

**THIAGO MACEDO MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA DENSITOMETRIA ÓSSEA EM FÊMUR DE  
RATO APÓS CONSUMO DE ÁLCOOL E FLUORETO DE SÓDIO**

**Araçatuba  
2008**

**THIAGO MACEDO MARQUES**

**AVALIAÇÃO DA DENSITOMETRIA ÓSSEA EM FÊMUR DE  
RATO APÓS CONSUMO DE ÁLCOOL E FLUORETO DE SÓDIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus Araçatuba – Unesp, para obtenção do grau de “Mestre em Odontologia” – Área de Estomatologia.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Maria Pescinini Salzedas.**

**Araçatuba  
2008**

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M357a	<p>Marques, Thiago Macedo Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio / Thiago Macedo Marques. - Araçatuba : [s.n.], 2008 45 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008 Orientador: Profa. Dra. Leda Maria Pescinini Salzedas</p> <p>1. Alcoolismo 2. Densitometria 3. Diagnóstico por imagem 4. Fluoretos</p> <p>Black D6 CDD 617.63</p>
-------	--

# DADOS CURRICULARES

- NASCIMENTO – 26.11.1978 – Belém – PA
- FILIAÇÃO – Eliseu Paes Marques e Maria de Fátima Macedo Marques
- 2000 – 2004 – Curso de Graduação: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará – UFPA
- 2004 – 2006 – Curso de Especialização em Radiologia Odontológica e Imaginologia: APCD, Regional Bauru.
- 2005 – 2006 – Curso de Aperfeiçoamento Profissional em Cirurgia Oral Menor: APCD, Regional Bauru.
- 2005 – 2006 – Curso de Aperfeiçoamento Profissional em Periodontia: APCD, Regional Bauru.
- 2006 – 2008 – Curso de Pós-graduação em Estomatologia, nível de mestrado, Faculdade de Odontologia, Campus Araçatuba – Unesp.

# Dedicatória

Aos meus pais, **Eliseu** e **Fátima**, pelo amor incondicional e apoio constante em todos os momentos de minha vida, sempre com compreensão, sabedoria, paciência e fé, conduzindo-me pelo melhor caminho da vida.

À minha esposa **Livia**, pelo amor, carinho, companheirismo e apoio que sempre demonstrou em todos os momentos alegres e tristes de todos os dias e horas dos últimos anos. Juntos nós somos imbatíveis.

# Agradecimentos Especiais

Minha gratidão eterna a **Deus** pela oportunidade de realizar este curso de mestrado e pela graça de conhecer e poder conviver com pessoas que engrandeceram minha vida para sempre.

À minha amada avó **Stella**, que nos deixou recentemente. Você é meu grande exemplo de vida, fonte de força e superação, que sempre renovarão meu coração. Obrigado vovó, por tanto amor, carinho e dedicação. Saudades.

Aos meus irmãos **Igor** e **Vitor**, pelo companheirismo em todos os momentos e pela compreensão de minha ausência em momentos tão duros para a nossa família. Vocês são meus melhores amigos.

Aos meus sogros, **Luís** e **Olivia**, a minha admiração, gratidão e respeito. Obrigado por sua amizade, apoio e por terem confiado a mim o bem mais precioso de suas vidas.

# Agradecimentos

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Maria Pescinini Salzedas que me orientou durante o mestrado, e, além disso, foi para mim um grande exemplo pessoal e profissional, com quem pude aprender lições que me servirão por toda a vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Pires Soubhia, exemplo de dedicação e amor ao que faz, pelo carinho e atenção com que sempre me acolheu, pela paciência e disponibilidade na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mario Jefferson Quirino Louzada, que abdicou várias vezes de seus afazeres, gentilmente cedendo o Laboratório de Biofísica do Curso de Medicina Veterinária da UNESP, viabilizando a realização desta dissertação.

A Prof<sup>a</sup> Maria Lúcia Marçal Mazza Sundefeld pela contribuição a este trabalho realizando a análise estatística.

Aos amigos José Marcelo Tramarin e Bruna Gabriela dos Santos Kotake, meus companheiros de bancada, biotério e muitas risadas.

À minha amiga Ana Carolina Prado Ribeiro, pela amizade que surgiu graças a esse curso de mestrado, e que espero, perdure por muitos e muitos anos. Obrigado por tudo!

Aos meus professores, colegas de pós-graduação e servidores do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica por tantos momentos alegres e inesquecíveis, que guardarei na memória por toda minha existência.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Aos Funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp pela atenção no atendimento.

Aos Funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Unesp que nos auxiliam com tanta boa vontade, sempre dispostos a nos ajudar.



# Epígrafe

“Deus não joga dados com o mundo.”

Albert Einstein.

## Resumo

Marques TM. Avaliação da densitometria óssea em fêmur de rato após consumo de álcool e fluoreto de sódio [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2008.

O consumo abusivo de álcool interfere no metabolismo ósseo podendo causar a osteoporose, e o fluoreto de sódio tem sido usado para reduzir o risco de fratura na osteoporose. Não há relatos do efeito sinérgico dessas substâncias no tecido ósseo. A densitometria óssea é um método preciso para avaliação do conteúdo mineral ósseo. O objetivo deste estudo foi realizar a análise densitométrica óssea em fêmur de rato submetidos ao consumo de fluoreto e ao consumo crônico de álcool com e sem consumo prévio de fluoreto. Os 105 ratos foram divididos em 5 grupos conforme a dieta líquida: água (Controle C) e fluoreto (Grupo F) “ad libitum” por um período de 90 dias; água (Grupo CA) e fluoreto (Grupo FA) por 30 dias antes do consumo de aguardente de cana (40° GL) em concentrações crescentes de 30% e 60% durante 20 dias, e pura por 40 dias até eutanásia do animal; água por 60 dias e a seguir fluoreto por 30 dias (Grupo CF). Os animais foram sacrificados após 3, 10 e 28 dias de completada a dieta, os fêmures esquerdos foram dissecados e submetidos à análise densitométrica no sistema DXA. Os valores obtidos de conteúdo de massa óssea (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo verificada diferença estatística entre os grupos no CMO e DMO. A ordem decrescente de DMO foi: F, CF, C, FA, CA, sendo observada diferença estatística entre os grupos F e CA. O grupo F apresentou os maiores valores de CMO e DMO, e os grupos FA e CA apresentaram menores médias de CMO e DMO comparados aos C, F e CF. Podemos concluir que o uso de NaF de maneira prolongada aumenta a densidade óssea e que o uso crônico de álcool diminui os valores de CMO e DMO, mesmo com o uso prévio de NaF, sendo encontrado valores intermediários após consumo das duas substâncias.

Palavras-chave: Alcoolismo, Densitometria, Diagnóstico por imagem, Fluoretos.

## Abstract

Marques TM. Evaluation of bone densitometry in the rat femur after consumption of alcohol and sodium fluoride [dissertation]. Araçatuba: Dental School, UNESP, São Paulo State University; 2008.

The abusive alcohol consumption intervenes with the bone metabolism being able to cause osteoporosis and the sodium fluoride has been used to reduce the risk of breaking in osteoporosis. There are not reports of the synergistic effect of such substances on bone tissue. The aim of this study was to analysis bone density in the rat femur submitted to the use of fluoride and the chronic consumption of alcohol with and without pre-fluoride. The 105 rats had been divided in 5 groups in agreement the liquid diet: water (Control C) and fluoride (Fluorid F) "*ad libitum*" for a period of 90 days; water (water and alcohol CA) and fluoride (fluorine and alcohol FA) per 30 days before the consumption of sugar cane brandy (40°GL) in increasing concentrations of 30% and 60% during 20 days, and pure for 40 days until euthanasia of the animal; water per 60 days and to follow fluoride per 30 days (fluorid 30 days CF). The animals were sacrificed after 3, 10 and 28 days of completion of the diet, the left femurs were dissected and submitted for analysis in the DXA standard system. The values obtained of bone mass content (BMC) and bone mineral density (BMD) were submitted to the analysis of variance and test Tukey for comparison between groups, and found statistical difference between the groups in the BMC and BMD. The order of decreasing BMD was: F, CF, C, FA, CA, and observed statistical difference between the groups F and CA. The group F presented the highest values of BMC and BMD, and the FA and CA groups had lower average BMC and BMD compared to C, F and CF. We can conclude that the use of NaF on a prolonged increases bone density and that the chronic use of alcohol lowers the values of BMC and BMD, even with the previous use of NaF, and intermediate values found after consumption of the both substances.

Key Words: Alcoholism, Densitometry, Diagnostic Imaging, Fluorides.

# Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Análise de variância de dupla entrada entre os grupos mediante aplicação do teste F	25
Tabela 2 -	Teste de Tuckey para comparação entre os grupos	25
Tabela 3 -	Análise de variância de dupla entrada entre os grupos mediante aplicação do teste F	26
Tabela 4 -	Teste de Tuckey para comparação entre os grupos	26

# Lista de Figuras

Figura 1 - Fêmur posicionado e sob imersão em água no densitômetro	22
Figura 2 - Aquisição da imagem	23
Figura 3 - Dados obtidos após a análise densitométrica	23

# Lista de Abreviaturas

cm <sup>2</sup>	=	Centímetro quadrado.
CMO	=	Conteúdo de massa óssea.
DMO	=	Densidade mineral óssea.
DXA	=	Absortimetria de raios x em duas energias
g/cm <sup>2</sup>	=	Grama por centímetro quadrado.
GL (álcool)	=	Graus Gay-Lussac
IGF-I	=	Fator I de crescimento semelhante à insulina.
kVp	=	quiloVolte pico.
μA	=	Microamper.
μmol/L	=	Micromol por litro.
mmol/l	=	milimol por litro.
mg/l	=	Miligramas por litro.
mm	=	Milímetro.
NaF	=	Fluoreto de Sódio
PQTC	=	Tomografia computadorizada quantitativa.
PTH	=	Paratormônio.
%	=	Por cento.

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>19</b>
3.1 INDUÇÃO AO ALCOOLISMO CRÔNICO	20
3.2 DENSITOMETRIA ÓSSEA	22
<b>4. RESULTADO</b>	<b>25</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>34</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>36</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>40</b>
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	41
ANEXO B - NORMAS PARA PUBLICAÇÃO ( <i>JOURNAL OF BONE AND MINERAL METABOLISM</i> )	42
ANEXO C - COMPLEMENTAÇÃO DO TEXTO	44

# 1. Introdução<sup>1</sup>

O consumo crônico de álcool promove perda de massa óssea, porém o mecanismo envolvido ainda não é bem compreendido. Existem evidências de que o etanol promove osteoporose por meio de alterações no mecanismo de produção, reabsorção e remodelação óssea, como demonstrado por um estudo com modelos animais em que o álcool inibiu a proliferação de osteoblastos humanos e células da calvária de frangos *in vivo*, aumentou a reabsorção óssea em tíbias de frango e osso trabecular de rato, sugerindo que osteoclastos contribuem com a perda óssea em osteoporose mediada por etanol [1-2].

A redução da massa óssea não é o único fator associado ao consumo abusivo de álcool e ao aumento do risco de fratura. Evidências sugerem que indivíduos que abusam de álcool estão mais propensos a acidentes e outras lesões comparados aos indivíduos que não consomem álcool [2].

Desde o momento em que o NaF começou a ser adicionados a água de beber em 1945, debate-se sua influência nos ossos humanos. O mecanismo molecular em que os fluoretos estimulam a proliferação de células osteogênicas ainda não está claramente estabelecido [3]. Estudos demonstram que o NaF pode reforçar a indução da replicação de células através dos fatores de crescimento de polipeptídeos incluindo fator I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I). Este efeito provavelmente está relacionado com o incremento da fosforilação da proteína tirosina pelo fluoreto em osteoblastos [4].

---

<sup>1</sup> As citações das referências no texto e a lista de referências estão de acordo com as normas da revista *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, encontrada no anexo B.



O flúor após a absorção pelo trato gastrointestinal é rapidamente incorporado aos tecidos calcificados, que contêm 99% desta substância na forma de fluorapatita. Os fluoretos têm a capacidade de prevenir a formação e a progressão de cáries dentais e estimular a formação de osso. Em doses terapêuticas no tratamento da osteoporose, os fluoretos demonstram incremento da densidade mineral óssea. Entretanto, a ingestão crônica de NaF que atinja doses entre 5 e 10  $\mu\text{mol/L}$  pode causar desmineralização e aumentar o risco de fratura [5].

A medição da massa óssea é essencial no diagnóstico e monitoramento do tratamento da osteopenia e osteoporose. Vale ressaltar que os ratos são excelentes modelos na simulação do comportamento humano desenvolvido em animais no estudo da osteoporose, em função de seu metabolismo ósseo ser bem conhecido e as respostas aos hormônios calcitotrópicos serem similares ao observado em humanos [6].

A fluoretação da água faz parte do programa de saúde pública de muitos países, bem como, os programas de combate ao abuso do álcool de maneira crônica. Porém, não existem na literatura modelos de estudos experimentais em animais que avaliem o efeito do consumo prévio de flúor ao álcool. Por isso, foi objetivo deste estudo avaliar a densidade mineral óssea em fêmures de ratos submetidos ao consumo crônico de etanol e fluoreto de sódio, utilizando a análise densitométrica óssea, no método DXA.

## **2. Proposição**

Foi proposta deste estudo, realizar a análise densitométrica óssea, pelo método DXA, em fêmures de ratos submetidos ao consumo de fluoreto de sódio e ao consumo crônico de álcool, com e sem consumo prévio de fluoreto.

### 3. Material e Método

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Para o presente trabalho foram utilizados 105 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) machos, com idade inicial de 30 dias, divididos em 5 grupos (n= 21) conforme dieta líquida administrada: Grupo C - controle (água), Grupo F (fluoreto de sódio), Grupo CF (fluoreto de sódio por 30 dias), Grupo FA (fluoreto e álcool), Grupo CA (água e álcool). Todos os animais foram alojados em ambiente com exaustão do ar, separados em um número máximo de 5 animais por gaiola, onde receberam ração comercial balanceada.

#### 3.1 Indução ao alcoolismo crônico

A indução ao alcoolismo foi efetuada nos grupos CA e FA, que receberam, respectivamente, água e flúor por 30 dias previamente à indução. Os animais deste grupo receberam ração comercial e solução de aguardente de cana-de-açúcar (40° GL) “*ad libitum*” em concentrações crescentes da seguinte forma: nos primeiros 10 dias os animais receberam solução de aguardente de cana-de-açúcar a 30%, nos 10 dias subsequentes, solução de aguardente a 60%, e a partir do 21º dia, a aguardente pura por um período de 40 dias, continuado até o sacrifício.

Para a melhor seleção dos animais e com a finalidade de conseguir um grupo de trabalho homogêneo, a cada 3 dias, foram controlados o peso, o consumo de água e de solução de aguardente de cana-de-açúcar, além da

quantidade de ração comercial dos ratos. Quando detectada discrepância entre um destes consumos, o animal foi eliminado do experimento.

Os grupos foram submetidos ao seguinte protocolo:

- Grupo C controle: Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” durante todo o experimento.
- Grupo F: Os animais foram tratados com ração comercial e receberam fluoreto de sódio na água de beber na concentração de 30 mg/l sob a forma de NaF durante todo o experimento.
- Grupo CF: Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” por 60 dias, e a seguir receberam fluoreto na água de beber na concentração de 30 mg/l, sob a forma de NaF, por 30 dias, sendo mantido até o sacrifício.
- Grupo FA: Os animais foram tratados com ração comercial e receberam fluoreto na água de beber na concentração de 30 mg/l, sob a forma de NaF, por 30 dias, e a seguir submetidos à metodologia do alcoolismo, recebendo aguardente pura até o sacrifício.
- Grupo CA: Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” por um período de 30 dias, e a seguir submetidos à indução do alcoolismo, recebendo aguardente pura até o sacrifício.

Os animais, após o período de tratamento de 90 dias, foram sacrificados nos tempos de 3, 10 e 28 dias, por dose excessiva de anestésico (Cloridrato de Xilazina - 0,03ml/100g peso corporal - e Cloridrato de Ketamina - 0,07ml/100g

de peso corporal), e os fêmures do lado direito foram removidos, dissecados e fixados em formol a 10% por 24 horas.

### 3.2 Densitometria óssea

As peças foram submetidas à análise densitométrica em um densitômetro de dupla emissão de raios X, modelo DPX-Alpha, Lunar® (Figura 1). Foi utilizado o programa para exames em pequenos animais. As aquisições de imagem foram realizadas com os fêmures na mesma posição, imersas sob profundidade de 2 cm de água (para simular os tecidos moles) e selecionadas as opções: apendicular; osso Tipo 1; modo alta resolução; 76 kVp; 150  $\mu$ A; colimação no ajuste fino; área de tamanhos padronizados em 40 mm de largura e 20 mm de comprimento. Conforme a recomendação do fabricante, o aparelho foi calibrado diariamente com um fantoma fornecido pelo próprio fabricante (Figura 2).

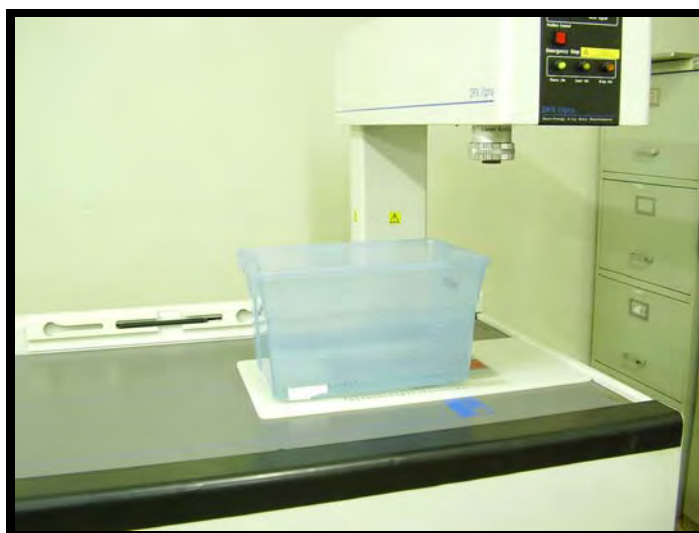


Figura 1 – Densitômetro.

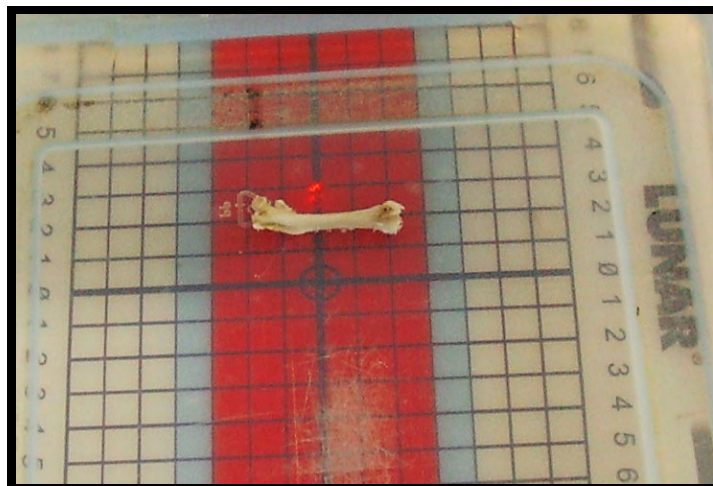


Figura 2 - Fêmur posicionado e sob imersão em água no densitômetro.



Figura 3 - Aquisição da imagem.

Com auxílio do mesmo programa computacional utilizado na aquisição das imagens foram realizadas as análises dos exames. Usando a ferramenta de seleção, os ossos foram demarcados em sua totalidade, colhendo as informações de conteúdo de massa óssea (CMO) e densidade mineral óssea (DMO) (Figura 3 e 4).



Figura 4 - Dados obtidos após a análise densitométrica.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação entre os grupos, nos três tempos.

## 4. Resultados

Na comparação do **CMO** foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos, mas sem diferença na interação grupo e tempo (Tabela 1).

No teste de Tuckey, os grupos C, F e CF foram similares entre si e diferiram estatisticamente dos grupos FA e CA (similares entre si) (Tabela 2).

Tabela 1 - Análise de variância de dupla entrada entre os grupos mediante aplicação do teste F.

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F Valor	Pr > F
Grupo	4	0.23538499	0.05884625	15.41	<.0001*
Tempo	2	0.03878368	0.01939184	5.08	0.0083
Espécie	6	0.04560472	0.00760079	1.99	0.0760
Grupo*Tempo	8	0.01780375	0.00222547	0.58	0.7894
Resíduo	84	0.32074585	0.00381840		
Total	104	0.65832299			

\*estatisticamente significativa em nível de 1%

Tabela 2 - Teste de Tuckey para comparação entre os grupos.

Grupo	N	Média	Decisão
C	21	0.38557	A
F	21	0.42595	A
CA	21	0.30919	B
FA	21	0.31733	B
CF	21	0.40700	A

\*alpha: 0,05.

Diferença Mínima significativa: 0.0532

Na comparação da **DMO** foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos, mas sem diferença na interação grupo e tempo (Tabela 3).

No teste de Tuckey, os grupos C, F e CF foram similares entre si, assim como os grupos C, FA e CA entre si. O grupo C não diferiu dos grupos CF e FA. Os grupos F e CA foram estatisticamente diferentes entre si (Tabela 4).



Tabela 3 - Análise de variância de dupla entrada entre os grupos mediante aplicação do teste F.

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F Valor	Pr > F
Grupo	4	0.01848090	0.00462022	6.49	0.0001*
Tempo	2	0.00912905	0.00456452	6.41	0.0026
Espécie	6	0.00354225	0.00059037	0.83	0.5509
Grupo*Tempo	8	0.00350390	0.00043799	0.61	0.7631
Resíduo	84	0.05983775	0.00381840		
Total	104	0.09449385	0.00071235		

\*estatisticamente significativa em nível de 1%

Tabela 4 - Teste de Tuckey para comparação entre os grupos.

Grupo	N	Média	Decisão
C	21	0.206524	A B C
F	21	0.223143	A
CA	21	0.185619	C
FA	21	0.193381	B C
CF	21	0.211524	A B

\*alpha: 0,05

Diferença mínima significativa:0.023

A média de CMO e DMO do grupo F foi a maior dentre os grupos e do grupo CA foi a menor (Tabela 2 e 4).

## 5. Discussão

O tecido ósseo é regido por um complexo mecanismo de remodelação em nível celular, que acontece de uma forma alternada entre formação e reabsorção óssea. O uso prolongado e excessivo de álcool causa alterações neste mecanismo, modificando seu conteúdo mineral, causando osteopenia e osteoporose, que pode ser detectada de várias maneiras. Estudos mostram que o uso prolongado de álcool reduz significativamente o número de osteoblastos inibindo a proliferação e atividade destas células, estimula a síntese de PTH, que é o principal hormônio responsável pela homeostase de cálcio em mamíferos. O PTH estimula osteoclastos a reabsorver o osso [7]. Em uma pesquisa sobre os efeitos do alcoolismo crônico no processo de remodelação óssea *in vivo* utilizando tíbias de ratos alimentados com dieta líquida de etanol a 35% durante 6 semanas, demonstrou-se significativa redução do número e atividade dos osteoblastos observados em análise por meio da histomorfometria [8].

Neste estudo optamos pela utilização da absorptimetria de raios X em duas energias, método não invasivo que vem sendo utilizado como recurso mais acessível na avaliação óssea [9,10].

Pesquisas propuseram a aplicabilidade do DXA para determinar a correlação entre densidade e conteúdo mineral ósseo em ratos como modelos animais. Utilizando as vértebras L2-L4 e os fêmures esquerdos de 14 ratas da raça Wistar, com 15 semanas de idade, concluíram que o DXA possui a precisão necessária na determinação da DMO em pequenos animais [6]. Em

um estudo com úmeros de ratos da raça Lewis, com 11 semanas de idade apresentou à mesma conclusão [11].

Muitos estudos em humanos tentam correlacionar a incidência de fraturas em comunidades que adotam a fluoretação da água no abastecimento público comparando com comunidades sem fluoretação. Entretanto, estes estudos não têm controle sobre variáveis que estão fortemente ligadas com o aumento do risco de fratura do osso como estrogênio, fumo, peso corporal e uso abusivo de álcool [12]. Porém, não existe dúvida que doses farmacológicas de flúor estimulam a formação óssea e aumentam significativamente a DMO. Fato este intrinsecamente ligado à diminuição da ocorrência de fraturas em ossos longos. O aumento na formação óssea foi relacionado ao aumento no número de osteoblastos, porém, tal mecanismo ainda não foi completamente elucidado [4,3,12].

Na tentativa de eliminar as variações inerentes a alimentação *ad libitum* em modelos animais, um estudo utilizou administração de álcool por via intragástrica mostrando que a exposição crônica ao etanol diminui drasticamente a resistência, densidade mineral óssea da cortical de tíbias de ratos durante o período de 75 dias de exposição. Segundo o autor estes resultados coincidiram com os de estudos que utilizaram o método tradicional de álcool *ad libitum* na dieta de ratos machos [13].

A concentração de fluoreto misturado a água neste estudo foi baseada em trabalhos anteriores que demonstram que 2 mg/l de NaF resultam no plasma humano, níveis entre 0,5 a 2,1 mmol/l; a concentração de água fluoretada deve ser elevada de 4 a 5 vezes, entre 8 a 10 mg/l para obtermos concentração equivalente em ratos [14]. Portanto, neste trabalho foi utilizado

água destilada com traços de concentração de 30 mg/l de NaF que equivalem em média a fluoretação de abastecimento público de água que possui traços de concentração de 0,7 mg/l de fluoreto.

Neste trabalho verificamos que o conteúdo mineral ósseo foi superior nos grupos tratados com flúor quando comparados aos com álcool, indicando uma perda no conteúdo mineral com o alcoolismo crônico. Isto pôde ser constatado pelos valores inferiores nos grupos com álcool em relação ao controle (Tabela 2). Apesar dos grupos com uso exclusivo de flúor apresentarem valores superiores de CMO, estes não diferiram estatisticamente do grupo Controle. O uso prévio de flúor ao álcool resultou em valores levemente superiores comparados ao uso exclusivo de álcool, porém sem diferença estatística (Tabela 2). Outro estudo sobre os efeitos do fluoreto de sódio associado ao IGF-I, ministrado durante 8 semanas, em coluna vertebral e tibia de ratas adultas castradas, no CMO e DMO por meio de um densitômetro de dupla emissão de raios x, não foi constatado incremento destes valores quando o fluoreto de sódio foi ministrado isoladamente, devido ao curto período de exposição à substância [4].

Considerando que na análise da DMO os grupos C, F e CF foram similares entre si, assim como os grupos C, FA e CA entre si, o consumo de flúor e álcool promoveram alterações na densidade óssea (Tabela 4), porém com diferença significativa apenas entre os grupos que tiveram o consumo exclusivo de uma das substâncias por longo período de tempo (Grupos F e CA). Em estudo sobre os efeitos ósseo protetor do xilitol em modelo animal submetido a indução experimental de osteoporose por meio do consumo crônico de álcool, ratos da variedade Wistar com 4 semanas de idade, tiveram

livre acesso a solução contendo 10% de xilitol e 10% de etanol no período de 40 dias. O CMO e a DMO da tíbia dos ratos foi determinado por meio do método de tomografia computadorizada quantitativa, e a diferença dos valores não foi significativa, quando comparado ao grupo controle e o grupo que recebeu apenas xilitol [15]. Assim, apesar de variações numéricas de DMO entre os grupos, não houve variação significativa em relação ao controle. A média de CMO e DMO do grupo F foi a maior dentre os grupos e do grupo CA foi a menor (Tabela 2 e 4), reforçando o aumento desses parâmetros analisados com o uso do flúor e redução com o uso do álcool [3-5,14]. Trabalhos que estudaram os efeitos do consumo crônico de álcool na DMO de ratos por meio do DXA encontraram resultados semelhantes aos deste estudo. A exemplo da pesquisa que analisou os efeitos da dieta de 15% de álcool e glicose, durante 6 semanas, no conteúdo de massa óssea e densidade mineral óssea em tíbias e fêmures de 55 ratos machos que apresentaram valores inferiores quando comparados ao grupo controle [16]. No estudo que utilizou ratos de ambos os sexos, com 6 semanas de idade e dieta líquida contendo etanol a 36%, foi encontrado menor valor de DMO no grupo de fêmeas tratadas com álcool [17]. Em um estudo com 30 ratos Sprague–Dawley de ambos os sexos com 30 dias de idade que receberam álcool a 36% durante 45 dias, suas colunas vertebrais foram removidas e dissecadas, a densidade óssea foi medida por meio de pQTC, que mostrou a redução do tamanho das peças e da DMO no grupo tratado com dieta alcoólica [18].

Na análise da interação grupo\*tempo quanto ao CMO e DMO não houve diferença estatística significativa (Tabela 1 e 3), indicando que o fator tempo de consumo utilizado em nosso experimento não interferiu nos resultados. Assim,

dentro dos limites deste trabalho, uma vez estabelecido o alcoolismo crônico, não houve interferência do tempo de manutenção de consumo nesses parâmetros de análise.

A realização de mais estudos, analisando os efeitos à estrutura mineral óssea resultante da interação do consumo de NaF e álcool utilizando o sistema DXA como metodologia de análise, são necessários. Visto que, o aperfeiçoamento do uso de modelos animais em novas pesquisas, possibilitará o maior entendimento do papel exato da interação entre estas substâncias.

## 6. Conclusão

Considerando que o uso do sistema DXA é adequado para avaliação da alteração mineral óssea em fêmures de ratos após o consumo de álcool e fluoreto de sódio concluímos que:

- O uso do NaF de maneira prolongada aumentou a densidade mineral óssea.
- O uso crônico de álcool diminuiu os valores de CMO e DMO independente do uso prévio de NaF.

## Referências

1. Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, Fu Z, Yao Z, Qi Y, Keller ET (2000) Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest* 106:887-95.
2. Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K, Ho E, Iwaniec UT (2007) Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone* 41:175-80.
3. Phipps KR, Orwoll ES, Bevan L (1998) The association between water-borne fluoride and bone mineral density in older adults. *J Dent Res* 77:1739-48.
4. Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Bonjour JP (1998) Fluoride potentiates the osteogenic effects of IGF-I in aged ovariectomized rats. *Bone* 22:39-43.
5. Sowers M, Whitford GM, Clark MK, Jannausch ML (2005) Elevated serum fluoride concentrations in women are not related to fractures and bone mineral density. *J Nutr.* 135:2247-52.
6. Gala Paniagua J, Díaz-Curiel M, de la Piedra Gordo C, Castilla Reparaz C, Torralbo García M (1998) Bone mass assessment in rats by dual energy X-ray absorptiometry. *Br J Radiol* 71:754-8.



7. Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Taguchi H, Yano R, Shoumura S 2001 Effects of ethanol on the ultrastructure of the hamster femur. *Histol Histopathol* 16:763-70.
8. Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW (1998) Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* 16:337-41.
9. Petersen MM, Nielsen PK, Lewin E, Olgaard K (2000) Dual energy X-ray absorptiometry in small rats with low bone mineral density. *Calcif Tissue Int.* 67:455-9.
10. Bertin E, Ruiz JC, Mourot J, Peiniau P, Portha B (1998) Evaluation of dual-energy X-Ray absorptiometry for body-composition assessment in rats. *J Nutr* 128:1550-4.
11. Kastl S, Sommer T, Klein P, Hohenberger W, Engelke K (2002) Accuracy and precision of bone mineral density and bone mineral content in excised rat humeri using fan beam dual-energy X-ray absorptiometry. *Bone* 30:243-6.
12. Phipps KR, Orwoll ES, Mason JD, Cauley JA (2000) Community water fluoridation, bone mineral density, and fractures: prospective study of effects in older women. *BMJ* 321:860-4.

13. Brown EC, Perrien DS, Fletcher TW, Irby DJ, Aronson J, Gao GG, Hogue WJ, Skinner RA, Suva LJ, Ronis MJ, Hakkak R, Badger TM, Lumpkin CK Jr (2002) Skeletal toxicity associated with chronic ethanol exposure in a rat model using total enteral nutrition. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1132-8.
14. Dunipace AJ, Brizendine EJ, Wilson ME, Zhang W, Katz BP, Stookey GK (1998) Chronic fluoride exposure does not cause detrimental, extraskeletal effects in nutritionally deficient rats. *J Nutr* 128:1392-400.
15. Mattila PT, Kangasmaa H, Knuutila ML (2005) The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. *Metabolism* 54:548-51.
16. Nyquist F, D ppe H, Obrant KJ, Bondeson L, Nordsletten L (2002) Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol Alcohol* 37:21-4.
17. Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tanaka T, Ochi H (2000) Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Metab* 18:317-20.
18. Wezeman FH, Juknelis D, Frost N, Callaci JJ (2003) Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. *Alcohol* 31:87-92.

## ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA).

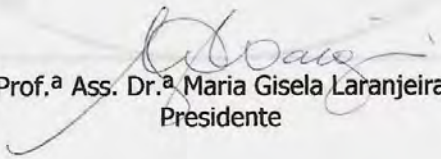
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "EFEITOS DO ALCOOLISMO CRÔNICO E FLÚOR NO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR E TECIDO ÓSSEO. ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS" sob responsabilidade de LEDA MARIA PESPININI SALZEDAS E ANA MARIA PIRES SOUBHIA e THIAGO MACEDO MARQUES está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado *AD REFERENDUM* pela CEEA em 10 de julho de 2006, de acordo com o protocolo nº 55/06.

Araçatuba, 10 de julho de 2006.

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

## ANEXO B – Normas da revista selecionada para a publicação do artigo.

*JOURNAL OF BONE AND MINERAL METABOLISM***Instructions for Authors****Editorial Policies**

**JBMM publishes:** (1) original articles, (2) review articles, (3) case reports, (4) rapid communications, and (5) short communications. Manuscripts are received with the understanding that they have not been published or submitted for publication in whole or part elsewhere. This restriction does not apply to abstracts published in connection with scientific meetings. All papers are reviewed by at least two referees, and acceptance is decided by the editorial board of the Japanese Society for Bone and Mineral Research and the Japanese Society for Bone Morphometry.

**All correspondence should be sent to:**

Editorial Office, Journal of Bone and Mineral Metabolism  
c/o APO PLUS STATION Co., Ltd.

5th floor, Kita Bldg., 4-3-7 Koraibashi,

Chuo-ku, Osaka 541-0043, Japan

Tel 81-6-6205-6005; Fax 81-6-6228-5811

e-mail: jbmm@apoplus.co.jp

Prerequisites for publication: A Certification Form, included in each issue, must be signed by all authors and be submitted to the journal's editorial office by e-mail, fax or postal mail (see above) separately from the manuscript at the same time you submit your manuscripts via Editorial Manager.

**IMPORTANT:** Upon receipt of a Certification Form, manuscripts are officially recognized as submissions.

**Manuscript Submission via Editorial Manager**

Authors should submit their manuscripts to the *Journal of Bone and Mineral Metabolism* online. Please log in directly at: <https://www.editorialmanager.com/jbmm> and upload your manuscript following the instructions given. If you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, click on Help in the upper left corner.

**Editorial Manager Requirements:**

- Windows or Macintosh computer capable of running Adobe Acrobat Reader 5.0 or later, and either Internet Explorer 5.0 or later or Netscape 7 or later
- Electronic files of the manuscript text
- Electronic files of the manuscript figures and illustrations

**Author Accounts**

Authors entering the journal's Editorial Manager site can either create a new account or use an existing one. When you have an existing account, use it for all your submissions; you can track their status on the same page.

If you have forgotten your username and password, please click the link "Send Username/Password" and enter your mail address. You will then receive an automatic e-mail with your user name and password. Alternatively, please create a new account and then follow the instructions given on the screen.

**Getting Started**

Once you have logged into your account, Editorial Manager will lead you through the submission process in an orderly, step-by-step process. If you cannot finish your submission in one visit, you can save a draft and re-enter the process later at the same point for that manuscript.

While submitting your electronic manuscript, you will be required to enter data about your manuscript in the system. These include full title, author names and affiliations, and so forth, as listed below under Preparation of Manuscripts. Support for special characters is available.

**Uploading Files**

**Main Documents:** Main documents of articles should be uploaded in rich text format (.rtf) or as a Microsoft Word document (.doc).

**Tables:** Use the table functions of your word-processing program, not spreadsheets, to make tables. Tables may be uploaded separately from the main document or inserted into the main document.

**Figures:** Common graphic files such as GIF, JPEG, EPS, and TIFF are supported. Please upload figures that are satisfactory for the review process. If your manuscript is accepted for publication, you will be required to provide figures/illustrations of sufficient quality for printing according to Requirements for Electronically Produced Illustrations for Accepted Papers toward the end of these instructions.

After uploading the parts of the article in this manner, the system will convert the files to PDF format. You can view the result of the conversion with Adobe Acrobat Reader. You will also be notified by e-mail that your submission was successful.

At any point during this process, there are Help buttons available to see frequently asked questions.

If the total size of the files exceeds the file volume (20 MB) for online submission, reduce the resolution of large files for initial submission.

**Keeping Track**

After submission, you may return and monitor the progress of your submission through the review process.

**Preparation of Manuscripts**

Manuscripts should be double-spaced. Leave margins of approximately 3cm on the sides, top, and bottom of the page. Three manuscript pages correspond to about one printed page. The title page should include the authors' names, addresses, and affiliations. Please indicate the name, address, phone number, fax number, and e-mail address of the author who is to receive correspondence. Provide up to five key words.

**Articles should have the following format:** Title page, text, references, tables, figure legends, and artwork. Number pages consecutively. Consult a current issue of the journal for the exact format.

**Tables and Illustrations**

Prepare each table (with its title) on a separate page. Use Arabic numerals to number tables. Each table must be able to stand alone, i.e., it must contain enough information to be understood independently of the text. Details of experimental conditions, statistical significance, and the definition of all abbreviations should be included in the table footnotes. Information that appears in the text should not be repeated in detail in the tables, and tables should not contain data that can be given in the text in one or two sentences.

For all figures, double-spaced figure legends should be supplied on a separate page. Magnifications should be included when appropriate, and all abbreviations must be defined. All tables and figures must be cited in order in the text. If a figure has been published previously, acknowledge its source and submit written permission from the author and publisher. The previously published source should also be included in the list of references.

Color illustrations will be accepted; however, the author will be expected to make a contribution to the extra cost (¥110,000 for the first color page and ¥60,000 for each additional color page).

**Abbreviations and Nomenclature**

Abbreviations and nomenclature should follow the recommendations of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry at the web sites, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/jcbr/>. All quan-

titles stated should conform to the International System of Units (SI units). The list of abbreviations in *Endocrinology* 138: 1 (January 1997) is generally acceptable in JBMM. Drug names should always be generic. Please give the name and location (city, state, country) of the manufacturer of any equipment referred to in your manuscript.

#### References

Number references consecutively in the order cited in the text using square brackets—as shown by Suzuki et al. [1], Fujita et al. [2], Brown and Roberts [3].

References should be listed in numerical order at the end of the article. References should include the names of all authors when 19 or less; when 20 or more, list only the first 5 names and add et al.

References should also include the full title. Journal titles should be abbreviated according to Index Medicus and inclusive page numbers should be supplied.

The styling of the reference list for journal articles [1], journal articles in Japanese [2], books [3], and chapters in edited books [4] is as follows:

1. Tezuka K, Wada Y, Takahashi A (2005) Computer-simulated bone architecture in a simple bone-remodeling model based on a reaction-diffusion system. *J Bone Miner Metab* 23:1–7
2. Ishida Y (1998) Studies on induction mechanism of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine especially on the cultured cells from the human spinal ligament (in Japanese). *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi (J Jpn Orthop Assoc)* 62:1019–1027
3. Takahashi HE (1999) Mechanical Loading of Bones and Joints. Springer, Tokyo
4. Suzuki F (1994) Regulation of cartilage differentiation and metabolism. In: Heersche JNM, Kanis JA (eds) *Bone and Mineral Research* 8. Elsevier, Amsterdam, pp 115–142

#### 1. Original Articles

The text should be composed of: abstract of not more than 250 words, introduction, materials and methods, results, discussion, and acknowledgments.

