

**Universidade do Sagrado Coração**

**IMPLANTES DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICA  
ÓSSEA (Gen-pro<sup>®</sup>) E CORTICAL ÓSSEA BOVINA  
(Gen-ox<sup>®</sup>) : HISTOMORFOLOGIA EM TÍBIA DE  
RATOS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO  
EXPERIMENTAL.**

**DANIELA VIEIRA BUCHAIM**

**Bauru – 2005**

**Universidade do Sagrado Coração**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**IMPLANTES DE PROTEÍNA MORFOGENÉTICA  
ÓSSEA (Gen-pro<sup>®</sup>) E CORTICAL ÓSSEA BOVINA  
(Gen-ox<sup>®</sup>) : HISTOMORFOLOGIA EM TÍBIA DE  
RATOS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO  
EXPERIMENTAL.**

**DANIELA VIEIRA BUCHAIM**

**Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo**

**Bauru - 2005**

## **DEDICO**

*Ao meu companheiro de todos os momentos, meu querido esposo ROGÉRIO LEONE BUCHAIM, guerreiro incansável na luta por seus ideais. Obrigada por me presentear com seus conhecimentos e incentivo constante, com muito amor...*

*Sua esposa DANIELA*

*Aos meus pais maravilhosos RAUL E SILONEI, exemplos de dignidade, cujos princípios de vida me guiaram e guiam até hoje, com todo o meu carinho...*

*Sua FILHA.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*Em primeiro lugar a DEUS, por estar sempre iluminando o meu caminho, fazendo com que todos os empecilhos do dia a dia se transforme em realizações e conquistas, muito obrigado.*

*Ao meu orientador e amigo, já que assim posso chamá-lo, Professor JESUS CARLOS ANDREO, exemplo de força e competência, cujo nome representa a grandeza do SENHOR, Divido com você os méritos desta conquista, pois ela também te pertence. Muito obrigado.*

## **AGRADECIMENTOS**

**À USC – Universidade do Sagrado Coração, pela oportunidade de estudar nesta casa.**

**Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral Professor Dr. Sérgio Catanzaro, meus sinceros agradecimentos.**

**Ao Professor Dr. Tetuo Okamoto pela colaboração na leitura das lâminas.**

**Ao Professor Dr. Carlos Padovani pela análise estatística.**

**Aos Professores Domingos e Sidney pelo apoio e ajuda na realização das cirurgias experimentais, muito obrigado.**

**À todos os professores da pós-graduação, pelo incentivo e colaboração no enriquecimento dos meus conhecimentos.**

**Aos funcionários da pós-graduação, especialmente a Ângela Moraes, pela paciência e disposição constante.**

**Aos funcionários do biotério da UNIMAR, pela colaboração no tratamento dos animais.**

**A CAPES/PROSUP – IASCJ, pelo fornecimento da bolsa de estudos.**

**A todos os meus colegas do Programa de Pós-Graduação que me auxiliaram neste caminho.**

**Aos meus queridos amigos mestrandos CLÁUDIA, ISIDRA, MARCELO e FÁBIO, pela jornada que juntos enfrentamos e pelos esforços realizados para que chegássemos até aqui.**

## **RESUMO**

Sabe-se que o uso prolongado do álcool em excesso produz alterações em vários tecidos corporais, inclusive no ósseo. É de conhecimento geral que a quantidade de defeitos

ósseos criados cirurgicamente e pelos vários tipos de acidentes têm aumentado, e que existe uma preocupação muito grande de produzir substâncias que acelerem a neoformação óssea que preencham estas cavidades. Baseado no exposto anteriormente resolveu-se realizar este trabalho com o objetivo de observar histologicamente se o uso da mistura das substâncias Gen-pro<sup>®</sup> e Gen-ox<sup>®</sup> interfere na neoformação óssea de animais submetidos ao alcoolismo de vários graus de concentração, e se o aumento da concentração do álcool também interfere neste fenômeno. Para isso foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus*), divididos em 4 grupos de 16 animais cada, assim distribuídos: Grupo controle (C) – animais que não receberam álcool; Grupos Experimentais I, II e III (EI, EII e EIII, respectivamente) - animais que foram submetidos à alcoolização de 6%, 15% e 25% respectivamente, por um período de 90 dias. Após este período a tíbia esquerda de todos animais foi submetida a uma cirurgia onde se realizaram duas cavidades no sentido longitudinal, sendo que na superior não foi usada nenhuma substância para preencher a cavidade, e a inferior foi preenchida com uma mistura de Gen-pro<sup>®</sup> e Gen-ox<sup>®</sup>. Quatro 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 as lojas cirúrgicas foram realizadas. Os blocos retirados foram processados histologicamente e submetidos às colorações de HE e tricrômico de Masson, para observação e avaliação da neoformação óssea. Os resultados mostraram que: na cavidade sem material implantar a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica e a neoformação óssea foi maior do que na cavidade com material implantar; na cavidade com material implantar a reparação óssea foi menor nos grupos dos animais submetidos a uma maior concentração de álcool. Baseado nesses resultados pode-se concluir que: a dieta alcoólica interferiu de maneira negativa na neoformação óssea tanto nos animais que não usaram material implantar, como nos animais que utilizaram material implantar para auxiliar na reparação óssea e que o material implantar não acelerou o processo de reparação óssea nos animais não submetidos ao alcoolismo.

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

## **ABSTRACT**

It had known the extensive use of alcohol in excess produces changes in many corporal tissues, including at osseous tissues. It is general knowledge the quantity of osseous defects surgically created and by the many types of accidents have increased and exists a great worry in producing

substances that speed up osseous neoformation and fill in these sockets. Based in the present, it had solved come true this study with the purpose to observe histologically if the mixture use of substances Gen-pro® and Gen-ox® interfere at the osseous neoformation in animals submitted to alcoholism in many concentration degrees and if the increase of alcohol concentration also interfere in this phenomenon. For this, it had been used 64 male rats (*Rattus norvegicus*), divided in four groups of 16 animals each one, distributed: Control group (C) – animals had not received alcohol; Experimental groups I, II and III (EI, EII and EIII, respectively) – animals that had been submitted to alcohol of 6%, 15% and 25%, respectively, for a period of 90 days. After this period, left tibia of all animals had been submitted to a surgery that was came true two sockets at longitudinal direction it had been at the top had not been used any substance to fill in the socket, and the inferior had been filled in with a mixture of Gen-pro® and Gen-ox®. Four animals of each group had been sacrificed in a period of 10, 20, 40 and 60 days, counted from the day of the experimental surgery, to withdraw part of the tibia, where the surgical store had been came true. The withdraw blocks had been processed histologically and had been submitted to he HE stain and Masson trichromic, to observation and evaluation of osseous neoformation.

**Key-words:** rat, tibia, alcohol, hydroxyapatite, demineralized bone.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>

<b>LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>12</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 EFEITOS DO ÁLCOOL EM GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 EFEITOS DO ÁLCOOL NO TECIDO ÓSSEO.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 ESTUDO DAS BIOCERÂMICAS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.1 CORTICAL ÓSSEA BOVINA (GEN-OX®).....</b>	<b>22</b>
<b>2.3.2 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DO OSSO (GEN-PRO®).....</b>	<b>25</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1 CIRURGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>31</b>
<b>4.2 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....</b>	<b>32</b>
<b>4.3 DOSAGEM DO ETANOL NO SANGUE.....</b>	<b>33</b>
<b>4.4 TRATAMENTO DOS DADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 OBSERVAÇÃO HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DE 03 DIETAS ALCOÓLICAS NA REPARAÇÃO ÓSSEA.CAVIDADE COM AUSÊNCIA DO MATERIAL IMPLANTADO.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 OBSERVAÇÃO HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO GEN- PRO® E GEN-OX® NA REPARAÇÃO ÓSSEA.....</b>	<b>38</b>
<b>5.3 OBSERVAÇÃO HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DAS DIETAS ALCOÓLICAS NA REPARAÇÃO ÓSSEA COM O USO DA ASSOCIAÇÃO GEN-PRO® E GEN-OX® .....</b>	<b>41</b>
<b>5.4 DOSAGEM DO ETANOL NO SANGUE.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5 TRATAMENTO DOS DADOS (PESO DOS ANIMAIS).....</b>	<b>45</b>

6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
8	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
9	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

Fig.1	Incisão.....	32
Fig.2	Preparação das cavidades cirúrgicas (seta) na tíbia (T).....	32
Fig.3	Cavidades realizadas na tíbia (T): superior com coágulo (seta) e inferior preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> (Biomateriais-B).....	32

Fig.4	Sutura .....	32
Fig.5	10 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + D) e Tricrômico de Masson (B+C).....	35
Fig.6	20 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (B) e Tricrômico de Masson (A + C + D).....	36
Fig.7	40 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + C) e Tricrômico de Masson (B+D).....	37
Fig.8	60 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo EII (A), Grupo EIII (B). Aumento 25 X. HE (A) e Tricrômico de Masson (B).....	38
Fig.9	10 dias - Cavidade com ausência do material implantado (A). Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> (B).Aumento 25 X. HE (A + B).....	38
Fig.10	20 dias - Cavidade com ausência do material implantado (A). Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> (B).Aumento 25 X. Tricrômico de Masson (A+B).....	39
Fig.11	40 dias - Cavidade com ausência do material implantado (A). Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> (B).Aumento 25 X. HE (A +B).....	40
Fig.12	60 dias - Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> (A). Aumento 25 X. Tricrômico de Masson (A).....	40
Fig.13	10 dias. - Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> . Grupo C (A),Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + B) e Tricrômico de Masson (C + D).....	41
Fig.14	20 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> . Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (B) e Tricrômico de Masson (A + C +D).....	42
Fig.15	40 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> . Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + C + D) e Tricrômico de Masson ( B ).....	43
Fig.16	60 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox <sup>®</sup> e Gen-pro <sup>®</sup> . Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (D) e	

Tricrômico de Masson ( A + B + C ).....	44
---	----

## **LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS**

Tabela 1:	Valores médios da concentração alcoólica.....	45
Gráfico 1:	Valores médios do peso dos animais segundo os 11 momentos pré-determinados.....	45
Tabela 2:	Valores médios do peso dos animais segundo os 11 momentos pré-determinados.....	46

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANOVA = Análise de variância com um fator

B = Biomateriais

BMP = Proteínas Morfogenéticas Ósseas

C = Grupo Controle

CEMA = Centro de Experimentação em Modelos Animais

EI	=	Grupo Experimental I
EII	=	Grupo Experimental II
EIII	=	Grupo Experimental III
HE	=	Hematoxilina eosina
MI	=	material implantado
NO	=	neocortical óssea
NV	=	neoformação vascular
RM	=	região medular
S1	=	início do experimento
S2	=	primeira semana de dieta alcoólica adaptativa
S3	=	segunda semana de dieta alcoólica adaptativa
S4	=	terceira semana de dieta alcoólica adaptativa
S5	=	30 dias de dieta alcoólica definitiva
S6	=	60 dias de dieta alcoólica definitiva
S7	=	90 dias de dieta definitiva
S8	=	10 dias pós-operatório e 1º sacrifício
S9	=	20 dias pós-operatório e 2º sacrifício
S10	=	40 dias pós-operatório e 3º sacrifício
S11	=	60 dias pós-operatório e 4º sacrifício
T	=	Cavidades realizadas na tibia
TC	=	tecido conjuntivo
TO	=	trabéculas ósseas
UNESP	=	Universidade Estadual Paulista
UNIMAR	=	Universidade de Marília
USP	=	Universidade de São Paulo



Buchaim, Daniela Vieira.

Implantes de proteína morfogenética óssea (Gen-pro<sup>®</sup>) e cortical óssea bovina (Gen-ox<sup>®</sup>) : Histomorfologia em tíbia de ratos submetidos ao alcoolismo experimental/ Daniela Vieira Buchaim.— 2005.

62 f.

Orientador: Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo.

Dissertação (Mestrado em Biologia Oral) – Universidade do Sagrado Coração, Bauru, SP.

1.Rato; 2.Tíbia; 3.Álcool; 4.Hidroxiapatita; 5.Osso desmineralizado. I. Andreo, Jesus Carlos. II. Título.

## **1. INTRODUÇÃO**

É de conhecimento geral que a quantidade de defeitos ósseos criados cirurgicamente e pelos vários tipos de acidentes, em práticas esportivas e automobilísticas, entre outras causas, tem aumentado, e existe uma preocupação muito grande de produzir substâncias que acelerem a neoformação óssea que preenchem essas cavidades.

A medicina, principalmente na área ortopédica, e a odontologia, nas áreas da periodontia, cirurgia e implantodontia, buscam a utilização de materiais naturais, artificiais ou sintéticos que substituam total ou parcialmente, restaurem ou aumentem os tecido biológicos,

incluindo o tecido ósseo. Neste sentido surgiram nas últimas décadas, os biomateriais, que tem se fundamentando em bases científicas fortes e corretas (LEGERONS & PENUGONDA, 1983).

O desenvolvimento dos biomateriais resulta de projetos de pesquisas que integram dois grandes conjuntos de atributos: a interdisciplinaridade e a multidisciplinaridade, pois necessitam de conhecimentos provenientes de diversas áreas que devem satisfazer uma série de pré-requisitos para a sua aplicação (GUSTALDI, 2004; BUCHAIM, 2004).

De acordo com a Sociedade Européia de Biomateriais, biomaterial é qualquer substância, droga, combinação de substâncias de origem natural ou sintética que pode ser usada por um período como parte de sistema tratado ou como reposição de algum tecido, órgão ou função do corpo.

Os biomateriais, além de outras exigências devem apresentar requisitos essenciais como biocompatibilidade local-sistêmica e biofuncionalidade. Assim, um material será biocompatível quando for aplicado no sistema biológico, com um determinado objetivo, sem provocar efeitos tóxicos ou injúrias (CARVALHO et al., 2004).

Então foram desenvolvidos materiais que, além da biocompatibilidade, apresentem potencial osteocondutor e osteindutor, acelerando a regeneração do tecido ósseo, além da formação de um osso de melhor qualidade.

Entre os biomateriais osteoindutores surgiram as Proteínas Morfogênicas Ósseas (BMP), ou Fatores de Crescimento Ósseo (SATO & URIST, 1985), que associado a materiais osteocondutores têm demonstrado bons resultados clínicos e histológicos (CHEUNG & TOFE, 1993; ZANER & YUKNA, 1984).

De acordo com Bikle (1993) o alcoolismo é um dos maiores problemas médicos e sociais de quase todas as sociedades neste século, mas a aceitação de que o uso abusivo do álcool possa levar a doenças ósseas é recente.

O uso prolongado de álcool em excesso causa uma multiplicidade de anormalidades clínicas, bioquímicas e eletrofisiológicas, que estão associadas com doenças do fígado, sistema neuromuscular, coração e cérebro (SPENCER et al., 1986). No tecido ósseo, comparativamente com outros tecidos, a concentração de álcool é baixa, mas as alterações ocorrem de acordo com o tempo do uso da droga (FISH & NELSON, 1942).

Numerosos estudos relatam que o consumo crônico de álcool interfere no metabolismo ósseo. O efeito da intoxicação aguda causada pelo álcool tem sido muito documentado, tanto em humanos quanto em animais experimentais. Estudos em animais, sobre

com o uso abusivo do álcool, sugerem que o etanol inibe o crescimento ósseo e interfere no processo de reparação de fraturas. (ELMALI et al., 2002).

Segundo Dyer et al. (1998) estudos que investigaram “in vitro” os efeitos do álcool sobre o osso, demonstraram uma diminuição no número e função de células osteoblásticas. O alcoolismo está associado também com o aumento do risco de fraturas e incidência da osteoporose.

A osteoporose não tem cura, mas a prevenção é essencial. No Brasil atinge 10 milhões de pessoas e 3 em cada 4 diagnósticos são realizados somente depois da primeira fratura o que levam a 80.000 fraturas de quadril por ano, onde desses 15.000 morrem. As mulheres são 04 vezes mais susceptíveis que os homens e, depois da menopausa, 01 em cada 03 mulheres estão condenadas a ter a doença (PASTORE, 1997).

Spencer et al, afirmaram em 1986, que o alcoolismo crônico provoca alterações no tecido ósseo. Entretanto, essas alterações apresentam menor interesse em serem estudadas, devido à presença de outras complicações mais sérias do alcoolismo crônico e agudo. Mas com o passar do tempo notou-se que os efeitos do álcool no tecido ósseo são menos conhecidos, mas o seu uso excessivo em longo prazo também afeta esse tecido e pode exercer uma importante função na causa de extensas perdas ósseas e osteoporose (PARRA-CABRERA et al., 1994; KLEIN & CARLOS, 1995; GARCIA-SANCHEZ et al., 1995; KLEIN et al., 1996; KIM et al., 2003).

Considerando que na literatura consultada não foram encontrados dados relacionando o efeito do álcool na regeneração do tecido ósseo em lojas cirúrgicas preenchidas com biomateriais ostecondutores (Gen-ox<sup>®</sup>) associado a BMP (Gen-pro<sup>®</sup>), decidiu-se realizar este trabalho com o interesse em avaliar as características histomorfológicas desse fato.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

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 a seguir mostra o seu efeito no sistema esquelético.

### **2.1 Efeitos do álcool em geral**

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.

Já em 1942 Fish & Nelson analisaram 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.

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

Para observar os efeitos do álcool sobre o crescimento, Ratcliffe em 1972, 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 pituitária. 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 tracto 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.

De acordo com 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 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 levar a 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 em 1995, Lin et al. estudaram os efeitos de diabetes maternal 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 maternal potencializava os efeitos de diabetes maternal, 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; WEZERMAN et al., 1999).

Em protocolo de dietas alcoólicas crônicas, contendo 36% de valor calórico de etanol, Wezerman et al. (2000), observaram que o nível sérico do etanol esteve mantido em 110-250mg/dl.

## **2.2 Efeitos do álcool no tecido ósseo**

Segundo Southia (1984), ratos tratados com aguardente de cana apresentaram alterações no processo de reparo alveolar. O autor utilizou um grupo controle, que recebeu água como dieta e um grupo experimental, que recebeu aguardente de cana 50° 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 21° 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 devida uma inibição da remodelação óssea por meio do mecanismo independente do hormônio calcitropic.

O fator subnutrição, com deficiência vitamínica, é constante nos indivíduos alcoólatras. Muller em 1991 estudou a influência da subnutrição no processo de consolidação de fraturas em tibia 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 (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 et al., 1995).

No mesmo ano, pesquisas envolvendo a associação do consumo do álcool e a densidade mineral óssea em idosos, mostraram 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 & CARLOS, 1995; GARCIA-SANCHES et al., 1995).

No ano seguinte, Lau & 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 & 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 et al., 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 et al., 1998).

No ano seguinte, Sampson (1999) também investigou os efeitos do consumo do álcool sobre o adulto e a idade óssea, por meio de um estudo histomorfométrico e verificou que a formação óssea nos ratos alcoólatras estava diminuída, e que esse fato estava associado à redução da atividade osteoblástica.

Segundo Daí 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 da L2 a L4 do segmento espinhal, 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 vertebrais, 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 (ZHAODI & WEZEMAN, 2004).

Segundo Willians et al. (2004), 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.

## **2.3 Estudo das Biocerâmicas**

### **2.3.1 Cortical óssea bovina (Gen-ox<sup>®</sup>)**

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 também 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).

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).

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, 1996; MARZOLA et al., 1996).

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).

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 através da formação de uma cicatriz (SCHENK & HERRMANN, 1994).

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, foram lançados no mercado produtos originados de osso bovino, com as mesmas finalidades (SONIS et al., 1985; TAGA et al., 1997).

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 adequados. Diversas empresas vêm produzindo biomateriais com osso bovino para substituição do tecido ósseo, como o Gen-ox<sup>®</sup>, utilizado nessa pesquisa, produzido pela Baumer S.A .

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 graus 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).

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).

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<sup>®</sup> e não irradiado) e grupo III (Gen-ox<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> (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 recentemente 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<sup>®</sup>), 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).

### **2.3.2 Gen-pro<sup>®</sup> - Proteínas Morfogenéticas do Osso (BMPs)**

O estudo das BMPs teve início pelos experimentos de Urist (1965), onde demonstrou que o tecido ósseo possui constituintes químicos capazes de induzir a formação de

osso em outras partes do corpo e, obviamente, no próprio osso. Por uma série de extrações bioquímicas, Urist mostrou ainda que estes constituintes estavam dentro da matriz óssea onde, então, ele purificou estes constituintes e chamou todo o conjunto de proteínas de Bone Morphogenetic Protein.

Por causa de sua atividade no desenvolvimento e capacidade de induzir a formação óssea ectópica, as BMPs podem ser consideradas fatores de diferenciação ou morfogenéticos, representando uma classe distinta de fatores de crescimento. Fatores de crescimento, como o TGF-beta, estimulam as proliferações celulares, podendo também ser encontrados em ossos adultos e associados ao reparo tecidual, mas não apresentam propriedade osteoindutora (REDDI, 1994).

O uso de BMPs em procedimentos reconstituintes, para a indução da osteogênese, representa uma alternativa para enxertos ósseos autógenos e aloimplantes, diminuindo o risco de complicações associadas às cirurgias e limitações do doador. BMPs recombinantes humanas (BMP-2 e BMP-7) usadas em calvária, ossos longos, mandíbula e maxila de animais induziram o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico (ROSEN & THIES, 1995; HOLLINGER & WONG, 1996).

A BMP tem um procedimento de extração exaustivo, com todas as etapas realizadas a 4°C. A fonte utilizada é osso cortical de feto bovino, porque o mesmo é bastante rico em BMPs. Este é um fator limitante ao osso humano no qual não se pode escolher a idade do doador. Osso adulto totalmente calcificado, produz uma matriz orgânica pobre em BMPs e conseqüentemente com baixo poder osteoindutor (TAGA & MULATINHO, 1998).

Com a extração das BMPs da matriz orgânica obtém-se o princípio ativo do osso na forma altamente concentrada. Para cada 100 Kg de osso cortical fetal bovino resulta, ao final do processo, cerca de 10 a 20 gramas de “pool” de BMPs. Na técnica de obtenção, após a granulação, o osso sofre descalcificação ácida seqüencial que tem por finalidade eliminar as proteínas antigênicas do osso. A matriz orgânica assim obtida é tratada com uréia 8M para extração das BMPs, que posteriormente são tratadas com cloreto de guanidina 4M.

Esse “pool” de BMPs é exaustivamente dialisada com milhares de litros de H<sub>2</sub>O deionizada e posteriormente liofilizada. Após a liofilização, as BMPs são ligadas a um carreador que tem por finalidade a conservação das BMPs por um tempo maior na cavidade cirúrgica óssea, uma vez que sozinhas, seriam rapidamente reabsorvidas pelo organismo. Por isso, uma característica destas proteínas morfogenéticas é a necessidade de um veículo que pode ser o Gen-col<sup>®</sup> (colágeno), Gen-ox<sup>®</sup> (osso bovino inorgânico) ou Gen-phos<sup>®</sup>

(hidroxiapatita). Dessa forma, a BMP é associada, preferencialmente as hidroxiapatitas, na proporção de 01 mg do princípio ativo da BMP associado a 20 mg de hidroxiapatita (ZENÓBIO et al., 1998).

A associação de materiais osteocondutores as BMPs, descritos na literatura internacional, demonstram um resultado clínico e histológico favorável, quanto à consistência química e qualidade do tecido ósseo neoformado (CHEUNG & TOFE, 1993; ZANER & YUKNA, 1984). A preferência dá-se as hidroxiapatitas naturais, obtidas do osso bovino (KRAMER et al., 1968; RIPAMONTI et al., 1992; HOWARD et al., 1998).

No comércio mundial existe a Osteograft (QIAN & BHATNAGAR, 1996; FROUM, 1998) e o Bio-Oss, as quais a literatura mostra, serem biomateriais reabsorvíveis e largamente utilizados nos Estados Unidos em substituição à matriz de osso humano.

Os enxertos xenogênicos, usualmente de origem bovina e processados através de várias técnicas, tem sido utilizados em muitos animais para estudos, sendo considerado um material osteocondutor. A associação das BMPs a esses enxertos têm demonstrado um aumento na neoformação óssea, visando a substituição desse tecido (YOUNG et al., 1999; TUOMINEN et al., 2000).

Os defeitos ósseos realizados em ossos longos têm sido largamente utilizados para avaliação do processo de reparação óssea (ARGENTO, 1998; KUSUZAKI et al., 2000).

Um estudo realizado por Tuominen et al. (2001), avaliou o processo de cicatrização em defeitos ósseos, de aproximadamente 2cm, realizados na ulna de cães, onde foi implantado osso bovino desmineralizado associado a BMP. Os autores observaram que a BMP nativa necessita de um material carregador para ser utilizada como material para substituição de tecido ósseo.

As proteínas morfogenéticas ósseas nativas (BMPs), extraídas de osso estão sendo usadas clinicamente para estimular o processo de regeneração e reparação óssea. Entretanto, a sua preparação e purificação são um processo laboratorial (PEEL et al., 2004).

No mesmo ano, Guimarães et al. (2004) avaliaram a aplicação do “pool” de BMPs bovinas no tratamento de defeitos intra-ósseos. A amostra constou de quinze indivíduos com idade entre 26 e 57 anos, apresentando defeitos no mesmo arco de dentes: pré-molares e molares e também com perda de inserção periodontal. Em cada indivíduo, o defeito teste foi tratado com a associação “pool” de BMPs – carregador hidroxiapatita reabsorvível (BMPs-HA), matriz orgânica bovina desmineralizada liofilizada (MO) e barreira de colágeno bovino, enquanto os defeitos controle foram tratados com MO-HA e barreira de colágeno. A análise de

variância indicou que a variação de profundidade de sondagem e nível de inserção foi significativa em ambos os grupos, porém a aplicação do “pool” de BMPs não ofereceu benefícios adicionais ao tratamento de defeitos intra-ósseos.

### **3. PROPOSIÇÃO**

Baseado no citado anteriormente propôs-se realizar esta pesquisa com os objetivos de observar histologicamente:

- 1) Os efeitos de 03 dietas alcoólicas na reparação óssea.
- 2) Os efeitos da associação Gen-pro<sup>®</sup> e Gen-ox<sup>®</sup> na reparação óssea.
- 3) Os efeitos das dietas alcoólicas na reparação óssea com o uso da associação Gen-pro<sup>®</sup> e Gen-ox<sup>®</sup>.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus*), adultos (com aproximadamente 03 meses de idade), da linhagem Wistar, com peso médio aproximado de 270 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da USP - Campus de Bauru - 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 4 grupos, de 16 ratos cada, sendo:

- 1) Grupo Controle (C), que recebeu água de torneira como dieta líquida.
- 2) Grupo Experimental I (E I), que recebeu álcool etílico a 6%, diluído com água de torneira.
- 3) Grupo Experimental II (E II), que recebeu álcool etílico a 15%, diluído com água de torneira.

4) Grupo Experimental III (E III), que recebeu álcool etílico a 25%, diluído com água de torneira.

Os animais de todos os grupos receberam “*ad libitum*” sempre a mesma dieta sólida (ração Nuvilab CR 1, da NUVITAL), 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.

Semanalmente realizou-se a mensuração dos pesos dos animais.

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 et al., 2000).

Essa adaptação constituiu-se no fornecimento através da dieta líquida de álcool etílico diluído, na primeira semana de 2% ao Grupo E I, 5% ao Grupo E II e 8 % ao Grupo E III; na segunda semana de 4% ao Grupo E I, 10% ao Grupo E II e 16 % ao Grupo E III e, por fim, na terceira semana de 6% ao Grupo E I, 15% ao Grupo E II e 25 % ao Grupo E III.

Após esse período de adaptação, os animais dos grupos experimentais continuaram a receber dieta alcoólica, semelhante ao da semana, por um período de 90 dias.

O álcool utilizado para diluição foi o etílico absoluto (LABSYNTH CH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> OH; PM 46.07).

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 para cada grupo.

#### **4.1 Cirurgia experimental**

Os ratos foram submetidos à anestesia geral pela injeção intramuscular de Cloridrato de tiletamina (125,0 mg) associado a Cloridrato de zolazepam (125,0 mg) na posologia de 50,0 mg/kg IM (Zoletil 50, Virbac).

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, cortando-se a pele e a fâscias 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 duas cavidades de aproximadamente 03 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).

As cavidades foram realizadas em um eixo longitudinal do osso, sendo a primeira perfuração no terço proximal da diáfise da tíbia, que não foi preenchida por nenhum material, e a segunda perfuração, aproximadamente 3 mm inferior à primeira, preenchida pela mistura de Gen-ox<sup>®</sup> (inorgânico) e Gen-pro<sup>®</sup>, produzidos pela Genius, divisão da Baumer S.A. (Fig.3).

Os atos operatórios eram realizados sempre por um único operador submetendo os animais às mesmas condições. A pasta foi preparada agregando o Gen-ox<sup>®</sup> + Gen-pro<sup>®</sup> ao soro fisiológico. A colocação da pasta na cavidade cirúrgica foi feita com auxílio de um condensador de Ward nº 1, obtendo-se melhor compactação da pasta.

Posteriormente os tecidos reposicionados e as suturas realizadas, primeira em periósteo com fio reabsorvível e, a seguir na pele com pontos interrompidos empregando fio de Seda 4-0 (Fig.4).

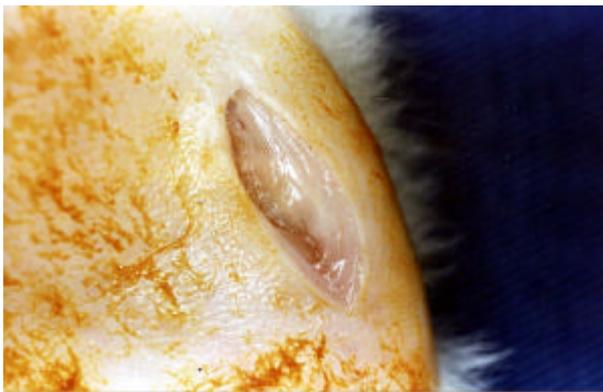


Fig.1 – Incisão.



Fig.2 – Preparação das cavidades cirúrgicas (seta) na tíbia (T).



Fig.3 – Cavidades realizadas na tíbia (T): superior com coágulo (seta) e inferior preenchida pela mistura de Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> (Biomateriais-B). Fig.4 – Sutura.

#### **4.2 Sacrifício dos animais e processamento do material**

Por injeção excessiva do anestésico citado anteriormente, 04 ratos de cada grupo foram sacrificados em períodos de 10, 20, 40 e 60 dias contados a partir do dia da cirurgia.

Quando do sacrifício, a porção da tíbia, que compreendem as cavidades, foi removida, tomando-se os devidos cuidados para não tocar o tecido ósseo no local das perfurações.

As peças ósseas retiradas das tíbias foram 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 (Morse, 1945). A solução descalcificadora, que continha as peças, foi trocada de 03 em 03 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 06 micrômetros em um micrótomo rotativo, resultando em cortes semi-seriados que foram submetidos à coloração pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Masson, para estudo histomorfológico sob microscopia de luz e fotografados em um fotomicroscópio Zeiss modelo D-7082.

#### **4.3 Dosagem do etanol no sangue**

O sangue coletado no dia do sacrifício dos ratos, através de punção intracardíaca, foi analisado por cromatografia em camada gasosa e detecção por ionização por chama (Reed & Cravey, 1971; Ciola, 1973) no Centro de Toxicologia da UNESP - Campus de Botucatu – SP, e avaliado estatisticamente pela análise de variância com um fator ANOVA.

#### 4.4 Tratamento dos dados

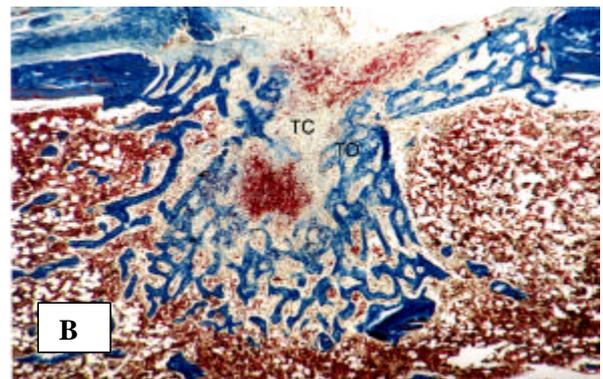
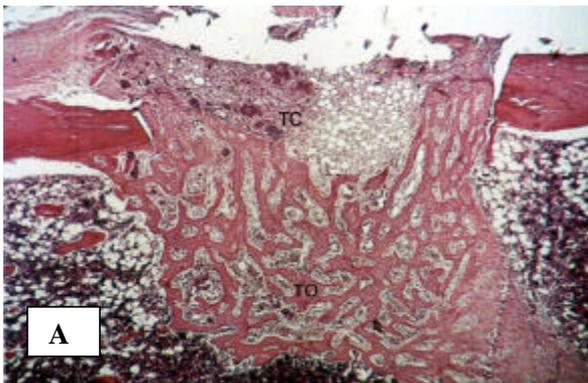
Com relação ao peso dos animais, utilizaram-se parâmetros comparativos entre os grupos controle e experimentais, em 11 momentos pré-determinados, assim denominados: S1 (início do experimento), S2 (primeira semana de dieta alcoólica adaptativa), S3 (segunda semana de dieta alcoólica adaptativa), S4 (terceira semana de dieta alcoólica adaptativa), S5 (30 dias de dieta alcoólica definitiva), S6 (60 dias de dieta alcoólica definitiva), S7 (90 dias de dieta alcoólica definitiva e dia da cirurgia experimental), S8 (10 dias pós-operatório e 1º sacrifício), S9 (20 dias pós-operatório e 2º sacrifício), S10 (40 dias pós-operatório e 3º sacrifício), S11 (60 dias pós-operatório e 4º sacrifício), similar ao método de Muller (1991).

### 5. RESULTADOS

Os resultados serão descritos de acordo com os objetivos do trabalho.

#### 5.1 Observação histológica dos efeitos de 03 dietas alcoólicas na reparação óssea. Caverna com ausência do material implantado.

##### 5.1.1 Animais sacrificados 10 dias após a cirurgia experimental.



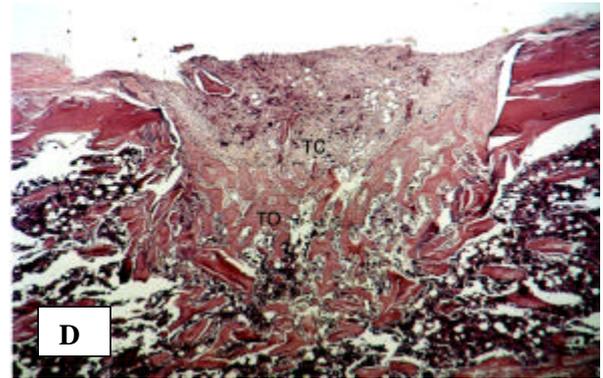
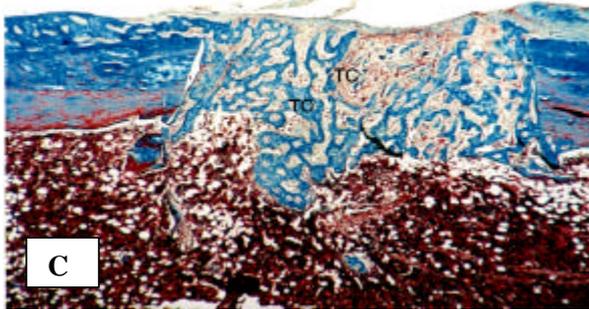


Fig. 5 - 10 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + D) e Tricrômico de Masson (B + C).

Na Figura 5 nota-se que:

- a loja cirúrgica está parcialmente ocupada por trabéculas ósseas (TO) delgadas. No espaço intertrabecular evidencia-se tecido conjuntivo rico em fibroblastos (TC) e sem diferenciação óssea;

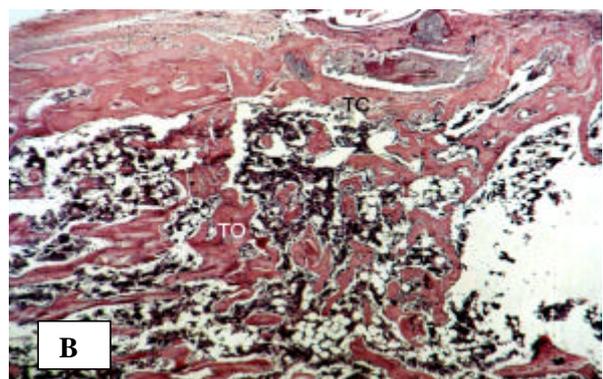
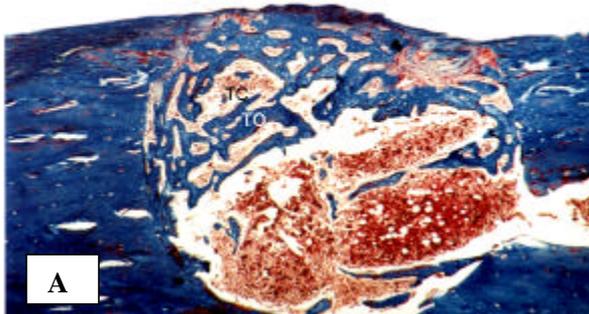
- em alguns espécimes, a ossificação é discreta, notando-se trabéculas ósseas (TO) delgadas que preenchem, aproximadamente, a terça parte da loja cirúrgica (Fig. 5D);

- a ossificação é mais intensa no Grupo C (Fig. 5A) em relação aos demais grupos, sendo que o Grupo EIII (Fig. 5D) apresenta nas regiões superficiais maior quantidade de tecido conjuntivo (TC).

- a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

Em maior aumento observou-se que, o tecido conjuntivo neoformado, sem diferenciação óssea, apresenta-se rico em fibroblastos e vasos sanguíneos, ao lado de alguns macrófagos e linfócitos;

### 5.1.2 Animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental.



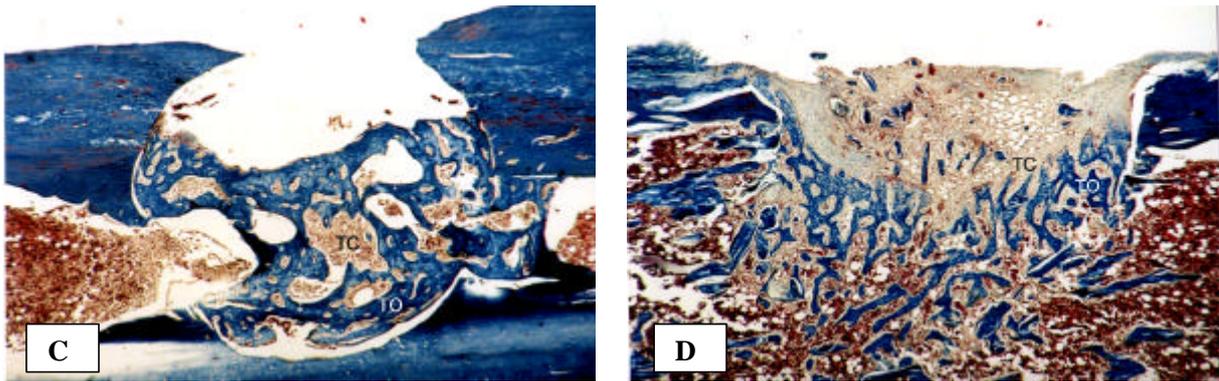


Fig. 6 -20 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (B) e Tricrômico de Masson (A + C + D).

Na Figura 6 nota-se que:

- a loja cirúrgica, em sua porção superficial, encontra-se ocupada por trabéculas ósseas (TO) neoformadas que deixam consideráveis espaços com tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea (Fig. 6A e 6B);

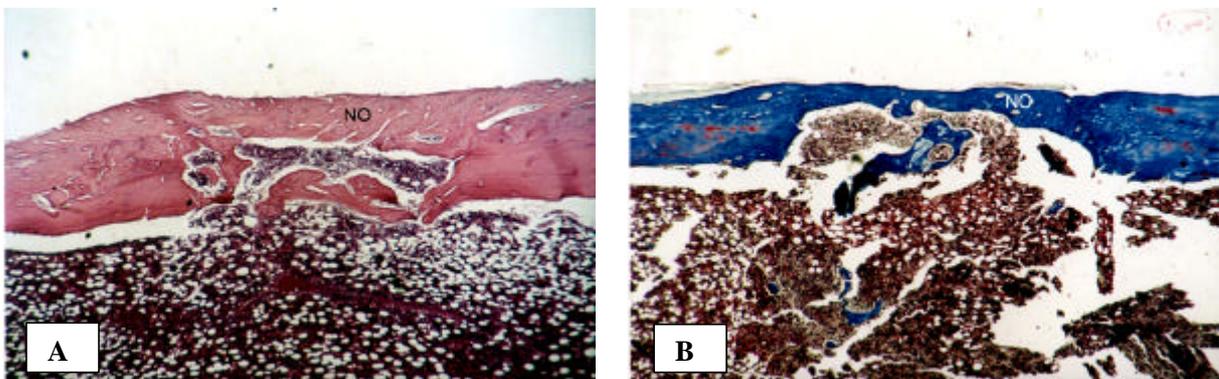
- outras vezes, o tecido ósseo neoformado (TO) ocupa a porção profunda da loja (Fig. 6C e 6D);

- no grupo EIII (Fig. 6D) as trabéculas ósseas (TO) são mais delgadas e com tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea localizado superficialmente na loja cirúrgica, e em maior quantidade quando comparado com os demais grupos;

- a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

Em alguns casos, a neoformação óssea no Grupo C é mais intensa ocupando toda extensão da loja cirúrgica.

### 5.1.3 Animais sacrificados 40 dias após a cirurgia experimental.



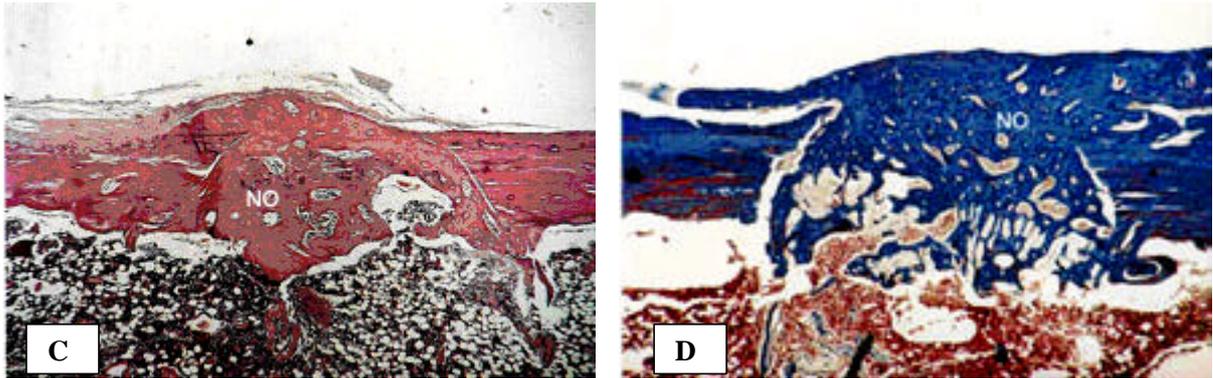


Fig. 7 -40 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + C) e Tricrômico de Masson (B + D).

Na Figura 7 nota-se que:

- a loja cirúrgica encontra-se reparada por tecido ósseo bem diferenciado em todos os grupos;
- em alguns casos, a espessura da neocortical óssea (NO) é mais delgada que a pré-existente (fig.7A e 7B);
- em outro caso, como no Grupo EII (Fig. 7C), a neocortical óssea (NO) deixa um degrau em uma das bordas, ocasionando irregularidades nas superfícies externa e interna;
- no Grupo EIII (Fig. 7D), nota-se a neocortical (NO) com formação óssea além das superfícies externa e interna da parede óssea, mas ainda desorganizada na região de transição cortical-medular, comparando-se com os grupos anteriores;
- nesse período os efeitos da dieta alcoólica são menos evidentes, quando comparado ao anterior.

#### 5.1.4 Animais sacrificados 60 dias após a cirurgia experimental.

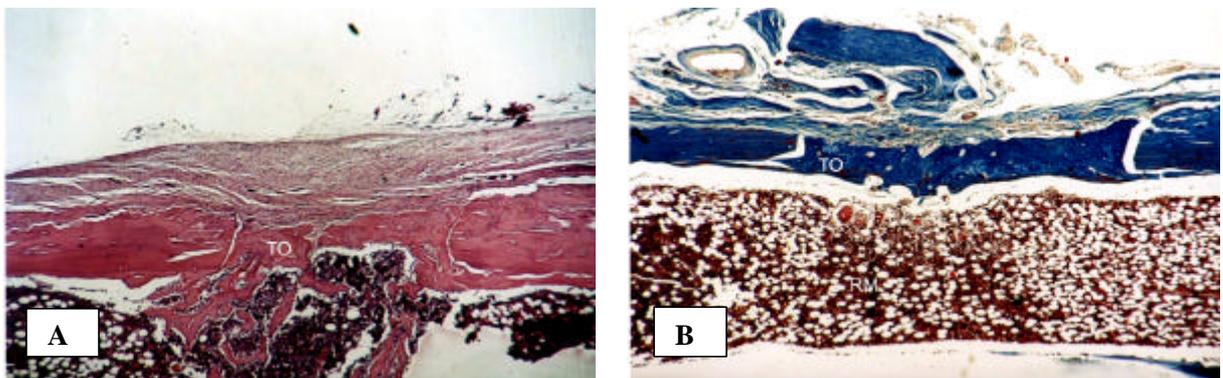


Fig. 8 -60 dias - Cavidade com ausência do material implantado. Grupo EII (A), Grupo EIII (B). Aumento 25 X. HE (A) e Tricrômico de Masson (B).

Na Figura 8 observa-se que:

- a loja cirúrgica encontra-se reparada por tecido ósseo (TO) bem desenvolvido, como no período anterior. O Grupo EIII (Fig. 8B) apresenta região medular (RM) organizada, compatível com os demais grupos.
- os Grupos C e EI já apresentaram reparação óssea completa desde o período anterior.
- nesse período os efeitos da dieta alcoólica não são evidentes, quando comparado ao anterior.

## 5.2 Observação histológica dos efeitos da associação Gen-pro<sup>®</sup> e Gen-ox<sup>®</sup> na reparação óssea.

### 5.2.1 Animais sacrificados 10 dias após a cirurgia experimental.

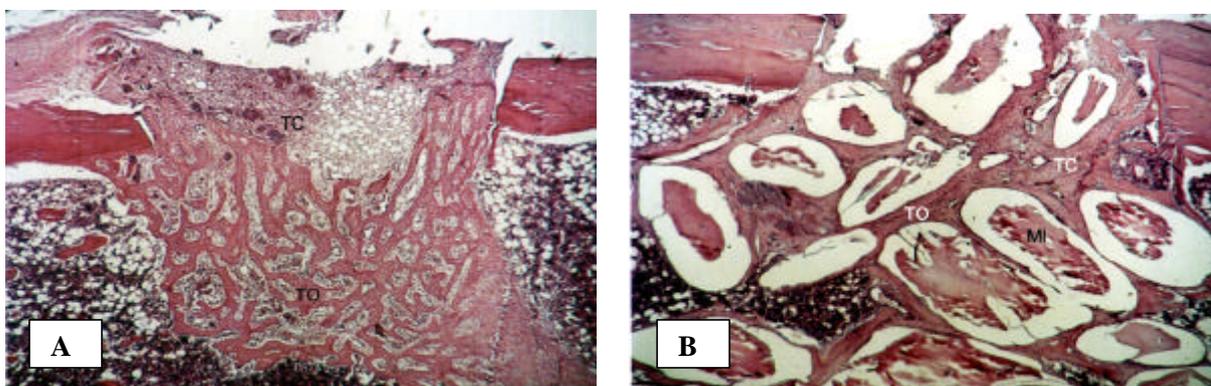


Fig. 9 - 10 dias - Cavidade com ausência do material implantado (A). Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> (B). Aumento 25 X. HE (A + B).

Na Figura 9 observa-se que:

- na cavidade sem material implantar observa-se que a loja cirúrgica está parcialmente ocupada por trabéculas ósseas (TO) delgadas. No espaço intertrabecular evidencia-se tecido conjuntivo sem diferenciação óssea (Fig. 9A);
- o material implantado (MI) geralmente ocupa a porção central e profunda da loja cirúrgica;
- em inúmeros pontos o implante apresenta nas adjacências, delgadas trabéculas ósseas (TO) neoformadas. Em todos os espécimes, a neoformação óssea é mais intensa junto à área superficial da loja cirúrgica, quando comparada com a área profunda. O tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea apresenta feixes de fibras colágenas (Fig. 9B);
- a neoformação óssea é mais intensa na cavidade sem material implantar.

### 5.2.2 Animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental.

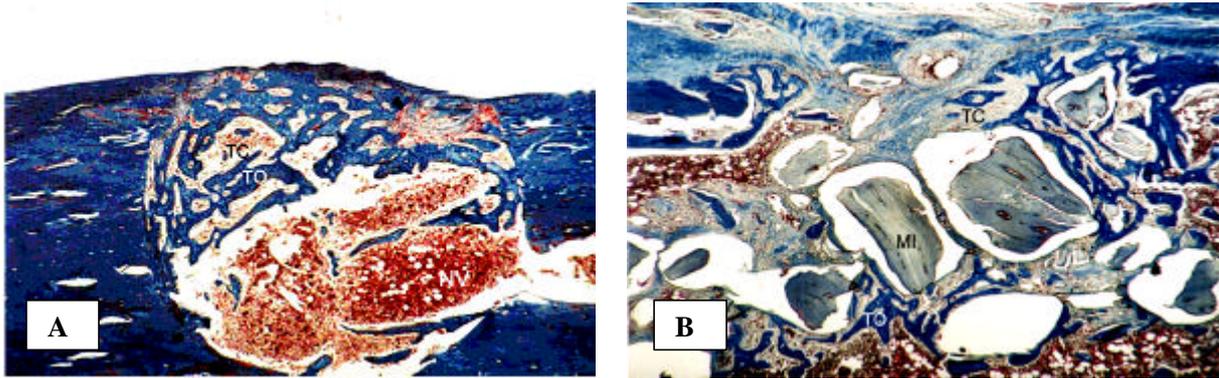


Fig. 10 -20 dias - Cavidade com ausência do material implantado (A). Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> (B).Aumento 25 X. Tricrômico de Masson (A + B).

Na Figura 10 nota-se que:

- na cavidade sem material implantar as trabéculas ósseas (TO) neoformadas localizam-se superficialmente, intercaladas por tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea (Fig. 10A). Na região profunda observa-se sangue com intensa neoformação vascular (NV) (Fig. 10A);
- na cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> o material implantado (MI) ocupa quase a totalidade da loja cirúrgica, notando-se nas proximidades tecido conjuntivo sem diferenciação óssea e pequenas trabéculas ósseas. A neoformação óssea localiza-se junto ao fundo e paredes laterais da loja cirúrgica (Fig. 10B);
- a neoformação óssea é mais intensa na cavidade sem material implantar.

### 5.2.3 Animais sacrificados 40 dias após a cirurgia experimental.

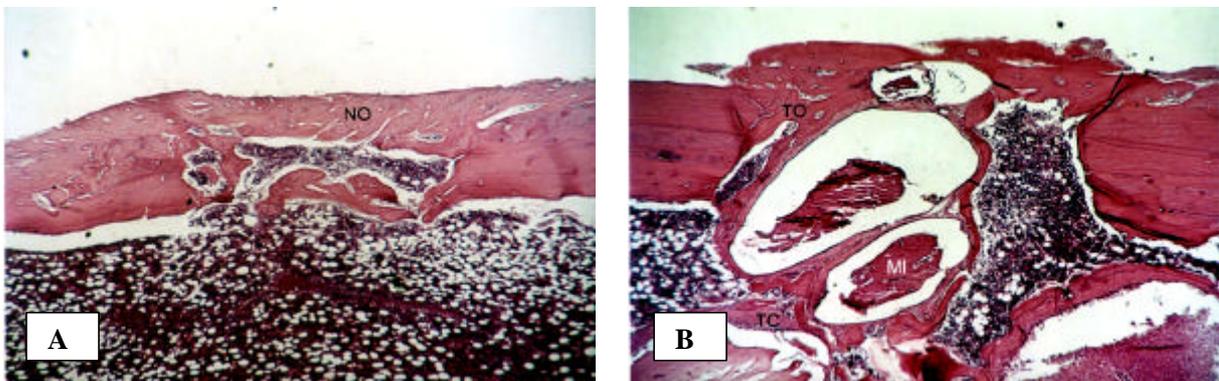


Fig. 11 -40 dias - Cavidade com ausência do material implantado (A). Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> (B).Aumento 25 X. HE (A + B).

Na Figura 11 observa-se que:

- na cavidade sem material implantar a neocortical (NO) apresenta-se formada e fechando a loja cirúrgica superficialmente (Fig.11A);
- na cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> ocorre a reparação parcial da parede óssea e o material de implante (MI) ocupa grande parte da loja cirúrgica, mostrando nas adjacências, tecido conjuntivo (TC) fibroso ou delgadas trabéculas ósseas (TO) neoformadas (Fig. 11B);
- a neoformação óssea é mais intensa na cavidade sem material implantar, que apresenta neocortical completa e região medular organizada.

### 5.2.4 Animais sacrificados 60 dias após a cirurgia experimental.

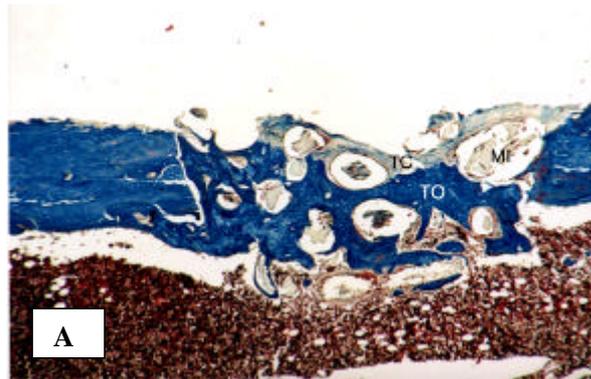


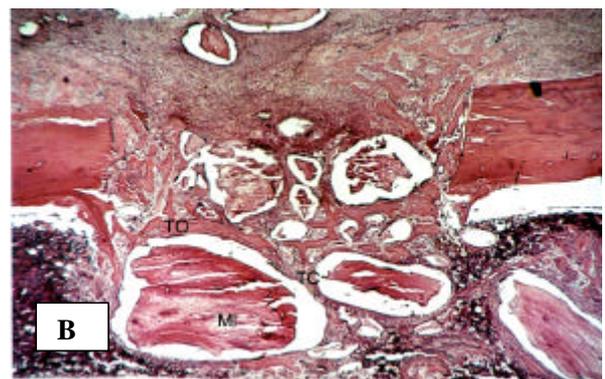
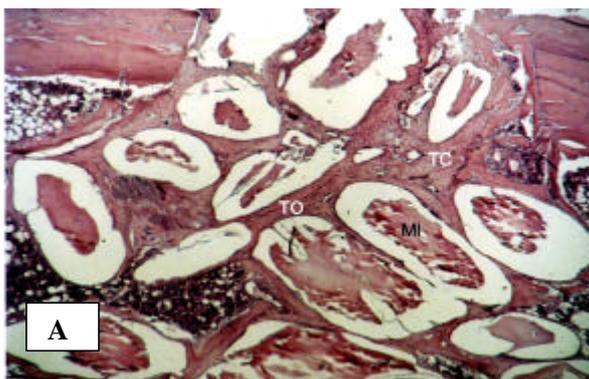
Fig. 12 -60 dias - Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> (A).Aumento 25 X. Tricrômico de Masson (A).

Na Figura 12 nota-se que na cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> ocorre a reparação parcial da loja cirúrgica, e o material implantado (MI) apresenta nas adjacências tecido conjuntivo (TC) fibroso e trabéculas ósseas (TO) neoformadas (fig. 12A). A neocortical apresenta-se incompleta.

Na cavidade com ausência do material implantado a loja cirúrgica encontra-se reparada desde o período anterior, com neoformação óssea mais intensa, neocortical completa e região medular organizada.

### 5.3 Observação histológica dos efeitos das dietas alcoólicas na reparação óssea com o uso da associação Gen-pro<sup>®</sup> e Gen-ox<sup>®</sup>.

#### 5.3.1 Animais sacrificados 10 dias após a cirurgia experimental.



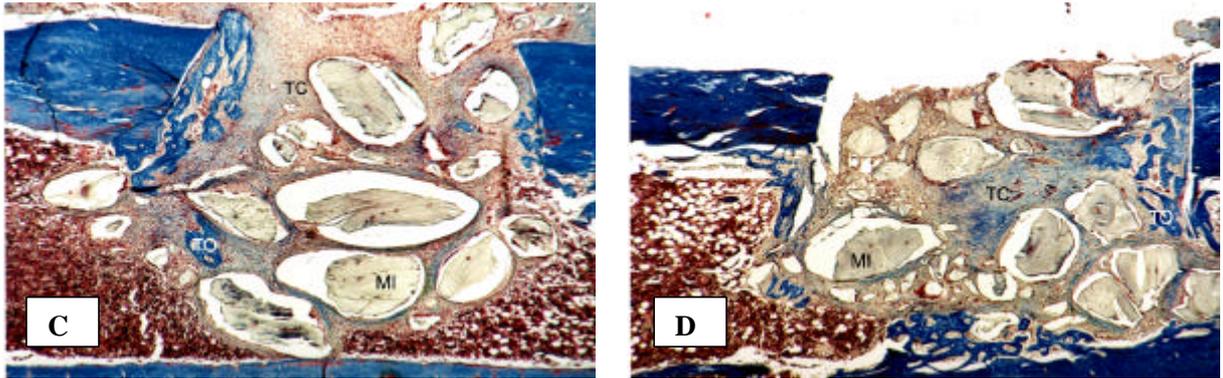


Fig.13 -10 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + B) e Tricrômico de Masson (C + D).

Na Figura 13 observa-se que:

- em todos os animais o material implantado (MI) ocupa quase a totalidade da loja cirúrgica. Em inúmeros pontos o implante apresenta nas adjacências, delgadas trabéculas ósseas (TO) neoformadas;

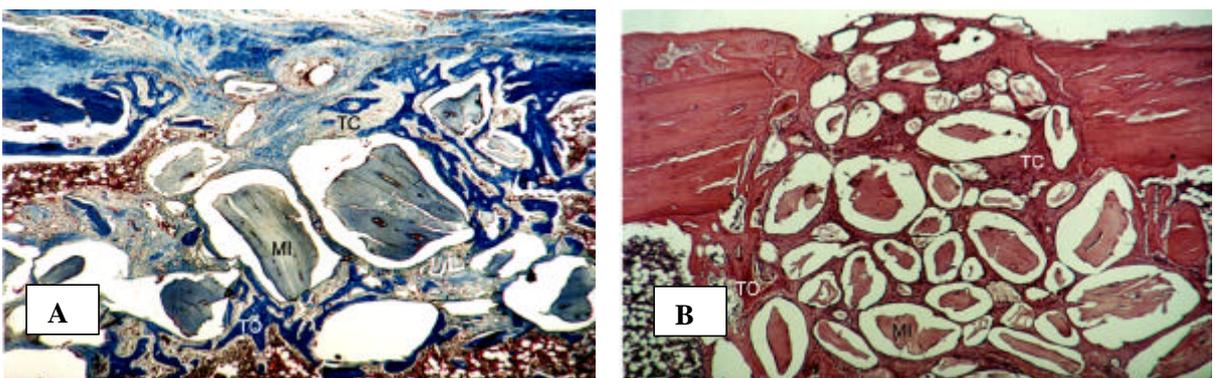
- a neoformação óssea é mais intensa junto à área superficial da loja cirúrgica, exceto no grupo EIII que se localiza nas paredes laterais e na porção profunda da loja (Fig. 13D). O tecido conjuntivo (TC) neoformado, sem diferenciação óssea, apresenta feixes de fibras colágenas localizados ao redor do material implantado e rico em vasos sanguíneos (Fig. 13D);

- no grupo EI, em dois espécimes, observa-se a neoformação óssea além do limite superior da loja cirúrgica (Fig. 13B).

- a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

Em maior aumento, número discreto de macrófagos e linfócitos pode ser evidenciado na região superficial. Nessa área, bem como junto ao fundo da loja cirúrgica, evidenciam-se delgadas trabéculas ósseas neoformadas com numerosos osteoblastos em suas bordas.

### 5.3.2 Animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental.



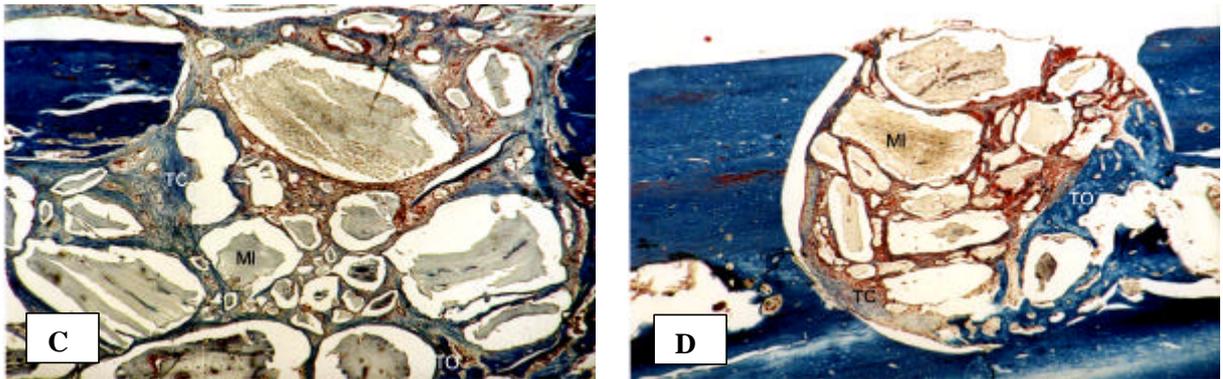


Fig.14 -20 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (B) e Tricrômico de Masson (A + C + D).

Na Figura 14 nota-se que:

- no Grupo C a neoformação óssea localiza-se junto ao fundo e paredes laterais da loja cirúrgica. O material de implante (MI) geralmente mostra nas adjacências, tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea (Fig. 14A);

- no Grupo EI (Fig. 14B) o material implantado (MI) preenche quase a totalidade da loja cirúrgica, observando-se a reparação parcial da loja cirúrgica com a presença de delgadas trabéculas ósseas (TO). Nas porções superficial e profunda da loja, nota-se o material implantado cercado por tecido conjuntivo (TC) neoformado, semelhante ao Grupo EII (Fig. 14C);

- no Grupo EIII o material implantado (MI) ocupa grande parte da loja cirúrgica, notando-se nas suas adjacências presença de tecido conjuntivo (TC) com discreta neoformação óssea (Fig. 14D);

- a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

### 5.3.3 Animais sacrificados 40 dias após a cirurgia experimental.

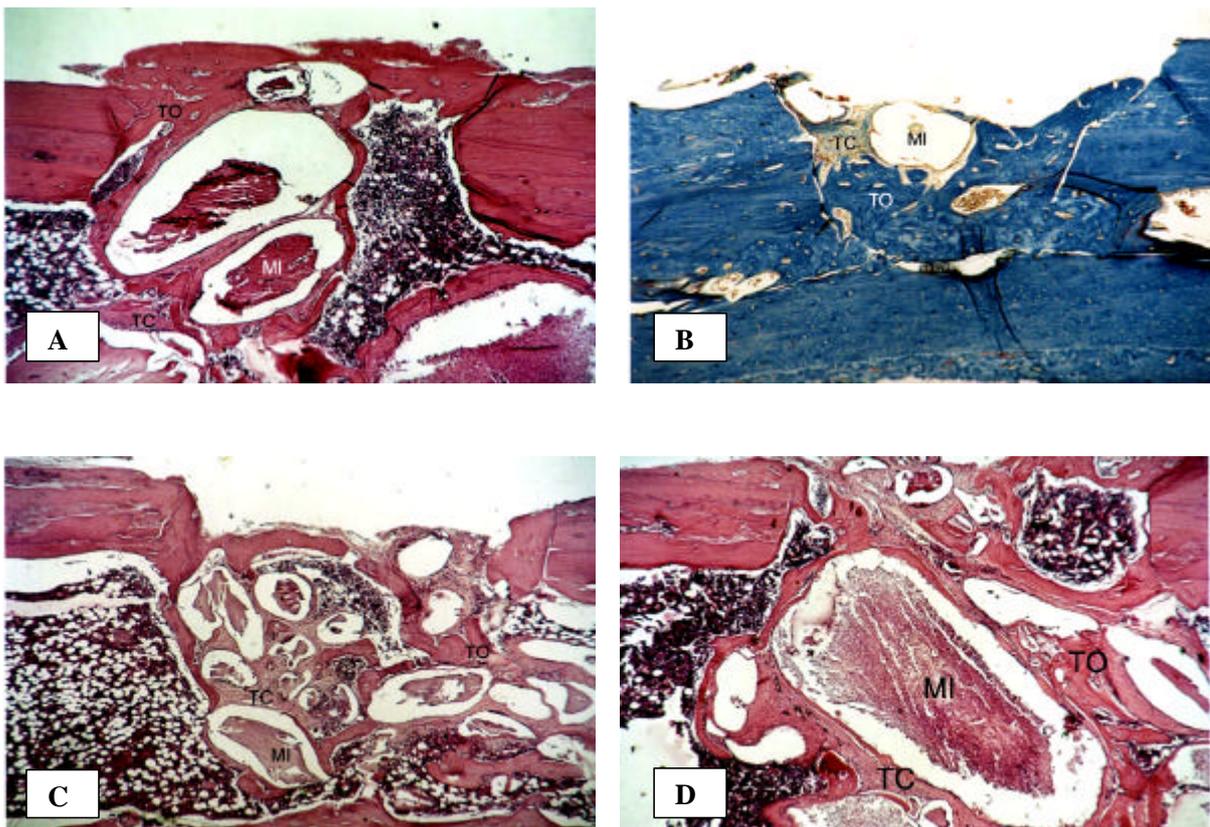


Fig.15 -40 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + C + D) e Tricrômico de Masson (B).

Na Figura 15 observa-se que:

- no Grupo C ocorre a reparação parcial da parede óssea e o material de implante (MI) ocupa grande parte da loja cirúrgica, mostrando nas adjacências, tecido conjuntivo (TC) fibroso ou delgadas trabéculas ósseas (TO) neoformadas (Fig. 15A);
- no Grupo EI a loja cirúrgica é reparada parcialmente por tecido ósseo (TO) bem desenvolvido, com pequena quantidade de material implantado (MI) (Fig. 15B);
- no Grupo EII a loja cirúrgica acha-se parcialmente reparada por delgadas trabéculas ósseas (TO). O material implantado (MI) mostra ao seu redor, tecido ósseo neoformado ou tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea (fig.15C), em maior quantidade quando comparado ao Grupo EIII (fig.15D);
- a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

#### 5.3.4 Animais sacrificados 60 dias após a cirurgia experimental.

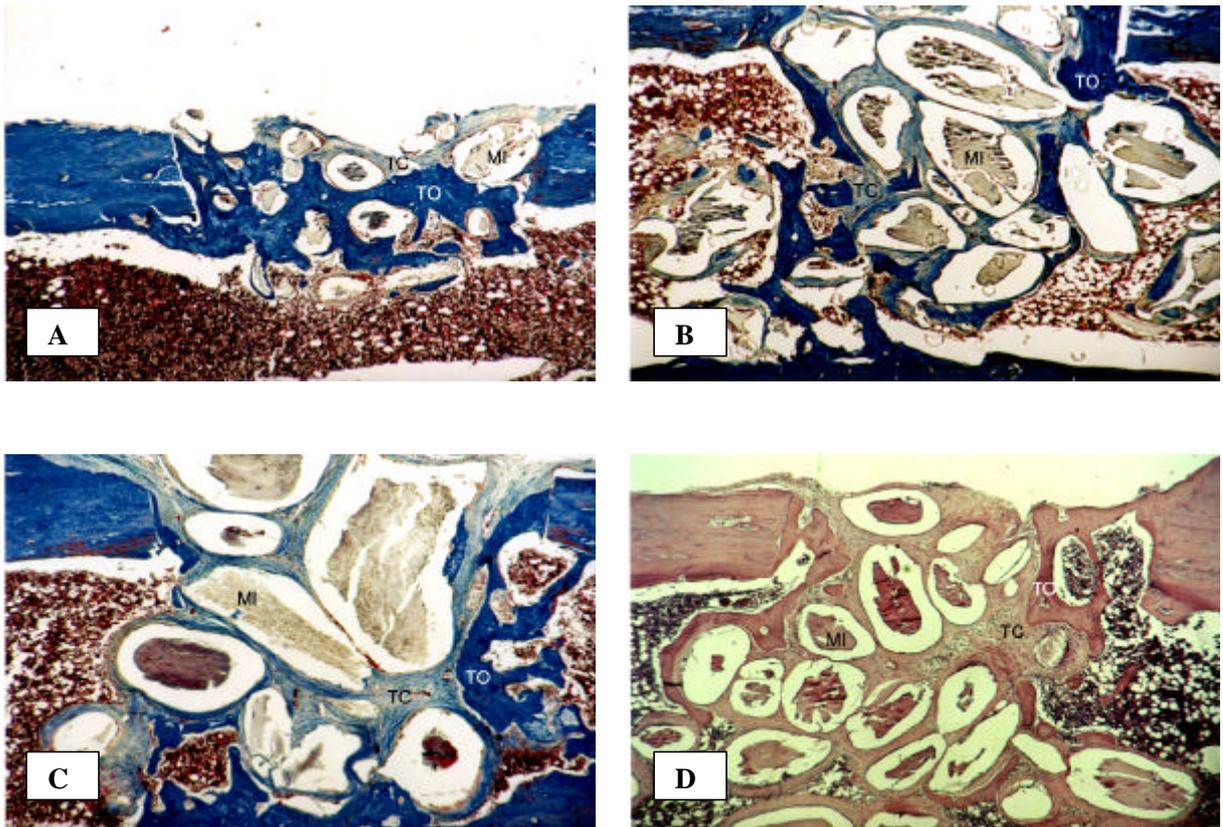


Fig.16 -60 dias.Cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (D) e Tricrômico de Masson ( A + B + C ).

Na Figura 16 observa-se que:

- a parede óssea encontra-se em alguns casos, reparada por tecido ósseo (TO) diferenciado, notando-se um estreitamento quando comparado à cortical pré-existente (Fig.16A);
- em outros, não ocorre reparação da loja cirúrgica e o material implantado (MI) mostra nas adjacências tecido conjuntivo (TC) fibroso e trabéculas ósseas neoformadas (Fig. 16B, 16C e 16D);
- o material implantado (MI) encontra-se acima do limite superior da loja cirúrgica, observando ao seu redor tecido conjuntivo (TC) bem desenvolvido rico em feixes de fibras colágenas (Fig. 16B, 16C e 16D);
- ocorre ausência de reparação na cortical óssea, parcial apenas no Grupo C (fig.16A).

Em todos os grupos estudados o material permanece em grande quantidade, notando-se ao redor pequenas trabéculas ósseas e tecido conjuntivo (TC) com feixes de fibras colágenas, sendo que a reparação foi menor no Grupo EIII quando comparada aos demais, devido ao aumento da concentração alcoólica.

#### 5.4 Dosagem do etanol no sangue

Os valores médios da concentração alcoólica, encontrados no sangue dos animais, estão na Tabela 1.

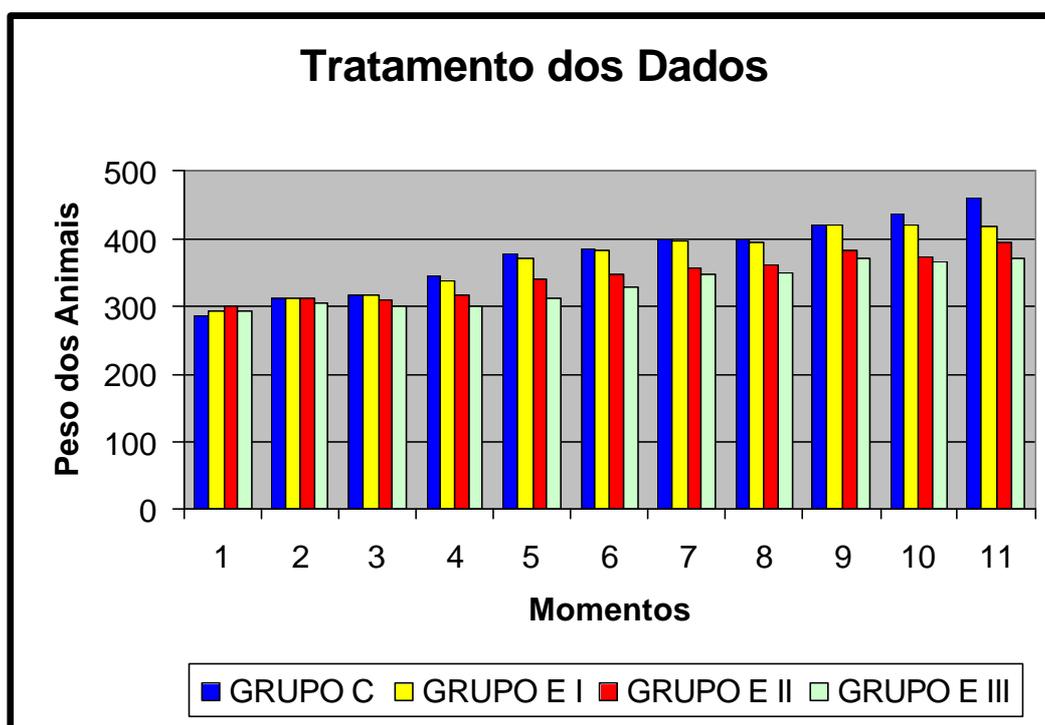
**Tabela 1. Valores médios da concentração alcoólica.**

	E1	E2	E3
<b>Média</b>	<b>0,313<sup>a</sup></b>	<b>0,429<sup>b</sup></b>	<b>0,540<sup>c</sup></b>
<b>Desvio Padrão</b>	<b>± 0,04</b>	<b>± 0,03</b>	<b>± 0,05</b>

As letras diferentes (a,b,c) indicam diferenças significantes estatisticamente.

Os dados da Tabela 1 demonstram que houve um aumento da concentração de etanol nos sangue dos animais do grupo EI para o EIII, inclusive com uma diferença significativa estatisticamente.

### 5.5 Tratamento dos dados (Peso dos animais)



**Gráfico 1** – Valores médios do peso dos animais segundo os 11 momentos pré-determinados.

## Tratamento dos Dados

<b>Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
<b>Controle (C)</b>	285,7	312,6	318,6	343,8	379,0	385,4	399,8	399,6	419,8	437,7	461,3
<b>Experimental (E I)</b>	293,3	312,6	318,0	338,1	370,8	381,6	396,7	394,5	420,9	421,2	417,6
<b>Experimental (E II)</b>	299,9	310,8	308,8	317,3	340,2	347,9	355,5	360,9	381,6	374,7	395,3
<b>Experimental (E III)</b>	293,0	304,6	299,9	300,0	312,7	328,3	345,6	349,6	371,5	366,7	370,6

**Tabela 2** – Valores médios do peso dos animais segundo os 11 momentos pré-determinados.

Os dados do Gráfico 1 e Tabela 2 demonstram que os animais, comparando-se o momento 1 (início do experimento) e o momento 11 (60 dias pós-operatório e 4<sup>o</sup> sacrifício), apresentaram ganho de peso, que percentualmente variam entre os grupos, sendo que no Grupo C o ganho foi de 61,4%, no Grupo EI foi de 42,37%, no Grupo EII foi de 31,81% e no Grupo EIII foi de 26,48%. Portanto, o ganho de peso foi menor de acordo com o aumento da dosagem alcoólica entre os grupos.

## **6. DISCUSSÃO**

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 (6%, 15% e 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).

Assim, os resultados encontrados mostraram que o álcool provocou uma diminuição no peso dos animais, ou seja, o ganho de peso foi inversamente proporcional à dosagem alcoólica dos grupos, e esses dados concordam com outras pesquisas, onde o álcool interferiu também no crescimento dos animais (SAMPSON, 1998; BUCHAIM et al., 2002).

O fator subnutrição com deficiência vitamínica é constante em indivíduos alcoólatras (MULLER, 1991), com características histológicas hepáticas de deficiência protéica. Neste trabalho não foi feita uma análise para verificar se ocorreu a subnutrição com deficiência vitamínica, porém, a perda de peso citado no parágrafo anterior, poderia indicar uma subnutrição desses animais. Entretanto, foi detectada a presença do álcool no sangue de todos os animais dos grupos experimentais através da cromatografia em camada gasosa e detecção por ionização por chama (REED & CRAVEY, 1972; CIOLA, 1973).

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 levar a 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.

Os resultados obtidos nesse experimento concordam com estudos dos efeitos da dieta alcoólica sobre a proliferação de células osteoblásticas e retardo no processo de reparação alveolar (SOUTHIA, 1984; KLEIN et al., 1996; SAMPSON, 1999), pois nos animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental, na cavidade com ausência do material implantado, a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica, levando a produção de trabéculas ósseas mais delgadas e tecido conjuntivo em maior quantidade quando comparado com os demais grupos. Estes aspectos indicam que o álcool possui vários efeitos na inibição da remodelação óssea (KLEIN & CARLOS, 1995).

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 (DAÍ et al., 2000), levando a perda de densidade mineral óssea

(NISIGUSHI 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 a perda óssea associada ao alcoolismo e buscam materiais capazes de acelerar a neoformação óssea, visando a reconstrução total ou parcial desse tecido.

Como na literatura consultada sobre a neoformação óssea não foram encontrados trabalhos usando a associação dos materiais Gen-ox<sup>®</sup> (Cortical óssea bovina) e o Gen-pro<sup>®</sup> (Proteína morfogenética óssea), os dados dessa pesquisa serão comparados com os dados de outras pesquisas onde foram usadas a associação de BMPs com alguns tipos de materiais carregadores, bem como trabalhos onde esses materiais foram utilizados individualmente.

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), apresentam como fonte o osso cortical de feto bovino, muito rico em BMPs e apresentam um procedimento de extração exaustivo (TAGA & MULATINHO, 1998), porém, são reabsorvidas rapidamente pelo organismo. Em um estudo realizado por Tuominen et al. (2001), para avaliar o processo de cicatrização em defeitos ósseos realizados na ulna de cães através da associação da BMP com osso bovino desmineralizado, foi verificado que a BMP necessita de um veículo carregador. De posse desta informação, pensou-se em utilizar nesta pesquisa o Gen-ox<sup>®</sup>, para melhores resultados clínicos e histológicos (TUOMINEN et al., 2000).

Assim no presente trabalho foram associados dois tipos de biomateriais, o Gen-ox<sup>®</sup> (Cortical óssea bovina) e o Gen-pro<sup>®</sup> (Proteína morfogenética óssea) em forma de pasta, como na pesquisa realizada por Martins (2004), que utilizou osso orgânico bovino em bloco (Gen-ox<sup>®</sup>) em calvária de ratos. Esse pesquisador observou que o material usado por ele serviu como material de preenchimento, favorecendo a neoformação óssea a partir das paredes da lesão, semelhante ao observado na cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>, nos animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental, neste trabalho.

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 (BUCHAIM, 2004). Isso pode ser observado nas cavidades vazias, 40 dias após a cirurgia, onde a cavidade se apresenta reparada por tecido ósseo bem diferenciado. Portanto, a neoformação óssea foi mais intensa na cavidade sem material implantar, que apresentou neocortical completa e região medular organizada.

No estudo realizado por Braz et al. (2003), onde foi usada a associação de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita, para favorecer a reparação de defeitos ósseos produzidos em crânios de ratos, foi observado que, aos 60 dias de reparação, nos animais cujo defeito foi preenchido pela associação dos dois materiais, ocorreu uma maior quantidade de osteoblastos e presença de osso. Esse fato não foi notado no presente experimento, onde nesse mesmo período, ou seja, nos animais sacrificados 60 dias após a cirurgia experimental, ocorreu a reparação parcial da loja cirúrgica e neocortical óssea incompleta, com presença de tecido conjuntivo fibroso e trabéculas ósseas neoformadas nas adjacências do material implantado, diferentemente da cavidade com ausência do material implantado, onde aos 40 dias de reparação a cavidade se apresentou reparada por tecido ósseo bem diferenciado, como já foi descrito no parágrafo anterior.

Além disso, pode-se também observar os efeitos das três dietas alcoólicas (6%, 15% e 25%) na reparação óssea com o uso da associação dos dois materiais citados anteriormente, onde ficou demonstrado que a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica, com ausência de reparação na cortical aos 60 dias de reparação, principalmente no grupo EIII, quando comparado aos demais grupos, observações essas ainda não encontradas na literatura.

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<sup>®</sup>), mesmo material usado no presente estudo, porém, associado a 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<sup>®</sup>. 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. No presente experimento, nos animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental, na cavidade preenchida pela mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>, sem a presença do álcool, o material implantado ocupou quase a totalidade da loja cirúrgica, com pequenas trabéculas ósseas junto ao fundo e paredes laterais da loja. Assim, pesquisas futuras poderão ser realizadas com o objetivo de avaliar a influência da radiação laser não-cirúrgica, procedimento muito utilizado atualmente nas áreas da medicina e odontologia no pós-operatório, sobre a associação dos dois materiais usados nessa pesquisa, visto que as BMPs necessitam de um veículo por serem reabsorvidas rapidamente pelo organismo, buscando melhores resultados histológicos e clínicos favoráveis ao processo de reparação óssea.

## **7. CONCLUSÃO**

De acordo com os objetivos estabelecidos no presente trabalho, é possível concluir que:

1) A dieta alcoólica influencia a neoformação óssea em todas as suas fases, retardando o processo de reparação óssea.

2) A associação Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup> não acelerou o processo de reparação óssea, servindo apenas como material de preenchimento.

3) A dieta alcoólica interferiu no processo de reparação óssea, onde se observou que a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica, mesmo usando-se a mistura Gen-ox<sup>®</sup> e Gen-pro<sup>®</sup>.

## **8. REFERÊNCIAS**

**ARGENTO, M.A. Análise histológica da reparação de defeitos ósseos criados em fêmures de ratos preenchidos com hidroxiapatita.** 1998. 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BAKER, R.D. Long-term of alveolar ridge augmentation. **J. Oral.Surg.**, v.37, n.7, p. 486-489, Jul. 1979.

BALHSI, T. J.; MAGID, M. J. Mandibular rehabilitation : a case study using inferior cadaver graft. **Int. J. Oral Maxillofac. Implant.**, v.10, n.5, p. 589-584, 1995

BIKLE, D. D.; GENANT, H. K.; CANN, C.; RECKER, R. R.; HALLORAN, B. P.; STREWLER, G. J. Bone disease in alchool abuse. **Ann Intern Med**, v.103, n.1, p. 42-48, Jul. 1985.

BIKLE, D. D. Alcool-induced bone disease. **World Rev Nutr Diet**, v.73, p. 53-79, 1993.

BRAZ. F. 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. Disponível em: <http://www.scielo.br>

BUCHAIM, R.L. **Biocompatibilidade de matrizes de colágeno aniônico e sua influência na orientação do crescimento celular.**2004. 82f. Dissertação (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

BUCHAIM, R.L.; ROQUE, D.D.; ROQUE, J.S.; TOLEDO FILHO, J.L.; ANDREO, J.C.; OKAMOTO, T. Gen-Phos implant in surgical cavities perfomed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. **Rev FOB.**, v.10, n.1, p.17-22, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; BASSI, A.P.F.; PEREIRA, L.A.V.D. Revision and nomenclature proposal for the biomaterials. **Implant News.**, v.1, n.3, p.255-260, Mai/Jun. 2004.

CHEUNG, H. S.; TOFE, A. J. Mechanism of cell growth on calcium phosphate particles : role of cell-mediated dissolution of calcium phosphat matriz. **S.T.P. Pharma Sciences.**, v.3, n.1, p. 51-55, 1993.

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.

CIOLA, R. **Introdução à cromatografia em fase gasosa**. São Paulo: EDUSP, 1973, p. 56, 186, 211.

DAI, J; LIN, D.; ZHANG, J.; HABIB, P.; SMITH, P.; MURTHA, J. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. **J Clin Invest**, v.106, n.7, p.887-895, 2000.

ELMALI, N.; ERTEM, K.; OZEN, S.; INAN, M.; BAYSAL, T.; GUNER, G. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.26, p. 500-513, 2002.

FELSON,D.T.; ZHANG, Y.; HANNAN, M.T.; KAMMEL, W.B.; KIEL, D.P. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. **Am. J. Eoidemiol.** v.142, n.5, p.485-491, 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.

FORTES, J. R. A.; CARDO, W.N. Alcoolismo e distúrbios 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. 642-655, Dec. 1987.

FORUM, S.J.; TARNOW, D.P.; WALLACE, S.S.; ROHRER, M.D.; CHO, S.C. Sinus floor elevation using anorganic bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without autogenous bone: A acinical, histologic, radiographic, and histomorphometric analys – part 2 an ongoing prospective study. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.18, n.6, p.529-543, 1998.

GARCIA-SANCHEZ, A.; GONZALEZ-CALVIN, J. L.; DIEZ-RUIZ, A.; CASALS, J. L.; GALLEGO-ROJO, F.; SALVATIERRA, D. Effect of acute alcohol ingestion on mineral metabolism and osteoblastic function. **Alcohol Alcohol**, v. 30, n. 4, p. 449-453, Jul. 1995.

GUIMARÃES, M.C.M; PASSANEZI, E.; SANT'ANA, A.C.P.; GREGHI, L.A. Pool of bovine morphogenetic ad guided tissue regeneration in the treatment of intrabony periodontal defects. I – Clinical measurements. **J. Appl. Oral. Sci.** v.12, n.1, p. 1-14, Jan/Mar. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br>.

GUSTALDI, A.C. Biomaterial – Ponderações sobre as Publicações Científicas. **Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.** v.58, n.3, p. 205-206, 2004.

HOLLINGER, J.; WONG, J. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** V.82, n.6, p.594-606. Dec. 1996.

HOWARD, B. K.; BROWN, K. R.; LEACH, J. L.; CHANG, C. H.; ROSENTHAL, D. I. Osteoinduction using bone morphogenetic protein in irradiated tissue. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 124, p. 985-988, 1998.

KARABUDA, C.; OZDEMIR, O.; TOSUN T.; ANIL A.; OLGAC V. Histological and clinical evaluation of 3 different grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. **J. Periodontol.**,v.72, n. 10, p.1436-1442, Oct. 2001.

KIM, M.J.; SHIM, M.S.; KIM, M.K.; LEE, Y.; SHIN, Y.G.; CHUNG, C.H.; KWON, S.O. 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.

KRAMER, I. R. H.; KELLY, H. C.; WRIGHT, H. C. A histological and radiological comparison of the healing of defects of the rabbit calvarium with and without implanted heterogenous anorganic bone. **Arch. Oral.Biol.**, v. 13, p.1095, 1968.

KUSUAKI, K. et al. Development of bone canaliculi during bone repair. **Bone**, v.27, n.5, p.665-659, Nov. 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com>

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

LEGERONS, R. Z., PENUGONDA, B. Biomaterials for alveolar ridge maintenance and augmentation. **N. Y. St. Dent. J.**, v. 49, n. 10, p. 570-575, Oct. 1983.

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.

MARTINS, L. V.; CESTARI, T.M.; SOTTOVIA, A.D.; GRANJEIRO J.M.; TAGA, R. 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. Disponível em: <http://www.scielo.br>

MARZOLA, C. Os implantes de materiais aloplásticos e as cirurgias pré- protéticas. In : \_\_\_\_\_. **Cirurgia Pré- Protética**. 2º ed. São Paulo : Ed. Pancast, 1996, p. 169-195.

MARZOLA, C.; TOLEDO FILHO, J. L.; ZORZETTO, D. L. G.; PASTORI, C. M. 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.

MORSE, A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, v.24, n.3/4, p. 143, 1945.

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.

NISIGUCHI, S.; SHIOMI, S.; TAMORI, A.; HABU, D.; TAKEDA, T.; TANAKA, T.; OCHI, H. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon x – ray absorptiometry. **J. Bone Miner Metab.**, v.18, n.6 ,p. 317-320, 2000.

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.2499-2503, 1995.

OWENS, A. H. Jr.; MARSHALL, E. K. Jr. 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.; HERNANDEZ-AVILA, M.; TAMAYO OROZCO, J. A.; FERNANDEZ ORTEGA, M. C.; MENESES, F. Risk factors in osteoporosis: Clinical and epidemiologic evidenc. **Gac Med Mex.**, v. 130, n. 4, p. 231-40, Jul-Aug. 1994.

PASTORE, K. Saúde : O perigo invisível da osteoporose. **Veja**, v. 1502, n. 26, p. 62-64, 1997.

PEEL, S.A.; HU Z.M.; CLOKIE C.M. In search of the ideal bone morphogenetic protein delivery system in vitro syudies on demineralized bone matrix, purified, and recombinant bone morphogenetic protein. **J. Craniof. Surg.** v. 14, n. 3, p. 284-291, May. 2003.

PINHEIRO, A.L.B.; JÚNIOR F.A.L.; GERBI, M.E.M.; RAMALHO, L.M.P.; MARZOLA, C.; PONZI, E.A.C. 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.

QIAN, J.J.; BHATNAGAR, R.S. Enhanced cell attachment to anorganic bone mineral in the presence of a synthetic peptide related to collagen. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.31, p.545-554, 1996.

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

REDDI, A.H. Symbiosis of biotechnology and biomaterials: applications in tissue engineering of bone and cartilage. **J Cell Biochem.**, v.56, n.2, p.192-195, Oct. 1994.

REED, D.; CRAVEY, R. H. A quantitative gas chromatographic method for alcohol determination. **Forensic Sci. Soc. J.**, v. 11, p. 263-265, 1971.

RIPAMONTI, U.; MA, S. S.; VAN DEN HEEVER, B.; REDDI, A. H. Osteogenin, a Bone Morphogenetic Protein, adsorbed on porous hydroxyapatite substrata, induces rapid bone differentiation in calvarial defects of adult primates. **Plast. Reconstr. Surg.**, v. 90, p. 382-93, 1992.

ROSEN, V.; THIES, R.S. The cellular and molecular basis of bone formation and repair. Heidelberg, Springer, 1995.

SAMPSON, H.W. Effect 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. 2029-2034, Dec. 1998.

SAMPSON, H.W.; HERBERT, V.A.; BOOE, H.L.; CHAMPNEY, T.H. 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.; SPEARS, H. Osteopenia due to chronic alcohol consumption by young actively growing rats is not completely reversible. **Alcohol Clin Exp Res.**, 23, n.2, p.589-594, Feb. 1999.

SMITH, J.W. Medical manifestations of alcoholism in the elderly. **Int. J. Addict.**, v.30, n. 13-14, p.1749-1798, 1995.

SANADA, J.T.; RODRIGUES, J.G.R.; CANOVA, G.C.; CESTARI, T.M.; TAGA, E.M.; BUZALAF, M.A.R.; GRANJEIRO, J.M. Análise histológica, 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.

SATO, K.; URIST, M. R. Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. **Clin. Orthop.**, v. 197, p. 301-311, 1985.

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.

SONIS, S. T.; WILLIAMS, R. C.; JEFFCOAT, M. K.; BLACK, R.; SHKLAR, G. Healing of spontaneous periodontal defects in dogs treated with xenogeneic desmineralized bone. **J. Periodontol.**, v. 56, n. 8, p. 470-479, 1985.

SOUTHIA, 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.

SPENCER, H.; RUBIO, N.; RUBIO, E.; INDREIKA, M.; SEITANA, A. Chronic alcoholism- Frequently overlooked cause of osteoporosis in men. **Am J Med**, v. 80; p. 393-397; Mar. 1986.

ST CLAIR, H. R. Hematologic. In: \_\_\_\_\_. **Recognizing alcoholism and its effect - A mini-guide**. p.41-42, 1991.

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

TAGA, R.; CESTARI, T. M.; SILVA, T. L.; STIPP, A. C. M. Reparo de defeito ósseo perene em crânio de cobaia pela aplicação de osseobond. **Rev. Bras. Implant.**, n. 01, ano 03, p. 13-20, Jan/Fev 1997.

TAGA, E. M.; MULATINHO, J. Biomateriais para uso em clínica médico-odontológica. In: \_\_\_\_\_. **Biomateriais**. São Paulo: Dentoflex, 1998, p.1-16.

TAGA, E. M.; TAGA, R.; BUZALAF, M. A. R.; GRANJEIRO, J. M. Análise histológica, 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.

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.

TUOMINEN, T.; JAMSA, T.; TUUKKANEN, J.; MARTTINEN, A.; LINDHOLM, T.S.; JALOVAARA, P. Bovine bone implant with bovine bone morphogenetic protein in healing a canine ulnar defect. **International Orthopedics**, p.1-7, Feb. 2001. Disponível em: <http://springerlink.metapress.com>

TUOMINEN, T.; JAMSA, T.; TUUKKANEN, J.; NIEMINEN, P.; LINDHOLM, T.S.; JALOVAARA, P. Native bovine bone morphogenetic protein improves the potential of biocoral to heal segmental canine lunar defects. **International Orthopedics**, v. 24, p. 282-294, 2000.

TURNER, R.T.; KIDDER, L.S.; KENNEDY, A.; EVANS, G.L.; SIBONGA, J.D. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. **J Bone Miner Res.**, v.16, n.3, p.589-594, Mar. 2001.

URIST, M. R. Bone : Formation by autoinduction. **Science**, v. 150, p.893-899, 1965.

WEINSTEIN, R.L.; FRANCETTI, L.; MAGGIORE, E.; MARCHESI, G. Alcohol and smoking. The risk factors for the oral cavity. **Minerva Stomatol.**, v.45, n.9, p.405-413, Sep. 1996.

WEZEMAN, F.H.; EMANUELE, M.A.; EMANUELE, N.V.; MOSKAL, S.F.II; WOODS, M.; SURI, M.; LAPAGLIA, N. 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.1534-1542, Sep. 1999.

WEZEMAN, F.H.; EMANUELE, M.A.; MOSKAL, S.F.; STEINER, J.; LAPAGLIA, N. Alendromate administration and skeletal response during chronic alcohol intake in the adolescent male rat. **J. Bone Miner Res.**, v.15, n.10, p.2033-2041, Oct. 2000.

WILLIS, B.R.; ANDERSON, R.A.JR; OSWALD, C.; ZANERILD, L.D. 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.

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.**, Jul. 2001.

ZANER, D. J., YUKNA, R. A. Particle size of periodontal bone grafting materials. **J. Periodontol.**, v. 55, p. 406-409, 1984.

ZENÓBIO, E.G.; SANTOS, F.A.; CAMPOS, C.A.; MARCONATO, JR.E.; TAGA, E. Regeneração periodontal, associado ao uso de biomateriais – revisão de literatura, Relato de caso clínico. **Rev. Period.**, v.7, n.1, p.42-58, Jan/Abr. 1998.

ZHAODI, G.; WEZEMAN, F.H. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Research Society on Alcoholism.**, v.23, n.3, p.468-479, Mar. 2004.

YOUNG, C.; SANDSTEDT, P.; SKOGLUND, A.; A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v.14. p.72-76, 1999.

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA  
UNIVERSIDADE DE MARILIA - UNIMAR**

**PARECER**

O grupo do trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, aprovou o protocolo de pesquisa **“Implantes de proteína morfogenética óssea (Gen-pro) e cortical óssea bovina (Gen-ox): Histomorfologia em Tibia de ratos submetidos ao alcoolismo experimental”**, da aluna Daniela Vieira Buchaim, do Programa de Pós-Graduação (nível Mestrado) em Biologia Oral, da Universidade do Sagrado Coração - USC/Bauru-SP sob orientação do Professor Dr. Jesus Carlos Andreo.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios referentes ao andamento da pesquisa e ao seu término cópia do trabalho desenvolvido.

A pesquisa em laboratório está sendo desenvolvida no Biotério da Universidade de Marília.

Marília, 29 de outubro de 2004.



Prof. Dr. Sosígenes Víctor Benfatti  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIMAR



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)