.; CHERKAS, L. F.; SPECTOR, T. D.; MACGREGOR, A. J. The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins. **Ann Rheum Dis**, v. 64, n. 2, p. 309-10, Feb 2005.

WILLIS, B. R. et al. Ethanol-induced male reproductive tract pathology as a function of ethanol dose and duration of exposure. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 225, n. 2, p. 470-478, 1983.

YUKNA, R. A. et al. Multi-center clinical evaluation of combination anorganic bovine-derived hydroxyapatite matrix (ABM)/cell binding peptide (P-15) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects: 6-month results. **J Periodontol**, v. 69, n. 6, p. 655-63, Jun. 1998.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "ANÁLISE HISTOLÓGICA DE OSSO BOVINO INORGÂNICO MICROGRANULAR (GEN-OX®) EM TÍBIA DE RATOS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO EXPERIMENTAL" sob responsabilidade de ROGÉRIO LEONE BUCHAIM, JESUS CARLOS ANDREO E DANIELA BUCHAIM está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 15/12/2004, de acordo com o protocolo nº 62/04.

Araçatuba, 12 de janeiro de 2005.

Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente