

Aneliza de Fatima Moraes da Silva

**Estudo do consumo excessivo de aguardente de
cana de açúcar na densidade mineral, espessura
e resistência às fraturas ósseas em fêmures e
tíbias de ratos adultos-jovens**

ARAÇATUBA-SP

2016

Aneliza de Fatima Moraes da Silva

Estudo do consumo excessivo de aguardente de cana de açúcar na densidade mineral, espessura e resistência às fraturas ósseas em fêmures e tíbias de ratos adultos-jovens.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Campus de Araçatuba, como requisito para a obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA - Área de Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia.

ARAÇATUBA-SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Silva, Aneliza de Fatima Moraes da.

S586e Efeito do consumo excessivo da aguardente de cana de açúcar na densidade mineral, espessura e resistência às fraturas ósseas: estudo em fêmures e tíbias de ratos adultos-jovens. / Aneliza de Fatima Moraes da Silva. – Araçatuba, 2016

64 f. ; il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual

Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Ana Maria Pires Soubhia

1. Alcoolismo 2. Osso e Ossos 3. Densitometria 4.
Remodelação Óssea 5. Densidade Óssea 6. Fenômenos Biomecânicos I. Título

Black D6

CDD 617.63

Dedicatória

Dedico esta dissertação...

À Deus, que permitiu que eu pudesse realizar este trabalho e concretizá-lo. Pelas oportunidades que coloca em minha vida, sempre abençoando e iluminando o meu caminho. Por todos os momentos em que pude confiar.

“Senhor, tu me sondaste, e me conheces”.

Salmo 139:1

Aos meus pais Elizia e Francisco por todos os ensinamentos e princípios. Por toda a confiança, compreensão e apoio durante esta caminhada. Obrigada por acreditarem em mim e sempre apoiarem minhas escolhas. Meu eterno amor, gratidão e admiração.

Agradecimentos Especiais

*Agradeço a minha orientadora profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia** por conceder a oportunidade em iniciar essa trajetória que tanto me fez crescer e estimar o que faço. Muito obrigada pelos conhecimentos compartilhados, por todo apoio, incentivo, afeto e amizade.*

*À profa. Dra. **Kellen Tjioe** que foi minha segunda orientadora na Pós-graduação. Agradeço por partilhar do seu vasto conhecimento intelectual, contribuindo para o meu crescimento profissional. Por sempre me ajudar, incentivar, e servir de inspiração como profissional e pessoa, além da amizade construída.*

Agradeço vocês por impulsionarem a curiosidade da ciência e meus anseios como educadora e pesquisadora.

Agradecimentos

*À Faculdade de Odontologia de Araçatuba FOA-UNESP, pela oportunidade em iniciar o curso de Mestrado e promover o fascínio pela pesquisa. Essa instituição que atualmente é dirigida pelo prof. **Wilson Roberto Poi**, que tive a oportunidade em participar de suas aulas e construir conceitos científicos e de humanização, minha eterna admiração.*

*Ao Departamento de patologia e propedêutica clínica FOA-UNESP. Aos professores da disciplina de Estomatologia e Patologia, **Glauco Issamu Miyahara, Daniel Galera Bernabé, Cristiane Furuse, Eder Ricardo Biasoli, Marcelo Macedo Crivelini, Agnes Assao** pela dedicação, exemplo e ensinamentos. A todos os funcionários, **Adriana, Robson e Dona Cidinha** pelo carinho, paciência e experiências. Meus agradecimentos e admiração.*

*Aos meus familiares, amigos, irmã (**Melissa**) e avós (**Maria e Augusta**) que sempre estiveram presentes mesmo que longe e sempre torcendo por mim.*

Ao meu amigo Willian, que sempre esteve comigo desde a graduação em Londrina, por todos trabalhos conjuntos, apoio e amizade quando eu precisei.
À Mônica e “Caru” que também foram grandes amigas em Araçatuba.

À minha amiga Débora, que mesmo longe sempre esteve presente em vários momentos da minha vida durante esta trajetória.

À “Batiam”, Marlene e Jum que me acolheram em Araçatuba na primeira semana sem me conhecerem, por intermédio da Ingrid, que foi uma grande amiga e companheira na Pós-graduação.

À minha amiga e companheira de laboratório, Ketelin, por toda amizade, experiências compartilhadas, ajuda nos experimentos e em outros trabalhos durante este percurso.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Giseli e Sidnei, que me ensinaram e auxiliaram em vários processos do Mestrado, sempre com muita paciência e dedicação.

Ao Marcelinho por toda alegria, carinho, preocupação e disposição para os ensinamentos laboratoriais e pessoais.

*Ao **Saygo**, colega e grande amigo que a Pós-graduação me concedeu, por toda alegria compartilhada. Também, aos colegas e amigos da Pós-graduação **Guilherme (Zé Gui)** e **Mayra** por todo apoio e momentos de descontração no processo das aulas de inglês.*

*Ao prof. Dr. **Leonardo Perez Faverani**, que me auxiliou desde a elaboração do projeto de Mestrado até os procedimentos experimentais com os animais. Agradeço também à profa. Dra. **Daniela Ponzoni** que sempre foi muito gentil, nos fornecendo o seu equipamento para os experimentos.*

*À Profa. Dra. **Leda Maria Pescinini Salzedas**, que sempre esteve muito disposta a ensinar e concedendo espaço no Laboratório de Radiologia para que eu realizasse parte de minha pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. **Mário Jefferson Quirino Louzada**, por toda disposição e prontidão em ensinar e auxiliar em vários procedimentos experimentais deste trabalho, juntamente com sua equipe ("**Seu Pedro**" e **Rodrigo**) da Faculdade de Medicina Veterinária - UNESP Araçatuba (FMVA).*

*À **Cefinha** que sempre foi muito gentil e solícita, e me ajudou com parte da estatística deste trabalho.*

A todos os colegas de Pós-graduação pela convivência e por partilharem deste processo de Mestrado. A todos que auxiliaram nos experimentos e eutanásia dos animais, principalmente à “Jaque” e Fernanda Furuse. Agradeço também ao seu Arnaldo, que sempre cuidou dos meus animais quando eu não estava presente.

Aos alunos da graduação por todo conhecimento compartilhado, pela oportunidade em ensiná-los e aprendizado com cada um.

A todos os pacientes atendidos durante esse processo de Mestrado, por toda confiabilidade conferida em toda equipe, pois sem eles o conhecimento seria vago e incompleto. Minha sincera gratidão.

Ao Departamento de Cirurgia e aos funcionários Paulo e Marco pela concessão do Biotério para que eu pudesse realizar todos os experimentos animais. Assim como, aos porteiros que sempre foram muito gentis, principalmente nas idas ao Biotério aos finais de semana.

À todas as funcionárias da seção de Pós-graduação por toda ajuda e paciência sempre que solicitado.

Agradeço também a todos os professores da Universidade Estadual de Londrina (UEL) que participaram de minha formação, principalmente à profa. Edna Harue Furukita Mizuno, prof. Lauro Toyoshi Mizuno, profa.

Cecília Pereira Stabile e profa. Maria de Lourdes (Nezinha) que sempre me deram oportunidades no processo da graduação e instigaram a escolha pela carreira acadêmica.

Agradeço ainda à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa no primeiro ano de Mestrado.

A todos vocês minha infinita gratidão, pois sem vocês o processo dessa caminhada não seria possível. Meu eterno e sinceros agradecimentos.

Epígrafe

*"A dívida é o sal do espírito, sem uma pitada de
dívida, todos os conhecimentos em breve
apodreceriam".*

Alain

Moraes-da-Silva, AF. **Estudo do consumo excessivo de aguardente de cana de açúcar na densidade mineral, espessura e resistência às fraturas ósseas em fêmures e tíbias de ratos adultos-jovens** [Dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

O consumo excessivo de bebidas alcoólicas pode ocasionar problemas econômicos, sociais e psicológicos, além de ser prejudicial a muitos órgãos e tecidos, incluindo o tecido ósseo. O álcool é um fator de desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea, entre osteoblastos e osteoclastos. Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos do consumo excessivo de álcool no tecido ósseo de ratos tratados com aguardente de cana de açúcar (cachaça), através da análise de fêmures e tíbias de ratos adultos-jovens. 24 ratos foram utilizados (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), divididos em 4 grupos de 6 animais, separados aleatoriamente, sendo: – Grupo com 90 dias de tratamento, grupo controle (GC90) e grupo experimental (GE90); e grupo com 105 dias de tratamento, grupo controle (GC105) e grupo experimental (GE105). Após tratamento e eutanásia, os fêmures e tíbias foram submetidos às análises radiográficas, densitometria óssea e teste biomecânico, respectivamente, avaliados através do Sistema Digital Digora, DEXA (Dual-Energy X-ray Absorptiometry) e Ensaio mecânico. Os dados obtidos foram submetidos ao teste homocedasticidade com significância de 5% e realizada análise de variância – ANOVA- two-way e pós-teste Tukey. Os animais dos grupos controles apresentaram maior espessura óssea total e cortical, maior densidade óssea e conteúdo mineral ósseo ($p < 0,05$), assim como maior resistência a fraturas comparados com os grupos experimentais. Ainda, observou-se que além do padrão de consumo os efeitos do etilismo sobre o tecido ósseo são influenciados pelo tempo de exposição ao álcool. Conclui-se, assim, que o consumo excessivo de aguardente de cana de açúcar além de ocasionar danos ao tecido ósseo, exerce efeito dose dependente nos parâmetros estudados em ratos adultos-jovens.

Palavras chave: Alcoolismo, osso e ossos, densitometria, remodelação óssea, densidade óssea, fenômenos biomecânicos.

Moraes-da-Silva, AF. **Study of excessive consumption of Sugarcane Brandy on mineral density, thickness and resistance to bone fractures in femurs and tibias of young adult rats** [Dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016.

ABSTRACT

The excessive consumption of alcoholic beverages can cause economic, problems social and psychological, in addition to being harmful to many organs and tissues, including the bone tissue. Alcohol is a factor of an imbalance between the formation and bone resorption, between osteoblasts and osteoclasts. This study aimed to analyze the effects of excessive alcohol consumption in bone tissue of rats treated with Sugarcane brandy (Sugarcane liquor, aqua vitae), through examinations of femurs and tibias. Twenty-four animals were used (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) were divided in 4 groups of 6 animals, randomly divided into: - Group with 90 days of treatment, control group (GC90) and experimental group (GE90); and group with 105 days of treatment, control group (GC105) and experimental group (GE105). After treatment and euthanasia, the femurs and tibias radiographic analyzes were submitted, bone densitometry and biomechanical test, respectively, evaluated by Digora Digital System, DEXA (Dual-Energy X-ray Absorptiometry) and mechanical testing. The data were submitted to the homoscedasticity test with 5% significance and performed analysis of variance - ANOVA- two-way and Tukey test. Control group animals showed higher total and cortical bone thickness, higher bone density and bone mineral content ($p < 0,05$), as well as greater resistance to fractures compared to the experimental groups. Furthermore, it was observed that in addition to the consumption pattern, the effects of alcohol on bone tissue are influenced by the time of exposure to alcohol. Concluded that the excessive consumption of Sugarcane brandy besides causing damage to the bone tissue exerts dose-dependent effect on the parameters studied in young adult rats.

Keywords: Alcoholism, bone and bones, densitometry, bone remodeling, bone density, biomechanical phenomena.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	LINHA DO TEMPO – Simulação da indução alcoólica realizada nos animais.	27
Figura 2	Ilustração da mensuração da espessura total e cortical em um fêmur de rato.	29
Figura 3	Modelo de curva força-deslocamento (modificado de Turner e Burr, 1993).	32
Figura 4	Espessura óssea total e cortical dos fêmures.	37
Figura 5	Espessura óssea total e cortical das tíbias.	38
Figura 6	DMO, CMO e área total dos fêmures.	40
Figura 7	DMO, CMO e área total das tíbias.	41
Figura 8	Força máxima da cabeça do Fêmur (CF).	42
Figura 9	Flexão a três pontos do Fêmur.	43
Figura 10	Flexão a três pontos da tíbia.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos grupos experimentais.	26
Tabela 2	Esquema de indução alcoólica.	27

LISTA DE ABREVIATURAS

“ad libitum” = Livre

BPE = “Episódios de beber pesado”

CEUA = Comitê de Ética no Uso de Animais

CISA = Centro de Informações sobre Saúde e Álcool

CMO = Conteúdo Mineral Ósseo

DEXA = Densitômetro de dupla emissão de raios-X

DMO areal = Densidade Mineral Óssea Areal

DMO = Densidade Mineral Óssea

F_{max} = Força máxima

MJ = Megajoule

GC = Grupo controle

GE = Grupo Experimental

GC90 = Grupo controle de 90 dias de tratamento

GE90 = Grupo experimental de 90 dias de tratamento

GC105 = Grupo controle de 105 dias de tratamento

GE105 = Grupo experimental de 105 dias de tratamento

Média±EPM = Erro padrão da média

ml/kg = Mililitro por quilograma

mm = Milímetro

OMS = Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Proposição	23
3. Materiais e Métodos	25
4. Resultados	35
5. Discussão	45
6. Conclusão	52
7. Bibliografia	54
Anexo A – Certificado do comitê de Ética no Uso de Animais.	61
Anexo B – Link com as normas da Revista que será submetido o artigo deste trabalho.	62
Anexo C – Ilustração das análises realizadas.	64

1. INTRODUÇÃO

O alcoolismo é uma doença caracterizada por dependência física, tolerância e perda de controle, que se desenvolve após anos de uso da substância alcoólica (1,2). A Organização Mundial da Saúde define dois tipos mais comuns de consumos alcoólicos pela população, o consumo nocivo e o de episódios de consumo excessivo (BPE). Consumo nocivo é aquele capaz de gerar algum problema social e de saúde ao indivíduo ou, indiretamente, a terceiros. E o BPE, também conhecido como “episódios de beber pesado” (*heavy episodic drinking*) é definido como a ingestão de 60g ou mais de álcool (cerca de 5-6 doses) em uma única ocasião nos últimos 30 dias. Estes padrões de consumo de álcool excessivo expõem o indivíduo a um maior risco de danos sociais, de saúde, acadêmicos, violência, entre outros (3,4).

Os efeitos do álcool sobre o esqueleto adulto são influenciados pela idade, frequência e padrão de consumo (5). A dose alcoólica padrão é uma unidade de medida que define a quantidade de etanol puro contido nas bebidas alcoólicas. A OMS estabelece uma dose padrão entre 10 e 12g de álcool puro, equivalente a uma lata de cerveja ou chope (330ml), uma taça de vinho (100ml) ou destilado (30ml) (3,4).

O Brasil apresenta, entre os países das Américas, o maior índice de mortes relacionadas ao consumo de álcool por adolescentes com idade entre 15 e 19 anos. Em 2010, cerca de 14 mil mortes de jovens com menos de 19 anos foram atribuídas ao álcool (3). No geral, o álcool é responsável por aproximadamente 3,3 milhões de mortes por ano sendo responsável por 5,9% de todas as mortes em todo o mundo (3,4).

O consumo de álcool é um dos cinco principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças (4). Seu consumo exacerbado ocasiona diversos efeitos prejudiciais sistêmicos, sendo os mais estudados os impactos no fígado, rins, pâncreas, coração e sistema nervoso central. Alterações patológicas nestes órgãos podem elevar o índice de mortalidade (4,6,7).

Os efeitos do álcool no tecido ósseo ainda têm sido muito pouco explorados. Dos estudos clínicos disponíveis, a maioria tem se concentrado em pacientes idosos, ainda que tenha sido observado um aumento do índice de alcoolismo em indivíduos jovens. De maneira geral, estes estudos têm demonstrado que o etilismo está associado com a diminuição da densidade óssea mineral e conteúdo mineral ósseo na região lombar, femoral, tíbia, extremidade distal do radio, diminuição na espessura das corticais, trabéculas ósseas e paredes ósseas. (8,9,10,11). Estas alterações estruturais podem ocasionar osteopenia, aumentando o risco para osteoporose e consequentemente ocasionar fraturas ósseas (6,12,13).

Também são escassos estudos experimentais em animais buscando desvendar os mecanismos das alterações ósseas ocasionadas pelo alcoolismo observadas nos estudos clínicos. Até o presente momento a maioria dos estudos dedicaram-se a investigar os efeitos do alcoolismo no reparo de defeitos ósseos realizados (14,15,16), de tecidos submetidos ao esforço físico (18,19,20,21) ou marcadores ósseos e moduladores hormonais que influenciam na resposta ao tecido ósseo (22,23,24,25,26). No entanto, pouco se sabe sobre as repercussões do álcool diretamente na estrutura e função do tecido ósseo íntegro.

Até o momento tem sido observado que a indução alcoólica em ratos em longo prazo pode promover um desequilíbrio no tecido ósseo sadio, causando uma redução na formação óssea e um excesso de reabsorção (5,27,28,29,30,31,32,33,34). O consumo crônico pode causar uma diminuição do conteúdo mineral ósseo (CMO), da densidade mineral óssea (DMO), assim como diminuição do osso trabecular e cortical, conseqüentemente aumentando o fator de risco de fraturas, osteopenia e aumento de risco de osteoporose (31,33,35,36).

Os estudos com modelos animais têm potencial para promover a compreensão das ações específicas do álcool sobre a remodelação óssea (5). Apenas 10 estudos avaliam isoladamente o efeito do álcool sobre a densidade óssea, espessura e resistência óssea às fraturas em ratos. Estes estudos observaram que, o consumo alcoólico pode gerar redução da densidade mineral óssea, menor volume esponjoso em fêmures, tíbias e vértebras lombares, assim como, promover uma redução estrutural dos ossos longos, diminuição da área óssea, espessura cortical e trabecular, bem como, interferir na resistência mecânica (27,28,29,30,31,32,33,34,35,36). Tais resultados corroboraram para a hipótese de que o álcool é um fator de risco para a osteoporose (28,37,38).

Embora estes estudos tenham apresentado resultados interessantes, a maioria se concentra em animais adultos e todos tiveram indução alcoólica com álcool absoluto diluído em água, o que não reflete o real hábito de um indivíduo alcoólatra, pois não é destinado ao consumo humano. O nosso grupo desenvolveu uma metodologia que busca simular o hábito de etilismo por meio da indução alcoólica com aguardente de cana de açúcar que é a bebida destilada

mais consumida no Brasil e a terceira mais consumida no mundo. O modelo experimental do alcoolismo crônico usado neste estudo foi fundamentado em estudos realizados por nosso grupo que mostram um modelo experimental efetivo de alcoolismo, como realizou Silva (2007). Ainda, diferentemente do álcool etílico, a aguardente de cana de açúcar passa por um processamento de extração do caldo, embebição, controle de acidez, temperatura, de nutrientes necessários para controle da fermentação alcoólica, entre outros (37).

Do exposto acima, pode-se observar que há uma escassez evidente de estudos investigando o impacto do alcoolismo no tecido ósseo de animais adultos-jovens. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi: avaliar os efeitos do consumo excessivo da cachaça sobre as propriedades biofísicas ósseas de ratos adultos-jovens.

2. PROPOSIÇÃO

A partir da análise de fêmures e tíbias de ratos adultos-jovens alcoolistas propôs-se:

- I. Medir a espessura óssea cortical e total.
- II. Avaliar as propriedades biofísicas (conteúdo mineral ósseo e densidade mineral óssea).
- III. Verificar a resistência óssea às fraturas.
- IV. Avaliar a influência do tempo entre os grupos que tiveram tratamento com aguardente de cana de açúcar.

Material e Método

3. MATERIAL E MÉTODO

1- *Animais e tratamento*

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com o protocolo (FOA - 618/2015 – ANEXO 1).

Para o presente trabalho foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*) da linhagem Wistar, com 40 dias de idade, provenientes do Biotério da Universidade Estadual Paulista de Araçatuba – UNESP, com peso médio de 150 gramas, sem quaisquer doenças. Estes animais eram alojados em 3 por gaiola e mantidos sob ambiente controlado (temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz 12h/12h com início às 08:00h). Todos os animais tiveram sua alimentação e bebidas controladas a cada três dias para que não houvesse muita divergência entre os animais.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos ($n= 6$ por grupo) sendo dois grupos controle e dois grupos experimentais. A distribuição foi realizada de acordo com a tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.

GRUPOS	ANIMAIS	ALIMENTAÇÃO	TEMPO DE TRATAMENTO
GC90	Controle	Ração + água “ad libitum”	90 dias de tratamento
GE90	Experimental	Ração + aguardente	90 dias de tratamento
GC105	Controle	Ração + água “ad libitum”	105 dias de tratamento
GE105	Experimental	Ração + aguardente	105 dias de tratamento

Todos os animais receberam ração e água à vontade. Nos grupos experimentais, a aguardente de cana também foi administrada à vontade.

A indução alcoólica foi realizada nos grupos experimentais com distribuição gradativa de aguardente de cana de açúcar (Pirassununga 51 - 39° GL) diluída em água. Conforme indicado na tabela 2 e figura 1 abaixo.

Tabela 2 – ESQUEMA DE INDUÇÃO ALCOÓLICA.

TEMPO DE INDUÇÃO ALCOÓLICA (DIAS)	CONCENTRAÇÃO DE AGUARDENTE DURANTE O DIA
1° ao 10°	30% do volume
11° ao 20°	60% do volume
21° ao 60°	100% = 16h/dia, Água pura = 8h/dia
60° ao 90° ou 105	3 DIAS 100% = 24h/dia
	4 DIAS 100% = 16h/dia, Água pura = 8h/dia

H: horas - H/dia: horas por dia

As porcentagens de 30% e 60% da aguardente diluída em água, simulam um período de adaptação dos animais até ser administrado as soluções alcoólicas em sua totalidade de 100%.

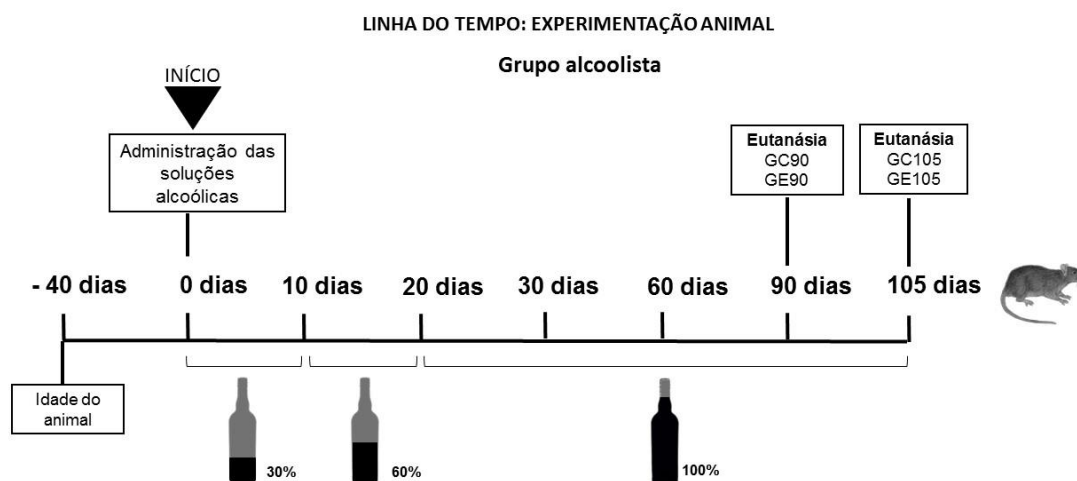


Figura 1 – ESQUEMA DE LINHA DO TEMPO SIMULANDO INDUÇÃO ALCOÓLICA REALIZADA NOS ANIMAIS.

2- Eutanásia

Os animais foram submetidos a eutanásia nos períodos estabelecidos de 90 dias de tratamento com aguardente de cana de açúcar e o segundo grupo com 105 dias, com dose excessiva de anestésico por meio da administração intraperitoneal, com cloridrato de quetamina (Cetamin 10% – Syntetic do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado ao cloridrato de xilazina (Xilazin 2% – Syntetic do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), nas concentrações de 75 mg/kg peso corpóreo e 10 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente, utilizando 3 vezes esta dosagem para eutanásia. Os fêmures e tíbias direitas dos animais foram desarticulados, dissecados e armazenados em tubos criogênicos contendo solução fisiológica (NaCl 0,9%) e conservados à -20°C até o momento das análises.

3- Análise radiográfica

Os fêmures e tíbias do lado direito foram submetidos à tomada radiográfica utilizando a placa óptica fósforo-ativada do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland) e o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 70 Kvp, 10 mA, 12 pulsos. A distância foco-filme foi de 30 cm, com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do filme-objeto. Sobre cada placa óptica, durante a tomada radiográfica, foram colocados os fêmures e tíbias, o penetrômetro de alumínio (liga 6063, ABNT) de 9 graus, e o número de identificação. As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em scanner a laser do equipamento Digora, e as imagens foram manipuladas no software Digora for Windows 1.51.

Na análise foram selecionadas áreas de leituras padronizadas no, terço médio dos fêmures e tíbias. A área selecionada dos fêmures e tíbias foi a área após o início da cortical óssea inferior, área com maior padronização de espessura. Foram realizadas três repetições de medidas para obtenção da média da espessura total do fêmur e tíbia. Em seguida foram medidas as corticais ósseas superiores e inferiores de cada fêmur e tíbia para obtenção da média da espessura das corticais ósseas de cada animal. Ainda, foi realizada a mensuração da espessura da cabeça do fêmur, região de colo, abaixo da cabeça do fêmur.

3.1 *Espessura de cortical absoluta*

Para a análise da espessura cortical óssea foi utilizada o terço médio dos fêmures e tíbias como base para a obtenção das medidas de espessura das corticais ósseas mesial e distal, e a seguir obtida a média aritmética simples de espessura. Os valores relativos foram obtidos pela representação percentual da soma das corticais em relação à espessura óssea total (Figura 2).

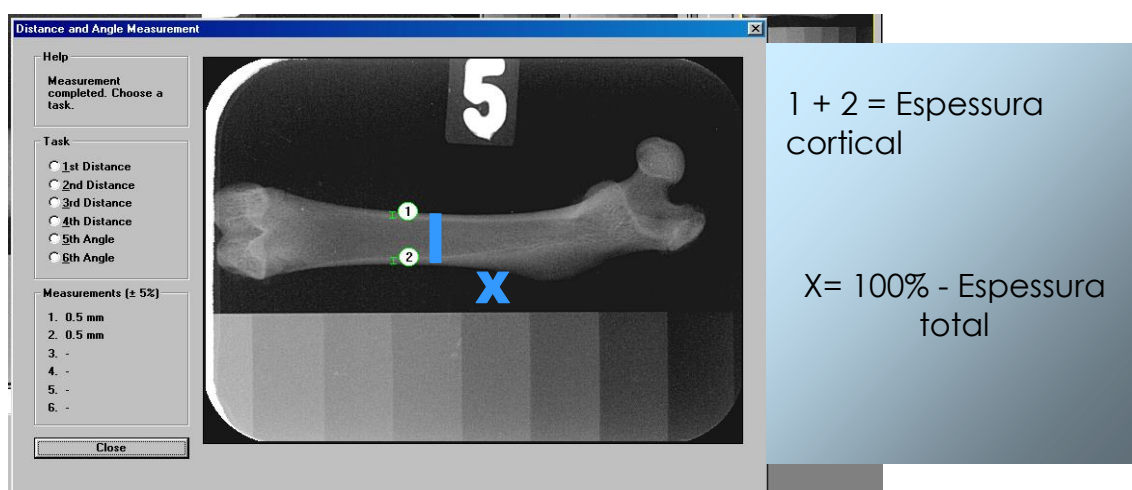


Figura 2- ILUSTRAÇÃO DA MENSURAÇÃO DA ESPESSURA TOTAL E CORTICAL EM UM FÊMUR DE RATO.

4- *Análise dos parâmetros Biofísicos*

Aproximadamente doze horas antes do início dos processos de preparação para realização dos ensaios biofísicos, os fêmures e tíbias foram retirados da temperatura de -20°C e mantidos em geladeira e, duas horas antes do experimento, foram mantidos em temperatura ambiente.

4.1 *Densitometria óssea*

As peças foram submetidas à análise densitométrica em um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DEXA), (BIERING-SORENSEN et. al., 1988; DEMIREL et. al., 1998), modelo DPX-Alpha, Lunar® (Madison – USA). Foi utilizado o programa computacional com software especial para exames em pequenos animais, pertencente ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP (Anexo 3 – figura 1 e 2).

As aquisições de imagem foram realizadas com os fêmures e tíbias em 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 µA; 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 é calibrado diariamente com um fantoma fornecido pelo próprio fabricante (Anexo 3 – figura 3).

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 mineral ósseo (CMO) - (g), área (cm²) e densidade mineral ósseo areal (DMO) - (g/cm²) (Anexo 3 – figura 4).

5- Ensaio Mecânico

Após a realização do DEXA, os fêmures e tíbias foram submetidos a um ensaio mecânico (flexão a três pontos e compressão axial), sendo a flexão a três pontos realizados no fêmur e tíbia e a compressão axial apenas no fêmur. Utilizou-se a máquina universal de ensaio, modelo EMIC® - DL 3000 (São José dos Pinhais – Brasil), pertencente ao Departamento de Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

5.1 Flexão a três pontos

Os fêmures e tíbias foram apoiados em dois suportes (dois pontos), sendo a distância de vão de apoio de $\frac{3}{4}$ do comprimento do osso. A força foi aplicada no osso em um terceiro ponto, no meio geométrico entre os dois apoios (terço médio do osso). O ensaio é destrutivo e registra a força máxima admitida (Anexo 3 – figura 5 e 6).

5.2 Compressão axial

Para análise da Força máxima (Fmax) e rigidez na região de colo femoral, os fêmures foram fixados individualmente em um aparato que mantinha os mesmos em posição perpendicular, utilizando a distância de vão de apoio que foi de 20 mm e a célula de carga utilizada de 2000 N com carga aplicada à velocidade de 5 mm/min até o momento de fratura do osso, determinando assim a força de quebra pelo osso e determinação posterior da rigidez óssea. Estas

variáveis expressam a resistência óssea no colo do fêmur e no terço médio do fêmur.

A carga foi aplicada na região da cabeça do fêmur cuja linha de ação do vetor força é paralela ao eixo longo do fêmur, causando uma flexão e um momento fletor na região da cabeça e colo femoral (Anexo 3 – figura 7 e 8).

A força aplicada e o deslocamento do travessão da máquina foram monitorados e registrados através de um software próprio do equipamento. A partir destes dados foram obtidas as curvas força-deformação para os diversos ensaios e determinados os parâmetros biofísicos.

Para o cálculo da rigidez determina-se a parte da curva de Força Máxima (N) x Deformação (mm) relativa à fase elástica do corpo (parte reta da curva). A inclinação da curva é dada pela constante, que expressa a rigidez do osso (inclinação da curva na fase elástica) (Figura 3).

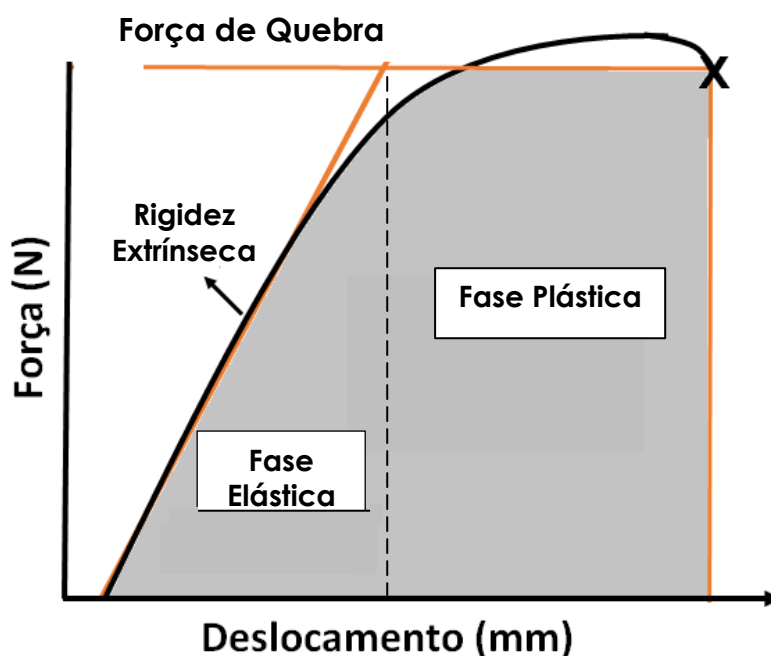


Figura 3 - MODELO DE CURVA FORÇA-DESLOCAMENTO (MODIFICADO DE TURNER E BURR, 1993).

Onde de acordo com Turner e Burr (1993):

- Força de Quebra (N): Evidencia a maior força aplicada durante o ensaio, seguido da fratura do osso.
- Rigidez (N/mm): Determinada através da inclinação da reta ajustada aos pontos da curva força-deformação na fase elástica.
- Energia de Fratura (MJ): Capacidade de absorção de energia até a fratura.

6. Análise estatística

Todos os parâmetros quantitativos foram submetidos inicialmente ao teste estatístico de homocedasticidade, para a posterior eleição de um teste mais adequado (paramétrico ou não paramétrico). Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5%, no programa estatístico para pesquisa biológica, Graph Pad Prism (versão 7.0).

Foi realizada análise de variância – ANOVA- two-way e teste de Tukey, para determinar diferença estatística entre os 4 grupos de 90 dias e 105 dias de tratamento. Para valores de $p < 0,05$, a diferença entre os grupos foi considerada significativa. Os resultados obtidos estão apresentados como média e erro padrão da média.

Resultados

RESULTADOS

Para melhor compreensão do leitor os resultados estão divididos de acordo com a técnica realizada e com o osso analisado.

1. Análise Radiográfica

1.1 *Espessura Óssea Cortical e Total*

1.1.1 Fêmur

Durante o período de tratamento com aguardente a espessura óssea cortical do fêmur apresentou interação extremamente significativa ($F= 46.36$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p< 0.0001$), onde, o grupo controle de 90 dias de tratamento (GC90), comparado com o grupo controle GC105 e com o grupo alcoolista GE105 apresentou diferença estatisticamente significativa $p=<0,0001$. Porém, comparando GC90 com GE90 não houve diferença estatisticamente significativa. Já o grupo experimental de 90 dias, os animais tratados com aguardente (GE90), comparado com os grupos de 105 dias de tratamento GC105 e GE105 também apresentaram diferença estatisticamente significativa na espessura óssea cortical do fêmur $p=<0,0001$. Confrontando os grupos de 105 dias de tratamento, GC105 e GE105 houve diferença estatisticamente significativa $p=<0,0001$, evidenciando que o tratamento ($F=46.69$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p< 0.0001$) e o tempo de tratamento ($F=271.06$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p< 0.0001$) influenciam na resposta do tecido ósseo em relação a espessura das corticais (figura 4).

A espessura óssea total não apresentou diferença estatística entre os grupos tratado e controle nos diferentes períodos experimentais, 90 e 105 dias,

porém, a interação se apresentou estatisticamente significativa ($F=4.36$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0498$) (figura 4).

Figura 4 – ESPESSURA ÓSSEA TOTAL E CORTICAL DOS FÊMURES

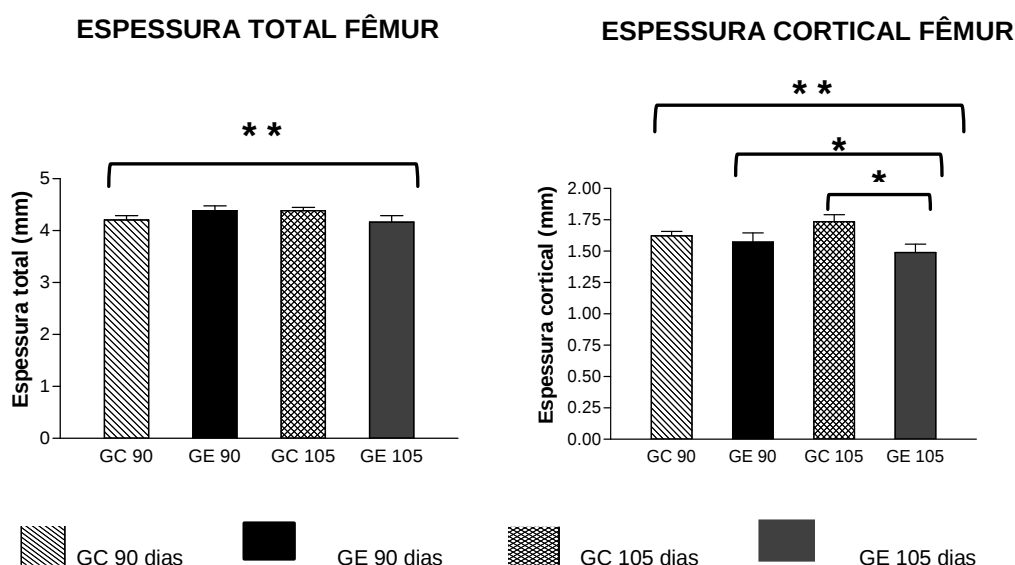


Figura 4. Análise Radiográfica – Espessura Óssea Total e Espessura Óssea Cortical (Fêmures). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, ($n= 6$ por grupo). Significância estatística adotada $p<0.05$. Símbolos: *= $p<0.05$; GC105xGE105, GE90xGE105 (Espessura cortical). Símbolos: = ** Interação estatística (Espessura total e cortical).

1.1.1.1 Tíbia

Nos períodos de 90 dias e 105 dias de tratamento com aguardente de cana de açúcar, confrontando todos os dados, a espessura óssea cortical e total das tíbias não apresentaram alterações expressivas, confirmado pelo teste estatístico que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Porém, o fator tratamento da espessura total foi considerado muito significativo ($F = 9.96$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p= 0.0050$), (figura 5).

Figura 5 – ESPESSURA ÓSSEA TOTAL E CORTICAL DAS TÍBIAS

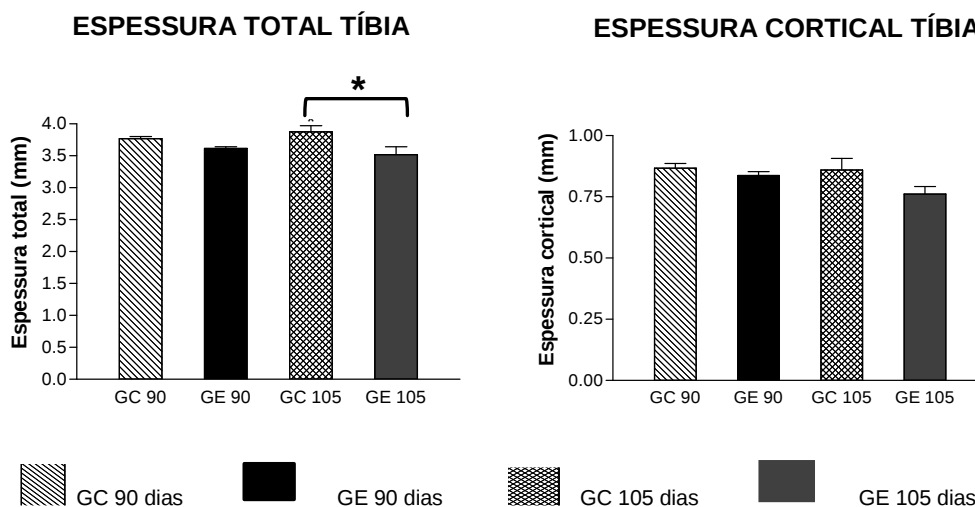


Figura 5. Análise Radiográfica – Espessura Óssea Total e Espessura Óssea Cortical (Tíbias). Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6 por grupo). Significância estatística adotada $p<0.05$. Símbolos: * = Tratamento estatisticamente significativo GC105xGE105.

2. Parâmetros Biofísicos

2.1 Densidade Mineral Óssea Areal

2.1.1 Fêmur

Ao analisarmos os parâmetros de desenvolvimento corporal no período de tratamento com aguardente de cana de açúcar, observamos que a DMO do fêmur apresentou interação estatisticamente significativa ($F=6.98$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0156$), assim como, o CMO ($F=4.45$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0478$), onde, ao analisarmos os dados de DMO e CMO o grupo controle de 90 dias de tratamento (GC90), quando comparado com os grupos experimentais GE90 e GE105, não houve diferença estatisticamente significativa, já comparado ao grupo controle de maior tempo GC105, a DMO ($p=0,0001$) e CMO ($p=0,0010$) do fêmur apresentaram diferença estatisticamente significativa. Confrontando o grupo experimental de 90 dias de tratamento (GE90), com o controle GC105, houve diferença estatisticamente significativa da DMO ($p=<0,0001$) e CMO

($p=0,0002$), já com o experimental de maior tempo GE105 não houve diferença estatisticamente significativa. Quando comparados os animais do mesmo grupo, GC105 e GE105, a densidade ($p=0,0092$) e conteúdo mineral ósseo ($p=0,0071$) apresentaram diferença estatisticamente significativa (figura 6).

Ao analisarmos as variáveis isoladamente constatamos também que, tanto o tratamento com álcool quanto o tempo de indução do mesmo influenciam na resposta dos parâmetros de desenvolvimento corporal do tecido ósseo. Os efeitos do etilismo sobre a DMO resultaram em uma interação estatisticamente significativa do tratamento ($F=5.91$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0246$) e uma interação extremamente significativa do tempo ($F=28.78$. $DFn=1$ $DFd=20$, $P=< 0.0001$), assim como os efeitos do tratamento sobre o CMO se apresentaram estatisticamente muito significativo ($F=9.78$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0053$), e este padrão de consumo ao longo do tempo extremamente significativo ($F=18.86$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p= 0.0003$), (figura 6).

Neste mesmo período de tratamento com aguardente, aos 90 e 105 dias, a área óssea do fêmur destes animais não apresentou alterações estatisticamente significativa do efeito do alcoolismo. Assim como, os confrontos dos dados de ambos os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 6).

Figura 6 – DMO, CMO E ÁREA TOTAL DOS FÊMURES

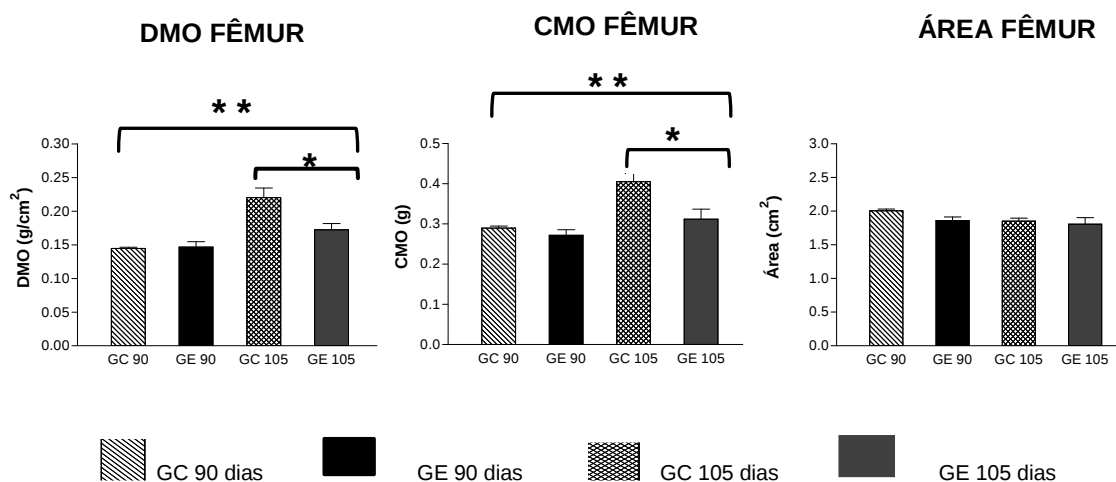


Figura 6. Densitometria Óssea – Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²), Conteúdo Mineral Ósseo (g) e Área Total (cm²) dos fêmures. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6 por grupo). Significância estatística adotada p<0.05. Símbolos: * = p<0.05; GC105xGE105 (DMO), GC105xGE105 (CMO); * * = Interação estatística (DMO e CMO).

2.1.1.1 Tíbia

Ao avaliarmos as influências do etilismo sobre o desenvolvimento corporal, foi possível observar que a DMO e CMO das tíbias não apresenta interação estatisticamente significativa ($F=2.24$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.1497$). Entretanto, ao analisarmos as variáveis isoladamente, tanto o tempo na DMO ($F=26.17$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p<0.0001$) e CMO ($F=9.31$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0063$), quanto o tratamento na DMO ($F=7.02$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0154$) e CMO ($F=7.20$. $DFn=1$ $DFd=20$, $p=0.0143$) alteram o desenvolvimento corporal. Ao analisarmos os dados de DMO o grupo controle de 90 dias de tratamento (GC90), quando comparado com os grupos experimentais GE90 e GE105, não houve diferença estatisticamente significativa, já comparado ao grupo controle de maior tempo GC105, a DMO das tíbias apresentou diferença estatisticamente significativa $p=0,0008$. Confrontando o grupo experimental de 90 dias de tratamento (GE90),

com o controle GC105, houve diferença estatisticamente significativa da DMO $p=0,0001$, já com o experimental de maior tempo GE105 não houve diferença estatisticamente significativa. Quando comparados os animais do mesmo grupo, GC105 e GE105, a densidade apresentou diferença estatisticamente significativa $p=0,0379$, (figura 7).

Neste mesmo período de indução alcoólica, não houve alterações estruturais nas tíbias expressas estatisticamente significativas. No entanto, apenas as comparações entre o grupo GE90 e GC105 apresentaram estatisticamente significativas $p=0,0032$. (Figura 7).

Figura 7 – DMO, CMO E ÁREA TOTAL DAS TÍBIAS

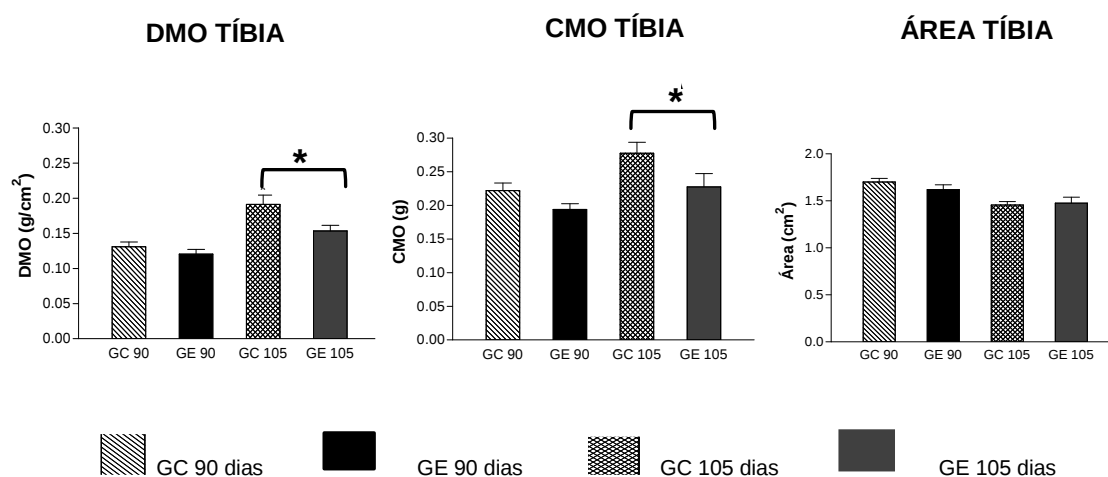


Figura 7. Densitometria Óssea – Densidade Mineral Óssea Areal (g/cm²), Conteúdo Mineral Ósseo (g) e Área Total (cm²) das tíbias. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6 por grupo). Significância estatística adotada $p<0.05$. Símbolos: *= $p<0.05$; GC105XGE105 (DMO); GC105XGE105 (CMO).

3.1 Compressão Axial – Cabeça do Fêmur (CF)

Durante o período de 90 e 105 dias de tratamento com aguardente, no teste de compressão axial da cabeça do fêmur, ao analisarmos força máxima, rigidez

e resiliência confrontando todos os dados, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa. Neste mesmo tempo de tratamento não houve interação considerada significativa, assim como o tempo e tratamento não influenciaram na resposta do desempenho mecânico dos ossos analisados. (Figura 8).

Figura 8 – FORÇA MÁXIMA DA CABEÇA DO FÊMUR (CF)

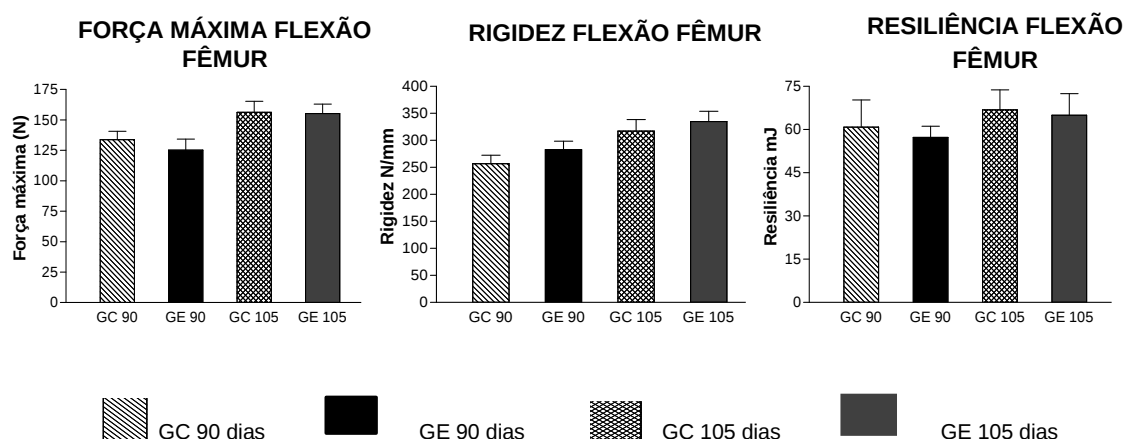


Figura 8. Bimecânica – Cabeça do Fêmur – Força máxima, Rigidez e Resiliência) dos fêmures. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$.

3.2 Flexão a Três Pontos - Fêmur

Nos períodos de 90 e 105 dias de tratamento com aguardente, ao analisarmos os parâmetros biofísicos do fêmur pelo teste flexão a três pontos, avaliando a Força de quebra, rigidez e resiliência observamos que não houve diferença estatisticamente significativa. Durante este mesmo período de tratamento não houve interação considerada significativa, e o tratamento parece não influenciar na resposta do desempenho mecânico do fêmur, entretanto, o tempo de tratamento é considerado estatisticamente muito significativo ($F=10,60$. $DFn=1$ $DFd = 20$, $p=0,0040$) na função mecânica óssea (Figura 9).

Figura 9 – FLEXÃO A TRÊS PONTOS DO FÊMUR

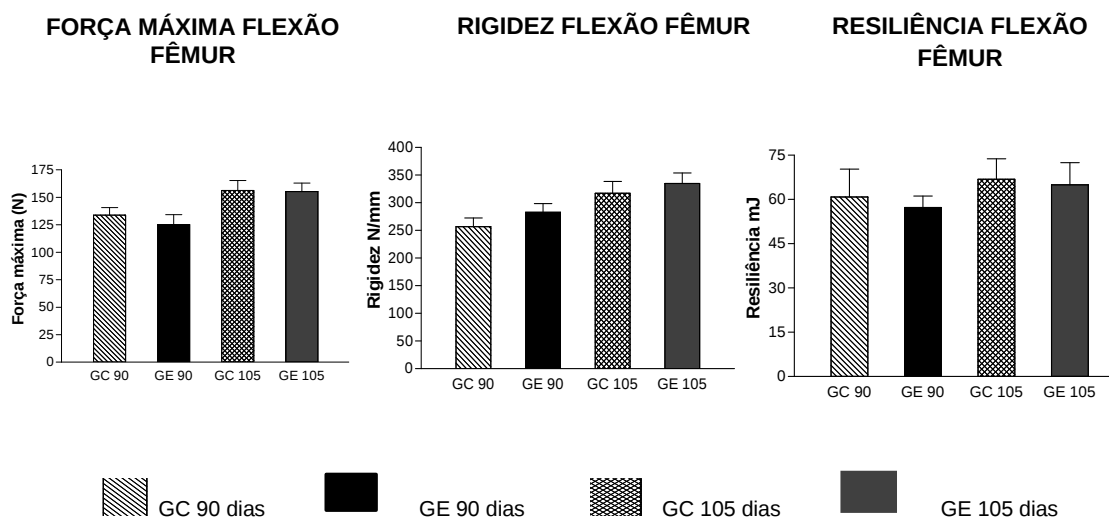


Figura 9. Bimecânica – Flexão a Três Pontos – (Força máxima, Rigidez e Resiliência) dos fêmures. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: * = $p < 0.05$.

3.3 Flexão a Três Pontos – Tíbia

Durante o período de 90 e 105 dias de tratamento com aguardente, no teste biomecânico da tíbia, ao analisarmos a força máxima, rigidez e resiliência confrontando todos os dados, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa. Neste mesmo período de tratamento não houve interação considera significativa, assim como o tempo e tratamento não influenciaram na resposta do desempenho mecânico dos ossos analisados (Figura 10).

Figura 10 – FLEXÃO A TRÊS PONTOS DA TÍBIA

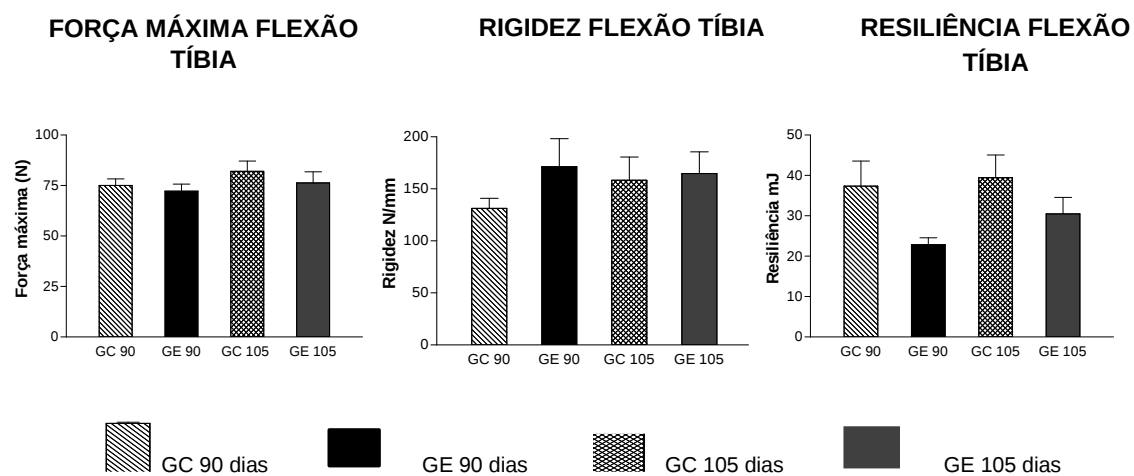


Figura 19. Bimecânica – Flexão a Três Pontos – Força máxima, Rigidez e Resiliência) das tíbias. Análises Estatísticas: Os dados são expressos em Média±EPM. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste two-way ANOVA com correção de Tukey, (n= 6 por grupo). Significância estatística adotada $p < 0.05$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O consumo excessivo crônico de álcool constitui-se em um comportamento e estilo de vida conhecido pelos efeitos prejudiciais sobre a saúde do indivíduo, afetando diversos órgãos. Embora o seu impacto negativo também tenha sido constatado no tecido ósseo, pouco se sabe sobre os reais efeitos do etanol na fisiologia óssea (20,28).

O modelo experimental da indução ao alcoolismo crônico utilizado no presente trabalho foi fundamentado em estudos já realizados por nossa equipe. Estas investigações demonstraram que o período de 60 dias de exposição ao álcool mimetiza, no rato, o comportamento de um humano etilista crônico (38). Além disso, este modelo transposto por nós também foi efetivo para verificar as possíveis alterações ósseas estruturais sem os revezes da senilidade nos animais nem dos danos por excesso de dosagem e indução a morte. Tais fatores secundários poderiam dificultar a interpretação dos nossos resultados.

Alguns outros modelos experimentais têm sido propostos com o intuito de investigar os efeitos do alcoolismo sobre o tecido ósseo (27,28,30,31,35,36,39). Diferentemente desses modelos experimentais realizados com álcool etílico absoluto, realizamos a indução alcoólica com aguardente de cana de açúcar, que é uma bebida consumível e submetida aos processamentos de fabricação. A administração da aguardente foi realizada através da diluição da bebida em água em doses gradativas até o período de adaptação dos animais, pois é um método mais prático, menos traumático e isentos dos efeitos do estresse, como mostrou Coleman (2008) em um modelo experimental distinto, porém, administrado em água de camundongos.

O presente estudo empregou um período experimental superior a 60 dias a fim de evidenciar os efeitos mais tardios do alcoolismo crônico no tecido ósseo de animais adultos jovens tratados com aguardente de cana de açúcar. Foram avaliadas as propriedades biofísicas e biomecânicas de fêmures e tíbias destes animais.

Na análise radiográfica dos fêmures e tíbias, foi possível observar que o consumo crônico de álcool influencia de maneira tempo-dependente a resposta do tecido ósseo. Enquanto não observamos alterações expressivas na espessura cortical dos fêmures no grupo com menor tempo de tratamento (90 dias), no grupo de 105 dias, a espessura da cortical óssea foi estatisticamente significante menor nos animais tratados com aguardente. Embora o osso cortical e trabecular sejam importantes para a composição corporal óssea e resistências às fraturas, o osso cortical é responsável por 80% da massa esquelética e 70% da perda óssea apendicular é cortical (41). A formação óssea desequilibrada aumenta a porosidade óssea cortical e a fragilidade do osso, fatores estes importantes que influenciam na resistência mecânica (41,42). Estudos recentes com imagens de alta resolução têm mostrado que há associação entre porosidade cortical e fratura em ossos longos (41,43), o que poderia refletir os nossos resultados observados nos fêmures.

Tendo em vista que ocorre um aumento da espessura óssea com a idade, ao observarmos os fêmures aos 90 e 105 dias de tratamento com aguardente nota-se que as espessuras corticais ósseas são semelhantes, sugerindo que o álcool inibe o pico de massa óssea, impedindo o ganho ósseo nos animais tratados. Já em tíbia, ao analisarmos a espessura do osso cortical, não foram observadas diferenças estruturais estatisticamente significantes entre os grupos

experimentais e controles. Entretanto, a espessura total óssea do GE105 apresentou-se menor do que a do GC105. Apesar do osso cortical geralmente apresentar maior perda óssea que o osso esponjoso, o processo fisiológico de remodelação óssea pode ser influenciado por mudanças associadas e prejudicada por uma variedade de fatores, como idade óssea, fatores hormonais e físicos. Além do mais, os resultados diferentes observados nos fêmures e nas tíbias sugerem que ossos distintos apresentam comportamento fisiológico e respostas distintas (41,42,44).

Parâmetros biofísicos, como densidade óssea são importantes para avaliação da integridade óssea (45). Nossos resultados demonstraram que as mudanças biofísicas referentes a massa óssea que ocorreram durante o tratamento se mostraram sensíveis às análises biofísicas de densitometria. Observamos nos fêmures e tíbias que a DMO areal foi menor no GE105 comparado com GC105, já nos grupos de 90 dias de tratamento, tanto tíbia quanto fêmur não apresentaram alterações significativas. Estes dados sugerem que o padrão de consumo alcoólico influencia na resposta biológica do tecido ósseo e que estas alterações no desenvolvimento corporal são tempo-dependentes. A análise da DMO areal do fêmur ainda demonstrou que há interação significativa entre os grupos, ou seja, um fator é dependente de outro nesse parâmetro e osso analisado.