#### 2. Review Articles

The editorial board invites selected investigators to submit review articles. Review articles should be about five to ten printed pages including figures, tables, and references. They may cover any area of clinical or basic science. Abstracts are not required: a concluding summary paragraph is preferred.

The requirements for review articles also apply to mini reviews, except that mini reviews should be within four printed pages including the elements described above.

#### 3. Case Reports

Case reports should be about three to five printed pages and may be accompanied by two figures (illustrations, micrographs, etc.) or tables. They may describe a single case or a small series of cases. Case reports that draw attention to important clinical situations, unusual clinical phenomena, or a new treatment or complication are the most appropriate.

Abstracts are not required.

#### 4. Rapid Communications

To provide an opportunity to authors to rapidly publish data that they consider to be particularly novel or valuable, the editorial board of JBMM has established a specific review process for rapid communications. Rapid communications should not exceed three printed pages including figures, tables, and references.

#### 5. Short Communications

These are brief reports of scientifically sound research of limited scope, new experimental methods, or similar

subjects. Short communications should not exceed four printed pages and they need not be restricted to the formal organization of regular papers. A brief summary is required.

#### Requirements for Electronically Produced Illustrations for Accepted Papers

After acceptance of the manuscript, the publisher requires figure files prepared according to the following specifications.

##### Illustrations

The preferred figure formats are EPS for vector graphics exported from a drawing program and TIFF for halftone illustrations. EPS files must always contain a preview of the figure in TIFF format.

The file name (one file for each figure) should include the figure number. Figure legends should be included in the text and not in the figure file.

To create an EPS or a TIFF file, please use graphic programs such as Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, Macromedia Freehand, Corel Draw or Corel Photopaint.

Note: Almost all common graphic programs are capable of saving files in EPS and in TIFF format. This option can normally be found under the “Save As . . .” or “Export . . .” commands in the “File” menu.

##### — Scan resolution

Scanned line drawings should be digitized with a minimum resolution of 800dpi relative to the final figure size. For digital halftones, 300dpi is usually sufficient.

##### — Color illustrations

Store color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

##### — Vector graphics

The font size of letters, numbers, or other symbols should be appropriate (neither too large nor too small) for the entire graphic. Fonts must be included or outlined. Please do not use hairlines. The minimum line width is 0.2mm (i.e., 0.567pt) relative to the final size.

#### General Information on Data Delivery

Please send those files to the publisher by the following methods.

- Via ftp.springer.jp (log-in:z00774; password:spvz00774).
- If you are using Netscape or Internet Explorer to upload your files, please use this URL: ftp://z00774:spvz00774@ftp.springer.jp
- By e-mail: jbmm@apoplus.co.jp (suitable only for small volumes of data)
- Via postal mail on a CD-ROM or MOD (230/640 MB)

#### Mailing address:

Editorial Secretary  
Journal of Bone and Mineral Metabolism  
c/o APO PLUS STATION Co., Ltd.  
5th floor, Kita Bldg., 4-3-7 Koraibashi,  
Chuo-ku, Osaka 541-0043, Japan

Please always supply the journal title, operating system, drawing program, image-processing program, and compression program with your data. For the file name, please use the manuscript number. Use only the extensions that the program assigns automatically.

#### Fees and Offprints

There is no publication charge for articles. Offprints of each paper are available in lots of 100; to order these, fill out the order form received with the corrected proofs.

## ANEXO C: Complementação para o texto.

## Anexo C1

Tabela I – Valores de CMO, Área e DMO dos fêmures nos cinco grupos.

Grupo	Rato	CMO (g)	ÁREA (cm <sup>2</sup> )	DMO (g/cm <sup>2</sup> )
<b>Grupo C</b>	1	0,355	1,787	0,199
	2	0,418	1,757	0,238
	3	0,29	1,595	0,182
	4	0,177	1,165	0,152
	5	0,379	2,136	0,177
	6	0,413	2,122	0,194
	7	0,426	1,912	0,223
<b>Grupo F</b>	1	0,338	1,658	0,204
	2	0,348	1,743	0,2
	3	0,45	2,235	0,202
	4	0,462	1,917	0,241
	5	0,385	1,694	0,227
	6	0,411	1,91	0,215
	7	0,384	2,001	0,192
<b>Grupo CA</b>	1	0,202	1,522	0,133
	2	0,269	1,69	0,159
	3	0,276	1,617	0,171
	4	0,181	1,722	0,105
	5	0,365	1,831	0,2
	6	0,232	1,906	0,122
	7	0,406	1,841	0,221
<b>Grupo FA</b>	1	0,325	1,874	0,173
	2	0,295	1,546	0,191
	3	0,319	1,767	0,181
	4	0,335	1,604	0,209
	5	0,264	1,567	0,168
	6	0,353	1,863	0,189
	7	0,359	1,76	0,204
<b>Grupo CF</b>	1	0,465	1,811	0,256
	2	0,366	1,813	0,202
	3	0,395	1,822	0,217
	4	0,339	1,819	0,186
	5	0,384	2,031	0,189
	6	0,392	1,92	0,204
	7	0,3	1,844	0,162



## Anexo C2

Na comparação de **Área** foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos, mas sem diferença na interação grupo e tempo (Tabela II).

Tabela I: Análise de variância de dupla entrada entre os grupos mediante aplicação do teste F.

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F Valor	Pr > F
Grupo	4	1.66913749	0.41728437	11.56	<.0001 *
Tempo	2	0.05971572	0.02985786	0.83	0.4409
Espécie	6	0.47416799	0.07902800	2.19	0.0521
Grupo*Tempo	8	0.36211922	0.04526490	1.25	0.2790
Resíduo	83	2.99654991	0.03610301		
Total	103	5.51159246			

\*estatisticamente significativa em nível de 1%

Não significativa a interação grupo tempo.