As propriedades extrínsecas do tecido ósseo também foram avaliadas através do CMO, que exibiu resultados interessantes em fêmures e tíbias. No fêmur, os grupos controles GC90 e GC105 apresentaram diferença estatisticamente significativa no CMO. Esta diferença constatada pode ser devido a diferença na idade dos animais ou interferência nas fases de formação óssea

(42). O CMO também foi menor no GC105 comparado ao GE105 ($p<0,05$), evidenciando que além do padrão de consumo, as alterações ósseas são tempo-dependentes.

Nas tíbias, o CMO foi menor no GE90 em relação ao GC105 ($p<0,05$). Este achado sugere que tempo e tratamento foram extremamente importantes, visto que o CMO nos animais alcoolistas jovens foi menor em relação aos animais mais velhos do grupo controle. Corroborando para o fato que em pouco tempo de tratamento o consumo alcoólico já é determinante para um efeito nocivo ao osso jovem comparado ao osso mais velho sadio. Observamos ainda que a resposta em relação a área total das tíbias também é tempo-dependente, considerando que os grupos controles GC90 e GC105 apresentaram diferenças entre si, que sugere ser devido a diferença na idade dos animais ou interferência no processo de formação óssea (42). Os fêmures não apresentaram diferenças expressivas em relação a área total, porém, comparando os grupos experimentais com os controles observou-se que não houve ganho na área, devido ao efeito deletério causado pelo álcool. Sendo assim, constatamos que o tempo de desenvolvimento do etilismo parece influir na aquisição de CMO que foi corroborado por outros estudos que observaram menor massa óssea em ratos induzidos ao alcoolismo crônico (5,31,34,46)

Em contrapartida, Horvath (2011), ao investigar os efeitos do alcoolismo sobre o tecido ósseo de ratos, promoveu um estudo de desintoxicação alcoólica nestes animais, realizando a desadaptação gradativa do álcool etílico no período de 13 semanas e observou que os animais desintoxicados apresentaram maiores níveis plasmáticos de cálcio total e maior resistência às fraturas comparados ao grupo alcoolista.

Apesar dos testes biomecânicos não indicarem fragilidade óssea, quando se observa todos os parâmetros analisados, uma vez que a espessura óssea diminui, tendo ocorrido uma diminuição do osso cortical, além do fator de risco aumentado para osteopenia e osteoporose, esses ossos conferem uma resistência óssea diminuída, o que pode aumentar o risco de fraturas, principalmente em locais de maior suporte ósseo, como os ossos longos, tíbias e fêmures (21,45,47). Sendo assim, o teste de flexão a 3 pontos e compressão axial são os mais utilizados para avaliar as propriedades biomecânicas dos ossos longos (48).

No comportamento biomecânico dos fêmures e tíbias não foi possível constatar alterações estatisticamente significantes nos parâmetros analisados para avaliar a resistência óssea (Fmax, rigidez e resiliência) dos GC e GE nos tempos de 90 e 105 dias de tratamento. Apesar de não existir alterações estatisticamente significantes entre os grupos, em todos os testes realizados, pudemos constatar que os valores da Fmax e resiliência dos fêmures e tíbias foram maiores nos grupos controles (Figuras 8, 9 e 10). Quando Fmax e resiliência estão aumentadas indicam resistência mecânica (48,49,50). Já a rigidez apresentou-se maior em todos os grupos experimentais, esta que, representa a parte inorgânica do osso, que quanto mais rígido, menos energia absorve e mais susceptível se torna às fraturas ósseas (48). Embora as análises estatísticas não tenham sido determinantes para confirmar o que constatamos com os valores da média e interpretação dos gráficos, a Fmax do fêmur mostrou-se ser tempo-dependente estatisticamente significativa. Sendo assim, sugere-se que a variável tempo não foi suficiente para diminuir a resistência óssea em fêmures, porém influencia na resposta. Uma vez que os

ossos de ratos jovens são pouco mineralizados, absorvem mais energia, mantendo a ductilidade e resultando em maior resistência às fraturas (50,51).

Vale ressaltar que a resposta do excesso de cachaça no tecido ósseo ocasiona uma dificuldade em manter o mecanismo de formação e reabsorção óssea e, conseqüentemente, gera uma aumento no risco de fraturas ósseas (31,34,52).

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito do etilismo no osso de ratos adultos jovens submetidos a longo período de indução alcoólica com um produto processado, a aguardente de cana de açúcar. Nossos resultados demonstraram diminuição da espessura cortical (fêmur) e total (tíbia), menor densidade óssea e maior fragilidade óssea de ratos alcoólatras; fatos estes escassamente investigados. Como perspectivas futuras colocamos a investigação dos aspectos microscópicos e moleculares decorrentes destas alterações.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Portanto, dentro das limitações do presente estudo, podemos concluir que o consumo excessivo de álcool provoca um desequilíbrio estrutural do tecido ósseo, diminuição da espessura óssea, densidade óssea e conteúdo mineral ósseo. Os efeitos do etilismo sobre o tecido ósseo também são influenciados pelo padrão de consumo e pelo fator tempo. Porém, não houve alterações nos parâmetros relacionado ao desempenho mecânico e resistência às fraturas em animais etilistas adultos-jovens.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Sharma P, Kumar A, Sharma BC, Sarin SK. Infliximab monotherapy for severe alcoholic hepatitis and predictors of survival: an open label trial. *J Hepatol*. 2009;50(3):584-91.
2. Cheung O, Sanyal AJ. Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26(3):202-8.
3. PAHO. Regional Status Report on Alcohol and Health in the Americas. Washington, DC: CISA - Centro de informações sobre Saúde e Álcool; 2015.
4. Organization WH. Global status report on alcohol and health. <http://www.who.int/en/>; WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2014. p. 365.
5. Gaddini GW, Turner RT, Grant KA, Iwaniec UT. Alcohol: A Simple Nutrient with Complex Actions on Bone in the Adult Skeleton. *Alcohol Clin Exp Res*. 2016;40(4):657-71.
6. Rai DV, Kumar G, Tewari P, Saxena DC. Acute and chronic dose of alcohol affect the load carrying capacity of long bone in rats. *J Biomech*. 2008;41(1):20-4.
7. Rehm J, Imtiaz S. A narrative review of alcohol consumption as a risk factor for global burden of disease. *Subst Abuse Treat Prev Policy*. 2016;11(1):37.
8. Paccou J, Edwards MH, Ward K, Jameson K, Moon R, Dennison E, et al. Relationships between bone geometry, volumetric bone mineral density and bone microarchitecture of the distal radius and tibia with alcohol consumption. *Bone*. 2015;78:122-9.
9. Maiken Parm Uihøi KM, Torben Steiniche, Anders Odgaard AV. Chronic Alcohol Abuse Leads to Low Bone Mass with No General Loss of Bone Structure or Bone Mechanical Strength. *Journal Forensic Sciences*. 2016.
10. Malik P, Gasser RW, Kemmler G, Moncayo R, Finkenstedt G, Kurz M, et al. Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009;33(2):375-81.

11. Díez-Ruiz A, García-Saura PL, García-Ruiz P, González-Calvin JL, Gallego-Rojo F, Fuchs D. Bone mineral density, bone turnover markers and cytokines in alcohol-induced cirrhosis. *Alcohol Alcohol*. 2010;45(5):427-30.
12. Santori C, Ceccanti M, Diacinti D, Attilia ML, Toppo L, D'Erasmo E, et al. Skeletal turnover, bone mineral density, and fractures in male chronic abusers of alcohol. *J Endocrinol Invest*. 2008;31(4):321-6.
13. Fili S, Karalaki M, Schaller B. Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell Int*. 2009;9:26.
14. Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(12):2077-90.
15. Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Lybarger DL, et al. Chronic ethanol consumption results in deficient bone repair in rats. *Alcohol Alcohol*. 2002;37(1):13-20.
16. Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Güner G, et al. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(4):509-13.
17. Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K, et al. Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone*. 2007;41(2):175-80.
18. Hefferan TE, Kennedy AM, Evans GL, Turner RT. Disuse exaggerates the detrimental effects of alcohol on cortical bone. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(1):111-7.
19. Maurel DB, Boisseau N, Pallu S, Rochefort GY, Benhamou CL, Jaffre C. Regular exercise limits alcohol effects on trabecular, cortical thickness and porosity, and osteocyte apoptosis in the rat. *Joint Bone Spine*. 2013;80(5):492-8.
20. Johnson TL, Gaddini G, Branscum AJ, Olson DA, Caroline-Westerlind K, Turner RT, et al. Effects of chronic heavy alcohol consumption and endurance exercise on cancellous and cortical bone microarchitecture in adult male rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014;38(5):1365-72.
21. Reed AH, McCarty HL, Evans GL, Turner RT, Westerlind KC. The effects of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002;26(8):1269-74.
22. Iwaniec UT, Trevisiol CH, Maddalozzo GF, Rosen CJ, Turner RT. Effects of low-dose parathyroid hormone on bone mass, turnover, and ectopic osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone*. 2008;42(4):695-701.

23. Howe KS, Iwaniec UT, Turner RT. The effects of low dose parathyroid hormone on lumbar vertebrae in a rat model for chronic alcohol abuse. *Osteoporos Int.* 2011;22(4):1175-81.
24. Sibonga JD, Iwaniec UT, Shogren KL, Rosen CJ, Turner RT. Effects of parathyroid hormone (1-34) on tibia in an adult rat model for chronic alcohol abuse. *Bone.* 2007;40(4):1013-20.
25. Chen JR, Lazarenko OP, Shankar K, Blackburn ML, Lumpkin CK, Badger TM, et al. Inhibition of NADPH oxidases prevents chronic ethanol-induced bone loss in female rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;336(3):734-42.
26. Shankar K, Hidestrand M, Haley R, Skinner RA, Hogue W, Jo CH, et al. Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats. *Endocrinology.* 2006;147(1):166-78.
27. Broulík PD, Vondrová J, Růžicka P, Sedláček R, Zíma T. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res.* 2010;59(4):599-604.
28. Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, et al. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int.* 2009;20(9):1529-38.
29. González-Reimers E, Martín-González C, de la Vega-Prieto MJ, Pelazas-González R, Fernández-Rodríguez C, López-Prieto J, et al. Serum sclerostin in alcoholics: a pilot study. *Alcohol Alcohol.* 2013;48(3):278-82.
30. Garcia JA, Souza AL, Cruz LH, Marques PP, Camilli JA, Nakagaki WR, et al. Effects of ethanol consumption and alcohol detoxification on the biomechanics and morphology the bone in rat femurs. *Braz J Biol.* 2015;75(4):983-8.
31. Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffré C. Cortical bone is more sensitive to alcohol dose effects than trabecular bone in the rat. *Joint Bone Spine.* 2012;79(5):492-9.
32. Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF, Woods M, Suri M, et al. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(9):1534-42.
33. Zhang J, Dai J, Lin DL, Habib P, Smith P, Murtha J, et al. Osteoprotegerin abrogates chronic alcohol ingestion-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1256-63.
34. Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, Evans GL, Sibonga JD. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res.* 2001;16(3):589-94.

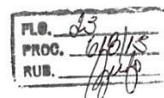
35. Nyquist F, Halvorsen V, Madsen JE, Nordsletten L, Obrant KJ. Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. *Acta Orthop Scand*. 1999;70(2):212-6.
36. Nyquist F, Düppe H, Obrant KJ, Bondeson L, Nordsletten L. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol Alcohol*. 2002;37(1):21-4.
37. Alexandre Nixon Soratto GV, Horii J. A certificação agregando valor à cachaça do Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment*, Campinas,. 2007;27(4):681-7.
38. Silva ARdS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia AMP, Sundefeld MLMM. Análise Da Densidade Óssea Radiográfica De Ratos Submetidos Ao Alcoolismo Crônico Utilizando imagem Digital. *Revista Odonto Ciência – Fac Odonto/PUCRS*. 2007;22(55).
39. Horvath RdO, Silva TDd, Neto JC, Nakagaki WR, Garcia JAD, Soares EA. Efeitos do alcoolismo e da desintoxicação alcoólica sobre o reparo e biomecânica óssea. *Acta ortop bras*. 2011;19(5).
40. Coleman RA, Young BM, Turner LE, Cook RT. A practical method of chronic ethanol administration in mice. *Methods Mol Biol*. 2008;447:49-59.
41. Ahmed LA, Shigdel R, Joakimsen RM, Eldevik OP, Eriksen EF, Ghasem-Zadeh A, et al. Measurement of cortical porosity of the proximal femur improves identification of women with nonvertebral fragility fractures. *Osteoporos Int*. 2015;26(8):2137-46.
42. Feng X, McDonald JM. Disorders of Bone Remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:121-45.
43. Bjørnerem Å, Bui QM, Ghasem-Zadeh A, Hopper JL, Zebaze R, Seeman E. Fracture risk and height: an association partly accounted for by cortical porosity of relatively thinner cortices. *J Bone Miner Res*. 2013;28(9):2017-26.
44. Mohan S, Baylink DJ. Insulin-like growth factor system components and the coupling of bone formation to resorption. *Horm Res*. 1996;45 Suppl 1:59-62.
45. McColl DJ, Abel RL, Spears IR, Macho GA. Automated method to measure trabecular thickness from microcomputed tomographic scans and its application. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(9):982-8.
46. Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, De Laet C, Eisman JA, et al. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int*. 2005;16(7):737-42.
47. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. *American Association for Laboratory Animal Science*. 2008;58:424-30(7).

-
48. Oksztulska-Kolanek E, Znorko B, Michałowska M, Pawlak K. The Biomechanical Testing for the Assessment of Bone Quality in an Experimental Model of Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2016;132(1):51-8.
 49. Schoenau E, Neu CM, Rauch F, Manz F. The development of bone strength at the proximal radius during childhood and adolescence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):613-8.
 50. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.
 51. Jokihaara J, Järvinen TL, Jolma P, Kööbi P, Kalliovalkama J, Tuukkanen J, et al. Renal insufficiency-induced bone loss is associated with an increase in bone size and preservation of strength in rat proximal femur. *Bone*. 2006;39(2):353-60.
 52. D CJ. *Structure and Mechanics*. Princeton, UP, New Jersey. 2002:1-380.

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



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Processo de reparo ósseo em ratos induzidos ao alcoolismo crônico. Análise histométrica, imunoistoquímica e densitometria óssea**", Processo FOA nº 2015-00618, sob responsabilidade de Ana Maria Pires Soubhia apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA (*Ad Referendum*) em 18 de Novembro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Março de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Abril de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Bone repair process in rats induced by chronic alcoholism. Analysis histometric, immunohistochemistry and bone densitometry**", Protocol FOA nº 2015-00618, under the supervision of Ana Maria Pires Soubhia presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA (*Ad Referendum*) on November 18, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 03, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 03, 2017.

Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

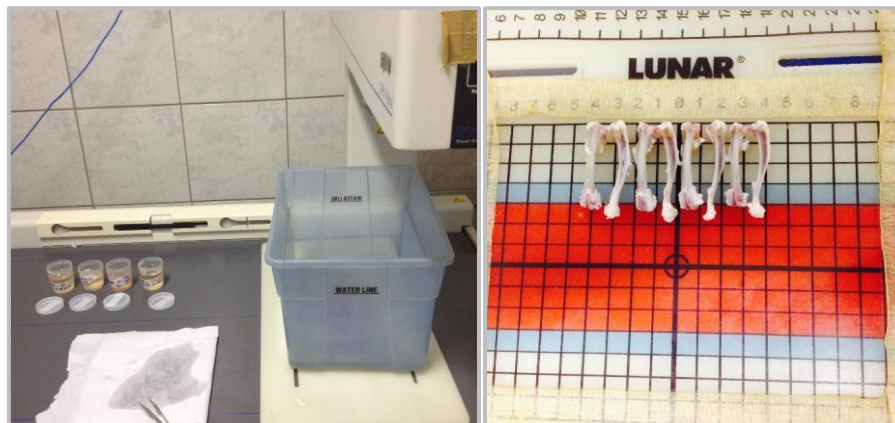
ANEXO B – Normas da revista selecionada para publicação do artigo.

Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico **BONE.
Abaixo, link das normas da Revista.*

<https://www.elsevier.com/journals/bone/8756-3282/guide-for-authors#25000>

ANEXO C – ILUSTRAÇÃO DAS ANÁLISES REALIZADAS

1. Densitometria Óssea



Figuras 1 e 2: Demonstração de fêmures e tíbias posicionados e sob imersão no Densitômetro.

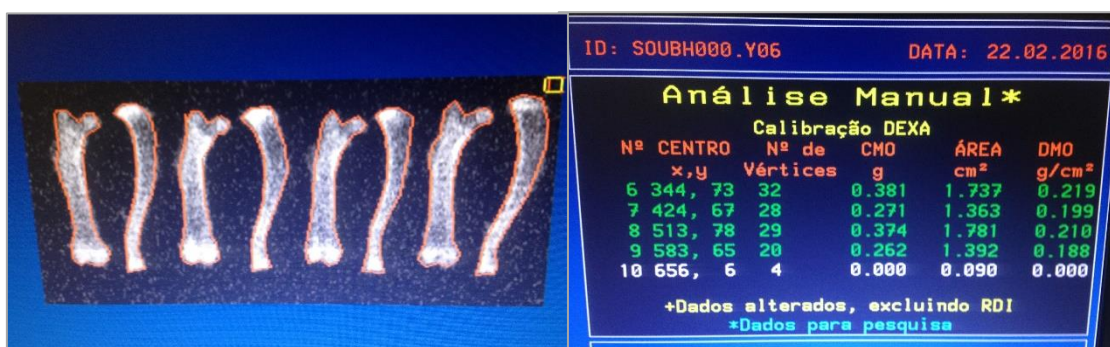


Figura 3 e 4: Aquisição da imagem no programa de software.

2. Ensaio Mecânico

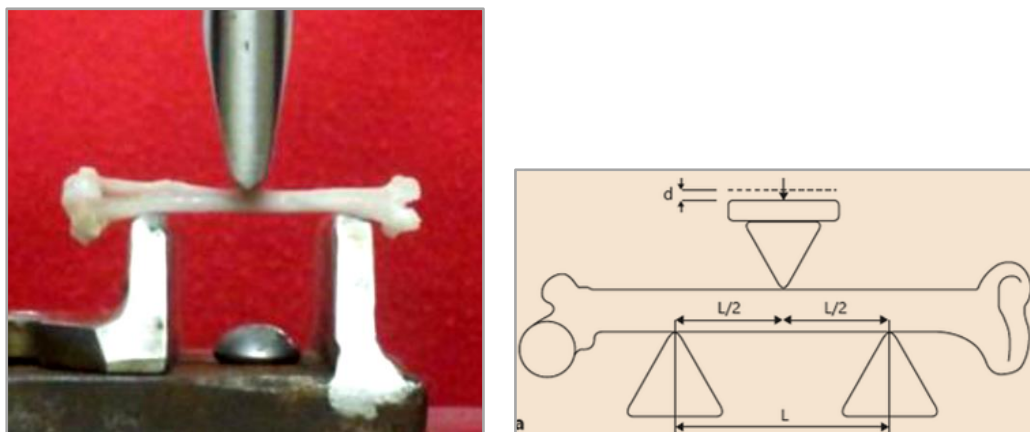


Figura 5 e 6: Ensaio mecânico de flexão a três pontos.

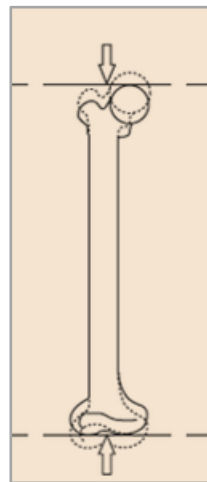


Figura 7 e 8: Ensaio mecânico de compressão no colo femoral.